



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Facultad de Odontología

División de Estudios de Posgrado e Investigación

Campo de conocimiento: Área Clínica

INDUCCIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA EN DEFECTOS ÓSEOS SEVEROS POR EL EFECTO DEL PÉPTIDO NOVEL DERIVADO DE LA PROTEÍNA DE ADHESIÓN DEL CEMENTO RADICULAR (PTPLA/CAP)

Tesis

que para optar por el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

Presenta:

Fabiola Salgado Chavarría

Tutor

Dr. Higinio Arzate

Facultad de Odontología, División de Estudios

México D.F. agosto, 2014.



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.

Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
3. Antecedentes	53
4. Definición del problema	73
5. Justificación	74
6. Objetivos	76
7. Hipótesis	77
8. Metodología	78
9. Resultados	97
10. Discusión	114
11. Conclusiones	121
12. Referencias bibliográficas	123
13. Anexos	135

Agradecimientos

Tengo tanto que agradecer a tantas personas que me hicieron bien. A mi familia que me crió con amor y a mis amigos que siempre están conmigo. No hay mal día para agradecer lo bueno de esta vida. Agradezco el amor de los que me rodean, los buenos y malos momentos. Lo que aprendí y lo que gané, lo que perdí y lo que estoy por vivir. Gracias infinitas por ser parte de mi vida.

Al **Dr. Higinio Arzate**, a quien admiro y respeto inmensamente y quien sin saberlo, me apoyó cuando todos me cerraron las puertas e hizo que el rumbo de mi vida viajara hacia otra increíble dirección; y a quien actualmente puedo decir que a parte de ser mi jefe, es mi mentor y amigo. *La gratitud es la memoria del corazón (Jean Baptiste Massieu).*

A mi **padre**, quien sin decirlo, sé que en todo momento me apoya y me ama y a quien mis alegrías lo hacen feliz.

A mi **madre**, quien siempre me aconsejó y me mostró el mejor camino a seguir. Gracias por ser mi guía, mi luz, mi claridad. Por detenerme cuando debías y por empujarme cuando tenía miedo de seguir mis sueños; mi vida no sería la misma sin ti.

A mi **hermana**, que cada día me demuestra el verdadero y amplio significado de ser una hermana mayor, a quien su fortaleza me da fuerza, a quien su valentía me da la lección de que se puede seguir adelante aún con las adversidades de la vida y a quien día con día descubro que más que mi hermana, es mi amiga incondicional.

A mi **hermano**, que pese a que es un socarrón, es una persona muy inteligente, perspicaz, audaz y cómica, y siempre intenta hacer de mis problemas, los menores. Te quiero mucho y sé que llegarás a donde tú quieras: sólo es cuestión de querer.

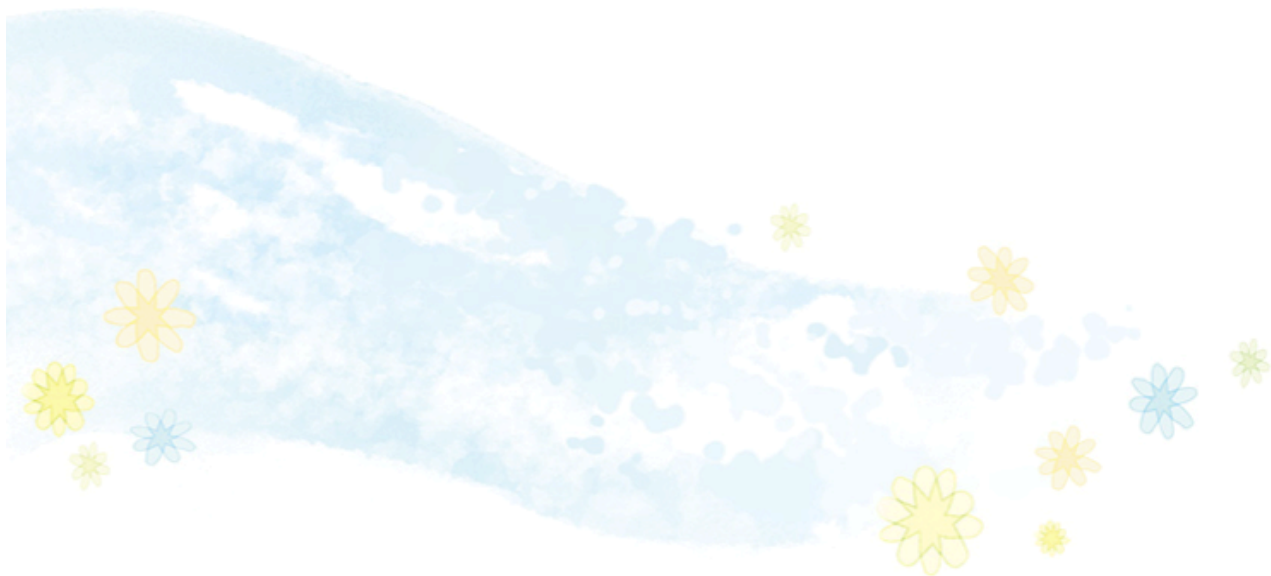
A mi **sobri** (José Emiliano), porque es mi motor de vida, mi fábrica de sonrisas y mi razón de seguir adelante y ser mejor persona. Agradezco que nos hayas elegido como familia, no te defraudaré mi vida.

A mi **abue** (Mayola), a quien admiro y no deja de sorprenderme; afortunada soy de tener la mejor abuela de la vida, mi segunda madre.

A **Alejandra Osidach, Jerem Cruz, Alejandro Alonso, Edgar Portillo**: en mi corazón sólo puede haber agradecimiento hacia ustedes porque son como una familia para mí; amigos que me acompañan en el camino que elegí para mi vida. Gracias a ustedes que hacen de mi vida la mejor, estaré eternamente agradecida.

A **Lía Hoz, Enrique Romo y Janeth Serrano**, aunque no lo diga, mi corazón recuerda cada gesto amable, cada favor, cada explicación y cada sonrisa que alegró mi vida. Por toda su paciencia entregada a ésta "clínica" no "básica" mujer.

A **Juan Manuel Trejo** (Sr. Juanito), por ser un gran colaborador y hacer de mis proyectos, los suyos; siempre apoyando, siempre resolutivo.



*"La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente
de todo progreso"*
Louis Pasteur

*"La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia
la verdad"*
Julio Verne

"La ciencia avanza a pasos, no a saltos"



1. Introducción

La ingeniería de tejidos se define como el arte y la ciencia de manipular compuestos sintéticos para fabricar estructuras anatómica y funcionalmente específicas, que pueden incorporar células vivas, agentes bioactivos o ambos, para reforzar, mantener, sustituir y/o mejorar la fisiología de los tejidos receptores. Por lo tanto, la ingeniería tisular ósea es la amalgamación de la cirugía ortopédica con las ciencias básicas (bioquímica, biología celular y molecular) e ingeniería (química y estructural), para el desarrollo de estrategias para la regeneración de tejido músculo esquelético. El campo de la ingeniería tisular (IT) ha hecho contribuciones novedosas e importantes para el tratamiento de la pérdida de tejido óseo¹. Aunque el hueso tiene la capacidad de regenerarse, crecer y remodelarse, existen situaciones clínicas severas, en las que la pérdida ósea es causada por enfermedad, deformidades congénitas, trauma o resecciones tumorales, condicionando a grandes pérdidas del tejido mineralizado en cuestión, por lo que la ingeniería tisular ha desarrollado y caracterizado nuevos implantes, los cuales pueden ser utilizados como potenciales sustitutos óseos².

De acuerdo a las estadísticas mundiales, existen más de 3 millones de pacientes que sufren de defectos óseos debidos a accidentes de tráfico y enfermedades óseas; el 40% de la población mundial sufre algún grado de periodontitis, afectando así las estructuras de soporte de los órganos dentarios, particularmente la pérdida ósea y consecuentemente la exfoliación de los órganos dentarios. Estos porcentajes se incrementan año con año, por lo que la demanda de materiales para la reparación y regeneración ósea es urgente y el mercado industrial es enorme, priori, se estima que se realizan más de 800 000 injertos óseos al año en todo el mundo³.

El avance tecnológico enfocado en regeneración ósea, vía la implementación de transplantes autólogos, aloinjertos, xenoinjertos y materiales biosintéticos (p. ej.; cerámicas, metales, polímeros y composites) ha permitido importantes avances en el tratamiento de las enfermedades que afectan las estructuras óseas y del periodonto⁴. Sin embargo, todos estos materiales poseen desventajas tales como: cantidad limitada de hueso donador, trauma quirúrgico adicional (causado por el sitio donador), tiempos largos de operación para los autoinjertos, riesgo de rechazo del huésped debido a diferencias genéticas, resorción elevada y problemas éticos y religiosos para la utilización de aloinjertos y xenoinjertos que finalmente no cumplen con los requerimientos clínicos deseados^{5, 6}.

El cemento radicular es un tejido conectivo calcificado, y en contraste con el hueso, el cemento no posee irrigación sanguínea de manera directa, inervación ni drenaje linfático. A pesar de estas diferencias, el cemento tiene una

composición similar al hueso, por lo tanto, las enfermedades que afectan las propiedades del hueso, también afectan las del cemento^{7,8}.

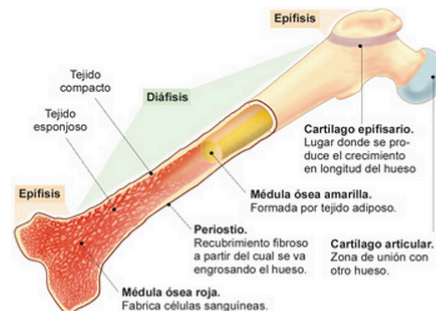
Estudios en el área de Biología Periodontal han identificado dos proteínas cemento específicas: la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento (CAP)⁹⁻¹¹. Se han descrito polipéptidos con expresión localizada en subpoblaciones de ligamento periodontal (LP), cemento y cementoblastos; éstos polipéptidos incluyen la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) y la proteína del cemento 1 (CEMP1), las cuales desempeñan un papel importante en el reclutamiento y diferenciación celular durante la formación del cemento radicular¹²⁻¹⁴. Recientemente se clonó e identificó un ARNm a partir de una biblioteca derivada de una línea celular de un fibroma cemento-osificante humano, el cual codifica para una isoforma truncada de la 3-hidroxiacil-CoA-dehidratasa 1 ó PTPLA. La proteína de adhesión del cemento radicular es homónimo de PTPLA y codifica para una proteína de 140 aminoácidos de los cuales los 125 aminoácidos de la Terminal-N son idénticos a PTPLA, la cual codifica para 288 aminoácidos¹⁵⁻¹⁸.

Actualmente, el resolver de un modo fundamental la reparación y/o regeneración de defectos óseos, constituye el problema médico/odontológico más importante a solucionar a nivel internacional, sobretodo, en aquellos defectos óseos severos que suponen un verdadero reto en la regeneración, es por ello, que el propósito de esta investigación, es comprobar experimentalmente, la neoformación ósea en aquellos defectos críticos en las tibias de conejos.



2.Marco teórico

HUESO



El hueso es un tejido conjuntivo especializado, dinámico, altamente vascularizado y con capacidad de sanar y remodelar sin cicatrizar; estas propiedades junto con su cualidad metabólica de mineralizar, lo hacen un tejido de características muy especiales. Su función principal es la de proporcionar un soporte estructural para el cuerpo. Además, el esqueleto también sirve como un depósito mineral, apoya la contracción muscular resultante del movimiento, de soporte de carga y protege los órganos internos¹⁹.

Las fuerzas que actúan sobre el tejido óseo modifican permanentemente su forma, de tal manera que la presión condiciona su reabsorción y la tensión da lugar a la neoformación ósea. Por lo tanto, es lógico decir que las principales alteraciones en su estructura debido a una lesión o enfermedad, pueden alterar significativamente el equilibrio corporal y la calidad de vida²⁰.

El conjunto de 206 huesos del organismo conforma el esqueleto, el que tiene un peso de aproximadamente 9 kg. El esqueleto proporciona el marco estructural para el apoyo y protección de los diferentes órganos del cuerpo. Además, los huesos proveen los puntos de sujeción a la musculatura responsable del movimiento corporal y la locomoción, conforman el reservorio principal de minerales del organismo y alojan la médula ósea que produce y suministra las células hematopoyéticas²¹.

Estructura

Los huesos del esqueleto presentan diferentes formas y tamaños que se relacionan con su función específica. Respecto a su estructura global, el tejido óseo está constituido por diferentes fases sólidas y líquidas, que le otorgan la característica de ser junto a la dentina y el esmalte de los dientes, los únicos tejidos duros del organismo.

Estructura macroscópica

El tejido óseo en el esqueleto adulto está dispuesto en dos formas arquitectónicas: trabecular, también llamado hueso canceloso, trabecular o **esponjoso** (alrededor del 20 % del esqueleto total), y el hueso **cortical** o compacto (alrededor del 80 %

del esqueleto total). Las proporciones de estas dos formas arquitectónicas difieren en varios lugares en el esqueleto²².

El hueso cortical está constituido por una masa sólida y continua cruzada por una red de finos conductos longitudinales, denominados canales de Havers, y transversales, conocidos como conductos de Volkmann (figura 1), que alojan vasos sanguíneos y fibras nerviosas. Predomina en el esqueleto apendicular, conformando la diáfisis de los huesos que adopta la forma de un cilindro hueco para contener la médula ósea. Sus particulares características lo hacen resistente a las fuerzas de flexión, torsión y cizallamiento. Tiene en su estructura sólo el 10 % de porosidad, y se puede dividir en diferentes subgrupos: huesos largos (fémur y la tibia), huesos cortos (muñeca y el tobillo), y los huesos planos (cráneo bóveda y huesos irregulares). En el otro extremo, el hueso trabecular presenta una porosidad más alta, 50-90%, por lo que su módulo de resistencia a la compresión es 20 veces inferior que la de hueso cortical²³.

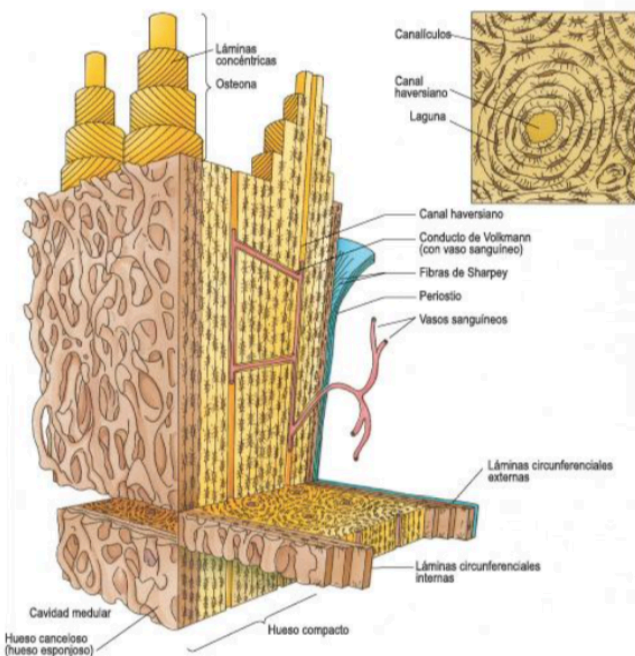


Figura 1. Esquema del hueso que ilustra hueso cortical compacto, osteonas, láminas, conductos de Volkmann, canales haversianos, lagunas, canaliculos y hueso esponjoso.

El hueso esponjoso está dispuesto con una forma tipo esponja o panal (entramado tridimensional de tabiques o trabéculas óseas ramificadas que se orientan de manera paralela a las líneas de fuerza y limitan un sistema laberíntico de espacios intercomunicantes, ocupados por médula ósea), teniendo diferentes tamaños de trabéculas. Se encuentra en el esqueleto axial, comúnmente en la epífisis y metáfisis de los huesos largos, y en los huesos planos cubiertos por el hueso cortical, y en los cuerpos vertebrales. Tiene la capacidad de resistir fuerzas de compresión y tensión²⁴.

Estructura microscópica

Considerando su estructura microscópica se pueden distinguir tres tipos diferentes de tejido óseo.

El hueso plexiforme corresponde a un hueso inmaduro que se encuentra en el tejido óseo esponjoso y cortical de los individuos en crecimiento, por lo que durante la maduración es sustituido gradualmente por hueso laminar desde los 14 ó 16 años. Este tipo de hueso está ausente en el esqueleto adulto, aunque se puede formar cuando se acelera la producción de matriz ósea, como ocurre en los callos de fractura y tumores óseos. El hueso plexiforme carece de una relación estable entre el contenido mineral y el colágeno, de tal manera que su densidad mineral es muy variable, a diferencia de los huesos haversiano y laminar, que se describen a continuación, que mantienen una relación fija entre estos elementos²⁵.

El hueso haversiano se encuentra constituido por un conjunto de láminas concéntricas, denominadas osteonas o sistemas de Havers, que tienen un diámetro de alrededor de 200 μm . y una longitud de 1 a 2 cm. y poseen un eje neurovascular central, denominado canal haversiano, que está recubierto por osteoblastos y células osteoprogenitoras. Los canales haversianos de osteonas contiguas se encuentran unidos entre sí por los conductos de Volkmann, los que se orientan en sentido perpendicular u oblicuo con éstos. Las osteonas están conformadas por alrededor de 4 a 20 láminas óseas, entre las cuales se localizan los osteocitos. A nivel de la unión entre las osteonas vecinas se encuentra una delgada línea de cementación, que está compuesta principalmente por sustancia fundamental calcificada. La microestructura de tipo osteonal o haversiana está presente en el hueso cortical maduro y se forma como resultado de la invasión vascular del tejido óseo ya existente, por lo que posee una menor resistencia mecánica y un sistema circulatorio menos eficiente que el del hueso laminar²⁶.

En el hueso laminar, las trabéculas del hueso esponjoso y los sistemas circunferenciales del hueso compacto están compuestos por una serie de láminas óseas paralelas entre sí. Las láminas tienen un espesor que oscila entre 3 y 7 μm . y están formadas por fibras colágenas dispuestas paralelamente unas con otras, aunque presentan una orientación distinta respecto de las fibras de láminas vecinas. En la interfaz entre las láminas óseas se encuentran las cavidades osteocitarias con sus correspondientes células, cuya nutrición depende de los canaliculos existentes en la matriz ósea, los que permiten el intercambio de moléculas e iones entre los capilares sanguíneos y los osteocitos. Las láminas del hueso laminar y las osteonas del hueso haversiano son diferentes configuraciones geométricas del mismo material, pues en ambas cada punto del tejido se encuentra, aproximadamente, a unos 100 μm . de un vaso sanguíneo²⁶.

Tanto el hueso laminar como el haversiano se encuentran simultáneamente en el tejido óseo humano. De esta manera, las diáfisis de los huesos largos están conformadas por los sistemas circunferenciales externos e internos que corresponden a hueso laminar, entre los cuales se encuentran el sistema de Havers constituido por hueso osteonal y el sistema intermedio que procede de restos de osteonas que fueron parcialmente destruidas durante el crecimiento óseo^{25, 26}.

Biomecánica del hueso

El hueso posee una resistencia a la tensión similar a la del hierro, pero es tres veces más ligero y diez veces más flexible. El esqueleto se adapta a su función específica en el organismo tanto respecto a su configuración como a su estructura microscópica. La naturaleza suele seguir, en general, la ley del mínimo, de tal manera que las funciones mecánicas de carga y de protección se consiguen con el mínimo peso y máxima eficacia. Las distintas cargas que actúan sobre los huesos del esqueleto se encuentran relacionadas con las diversas actividades del individuo, tanto compresivas, como de tracción o de cizalladura. El hueso esponjoso trabaja principalmente a compresión, en cambio, el hueso cortical debe soportar fuerzas de compresión, tracción y cizalladura. En líneas generales, la fase mineral del hueso le confiere su resistencia a la compresión y cizalladura, mientras que el colágeno le proporciona su resistencia a la tracción²⁷.

El hueso responde con un patrón característico a las fuerzas aplicadas sobre su superficie, el que depende del tipo de fuerza, densidad, arquitectura y composición del tejido. La primera fase es elástica y genera una deformación temporal que se mantiene mientras actúa la fuerza, para luego recuperar su forma original. Si la fuerza aumenta, se entra en una fase plástica y el hueso, aunque se recupera parcialmente, queda deformado. Por último, cuando la fuerza aplicada es superior a la resistencia del tejido se produce la fractura. Las fuerzas que actúan sobre el tejido óseo son tensión, compresión y torsión. Además pueden ser aplicadas de forma perpendicular a la superficie ósea, como fuerza normal, o de forma oblicua, como fuerza de cizallamiento.

Los huesos largos, formados fundamentalmente por tejido cortical, son elásticos y poco plásticos, por lo que su resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica de manera vertical al sentido de la carga. Cuando la fuerza actúa de forma oblicua la fase plástica se acorta y el hueso se fractura con mayor rapidez²⁸.

En los huesos integrados por tejido esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica a lo largo de su eje vertical. Estos huesos al ser menos densos, son más plásticos y menos elásticos, por lo que pueden resistir deformaciones

mayores. En los huesos esponjosos las fracturas se producen con variaciones de longitud de alrededor de un 7 %, en cambio, en los huesos corticales bastan modificaciones de alrededor de un 2 %²⁷⁻²⁸.

Biomecánica del hueso esponjoso

El hueso esponjoso se caracteriza por poseer una estructura porosa que se mide mediante la densidad aparente o estructural. Para diferenciar ésta de la densidad de la matriz mineralizada se debe descontar el volumen de los poros de la masa total, de esta forma la densidad aparente es directamente proporcional a la porosidad del hueso. El aumento del área ocupada por los poros implica una disminución de las propiedades mecánicas del hueso.

Cuando el hueso esponjoso (Figura 2) es sometido a deformación presenta inicialmente un comportamiento elástico, pero al mantenerse la aplicación de la carga comienza la rotura de algunas trabéculas. Al persistir las fuerzas deformantes se genera un fenómeno de reforzamiento estructural transitorio, previo a la fractura, determinado por el llenado de los poros del hueso aún intactos con los fragmentos de las trabéculas rotas²⁹.

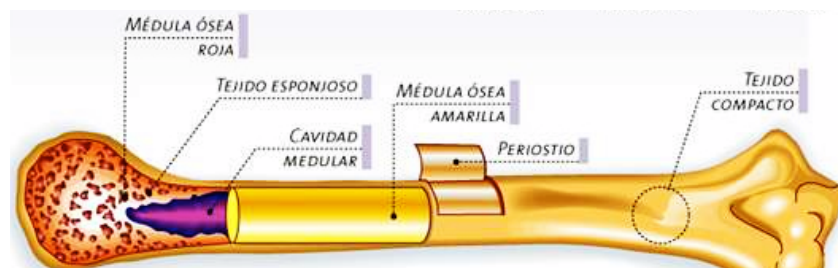


Figura 2. En el extremo izquierdo se observa el hueso esponjoso en conjunción con la médula ósea.

La estructura del tejido esponjoso se adapta a la función particular de cada hueso. De esta manera, un hueso más resistente a las sollicitaciones en flexión es el más adecuado para la absorción de energía de impactos, en cambio, en áreas como la epífisis proximal de la tibia el hueso esponjoso presenta mayor resistencia a las sollicitaciones en carga axial. La estructura porosa plena de líquido es la mejor organización y diseño para absorber la energía procedente de los impactos. Las propiedades del hueso esponjoso dependen de su densidad aparente, por lo que los valores del módulo elástico y resistencia varían con el cubo o el cuadrado de ésta. Así, la densidad del hueso esponjoso oscila entre 0.1 y 1 g/cm³, mientras que la del hueso cortical es de aproximadamente 1.8 g/cm³. Las trabéculas del hueso esponjoso tienen una densidad que fluctúa entre 1.6 y

1.9 g/cm³, muy similar a la del hueso cortical. La magnitud de las propiedades del hueso esponjoso son muy variables, pero los valores medios de su resistencia son de 5 a 10 MPa y su módulo de Young oscila entre 50 a 100 Mpa³⁰.

Biomecánica del hueso cortical

El hueso cortical es altamente anisotrópico, por lo que su resistencia depende de la orientación de la carga respecto a la dirección de las osteonas. Además, en los huesos largos se admite la existencia de un isotropismo transversal, cuya dirección de referencia es determinada por su eje longitudinal. De esta manera, la resistencia del hueso cortical depende de la dirección y forma en que se aplican las cargas, de modo tal que la resistencia a la compresión es mayor que a la tracción en todas las direcciones. La resistencia a la torsión suele tener un valor de, aproximadamente, un tercio de la correspondiente a la compresión³¹.

Debido a la proximidad entre los límites elástico y plástico del hueso cortical, es muy rara la deformación elástica sin fractura en los huesos maduros. En cambio, en los huesos inmaduros, que tienen menor contenido mineral, es más frecuente la deformación plástica sin rotura ósea. El hueso cortical se muestra más rígido y resistente cuando la velocidad de deformación es mayor, hecho que hace que su módulo elástico varíe hasta en un 15.0 % en función de la actividad física del individuo. La resistencia a la fatiga es moderada y el hueso se encuentra acumulando daño constantemente durante la actividad normal. Por lo tanto, se requiere que se produzca un proceso de remodelación ósea permanente para mantener la integridad estructural del sistema esquelético.

La particular distribución del tejido óseo cortical en los huesos minimiza las tensiones generadas por las cargas fisiológicas que deben soportar. De esta forma, una estructura tubular como la diáfisis femoral es la más adecuada para enfrentar las sollicitaciones en compresión, tracción, flexión y torsión, en cambio, la sección triangular de la diáfisis tibial es óptima para absorber las sollicitaciones en flexión en el plano sagital, que predominan durante la marcha³².

Las propiedades mecánicas del hueso cortical varían con la orientación de las fuerzas y para las cargas longitudinales la resistencia a la tracción oscila entre 78.8 y 151 MPa, la resistencia a la compresión entre 131 y 224 MPa y el módulo de Young entre 17 a 20 GPa. Los valores de referencia para las fuerzas transversales corresponden a una resistencia a la tracción entre 51 y 56 MPa, una resistencia a la compresión entre 106 y 133 MPa y un módulo de Young entre 6 y 13 GPa. Los valores de resistencia a la cizalladura oscilan entre 51.1 y 70 MPa y el módulo de cizalladura es de 3.3 GPa²⁷.

HISTOLOGÍA

La elaboración, el mantenimiento y la resorción del hueso, resulta de la interacción de tres tipos de células: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Todas ellas tienen bien definida sus tareas y por ello son esenciales para el mantenimiento de un tejido óseo sano.

El hueso está involucrado en una serie de procesos que son esenciales para el cuerpo humano. La mayor parte de las propiedades de los huesos, están relacionadas con la constitución de su matriz. La matriz ósea tiene dos componentes: una parte mineral constituida por hidroxapatita, que contribuye con el 65-70% de la matriz y una parte orgánica, compuesta por glicoproteínas, proteoglicanos y sialoproteínas, que conforman el 25-30% del total de la matriz. Debido a esto, el hueso es considerado como un material verdaderamente complejo. Diferentes proteínas (con funciones diversas) constituyen la fase orgánica de la matriz ósea. El hueso es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. Tanto el hueso cortical como el esponjoso contienen células especializadas, matriz orgánica y fase mineral³³.

1. Células óseas

En el hueso coexisten varios tipos de células (Tabla 1). Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas; estas células pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes.

1.1. Diferenciación osteoblástica.

- Genética y factores de crecimiento. Actualmente se sabe que la diferenciación hacia la estirpe osteoblástica está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: *Ihh* (*Indian hedgehog*) y *Shh* (*Sonic hedgehog*). También es esencial el factor de transcripción *Cbfa1* (*core-binding factor a-1*, también llamado *Runx2*) y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que constituyen los reguladores más potentes de la diferenciación osteoblástica desde las células mesenquimales pluripotenciales

- Marcadores de diferenciación. A medida que las células precursoras se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de Cbfa1 es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos. La colágena I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en células osteoprogenitoras. Igualmente la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta especialmente útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica³⁴.

1.2. El osteoblasto

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos. Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina 43. Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm por día. Actualmente, se sabe que:

1. sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso
2. dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular
3. contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina
4. median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas
5. sintetizan factores de crecimiento

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de

las cuales pueden ser eliminados por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (*bone lining cells*) o en osteocitos (15 %). Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las células limitantes son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, sin organelas. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos anteriormente citados como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, y fosfatasa alcalina así como el receptor de paratohormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo³⁵.

1.3. El osteocito

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro de ésta, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. Cuando se produce un trauma en el hueso, el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1 mm de un capilar intacto. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción³⁶.

Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes.

1.4. El osteoclasto

Las células encargadas de la reabsorción son los osteoclastos. Se trata de células grandes (100 μm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los

osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la defosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además tienen receptores para calcitonina. Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades Formadoras de Colonias de Granulocitos y Macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos.

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por la zona con forma de cepillo, sellando los bordes del área mediante las integrinas. La integrina del osteoclasto, particularmente $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, reconoce la secuencia Arg- Gly-Asp (RGD) existente en la colágena y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos (H^+) generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc., que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después.

Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Así, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor del anterior, situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL (receptor activador del ligando NF κ B) antiguamente llamado ODF (*osteoclast differentiation factor*), es una citocina transmembranal perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF).

La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Asimismo, los efectos del RANKL tanto *in vivo* como *in vitro*, son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la superfamilia de los receptores de TNF.

Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello, OPG, RANK y RANKL son importantes

reguladores de la osteoclastogénesis³⁷.

Estroma Medular	Tejido óseo
Stem cells hematopoyéticas	Osteoblastos
Stem cells mesenquimales	Pre-osteoblastos
Adipocitos	Osteocitos
Macrófagos	Osteoclastos
Mastocitos	Pre-osteoclastos
Células endoteliales	Células linfoides

2. Matriz orgánica

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas (Tabla 2), entre las que destaca la colágena (90%). La matriz juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo, siendo evidente este hecho cuando aparecen enfermedades de la colágena como la osteogénesis imperfecta. Sin embargo, actualmente debe considerarse a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo.

- **La colágena.** El 90% de la matriz extracelular (MEC) está constituida por colágena, sobre todo tipo I (> 95%) y tipo V (< 5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágena tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formada bajo estrés mecánico. En la molécula de colágena se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células

óseas. Contiene, característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo, este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágena y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea. Las fibras de colágena se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas. Sin embargo, la colágena no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que son otras las proteínas implicadas en el depósito mineral³⁹.

Tabla 2. Componentes de la fase orgánica de la matriz ósea¹⁹

Hueso extracelular, constituyentes de la matriz		Funciones y propiedades
Colágena I, III, V, XII		Proporciona un andamio para la estructura esquelética; matriz de calcificación.
Proteoglicanos	<ul style="list-style-type: none"> ○ Condroitin sulfato ○ Decorina ○ Hialuronano ○ Biglicano 	Proteoglicanos; afecta el crecimiento de fibras y el diámetro de la colágena; involucrado en el proceso de mineralización de la matriz
Proteínas con ácido γ-carboxi-glutámico	<ul style="list-style-type: none"> ○ Osteocalcina ○ Proteína de la matriz con ácido γ-carboxi-glutámico 	Proteína esquelética; marcador tardío del fenotipo osteogénico; implicada en la remodelación ósea; puede estar involucrada en el control de la mineralización a través de su inhibición.
Glicoproteínas	○ Osteonectina	Glicoproteína; une al calcio y a la colágena; nuclea la hidroxapatita
	○ Fosfatasa alcalina	
	○ Proteínas con RGD	
	• Vitronectina	
	• Trombospondina	Glicoproteína; une calcio, hidroxapatita, osteonectina y otras proteínas de superficie celular; media la adhesión celular de una manera independiente de RGD.
• Fibronectina	Une al osteoblastos al sustrato.	
• Osteopontina	Sialoproteína; constituyente de la línea del cemento; participa en la remodelación	

	ósea
	<ul style="list-style-type: none"> o Sialoproteínas óseas Sialoproteína; constituyente de línea de cemento
Proteínas del plasma	<p>Albúmina</p> <p>2-SH- glicoproteína</p>
Factores de crecimiento	<p>IGF-I y II Factor de crecimiento de insulín (<i>Insulin growth factor I y II</i>)</p> <p>TGF- β Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor -beta</i>)</p> <p>PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>Platelet derived growth factor</i>)</p>

- **Proteínas no colágenas.** Entre ellas destacan:
 - o **Proteoglicanos:** Constituyen el 10% de las proteínas no colágenas. Son moléculas de gran tamaño. En la matriz osteoide hay cuatro tipos de proteoglicanos: Hialuronato y Condroitínsulfato: de molécula grande, intervienen en las etapas iniciales de la morfogénesis ósea. Biglicano y decorina: de molécula más pequeña, aparecen en las fases siguientes de la formación ósea.
 - o **Proteínas con ácido γ -carboxi-glutámico:** Son la osteocalcina (OCN) y la proteína de la matriz con ácido γ -carboxiglu- támico. Este ácido es un aminoácido que liga calcio y necesita vitamina K para su síntesis. La osteocalcina es una pequeña proteína de la matriz sintetizada por los osteoblastos y plaquetas, dependiente de las vitaminas D y K. Representa el 15% de las proteínas no colágenas de la matriz y contiene tres restos de ácido γ -carboxiglutámico. Sus niveles plasmáticos se han considerado como uno de los marcadores bioquímicos de la osteogénesis, relacionándose con el número y actividad de los osteoblastos.
 - o **Glicoproteínas:** Son la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp). La osteonectina es una glicoproteína con gran afinidad por la colágena tipo I, por el calcio y por la hidroxapatita. Representa el 25% de las proteínas no colágenas. Se cree que interviene en la regulación de la adhesión

celular entre la matriz y las células y en el hueso, es necesaria para la mineralización normal. La fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización.

- **Proteínas con el tripéptido RGD**, también llamadas SIBLINGS (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) son fundamentalmente cinco: osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, trombospondina y vitronectina. Son glicoproteínas fundamentales en los procesos de remodelado y regeneración óseos, con una secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) que es reconocida por las integrinas de los osteoblastos y los osteoclastos ($\alpha\beta3$, entre otras). También actúan como receptores de superficie de las células óseas permitiendo la adhesión de las células a la matriz extracelular y activando señales.
- **Proteínas procedentes del plasma**: Se encuentran en la matriz orgánica ósea en mayor proporción que en el plasma. Son la albúmina y la $\alpha2$ -SH-glicoproteína, probablemente relacionadas con la incorporación del calcio a la matriz osteoide.
- **Factores de crecimiento**: Son polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina⁴⁰.

3. Fase mineral

Finalmente, el componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y, en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben⁴¹.

4. Osteogénesis/osificación

Embriológicamente, el maxilar y la mandíbula se derivan del primer arco branquial. Ambos tienen un andamio/soporte cartilaginoso durante su desarrollo, pero a diferencia de los huesos del esqueleto apendicular, esos cartílagos sólo

actúan como un andamio para las células de la cresta neural para formar el hueso. Este tipo de formación ósea se conoce como osificación intramembranosa (huesos faciales y calota). Los huesos apendiculares se originan del cartilago preexistente. Bajo la dirección de proteínas reguladoras, las células de la cresta neural migran a lo largo del “esqueleto cartilaginoso” (andamio) del maxilar y la mandíbula para comenzar el proceso de formación de hueso.

El esqueleto de los mamíferos tiene tres orígenes distintos. El primero es el mesodermo paraxial, que da lugar al esqueleto axial. El segundo es el mesodermo de la placa lateral, que da lugar al esqueleto apendicular. En contraste con los dos primeros, el tercero es de origen ectodérmico: la cresta neural, que da lugar al esqueleto facial. El origen de cada elemento del esqueleto, depende de la ubicación en la que se forme inicialmente su primordio, porque las células mesenquimales, que son la fuente del origen esquelético, en diferentes lugares se derivan de diferentes fuentes de mesodermo o incluso del ectodermo. Por lo tanto, a pesar de la estrecha semejanza de los productos finales, es decir, de los osteoblastos y de su matriz, los huesos tienen diferentes orígenes ontogenéticos. Esta distinción es importante porque los huesos de diferentes orígenes pueden tener diferentes mecanismos y funciones de señalización.

Hay otra manera de mirar el sistema esquelético de mamíferos basado en el modo de osteogénesis. Existen dos modos distintos de osteogénesis. El primero es la formación de **hueso intramembranoso**, durante el cual, las células mesenquimales se condensan y se diferencian directamente en osteoblastos para depositar la matriz ósea. El segundo es la formación de **hueso endocondral**, durante el cual primero se forma un molde de cartilago de condensaciones mesenquimales y luego se sustituye por hueso y médula ósea⁴².

La mayoría de los huesos de origen mesodérmico se someten a la formación de hueso endocondral. Durante la formación de hueso endocondral, las células mesenquimales indiferenciadas se condensan en un sitio donde se formará un futuro esqueleto y asumen más o menos la configuración futura del hueso. Luego, las células en el núcleo se diferencian en condrocitos, que expresan genes de la matriz cartilaginosa, incluyendo colágena tipo II, colágena tipo IX, colágena tipo XI, agrecano, condromodulina-1, y matrilin-3, mientras que las células de las capas delgadas de la periferia se diferencian en células pericondriales tipo fibroblasto. Los condrocitos proliferan rápidamente. Entonces, los condrocitos de en medio, detienen su proliferación e inician su alargamiento, convirtiéndose en hipertróficos, y sintetizan una matriz cartilaginosa específica tal como colágeno tipo X.

Los condrocitos hipertróficos se diferencian más y maduran mineralizando su matriz extracelular circundante. Con la maduración de los condrocitos hay expresión de marcadores específicos, incluyendo la osteopontina, matriz metaloproteinasa-9, matriz metaloproteinasa-13, y el factor de crecimiento endotelial vascular; presentan afinidad con los vasos sanguíneos y con células de la sangre y finalmente mueren por apoptosis.

La matriz cartilaginosa mineralizada es invadida por los tejidos vasculares y es degradada por los condroclastos, los cuales están estrechamente relacionados o idénticos a los osteoclastos. Al mismo tiempo, las células pericondriales adyacentes a los condrocitos hipertróficos mineralizadas, se convierten en osteoblastos que forman la estructura ósea, la precursora del hueso cortical. Estos precursores de los osteoblastos y los propios osteoblastos, se mezclan en el cartílago mineralizado junto con los tejidos vasculares. Ulteriormente, se depositará matriz ósea sobre la matriz cartilaginosa mineralizada degradada y forman la esponjosa primaria: precursora del hueso trabecular y de la médula ósea. En la médula ósea, las células madre hematopoyéticas interactúan con el estroma para establecer el sitio principal para la hematopoyesis en la vida postnatal. Durante este proceso, los condrocitos hipertróficos parecen jugar un papel esencial, ya que, temporalmente, aparecen antes de la formación ósea y, espacialmente, la formación de hueso se produce en lugares adyacentes a los condrocitos hipertróficos⁴³.

5. Regeneración ósea

El hueso posee una gran capacidad de regeneración espontánea en la mayoría de los defectos óseos, bajo una estimulación dada por condiciones homeostáticas y microambientales adecuadas⁴⁴.

Este fenómeno equilibrado de remodelación, permite la renovación de un 5% del hueso cortical y un 20 % del trabecular al año. El hueso cortical constituye el 75% del total óseo, sin embargo, la actividad metabólica es 10 veces mayor en el hueso trabecular, ya que la relación entre superficie y volumen es mayor (la superficie del hueso trabecular representa un 60% del total). Por esto la renovación es de un 5-10% del hueso total al año.

El remodelado óseo existe toda la vida, pero sólo hasta la tercera década de la vida, el balance es positivo; en la tercera década existe la mayor masa ósea,

manteniéndose con pequeñas variaciones hasta los 50 años de edad. Después de la quinta década, predomina la reabsorción por lo que la masa ósea empieza a disminuir⁴⁵.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas unidades básicas multicelulares o BMU (por sus siglas en inglés, *basic multicellular units*). La reabsorción siempre precede a la formación y en el esqueleto joven las cantidades de hueso reabsorbidas son similares a las neoformadas. La vida media de cada unidad de remodelado en humanos es de 2 a 8 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. Existen en el esqueleto humano 35 millones de unidades básicas multicelulares y cada año se activan 3-4 millones, por lo que el esqueleto se renueva totalmente cada 10 años³⁸.

El conjunto de osteoclastos y osteoblastos, que de manera coordinada actúan sobre un área ósea durante un ciclo de remodelado, reciben el nombre de unidades multicelulares básicas, las que se activan de manera asincrónica y coexisten en las tres fases. El segmento óseo que resulta de la acción de cada unidad multicelular se denomina unidad estructural ósea. El límite entre el hueso preexistente y la nueva unidad estructural se identifica por una línea ondulada que recibe el nombre de superficie de inversión o de cementación.

En la remodelación del hueso compacto, los osteoclastos parten desde los canales de Havers o de Volkmann y excavan túneles cilíndricos, que corresponden a unidades estructurales óseas corticales, llamadas también osteonas. En cambio, en el hueso esponjoso, los osteoclastos labran en la superficie de las trabéculas excavaciones poco profundas y de base ancha, razón por la cual las unidades estructurales óseas trabeculares, llamadas también paquetes trabeculares, tienen forma plano convexa⁴⁶.

Se conoce como recambio óseo al volumen total de hueso que es renovado por unidad de tiempo, mediante el remodelado, el que es directamente proporcional al número de unidades multicelulares básicas activas. La diferencia entre el volumen de hueso formado y reabsorbido por unidad de tiempo se denomina balance óseo y corresponde a la suma del hueso ganado o perdido en cada ciclo de remodelado. Si la reabsorción y la formación son idénticas, el balance es igual a cero y el volumen total, o masa ósea, no varía en el tiempo. La masa ósea máxima se alcanza a los 30 años de edad y depende de factores genéticos y ambientales. De los 30 a los 40 años el balance óseo es igual a cero y la masa del hueso permanece estable. A partir de los 40 años se instaura un balance negativo

y la masa ósea disminuye de manera progresiva. En el hombre, la pérdida ósea se desarrolla a una velocidad constante de un 0.5 % anual, mientras que en la mujer se acelera durante los años de la menopausia. Al inicio de la octava década los hombres han disminuido su masa ósea en un 20 % y las mujeres en un 30 %.

El remodelado óseo está sometido a un control sistémico que regula el ritmo de activación de las unidades multicelulares básicas y la actividad funcional de las células que las integran, siendo especialmente importantes la hormona paratiroidea y la vitamina D, aunque también intervienen las hormonas tiroideas, los esteroides sexuales, los glucocorticoides, la insulina y la hormona somatotrófica. El control local del remodelado óseo se lleva a cabo a través de diversos factores de crecimiento que son producidos por las células óseas y medulares adyacentes, tales como células hematopoyéticas, linfocitos y macrófagos. Los factores locales intervienen en el control de la actividad funcional de las células de las unidades multicelulares básicas y permiten el acoplamiento de osteoclastos y osteoblastos. Las células del linaje osteoblástico son capaces de activar a los osteoclastos por medio de la producción de factores locales, contribuyendo al inicio de los ciclos de remodelado. A su vez, factores liberados por los osteoclastos, o por la matriz ósea bajo la acción de éstos, pueden activar a los osteoblastos. Estos fenómenos constituyen el sustrato molecular para el acoplamiento entre la reabsorción y la formación dentro de los ciclos de remodelado. La resistencia del hueso a la fatiga es moderada, por lo que acumula daño constantemente durante la actividad normal, hecho que genera un proceso de remodelación ósea permanente para mantener la integridad estructural del sistema esquelético⁴⁷.

Fases del remodelado

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases⁴⁸:

a. Fase quiescente

Hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

b. Fase de activación

El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada, se produce la atracción de osteoclastos circulantes

procedentes de los vasos próximos.

c. Fase de reabsorción

Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso lo llevan a cabo los macrófagos, permitiendo la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II).

d. Fase de formación

Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de preosteoblastos, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la sustancia osteoide que rellenará las zonas horadadas.

e. Fase de mineralización

A los 30 días del depósito de la sustancia osteoide, comienza la mineralización, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular. Y de nuevo empieza la fase quiescente o de descanso.

Cartílago

La reparación de la fractura es una secuencia compleja de procesos celulares que finalmente conduce a la regeneración del defecto óseo. En la década de los 60's se tenía la creencia de que el cartílago se formaba como consecuencia de bajos niveles de oxígeno y por la ausencia de aporte sanguíneo. Actualmente se sabe que el cartílago se forma en un microambiente altamente vascular debido a su capacidad para retener temporalmente los vasos sanguíneos en la zona de regeneración.

El cartílago contiene factores que repelen capilares e incluso constriñe capilares que estaban presentes en el hematoma. Así que antes de la invasión vascular pueden producirse algunos cambios; se reconocen como eventos preliminares la

hipertrofia condrocítica y la calcificación⁴⁹.

La mayoría de las fracturas, sanan con la formación del callo externo (e interno). Las principales etapas de este proceso están bien establecidas. Después del hematoma inicial, se forma un callo cartilaginoso (suave/blando) junto con hueso nuevo intramembranoso. El primero con el tiempo tiende un puente sobre la brecha de la fractura, mientras que el segundo constituye los contrafuertes del puente. El callo blando se transforma poco a poco en un callo duro por osificación endocondral. El proceso es generalmente (y superficialmente) descrito como el cartílago que será reemplazado por hueso. En sentido estricto, el cartílago se reabsorbe por los osteoclastos y macrófagos, los cuales crean espacios y canales, dejando algunas pequeñas zonas de cartílago intacto. Estas estructuras actúan como una superficie osteoconductora, permitiendo que las células madre osteogénicas de los capilares invadan estas zonas y formen una nueva matriz de hueso laminar. El nuevo hueso de origen cartilaginoso se forma: 1) por la aposición del espacio vascular y 2) mediante la formación de hueso lacunar por condrocitos⁵⁰.

Hueso vascular aposicional

Existen células osteoprogenitoras en el estroma de la médula ósea. Esas células se diferencian en osteoblastos, se alinean a lo largo de los bordes de cartílago no reabsorbido, y establecen una capa tras otra de hueso laminar. Aunque este proceso es generalmente descrito como osificación endocondral (es decir, dentro del cartílago), es un término incorrecto, puesto que el hueso no se forma dentro del cartílago, sino en el espacio vascular. El centro de las espículas óseas seguirá conteniendo condrocitos y la matriz de cartílago (visible con azul alciano o anticuerpos de colágeno tipo II). Sin embargo, ya calcificado, la matriz del cartílago prácticamente desaparece. Entonces, ¿qué ha ocurrido con los núcleos centrales cartilaginosos del hueso endocondral? Una forma de eliminar este cartílago se da durante la remodelación cuando todo o una parte del remanente es reabsorbido y sustituido por hueso nuevo (un proceso lento que se da desde el nuevo hueso, estableciéndose en los restos cartilaginosos).

Hueso lacunar

El aumento gradual de la proporción de la matriz ósea en el interior del núcleo de las trabéculas del callo duro, por el tiempo y la distancia desde el sitio de la fractura, no puede ser completamente explicado por sólo la remodelación⁵¹.

Factores reguladores del remodelado óseo

El balance entre la reabsorción y la formación óseas, está influido por una serie de factores, interrelacionados entre sí, como son factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales⁵¹.

Factores genéticos

Son determinantes muy importantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta, se encuentra determinada genéticamente. Así los sujetos de raza negra poseen una masa ósea mayor que los de raza blanca y éstos mayor que la amarilla. La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen⁵².

Factores mecánicos

Es necesaria la actividad física para el correcto desarrollo del hueso. Se cree que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos, incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Y por el contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez tienen un efecto negativo sobre el hueso, acelerando la reabsorción.

Factores vasculonerviosos

La vascularización es vital para el desarrollo óseo normal, permitiendo el aporte de células sanguíneas, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento. La vascularización constituye el primer paso para la osificación: los vasos sanguíneos invaden el cartílago y posteriormente se produce la reabsorción ósea por los osteoclastos, procedentes de los vasos próximos. Igualmente, la angiogénesis es fundamental para la reparación de fracturas o de la regeneración ósea, ya que la existencia de oxígeno es importante para que se produzca neoformación ósea y no tejido fibroso (prueba de ello son los osteocitos, los cuales se mueren cuando están lejos de un capilar -la distancia máxima es de 0.1 mm-). La inervación es necesaria para la fisiología ósea. El hueso es inervado por el sistema nervioso autónomo y por fibras nerviosas sensoriales. Se han encontrado fibras autónomas en periostio, endostio, hueso cortical y asociadas a los vasos sanguíneos de los conductos de Volkmann, así como neuropéptidos y sus receptores en el hueso (pacientes con desórdenes neurológicos presentan frecuentemente osteopenia, fragilidad ósea y menor densidad mineral ósea)^{51, 52}.

El **periostio** es un tejido conectivo especializado que cubre el hueso. Tiene dos capas: una estructura fibrovascular exterior y una capa interior, la cual es una estructura osteogénica activa⁵³.

La propiedad osteogénica de los injertos de periostio se ve afectada por factores tales como las características de las zonas donantes y receptores y la vascularización. Se ha demostrado que el periostio tibial es superior con respecto al de la bóveda craneal y costal⁵⁴.

Factores nutricionales

Se necesita un mínimo de calcio para permitir la mineralización que la mayoría de los autores cifran en unos 1200 mg. diarios hasta los 25 años; después y hasta los 45 no debe ser inferior a 1 gramo y tras la menopausia debe ser por lo menos 1500 mg al día. Los hábitos perniciosos como tabaco, cafeína, alcohol y exceso de sal, constituyen factores de riesgo para la aparición de osteopenia^{29, 38}.

Factores hormonales

El desarrollo normal del esqueleto está condicionado por el correcto funcionamiento del sistema endocrino, principalmente de la hormona somatotropina (GH) y las hormonas calcitrópicas (paratohormona, calcitonina y metabolitos de la vitamina D). Las hormonas son mensajeros sistémicos que actúan a distancia de su lugar de producción (efecto endocrino), pero también regulan la síntesis y acción de los factores locales, que intervienen directamente en el metabolismo celular (efectos autocrino y paracrino). Las hormonas más importantes que intervienen en la fisiología ósea son³⁸:

- **Hormonas tiroideas:** Poseen dos acciones contrapuestas sobre el hueso. En primer lugar, estimulan la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización, favoreciendo la síntesis de IGF-I. Por esto, en el hipotiroidismo congénito (cretinismo) se produce talla baja por alteración de la formación ósea. En segundo lugar, se produce un efecto contrario, estimulando la reabsorción al aumentar el número y función de los osteoclastos. La manifestación clínica de este efecto es la aparición de pérdida de masa ósea en el hipertiroidismo.
- **Paratohormona (PTH):** Es la hormona que controla la homeostasis del calcio a través de la acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Producida en las glándulas paratiroides que responden al descenso de la calcemia, es la hormona hipercalcemiente por excelencia,

al favorecer la reabsorción. No obstante, en los últimos años se ha descubierto un papel estimulador en la formación ósea, a través de la síntesis de IGF-I y TGF- β . Este doble efecto de reabsorción y formación se explicaría porque la PTH en administración continua estimularía la reabsorción ósea a través de la síntesis de un factor favorecedor de la osteoclastogénesis (RANKL) por parte de las células osteoblásticas, mientras que a dosis intermitentes estimularía la formación de hueso, asociado a un incremento de los factores de crecimiento mencionados anteriormente y a una disminución de la apoptosis de los osteoblastos.

- **Calcitonina:** Producida en las células C o parafoliculares de la tiroides, es inhibidora de la reabsorción ósea, al reducir el número y la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, esta acción es transitoria, ya que los osteoclastos parecen volverse “impermeables” a la calcitonina en pocos días.
- **Calcitriol o 1,25(OH)₂ vitamina D₃:** Hormona esteroidea que favorece la absorción intestinal de calcio y fosfato y, por tanto, la mineralización ósea. Es necesaria para el crecimiento normal del esqueleto. Algunos autores piensan que puede ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos⁵⁵.
- **Andrógenos:** Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. Mientras que, la deficiencia androgénica se asocia a una menor densidad ósea, la administración de testosterona en jóvenes antes del cierre epifisario incrementa la masa ósea. Igualmente, las mujeres con exceso de andrógenos presentan densidades óseas más altas.
- **Estrógenos:** Son esenciales para el cierre de los cartílagos de conjunción y se ha descubierto que juegan un papel importante en el desarrollo esquelético tanto femenino como masculino durante la adolescencia. Los estrógenos tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo: por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por otro lado, disminuyen la reabsorción. Se han descrito receptores de estrógenos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos humanos. Investigaciones recientes han comprobado que los estrógenos pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG), proteína producida por los osteoblastos que inhibe la reabsorción, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Es por esto, que la deficiencia de estrógenos durante la menopausia constituye el factor patogénico más importante de la pérdida ósea asociada a la osteoporosis⁵⁶.
- **Progesterona:** Es igualmente anabolizante sobre el hueso, bien directamente, a través de los osteoblastos, que poseen receptores para la

hormona o bien de forma indirecta, mediante la competición por los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides.

- **Insulina:** Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente, a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I (factor de crecimiento análogo a la insulina-I).
- **Glucocorticoides:** A dosis altas tienen efectos catabólicos sobre el hueso, ya que inhiben la síntesis de IGF-I por los osteoblastos, y suprimen directamente la BMP-2 y el Cbfa1, factores críticos para la osteoblastogénesis. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la diferenciación osteoblástica.
- **Hormona de crecimiento (GH):** Tiene dos acciones sobre el hueso, directa e indirecta. La GH actúa directamente sobre los osteoblastos, con receptores para la hormona, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. La acción indirecta se produce a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos. Estos factores favorecen la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, aumentando su número y función⁵⁷.

Factores locales

El remodelado óseo también está regulado por factores locales, entre los que destacan los factores de crecimiento, las citoquinas y recientemente se han implicado las proteínas de la matriz ósea, como moduladoras de la acción de otros factores locales (Tabla 3). Las células del hueso también juegan un papel importante por la producción de prostaglandinas y óxido nítrico, así como de citoquinas y factores de crecimiento.

Factores de crecimiento

Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos, que actúan como moduladores de las funciones celulares, fundamentalmente sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular.

- **IGF-I y II (Insulin-like Growth Factor I y II) o factor de crecimiento de insulina:** Los factores de crecimiento análogos a la insulina son polipéptidos similares a esta hormona sintetizados por el hígado y los osteoblastos. Se hallan en gran concentración en la matriz osteoide. Incrementan el número y función de los osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. Circulan unidos a proteínas de unión (IGFBP de *IGF-binding proteins*) que a su vez pueden ejercer efectos estimulatorios o inhibitorios sobre el hueso. Los IGFs están regulados por hormonas y factores de crecimiento locales;

así la GH, los estrógenos y la progesterona aumentan su producción, mientras que los glucocorticoides la inhiben. Asimismo, median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en el remodelado óseo. El IGF-II es el factor de crecimiento más abundante de la matriz ósea, es importante durante la embriogénesis, pero sus efectos sobre el esqueleto ya desarrollado actualmente se desconocen.

- **TGF- β (Transforming Growth Factor- β) o factor de crecimiento transformante β :** Los factores de crecimiento transformantes β son una gran familia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo (los segundos, tras los IGF). Están presentes en la matriz en forma latente y se activan durante la reabsorción osteoclástica. TGF- β es un potente estimulador de la formación ósea, potenciando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide e inhibiendo la síntesis de proteasas (entre las que destacan la metaloproteasa de la matriz (MMP), enzima que degrada la matriz osteoide). Asimismo, inhibe la reabsorción al reducir la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros y estimula su apoptosis⁵⁸.
- **BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) o proteínas morfogenéticas:** Las proteínas morfogenéticas óseas están incluidas dentro de la familia de los TGF- β . Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago. Actualmente se considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica y como estimulantes de la osteogénesis, inhiben la osteoclastogénesis⁵⁹.
- **PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) o factor de crecimiento derivado de las plaquetas:** El factor de crecimiento derivado de las plaquetas por un lado estimula la síntesis proteica llevada a cabo por los osteoblastos, y por otro, favorece la reabsorción ósea. Otros efectos son la proliferación de fibroblastos, así como de células musculares lisas, la neovascularización y la síntesis de colágeno, por lo que favorece la cicatrización.
- **FGF (Fibroblastic Growth Factor) o factor de crecimiento fibroblástico:** El factor de crecimiento fibroblástico es anabolizante óseo, ya que es mitógeno de los osteoblastos y de las células endoteliales vasculares, así como de los fibroblastos. Las mutaciones en sus receptores producen alteraciones del esqueleto craneofacial, como la acondroplasia, el síndrome de Apert y el síndrome de Crouzon, entre otras.
- **EGF (Epidermal Growth Factor) o factor de crecimiento epidérmico:** El factor de crecimiento epidérmico es un potente mitógeno de las células

de origen mesodérmico y ectodérmico. Se sintetiza en múltiples tejidos del organismo, por lo que podría estar involucrado en diversas funciones biológicas, aún no bien esclarecidas. Respecto al hueso podría tener una doble acción formadora y destructora, si bien ésta última es la más conocida.

- **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) o factor de crecimiento vascular endotelial:** El factor de crecimiento vascular endotelial induce la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular. Produce vasodilatación y un incremento de la permeabilidad vascular. Se produce en situaciones de hipoxia y actualmente se está considerando como uno de los factores claves en el desarrollo de las primeras fases del proceso de reparación de fracturas y regeneración ósea, así como en el desarrollo tumoral.
- **GM-CSF (Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor) o factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos:** El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos es importante para la osteoclastogénesis y puede intervenir en la patogenia de la osteopetrosis.
- **M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) o factor estimulador de colonias de macrófagos:** El factor estimulador de colonias de macrófagos es producido por los osteoblastos y células del estroma medular y es requerido como factor esencial en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas, pero no tiene efecto sobre la actividad osteoclástica.
- **TNF (Tumor Necrosis Factor) o factor de necrosis tumoral:** El factor de necrosis tumoral *in vitro* estimula la reabsorción y se le ha relacionado con la pérdida ósea de la artritis y de la enfermedad periodontal.
- **Proteínas de la matriz:** Las proteínas de la matriz actúan como moduladores de los factores de crecimiento. Hay que tener en cuenta que las proteínas de la matriz se hallan a una concentración mil veces mayor que los factores de crecimiento, por lo que podrían jugar un papel más importante en la regulación de las diferentes funciones celulares. También participan en la regulación de la diferenciación de las células contenidas en la matriz. Por ejemplo, la colágena I es uno de los marcadores más tempranos que regulan las células osteoprogenitoras y la fosfatasa alcalina es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas⁶⁰.

Citocinas

Son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas que juegan un papel importante en múltiples funciones celulares, como en la respuesta

inmunológica, la inflamación y la hematopoyesis, con un efecto autócrino y parácrino. En el hueso son importantes las siguientes citocinas⁶¹:

- **Interleucina 1 (IL-1):** Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos. En realidad son 3 moléculas diferentes relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y Antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras. Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas.
 - **Interleucina 6 (IL-6):** Estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la patogenia de la enfermedad de Paget. Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1 y 1,25(OH) $_2$ D $_3$.
 - **Interleucina 11 (IL-11):** De reciente descubrimiento, se produce en la médula ósea e induce la osteoclastogénesis.
- » **Prostaglandinas (PG):** *In vitro* favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE $_2$, pero también la PGE $_1$, PGG $_2$, PGI $_2$ y PGH $_2$. Estudios *in vivo*, midiendo los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular, han demostrado su participación en la destrucción ósea que tiene lugar en la enfermedad periodontal⁶².

Tabla 3. Factores locales reguladores del remodelado óseo^{29, 38}

	Estimulan formación	Estimulan reabsorción	Inhiben reabsorción
Factores de crecimiento	BMP-2 (Proteína morfogénica ósea-2)	TNF (Factor de necrosis tumoral)	
	BMP-4 (Proteína morfogénica ósea-4)	EGF (Factor de crecimiento epidérmico)	
	BMP-6 (Proteína morfogénica ósea-6)	PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas)	
	BMP-7 (Proteína morfogénica ósea-7)	FGF (Factor de crecimiento fibroblástico)	
	IGF-I (factor análogo a la	M-CSF (Factor estimulante	

Citocinas y prostaglandinas	insulina I) IGF -II (Factor análogo a la insulina II) TGF- β (Factor transformante del crecimiento β) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	de colonias de macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
		IL-1 (Interleucina -1)	
		IL-6 (Interleucina -6)	
		IL-8 (Interleucina -8)	
		IL-11 (Interleucina -11)	IFN- γ (Interferón γ)
		PGE ₂ (Prostaglandina E-2)	IL-4 (Interleucina -4)
		PGE ₁ (Prostaglandina E-1)	
		PGG ₂ (Prostaglandina G-2)	
		PGI ₂ (Prostaglandina I-2)	
		PGH ₂ (Prostaglandina H-2)	

6. Reparación o consolidación ósea

El tejido óseo es el único capaz de repararse a sí mismo de manera completa por medio de la reactivación de los procesos que tienen lugar durante su embriogénesis. Cuando un hueso es sometido a fuerzas que superan su resistencia

mecánica se origina su fractura, desencadenándose el proceso de consolidación o reparación ósea, que tiene como objetivo restablecer la estructura tisular y las propiedades mecánicas originales.

La consolidación comienza con la estabilización otorgada por los callos periósticos y endósticos, proceso que restablece la continuidad de los extremos fracturarios. Cuando la fractura es manejada en condiciones de estabilidad óptima por medio de la reducción anatómica y compresión interfragmentaria no se forma el callo perióstico, denominándose a este proceso consolidación primaria. La siguiente fase corresponde al establecimiento de una unión ósea entre los fragmentos fracturados. Si durante este periodo la fractura carece de condiciones de estabilidad, se puede generar una pseudoartrosis hipertrófica, debido a la persistencia de tejido fibroso. Sin embargo, el proceso tolera un pequeño margen de movimiento, que es capaz de estimular la consolidación ósea. En la fase final del proceso de reparación, el tejido óseo neoformado experimenta fenómenos de remodelación que se mantienen hasta conseguir la resistencia inicial del hueso lesionado. Los factores que favorecen la consolidación son la presencia de fracturas en áreas del hueso esponjoso, la estabilización correcta, el procedimiento de transporte óseo, los injertos óseos, los biomateriales sustitutivos del tejido óseo, la matriz ósea desmineralizada, los factores de crecimiento, las células de la médula ósea, el traumatismo craneoencefálico concomitante, los campos eléctricos, el oxígeno hiperbárico, el ejercicio físico, la hormona somatotrófica, las hormonas tiroideas, la calcitonina, la insulina, las vitaminas A y D, los esteroides anabolizantes, el condroitinsulfato y la hialuronidasa, entre muchos.

Los factores que dificultan la consolidación son la ocurrencia de fracturas en hueso de tipo cortical, el compromiso de los tejidos blandos en las fracturas expuestas o por alta energía, las lesiones articulares, las fracturas en hueso patológico, la interposición de tejidos blandos, la devascularización extensa o el aporte sanguíneo precario, la manipulación tardía, la edad avanzada, la infección, la malnutrición, el tratamiento con corticoides, la diabetes mellitus, la anemia, el uso de cera ósea, la denervación y los anticoagulantes, entre otros. La consolidación ósea se desarrolla en tres etapas secuenciales que se superponen en el tiempo, que corresponden a las fases de inflamación, reparación y remodelación⁶³.

Fase de inflamación

Los traumatismos causantes de las fracturas lesionan las células, vasos sanguíneos y matriz del tejido óseo y también comprometen los tejidos adyacentes como

periestio y músculos. De esta forma, se establece un hematoma fracturario que es la base del proceso de consolidación. La lesión vascular interrumpe el aporte sanguíneo a los osteocitos y por ello en los extremos fracturados no se encuentran células vivas. Los mediadores de la inflamación liberados por las plaquetas y demás células lesionadas provocan vasodilatación y la aparición de un exudado plasmático que lleva al edema agudo. Entre las células inflamatorias que migran al foco de fractura se encuentran leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. En la medida que disminuye la reacción inflamatoria, el tejido necrótico y el exudado plasmático son reabsorbidos y los osteoblastos se encargan de producir una nueva matriz ósea.

Fase de reparación

El proceso de consolidación es estimulado por factores quimiotácticos liberados en la fase previa, las proteínas de la matriz expuestas por la desorganización tisular y los factores eléctricos. La organización del hematoma de fractura proporciona un soporte de fibrina que facilita la migración celular, proliferación y síntesis de matriz ósea. En este estado evolutivo, el microambiente a nivel del foco fracturado es ácido, pero en la medida que el proceso avanza el pH se va alcalinizando progresivamente, de este modo, la fosfatasa alcalina alcanza su nivel de actividad óptimo, favoreciendo la mineralización del callo óseo. Cuando los extremos fracturados se necrosan son reabsorbidos por los osteoclastos, lo que permite que los vasos periósticos aporten los brotes vasculares que inician la reparación. Las células mesenquimáticas pluripotenciales del foco de fractura y del torrente sanguíneo son las responsables de la neoformación ósea. La composición del callo óseo se modifica a medida que progresa la consolidación, de tal forma que las células sustituyen el coágulo de fibrina por una matriz fibrosa que contiene colágeno tipo I y III, proteoglicanos y glicosaminoglicanos. Luego el tejido fibroso se transforma en fibrocartilago que presenta un importante contenido de colágeno tipo II, proteoglicanos específicos y proteínas de unión. Posteriormente, se produce la mineralización de la matriz ósea con un aumento de la concentración de colágeno tipo I, fosfatasa alcalina y proteínas no colágenas, proceso que concluye con la osificación de la masa fusiforme del callo que envuelve los extremos fracturados, el que contiene cantidades crecientes de hueso inmaduro⁶⁴.

Fase de remodelación

Corresponde a la última fase del proceso de reparación o consolidación en que se sustituye el hueso inmaduro del callo óseo por hueso laminar. Una vez que se

ha reemplazado todo el hueso neoformado, el proceso de remodelación continúa con la reabsorción de las trabéculas mal orientadas por parte de los osteoclastos y su sustitución por otras nuevas adaptadas a las líneas de fuerza. Cuando la remodelación del callo óseo concluye completamente, se recuperan las propiedades mecánicas originales del hueso comprometido⁶⁵.

Necesidades clínicas de la sustitución ósea y campo de regeneración

Macewan (1881) utilizó injertos óseos animales para la reconstrucción de húmeros de niños, convirtiéndose así, en uno de los pioneros en heterogeneidad ósea; después de casi 200 años, continuamos con la necesidad de innovar en el campo de regeneración ósea. Existen cientos de miles de pacientes que cada año requieren de procedimientos quirúrgicos de injertos óseos. Las consecuencias económicas son importantes (sin tomar en cuenta la atención médica de la enfermedad base); cifras que seguirán aumentando año tras año por el envejecimiento de la población.

Los tratamientos actuales se basan en los injertos de hueso autólogo, xenoinjertos o como una alternativa a estos, metales y cerámicas. Motivo por el cual, se clasifican depende del tipo de injerto en⁶⁶:

- **Autólogos:** El material óseo para el injerto es obtenido del mismo paciente. Este injerto forma una estructura rígida que puede soportar dientes o implantes, el sitio donante se selecciona de acuerdo con el volumen del defecto; el injerto autólogo es el único que cumple con las tres vías para la formación de hueso nuevo (osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción), así como la gran ventaja de tener ausencia de problemas de histocompatibilidad y riesgos de transmisión de enfermedades (Tabla 4).
 - El injerto de hueso autólogo, por décadas ha sido el estándar de oro en la sustitución ósea (vascularizado o no vascularizado), ya que proporciona las células osteogénicas así como los factores osteoinductores esenciales y necesarios para la consolidación y regeneración ósea. Los principales inconvenientes del autoinjerto óseo son su disponibilidad limitada y la problemática asociada con

su obtención, es decir, afectación de estructuras anatómicas indemnes, morbilidad quirúrgica añadida, prolongación del tiempo quirúrgico, riesgo de infección y dolor posoperatorio. El autoinjerto óseo esponjoso posee el mayor poder osteogénico entre todos los implantes empleados para el relleno óseo, debido a su capacidad para promover una neoformación ósea progresiva que no requiere pasar por el estadio de reabsorción osteoclástica necesario para la incorporación de los aloinjertos, por lo que constituye el material de referencia con el que se comparan todos los sustitutivos óseos. Es preciso describir los sitios donantes, así como sus potenciales consecuencias⁶⁷:

- cresta iliaca (desventajas: dolor, dificultad para caminar, parestesia temporal o permanente del nervio femoral cutáneo, defectos del contorno de la cresta, íleo paralítico), calota (desventajas: hematoma epidural o subdural, seroma, fístula del líquido cefalorraquídeo, daño cerebral, dehiscencia de la herida, rasgadura de la duramadre, hemorragia aracnoidea e infección de la herida), rama mandibular, mentón y tuberosidad maxilar (desventajas: hemorragia, dolor, dehiscencia, inflamación severa, trismus, infección), radio (desventajas: cicatriz, dolor, dificultad para realizar manualidades, parestesia temporal, infección), costilla (desventajas: el injerto sufre grandes reabsorciones, además de las posibles complicaciones operatorias y posoperatorias, como el neumotórax, dolor pleurítico y depresiones en el tórax) y diáfisis tibial (desventajas: cicatriz, dolor, dificultad para caminar, parestesia temporal, infección)^{68, 69}.

Tabla 4. Clasificación de injertos óseos autólogos según su localización y su origen embriológico

	Recolección del injerto	Toma de injerto	Origen embrionario
Intraoral	Mandíbula	Sínfisis mentoniana	Intramembranoso
		Rama mandíbula	

Extraoral	Cuerpo mandibular			
	Proceso coronoideo			
	Maxilar	Tuberosidad	Intramembranoso	
	Reborde alveolar			
	Apófisis cigomatoalveolar			
	Cresta iliaca	Vía posterior	Endocondral	
	Vía anterolateral			
	Vía anteromedial			
	Craneal (calvaria)	Parietal	Cortical	Intramembranoso
		Frontal temporal	Bicortical Cortical	
Microvascularizado	Costilla		Endocondral	
	Tibia			
	Metatarso			
	Peroné			
	Escapular	Osteofasiocutáneo	Endocondral	
	Paraescapular	Osteomuscular		
	Costilla			
	Tibia			

- Aloinjertos:** son tomados de otros individuos de la misma especie pero de diferentes genotipos, se puede obtener de donantes vivos, como en el caso de las cabezas femorales extraídas en las artroplastías de cadera, de donantes multiorgánicos o de donantes de tejidos. Para su conservación se pueden emplear los métodos de congelación, criopreservación o liofilización; se almacenan y procesan en bancos tisulares. Tiene ventajas debido a que se elimina el sitio donante en el paciente, se disminuye el tiempo quirúrgico y de anestesia y se presenta menor pérdida sanguínea durante la cirugía. Existen tres tipos de aloinjertos óseos: congelado-desechado (liofilizado) y hueso desmineralizado-congelado-desechado

(DFDB). Los aloinjertos pueden formar hueso a través del efecto de la osteoinducción y la osteoconducción; no se da en el proceso de la osteogénesis debido a que el injerto no posee células vivas. El aloinjerto se comporta como una estructura que permitirá el crecimiento de nuevo hueso a partir del remplazo gradual que sufre el injerto por el hueso huésped. Este proceso se da por proliferación subperióstica y endocontral⁷⁰.

- Entre las ventajas de los aloinjertos destacan su amplia disponibilidad, que depende de la oferta de los bancos de tejidos, su reducida inmunogenicidad y su buena tolerancia por parte del receptor. Sin embargo, presentan como inconvenientes un comportamiento biológico inferior al del autoinjerto óseo, un elevado costo de manutención, el riesgo de infección, una mayor incidencia de fracturas y la posibilidad de transmisión de enfermedades como SIDA, hepatitis, leucemia, tuberculosis, sífilis, cáncer y encefalopatía de Creutzfeldt-Jakob, entre otras⁷¹.
 - Sus propiedades mecánicas y biológicas son variables y dependen de los sistemas de conservación y esterilización empleados previamente. Se utilizan principalmente en forma de injertos libres, ya sean esponjosos, corticales o corticoesponjosos, para el tratamiento de variados defectos óseos segmentarios o cavitarios⁷⁰. La formación ósea es lenta y se pierde volumen apreciable si se compara con el injerto autólogo^{72, 73}.

- **Xenoinjertos:** injertos que se obtienen e implantan entre individuos de especies diferentes.
 - Son el centro de interés de muchos estudios debido a que se pueden conseguir con facilidad, sin embargo, la capacidad inmunogénica, tanto de las células como de la matriz orgánica, limita su utilización y hace necesaria su desproteínización.
 - Existen diferentes preparados de heteroinjertos óseos

disponibles. Presentan las mismas ventajas que los aloinjertos, pero carecen de capacidad osteoinductora y, debido a los procesos de conservación y esterilización, sus propiedades biomecánicas son deficientes (Tabla 5)⁷⁴.

- **Aplásticos:** son materiales sintéticos biocompatibles, que pueden ser usados para relleno, sin embargo no cumplen con todos los objetivos que los injertos óseos alveolares pero pueden ser útiles en injertos tardíos en los que se buscan fines restaurativos pero no ortodónticos.
 - Corresponden a todos los materiales destinados a estar en contacto con los sistemas biológicos con el objetivo de tratar, aumentar o sustituir un tejido, órgano o función del organismo. El implante de un biomaterial genera la reacción de los tejidos vivos receptores, produciéndose un proceso inflamatorio de cuantía variable que concluye con la cicatrización. En la reacción de los tejidos también influyen los productos de corrosión, degradación o abrasión del material implantado. La respuesta de los tejidos puede favorecer la incorporación del material o acelerar la regeneración de una lesión. Este es el caso de los implantes de cementos óseos y vidrios bioactivos basados en fosfatos de calcio en que los biomateriales interactúan directamente con los componentes del tejido óseo y el proceso resultante permite la reparación del defecto óseo.
 - Presentan pobre integración, pueden fallar debido a procesos de infección o por fatiga mecánica. La cerámica tiene una fuerza de tensión muy baja y es frágil y por lo tanto, no puede ser utilizada en lugares donde la torsión, flexión o tensión de corte son significativas. Se sugiere la utilización de hidroxiapatita no porosa en gránulos, ya que el material poroso ha presentado fallas posiblemente por retención de microorganismos nasales o de la cavidad oral⁷⁵.



Tabla 5. Clasificación de ventajas y desventajas de los materiales utilizados en injertos⁷⁶

Materiales	Ventajas	Desventajas
Material Autólogo	Económico	Limitada disponibilidad
	No antigénico	Morbilidad áreas donadoras
	No transmite enfermedades	No se puede almacenar
	Osteoinducción	Recolección extraoral con anestesia general
	Osteoconducción	
Material Homólogo, alogénico o aloinjerto	Gran disponibilidad	Puede transmitir enfermedades
	Almacenable	Proceso elaboración costoso
	Osteoinductor leve	Posee poder antigénico
	Osteoconductor	
Material Heterólogo o xenoinjerto	Elaboración industrial	Proceso elaboración costoso
	Osteoconductor por excelencia	No posee osteoinducción
	Nula reacción inflamatoria	
Material Aloplástico o sintético	No transmite enfermedades	Costo elevado
	Osteoconducción	No posee osteoinducción
	Disponibilidad ilimitada	Reacción de cuerpo extraño
	Fácil manejo	
	Alto nivel de calidad	
	Almacenamiento sencillo	

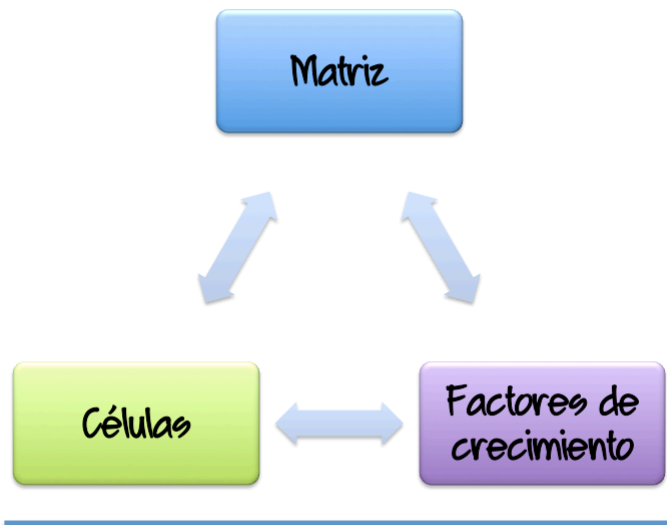


Figura 3. Formación de hueso a través de la ingeniería tisular. Interacción sinérgica entre la matriz, las células y los factores de crecimiento usados en ingeniería tisular y la efectividad de las terapias utilizadas para la regeneración ósea basadas en proteínas o genes (Kofron MD, 2004).

REGENERACIÓN TISULAR GUIADA

Se denomina sustituto óseo a todos los tejidos o materiales que pueden emplearse para rellenar defectos del hueso, con el objetivo de obtener la regeneración y reparación del tejido óseo. De acuerdo con esto, podemos reconocer dos tipos fundamentales de sustitutivos, los injertos óseos y los biomateriales.

Los injertos óseos corresponden a fragmentos de hueso que se pueden implantar en un área del

esqueleto para restaurar el capital óseo perdido. Los biomateriales son aquellas sustancias, naturales o sintéticas, o combinación de sustancias, que pueden implantarse en el organismo para tratar, restituir, sustituir o aumentar un órgano o tejido, entre los cuales se encuentra el tejido óseo (Figura 3)⁷⁷.

Las nuevas estrategias de la ingeniería tisular están enfocadas en materiales que sirvan de andamios porosos para la liberación de componentes biológicos que proporcionen un enfoque para el desarrollo eficaz de sustitutos de injerto óseo. En años recientes, el uso de técnicas de ingeniería de tejidos ya sea vía trasplante de composites o la implantación separada de moléculas de la matriz extracelular (uso de factores de crecimiento y sembrado de células en defectos óseos) para la reparación y/o regeneración de defectos óseos, ha ocupado la atención como un problema médico/odontológico a resolver en diversos países⁷⁸.

Se requieren de tres parámetros fundamentales para que la ingeniería de tejidos ósea sea exitosa:

- 1) señales osteoinductivas
- 2) células que respondan a estas señales (p. ej.: células troncales mesenquimales) y,
- 3) una matriz extracelular adecuada ⁷⁹

Diferentes métodos han sido usados en un intento de superar las limitaciones de la regeneración ósea en defectos críticos (ya detallados en los diferentes tipos de injertos). Sin embargo, uno de los problemas claves, es el desarrollo de fármacos, medicinas y/o materiales para la reparación de estos defectos de un modo predecible y notable. La composición y la arquitectura de los biomateriales son variables importantes que afectan directamente la respuesta de reparación. Y se clasifican según su modo de acción⁸⁰:

- a. **Osteogénicos:** son los injertos de hueso autógeno, que mediante el establecimiento de centros de formación de células vivas producen la regeneración ósea directa del defecto.
- b. **Osteoinductivos:** son aquellos que tienen capacidad de liberar sustancias que inducen la formación ósea, es decir, que actúan sobre células pluripotenciales (osteoinductibles), originando una diferenciación fenotípica que concluye en la formación ósea por mecanismo endocondral. Estas moléculas se conocen como *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) y son las BMPs 2, 3 y 7 las que producen neoformación endocondral. El resto inducen formación de cartílago. Se ha encontrado BMP en el hueso de banco desmineralizado.
- c. **Osteoconductivos:** proporcionan una trama que estimula a las células no pluripotenciales o preprogramadas para que se conviertan a osteoblastos, desde los márgenes del defecto. Pueden ser materiales permanentes o reabsorbibles. Esta capacidad la tiene el hueso bovino y la hidroxiapatita sintética.

Los injertos autógenos o el uso de sustitutos óseos son materiales populares que han sido utilizados para ayudar al cuerpo en la curación ósea. Esos materiales o injertos trabajan a través de procesos de osteoinducción, osteoconducción y osteogénesis. Aunque muchos clínicos han intentado obtener resultados similares con hueso alogénico o xenogénico, sustituto óseo y aloplástico, ninguno ha igualado los resultados obtenidos con injertos óseos autógenos⁸¹.

Pese a que los injertos autólogos son los injertos ideales, presentan importantes desventajas, sobretudo para defectos críticos, ya que pueden incrementar el tiempo quirúrgico, requerir de una incisión extra para obtener el injerto, presentar pérdida sanguínea, dolor, tener riesgo de infección postoperatoria, morbilidad del

sitio donador, integración incompleta del trasplante, estar limitados a una cierta cantidad ósea disponible (cantidad de injerto insuficiente)⁸², destrucción de células vivas durante el procesamiento de tejido y la desvitalización del injerto con su subsecuente proceso de resorción, disminuyendo así, la estabilidad mecánica⁸³.

A continuación, se mencionarán algunas de las desventajas específicas de los autoinjertos (Figura 6):

Los injertos autólogos de cresta iliaca han sido asociados con: infecciones superficiales y profundas, seromas, hematomas, lesiones vasculares y nerviosas, fractura de la cresta iliaca, hernia abdominal, dolor crónico, cicatriz y deformidad postoperatoria⁸⁴.

Los riesgos de los injertos de costilla están relacionados con: defectos del contorno, neumó y hemotórax, cicatriz y dolor de larga evolución.

Los riesgos de los injertos de calvaria son: perforación de la duramadre, lesión intracraneal, meningitis, alopecia y cicatriz⁸⁵.

Los injertos microvascularizados tienen el riesgo de: rechazo, técnicamente demandante, cirugías prolongadas, necrosis, trombos, costosos y fractura del sitio donador⁸⁶.

El proceso de distracción y transporte óseo también se han utilizado para la reposición y reparación de defectos en varios huesos faciales^{87, 88}. Aunque este proceso tiene la capacidad de promover la formación ósea en defectos óseos críticos, también tiene sus propios inconvenientes: se necesitan dispositivos externos, lo que da un potencial inaceptable de cicatrices, lesión nerviosa, infección, procedimiento quirúrgico complicado, largo y costoso⁸⁹.

Por otra parte, los aloinjertos se obtienen generalmente de los bancos de tejidos, pero tiene el riesgo de transmitir enfermedades así como de complicaciones postoperatorias debido a la falta de vascularización⁹⁰ o por un rechazo mediado por un proceso inmunológico y secuestro óseo, a parte de ser costosos⁹¹. La densa naturaleza de la cortical de los aloinjertos, impide la revascularización y la invasión celular del huésped al implante, por lo que esta limitada habilidad para revascularizar, se cree que es la responsable del 25-60% de complicaciones asociadas con los aloinjertos⁹².

Otro tipo de factores osteoinductivos son los factores de crecimiento. La matriz ósea extracelular constituye una importante reserva de factores de crecimiento,

especialmente los sintetizados por las células óseas como IGF, TGF, FGF y PDGF. Detallados brevemente a continuación⁹³:

- » IGF o Factor de crecimiento de insulina (*Insulin Growth Factors*): Estos factores regulan el crecimiento celular y determinan la calcificación de la matriz ósea. La síntesis de los IGF I e IGF II depende de la acción de la hormona del crecimiento sobre el tejido óseo. Los glucocorticoides, los estrógenos y los análogos de la vitamina D, también pueden controlar la acción de los IGF.
- » TGF β o Factor de crecimiento transformante β (*Transforming Growth Factor β*): Cumple un importante rol en los procesos de formación y mineralización de la matriz ósea. La acción del TGF β está regulada por otros factores como los FGF, los estrógenos y la calcitonina.
- » FGF o Factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*): Genera la proliferación de células indiferenciadas en el proceso de reparación ósea y también es capaz de promover la neoangiogénesis.
- » PDGF o Factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*): Estimula la proliferación de fibroblastos y osteoblastos, siendo considerada junto con la IGF I uno de los factores más importantes en el proceso de regeneración del tejido óseo.

Diferentes líneas de investigación se encuentran orientadas para la obtención de biomateriales que actúen como portadores de factores de crecimiento, para mejorar la velocidad, cantidad y calidad de la regeneración ósea en el lugar de la implantación. Se ha empleado hidroxapatita como vector de FGF e hidroxapatita y fosfato tricálcico como portadores de IGF I. El aislamiento de diversos factores bioactivos y la posibilidad de sintetizarlos con técnicas de ingeniería genética, permite postular un desarrollo promisorio de los sustitutivos osteoinductores.

Sin embargo, se debe tener en consideración que los efectos secundarios de los diferentes factores de crecimiento óseo todavía no son bien conocidos⁹⁴.

Por otro lado, cabe hacer mención especial acerca de las proteínas morfogénicas de hueso (BMP por sus siglas en inglés, *bone morphogenetic protein*), las cuales constituyen la familia más importante de factores de crecimiento para lograr la regeneración ósea y poseen una amplia variedad de actividades biológicas que incluyen: inducción de cartílago, formación ósea, organogénesis, proliferación y apoptosis^{95, 96}.

En 1965, Urist describe la fracción proteica contenida en la matriz ósea descalcificada, a la cual le denominó proteína morfogenética ósea (BMP), la que al ser implantada en defectos cavitarios conduce a la formación de tejido óseo. Las BMP son proteínas básicas de bajo peso molecular que se pueden aislar desde el hueso cortical, la dentina y algunos tumores óseos. Actualmente se describen alrededor de 12, entre las que destacan la BMP2, BMP3, BMP4, BMP6 y BMP7, que se obtienen a partir de tecnologías de recombinación del DNA, asociándolas con diferentes biomateriales capaces de retenerlas en el lugar de implantación⁹⁷. Investigaciones posteriores han permitido identificar y purificar las proteínas que estimulan la diferenciación de las células mesenquimáticas hacia la línea osteogénica. Los estudios han demostrado que la cantidad de tejido óseo formado es mayor en presencia de BMP, encontrándose además que esta es dosis dependiente. En la actualidad, se busca determinar la dosis mínima de BMP capaz de inducir la osteogénesis, para limitar los riesgos de su acción a distancia⁹⁸.

A través de la tecnología de ADN recombinante, se ha logrado obtener cantidades adecuadas de proteínas morfogénicas recombinantes humanas (rhBMPs) para propósitos de investigación. Sin embargo, su uso en la práctica clínica no solamente es costoso, sino que también se asocia a efectos adversos tales como el sobrecrecimiento óseo y las reacciones inmunológicas del huésped⁹⁹.

Recientemente se ha reportado que secuencias cortas de péptidos de su región central, podrían imitar las propiedades inductivas óseas de las BMPs en términos de regeneración ósea, sugiriendo que pueden utilizarse como un inductor alternativo^{96, 100-102}. Las BMPs inducen la formación de hueso endocondral por medio del estímulo del proceso de diferenciación de las células progenitoras mesenquimales¹⁰³, y han sido ampliamente evaluadas en diversas aplicaciones que incluyen el tratamiento de fusiones espinales, fracturas, defectos craneofaciales y periodontales¹⁰⁴⁻¹¹⁰.

Aunque se ha demostrado la eficacia de las rhBMPs, los inconvenientes con la estabilidad de las proteínas en el sitio del injerto, el entendimiento de la cinética de las BMPs *in vivo* y las condiciones de liberación de éstas, así como su alto costo, han limitado el uso de las BMPs en la clínica. Por otra parte, estas proteínas poseen una vida media corta (1 a 4 horas). Sólo las proteínas recombinantes humanas BMP-2 y BMP-7/OP1 han obtenido la aprobación para su uso clínico en humanos por la FDA (*Federal and Drug Administration, USA*) y se limita únicamente a aplicaciones ortopédicas -fusión de la columna vertebral- y en cirugía maxilofacial -BMP-2, es usada en reconstrucción maxilo-mandibular-¹¹¹.

La administración de BMP-2 y BMP-7/OP1 mejora significativamente los estados iniciales de reparación de cartílago. Sin embargo, se requieren grandes dosis o aplicaciones múltiples para lograr el efecto osteogénico deseado; lo cual significa que una dosis de aplicación exógena de BMP es equivalente a la cantidad endógena presente en 1000 seres humanos. Lo anterior representa una seria preocupación respecto a su seguridad y costo¹¹².

Las BMPs también se han relacionado a complicaciones clínicas severas como los hematomas generalizados en tejido blando y a la resorción ósea peri-implante, debido a que las concentraciones son suprafisiológicas, como resultado de una cinética de liberación imperfecta de BMPs (el 30% del encapsulado es perdido en la fase inicial)^{95,113}.

Otro efecto colateral de la administración de BMP es la promoción de crecimiento óseo excesivo, lo que trae como consecuencia la presión sobre el tracto gastrointestinal y raíces nerviosas, además de ser inductores potentes de la calcificación arterial, lo que puede predisponer a los individuos recipientes a complicaciones serias como ateromas o trombosis¹¹⁴.

Actualmente se han empleado técnicas de biología molecular y de ingeniería genética para la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo la complejidad del equipo, así como las técnicas de preparación, ciclos de producción largos, rendimientos bajos y procesos costosos, dificultan el lograr una producción a gran escala. En adición a esto, existen problemas de seguridad de los productos como resultado de la ingeniería genética. Para aplicaciones clínicas se utilizan materiales inorgánicos, polímeros, materiales biológicos y composites como vectores para la liberación de BMPs. Sin embargo, para diversos materiales existen diferencias tales como biocompatibilidad, propiedades mecánicas, osteoconductividad, osteoinductividad, plasticidad y degradabilidad. A la fecha no existen materiales para sustituir hueso que cumplan con los requerimientos de un material perfecto para la reparación y/o regeneración de los defectos óseos. Por lo que la aplicación de BMPs (BMP2 y BMP-7/OP1) para la reparación de fracturas es limitada. Asimismo, el arreglo tridimensional al azar de estas proteínas y su adherencia a los materiales (acarreadores) influye en su bioactividad debido a la insuficiente exposición de los sitios activos de las proteínas¹¹⁵.

Otro método es la transfección de BMPs en células troncales mesenquimales utilizando tecnología transgénica y la expresión de BMPs en células transgénicas. Sin embargo, los vectores utilizados son principalmente adenovirus, los cuales

pueden causar daño al huésped a través de una proliferación celular persistente. Para los genes del huésped, también existe el riesgo de mutación debido a la intervención extrínseca de genes. Sin embargo, la transfección extrínseca de genes por métodos diferentes a los vectores virales (plásmidos) podrían no ser integrados a los cromosomas de las células huéspedes por lo que no existe el riesgo de mutación, pero su expresión es menos eficiente. En síntesis, el tiempo y la cantidad de la expresión génica *in vivo* no se puede controlar artificialmente. Asimismo, existen desventajas con estos métodos tales como: la baja eficiencia de transfección, expresión limitada en el tiempo y el potencial carcinogénico de los vectores virales. Por lo tanto, la terapia génica basada en las BMPs, está alejada de su aplicación clínica en el futuro inmediato¹¹⁶.

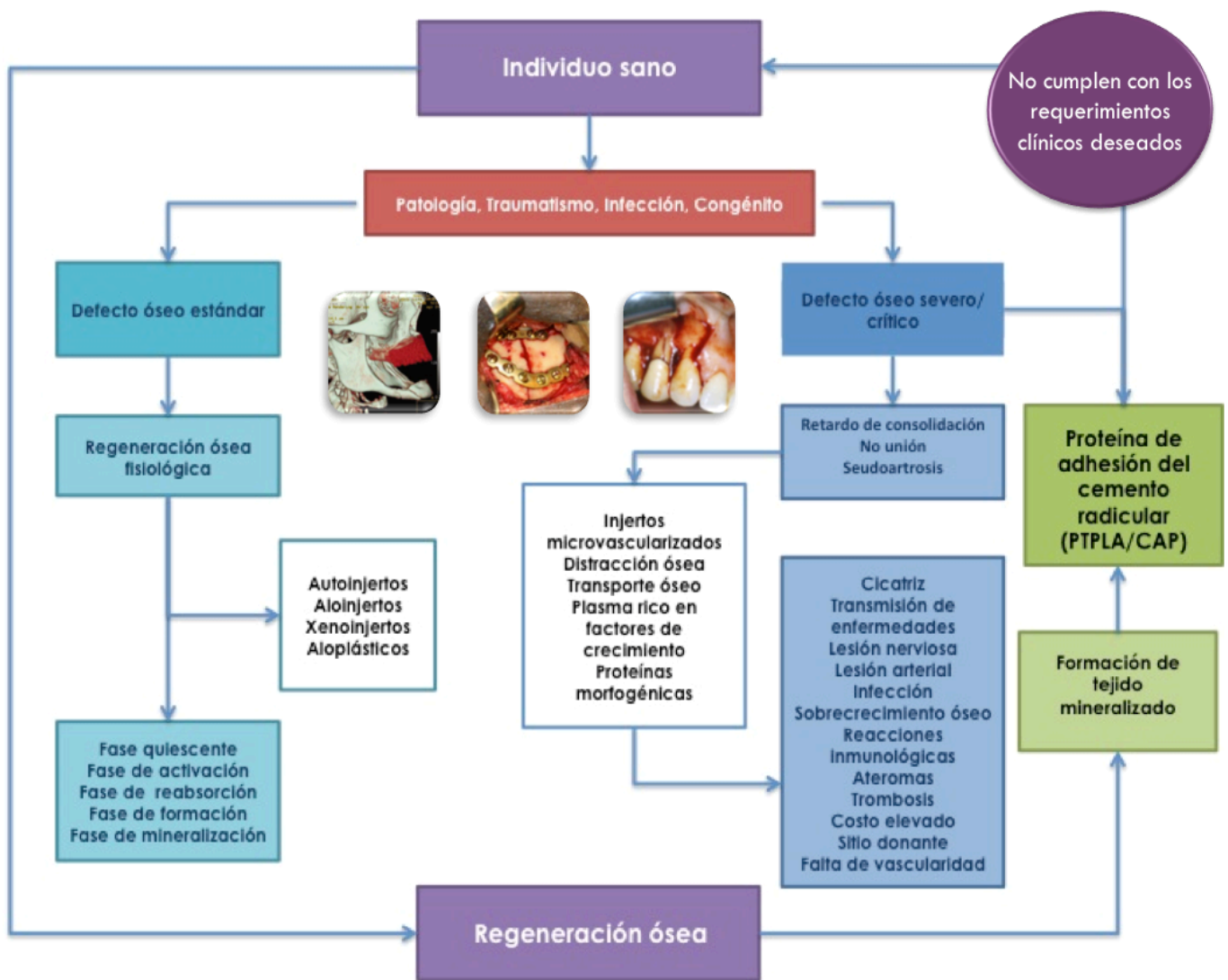


Figura 4. Modelo causal de regeneración ósea

DEFECTOS CRÍTICOS

En el ser humano, la capacidad regenerativa de los tejidos es limitada, por tanto, existen daños bajo las cuales se deben idear terapéuticas, que promuevan la regeneración cuyo producto sea un tejido anatómico y funcionalmente idéntico al anterior. Dependiendo del tipo de defecto y los factores causales de las lesiones óseas, existen situaciones en las cuales la regeneración ósea puede verse truncada y es necesario hacer mano de técnicas que estimulen una correcta reposición del tejido. Sin embargo, factores como: un medio ambiente desfavorable para la cicatrización, una técnica quirúrgica poco óptima/inapropiada o una inestabilidad biomecánica, traumatismos, enfermedades óseas, patologías congénitas o tumores, pueden provocar una formación de defectos óseos grandes, los cuales tienen limitado su potencial intrínseco de regeneración. Por lo tanto, los defectos óseos grandes representan un desafío significativo para los clínicos, ya que la falta de unión ósea es muy común¹¹⁷.

Un defecto óseo de tamaño crítico/severo, se define como una herida intraósea que no sana espontáneamente durante la vida de un animal, o como un defecto que muestra menos del 10% de regeneración ósea durante la vida de dicho animal^{92, 118, 119} o como el resultado de la multiplicación del diámetro del hueso por 2.0-2.5¹²⁰.

Cuando el tamaño crítico es excedido, el resultado deriva en una formación de tejido fibroso más que óseo. El propósito ulterior de la ingeniería de tejidos óseos, es el imitar los procesos naturales, diseñando y aplicando materiales bioimitadores (p.ej.: materiales sintéticos que llevan a cabo algunas de las funciones de moléculas biológicamente activas) que proveen condiciones adecuadas para la inducción de hueso¹¹⁸.

Modelo animal/modelo de fractura tibial

El desarrollo y la modificación de los implantes ortopédicos y dentales ha tenido lugar durante muchos años como un esfuerzo para crear una interacción óptima entre el cuerpo humano y el material implantado. El objetivo de lograr una interfase óptima hueso-implante, ha sido enfocado a la alteración de la superficie del implante, topografía, la química, la energía y la carga, así como la composición del material a granel¹²¹.

Un material de implante óseo ideal, deberá tener una composición química biocompatible para evitar la reacción adversa del tejido, excelente resistencia a la corrosión en el medio fisiológico, aceptable resistencia, una alta resistencia al desgaste y un módulo de elasticidad similar a la del hueso para reducir al mínimo la resorción ósea alrededor del implante.

Las características relativas a la seguridad de los implantes, tales como evitar una reacción adversa del tejido y resistencia al desgaste y la corrosión, son de alta importancia clínica para los implantes utilizados en situaciones clínicas a largo plazo tanto en la medicina humana como en la veterinaria, ya que ha habido algunos vínculos entre la exposición prolongada a materiales no biocompatibles y una respuesta adversa como la formación de tejidos neoplásicos¹²².

Con el fin de determinar si un nuevo material cumple los requisitos de biocompatibilidad y estabilidad mecánica antes del uso clínico, debe someterse a pruebas rigurosas (inicialmente *in vitro* y luego en condiciones *in vivo*).

Las pruebas *in vitro* son muy populares para la caracterización de materiales, especialmente los investigadores adoptan los principios de la reducción de los animales para pruebas científicas. A pesar de ello, se acepta que la prueba *in vitro* sea utilizada principalmente como una primera etapa del ensayo para la toxicidad aguda y la citocompatibilidad (el término biocompatibilidad a menudo se utiliza incorrectamente con los ensayos *in vitro*; como biocompatibilidad sólo se puede utilizar en el caso de animales o seres humanos *-in vivo-*, siendo el término correcto citocompatibilidad para las pruebas *in vitro*) para evitar el uso innecesario de animales en el ensayo de materiales citológicamente inapropiados¹²³.

Extrapolar directamente los resultados obtenidos en el laboratorio *in vitro* a pacientes *in vivo*, es prácticamente imposible y/o riesgoso. Sin embargo, la aplicación sistemática en un modelo animal (el modelo de defecto óseo segmental y crítico serviría como blanco de pruebas sólidas para las estrategias de regeneración ósea), se considera un paso esencial en el proceso del desarrollo de injertos óseos para ser usados ulteriormente en humanos. Por estas razones, los modelos animales son esenciales para evaluar la biocompatibilidad, la respuesta de los tejidos y la función mecánica de un material ortopédico o dental antes de la utilización clínica en el ser humano.

Los modelos animales permiten la evaluación de los materiales en situaciones cargadas o descargadas durante duraciones de tiempo potencialmente largos y

en diferentes calidades de tejido (por ejemplo, de hueso sano o normal, osteopenia) y edades. No sólo se pueden evaluar los tejidos en la proximidad inmediata del implante, también pueden ser estudiados los tejidos en lugares remotos. Mientras que los modelos animales pueden representar estrechamente la situación clínica humana mecánica y fisiológica, se debe recordar que se trata de sólo una aproximación. Actualmente existen numerosos modelos para probar los materiales de implante *in vivo*, que van acorde con el propósito de la evaluación de la adsorción de proteínas y de la adhesión del tejido blando a la integración de los huesos y la difusión de las partículas de desgaste de los implantes.

Hay varios modelos animales para la investigación musculoesquelética. Algunas especies de laboratorio, por ejemplo, ratones y ratas, son demasiado pequeños para la investigación de materiales de implante (por ejemplo, placas y tornillos ortopédicos/maxilofacial) en los huesos que soportan peso. Por lo tanto, además de ovejas, cerdos y perros, los conejos son un modelo comúnmente utilizado. Aunque la microestructura del hueso, la remodelación ósea, la marcha, y en consecuencia, las fuerzas biomecánicas que actúan sobre los huesos, difieren presumiblemente de las de los seres humanos, es común que estos materiales se prueben en animales¹²⁴.

Como método de evaluación adicional *in vivo*, se pueden verificar las alteraciones por estudios de gabinete y durante el período de seguimiento post operatorio. En contraste, este método no se puede utilizar en animales más grandes debido a su tamaño. Igualmente, es de suma importancia el conocimiento de las fuerzas biomecánicas para decidir, si el conejo o un modelo animal grande es la elección adecuada para la pregunta de investigación. También, tienen que ser evaluados especialmente los procesos de cicatrización y el posible fracaso de los implantes, con respecto a la carga efectiva para poder transmitir en un futuro, los resultados a las condiciones humanas. Adicionalmente, estos datos pueden ser utilizados para simular la remodelación ósea y para el cálculo de la estabilidad requerida del material de implante, incluso durante el período de curación de la fractura. El conejo es uno de los animales más utilizados para la investigación médica, se utiliza aproximadamente en el 35% de los estudios de investigación musculoesquelética. Esto es en parte, debido a la facilidad de manejo y tamaño. El conejo también es conveniente ya que alcanza la madurez esquelética poco después de la madurez sexual, alrededor de los 6 meses de edad¹²⁵.

Un inconveniente con el conejo como modelo animal para la evaluación de múltiples materiales de implante, es su limitación de tamaño. El estándar internacional para la evaluación biológica de dispositivos médicos recomienda un máximo de 6 implantes (3 de prueba y 3 implantes de control; Norma Internacional ISO 10993-6, 1994) por conejo; esta es la mitad del número máximo de implantes recomendadas para ovejas, perros, cabras y cerdos. Además, el tamaño del implante que puede ser introducido es limitado. No se recomienda colocar implantes cilíndricos mayores de 2 mm de diámetro y 6 mm de longitud; de nuevo, esto es la mitad de lo recomendable para otras especies más grandes mencionados. A pesar de esto, el conejo sigue siendo una opción muy popular para el ensayo de materiales de implante en el hueso.

Es evidente que hay grandes diferencias en la anatomía del hueso entre el conejo y el humano, tanto en el tamaño y la forma de los huesos como en la carga, esto debido a las diferencias en posición entre las dos especies. Histológicamente los huesos largos de conejo tienen una microestructura muy diferente a la de los humanos. En comparación con la estructura ósea humana, los conejos tienen una estructura de tejido longitudinal vascular primaria, que comprende canales vasculares de osteonas paralelas con el eje largo del hueso, las cuales rodean el canal medular así como la superficie perióstica. El hueso entre estas capas está compuesto de hueso denso Haversiano. El promedio del diámetro máximo de la osteona es de $223.79 \pm 47.69 \mu\text{m}$ con un diámetro mínimo de $50.79 \pm 9.71 \mu\text{m}$ ¹²⁶.

Existe poca literatura que describa las diferencias entre la composición y la densidad ósea humana y de conejo. Lo único reportado, indica similitud entre la densidad mineral ósea (DMO) y, la tenacidad a la fractura de hueso diafisario. (Wang X, 1998). En comparación con otras especies, tales como primates y algunos roedores, el conejo tiene el recambio esquelético más rápido (remodelación de Havers). Esto puede hacer que sea difícil extrapolar los resultados de estudios realizados en conejos sobre la probabilidad de una respuesta clínica en humanos. Sin embargo, los conejos se utilizan comúnmente para la detección de materiales de implante antes de la prueba en un modelo de animal más grande.

Los modelos de fractura animal han sido investigados ampliamente para identificar y caracterizar los procesos fisiológicos y patofisiológicos de la regeneración de fracturas de huesos largos. Se han investigado y desarrollado múltiples modelos de defectos críticos tibiales (simulando lo más parecido posible a las condiciones humanas), con el objetivo de obtener información sobre las interacciones de diversos injertos óseos. En comparación con las ovejas, los momentos y las fuerzas axiales de la tibia de los conejos, son muy parecidos a la

de los seres humanos. Sin embargo, toda una comparación de momentos entre las ovejas, conejos y humanos es muy difícil debido a la falta de mediciones directas, aún así, se considera que el conejo, es un modelo animal adecuado para estudiar la reparación de fracturas, sobre todo debido a su fácil manejo y a la viabilidad de los métodos de exámenes adicionales¹²⁷.

VEHÍCULOS/ANDAMIOS

La combinación de dos o más materiales para conformar biomateriales compuestos, ha permitido desarrollar y caracterizar nuevos implantes que pueden ser utilizados como potenciales sustitutos óseos.

Uno de los materiales poliméricos naturales que más se ha empleado en asociación con otros para obtener biomateriales compuestos es la colágena. Así, en distintas experiencias se ha combinado colágena liofilizada que puede conformar una red de aldehídos, por ejemplo, como soporte para hidroxapatita granulada. Luego de su implantación, este compuesto se comporta como un biomaterial osteoconductor. Sin embargo, hasta ahora la utilización exclusiva de colágena no ha demostrado capacidad para promover neoformación ósea¹²⁸.

Como ya se ha mencionado, un hueso sano tiene la capacidad de regenerar espontáneamente si el volumen del defecto no supera un cierto tamaño. En los casos de grandes defectos, o cuando el metabolismo óseo no es capaz de reparar adecuadamente el defecto óseo (osteoporosis o enfermedad de Paget), se pueden usar biomateriales de injerto de hueso tanto como puente de los defectos como para facilitar la formación de hueso en las áreas defectuosas¹²⁹.

Los biomateriales utilizados para injertos óseos deben proporcionar tres dimensiones de apoyo para la migración celular, la proliferación, la diferenciación, también deben actuar como un andamio para la formación de nuevo hueso en las áreas defectuosas. Los andamios deben poseer una amplia gama de características diferentes. Éstos deben de ser biocompatibles, biodegradables, porosos, con propiedades mecánicas adecuadas, maleables o inyectables, y lo más importante, tener compatibilidad o afinidad por las proteínas de la matriz ósea y factores osteogénicos¹³⁰.

En la última década, varios investigadores han observado una respuesta sinérgica cuando se utilizan en conjunto, factores bioactivos, andamios y células con el

objetivo de impulsar la ingeniería de tejidos óseos^{4, 131}.

Como antecedente se sabe, que en intentos iniciales para el uso de factores de crecimiento osteogénicos *in vivo* mediante inyección directa en el sitio, daba lugar a la curación limitada, debido a que la citoquina se eliminaba rápidamente del sitio de aplicación. Motivo por el cual, se diseñó un sistema capaz de contener y liberar sostenidamente las proteínas: factor de crecimiento de adsorción encapsulado con superficie polimérica; la liberación del péptido por desorción de la superficie del polímero y/o difusión a través de la barrera de polímero. Para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos, este sistema contiene el factor osteogénico el tiempo suficiente para estimular la quimiotaxis, la proliferación, la diferenciación y la secreción de matriz extracelular que rodea a las células madre mesenquimales¹³².

Los polímeros biodegradables de origen natural (p. ej.: gelatina, colágena, elastina, fibrina, ácido hialurónico, chitosán/chitin y alginato) han sido estudiados y utilizados como materiales para injertos óseos o de cartílago para reparar defectos con aplicaciones ortopédicas y odontológicas¹³³.

Los polímeros derivados naturalmente, son proteínas de matriz extracelular de diferentes tejidos y proveen un andamio para el soporte celular en el organismo. Como materiales de injerto óseo, los materiales derivados de proteínas poseen propiedades superiores sobre los materiales sintéticos debido a su excelente biocompatibilidad y su alta afinidad con otras proteínas de la matriz extracelular. La gelatina es una colágena desnaturalizada térmicamente que puede ser preparada por medio de extracciones ácidas (Tipo A) o alcalinas (Tipo B) de piel de cerdo, hueso o tendón, seguida por un tratamiento térmico en un ambiente acuoso (hidrólisis)¹³⁴. El producto final se separa usando diversos métodos, tales como sedimentación, filtración, y centrifugación¹³⁵.

El andamio en cuestión, se compone de unos 18 aminoácidos diferentes repetidos, los cuales forman una estructura bobina (colágeno tiene una estructura de triple hélice). glicina o alanina, forman entre un tercio o la mitad de todos los aminoácidos de la estructura de la gelatina, otros aminoácidos secundarios son prolina e hidroxiprolina. Estos materiales tienen diferentes formas (esponja, gel, película, fibras, etc.). La gelatina posee una larga historia de uso en la industria alimentaria como agente clarificante, como material de recubrimiento estabilizador y protector. En la industria farmacéutica se ha utilizado para la manufactura de cápsulas, ungüentos, cosméticos y recubrimiento de tabletas y en emulsiones¹³⁴. Debido a sus propiedades hemostáticas, las esponjas de gelatina han sido ampliamente utilizadas en cirugía como adhesivos y

absorbentes. La ventaja real de la gelatina (derivado de la colágena) sobre la colágena, es su extracción y preparación fácil, lo que resulta económico, obteniendo mayores rendimientos de producción de matriz de gelatina; aún así, lo más importante, es el hecho de que, a diferencia de la colágena, la gelatina no es antigénica en condiciones fisiológicas¹³⁶.

Debido a su flexibilidad en cuanto a la forma, biocompatibilidad, afinidad a proteínas y biodegradabilidad, las esponjas en base a gelatina pueden ser excelentes candidatos para utilizarse como andamios en injertos óseos o como material de liberación de fármacos. Las esponjas de gelatina han sido utilizadas como material de injerto de aplicación cardiovascular¹³⁷⁻¹³⁹, así como material de liberación de fármacos¹³⁵. A continuación, se detallará el tipo específico del andamio (Gelfoam®) utilizado en el proyecto de investigación.

El Gelfoam® es una esponja comprimida estéril diseñada para ser aplicada a las superficies de sangrado como hemostático. Se trata de un producto preparado de la purificación de la piel de los porcinos, el cual es de insoluble en agua, blanco, no elástico y poroso. Se puede cortar y no se deshilacha, siendo capaz de absorber y retener dentro de sus intersticios, muchas veces su peso de la sangre y otros fluidos.

Su modo de acción no se entiende completamente, en el caso de la hemostasia, su efecto parece ser más físico que el resultado de alterar el mecanismo de coagulación de la sangre. Cuando no se utiliza en cantidades excesivas, Gelfoam® se absorbe completamente, con poca reacción del tejido. Esta absorción es dependiente de varios factores, incluyendo la cantidad utilizada, el grado de saturación con sangre u otros fluidos, y el sitio de uso. Cuando se coloca en los tejidos blandos, generalmente se absorbe completamente dentro de cuatro a seis semanas, sin inducir excesivamente tejido cicatricial. No se recomienda que la esponja reabsorbible sea saturada con una solución antibiótica o espolvoreado con polvo antibiótico. El Gelfoam® se suministra en un sobre individual estéril disponible en 8 x 12.5 cm de tamaño.

3. Antecedentes

Desde la época de los egipcios, griegos y romanos se usaron materiales no biológicos, en particular, metales y otros materiales naturales para curar heridas y algunas enfermedades. Incluso en México algunas culturas prehispánicas usaban cuarzo y piedras preciosas para restaurar dientes o huesos. Pero el desarrollo de los materiales para la restauración del cuerpo que

conocemos actualmente, inició en la década de los 50, poco después de haber terminado la segunda guerra mundial. Uno de los problemas que impulsó el desarrollo de los materiales para restaurar el cuerpo humano, fue la necesidad que mucha gente tenía de éstos, dada la cantidad de personas con lesiones óseas: fue en esta etapa donde se empezaron a fraguar los conceptos de biomateriales, y biocompatibilidad así como el progreso en general en la ciencia de los biomateriales, para lo cual, es preciso hablar acerca del periodonto. El periodonto es la parte vital del diente. Se denomina periodonto a los tejidos que rodean y soportan los dientes. El periodonto está conformado por: encía, cemento dentario, ligamento periodontal y hueso alveolar. El periodonto es una unidad biofuncional que es parte del sistema masticatorio. El periodonto es una unidad compleja, cuyo principal objetivo es brindar la unión del diente (cemento) al hueso alveolar de la cavidad oral distribuyendo las fuerzas masticatorias y además constituyendo un reservorio de células necesarias para la homeostasis¹⁴⁰.

El cemento radicular es un tejido conectivo calcificado/mineralizado. Fue descrito por primera vez en 1835, no sufre procesos de remodelación pero si de aposición, el cual se mantiene durante toda la vida. Se ha clasificado como celular o acelular dependiendo de la presencia o ausencia de cementocitos en su estructura. Otra clasificación incluye cemento con fibras intrínsecas o extrínsecas, dependiendo de la presencia de fibras colágenas^{141,142} y en contraste con el hueso, el cemento no posee irrigación sanguínea de manera directa, inervación ni drenaje linfático; tiene un metabolismo lento y sigue un proceso de diferenciación (mineralización) distinto al de otros tejidos mineralizados. A pesar de estas diferencias, el cemento tiene una composición similar al hueso, por lo tanto, las enfermedades que afectan las propiedades del hueso, también afectan las del cemento.

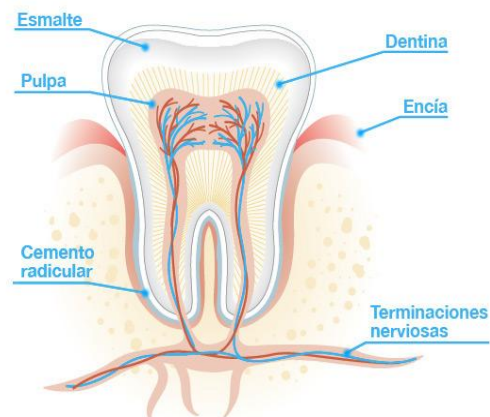


Figura 5. Esquema de un órgano dental (primer molar inferior).

El cemento, al igual que la dentina y el hueso, contiene moléculas bioactivas que promueven la migración, adhesión, y crecimiento de los fibroblastos e influyen en la síntesis de la matriz extracelular. Cabe mencionar que, algunas moléculas presentes en el cemento existen en mayor o menor cantidad o bien, están ausentes del todo en otros tejidos mineralizados, o en los tejidos conectivos (Figura 6)¹².

Además, está constituido por agua, por una matriz orgánica y una matriz inorgánica distribuidos en partes iguales. El 50% de la masa seca es inorgánica y corresponde a cristales de hidroxapatita (HA), mientras que el 50% restante corresponde a la matriz orgánica y contiene glicoproteínas, proteoglicanos y principalmente fibras de colágena¹⁴⁰.

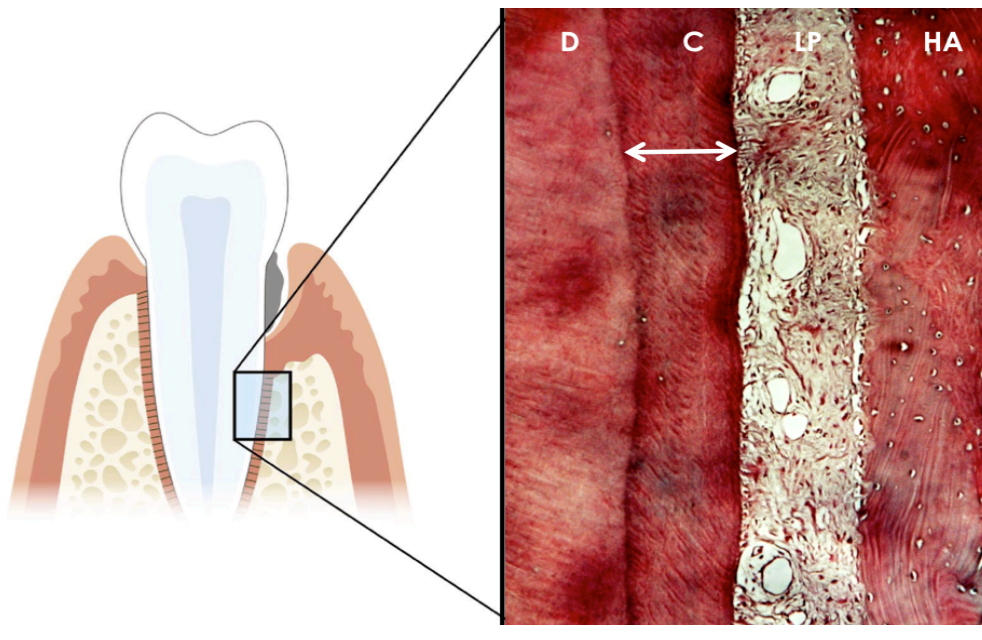


Figura 6. Esquema y microfotografía del periodonto. D. Dentina, C. Cemento, LP. Ligamento periodontal y HA. Hueso Alveolar.

- Matriz Inorgánica

El 50% del material inorgánico del cemento corresponde a la hidroxapatita (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$.

- Matriz Orgánica

- Fibras colágenas: las principales fibras de colágena son I (90% de toda la matriz orgánica, provee el andamio y regula la forma de los cristales de hidroxapatita) y III (5% y cubre las fibras de colágena I).

- Proteínas **no** colágenas
 - Glucoproteínas: sialoproteína ósea (BSP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN) y osteonectina, igual que en el hueso.
 - Proteoglicanos: son decorina, biglicano, versicano, lumicano, fibroglicano y fibromodulina, los cuales no son específicos del cemento.
 - Proteínas del esmalte: rara vez están presentes en cemento.
 - Fosfatasa alcalina: enzima participadora en la mineralización del cemento, su actividad se correlaciona positivamente con el grosor del mismo.
 - Factores de crecimiento: los factores específicos del cemento son, BMP2, BMP3, BMP4, BMP7, PDGF, aFGF, bFGF, TGF- β e IGF-I.
 - Proteínas específicas del cemento: existen tres proteínas específicas de cemento: Factor de Crecimiento del Cemento (CGF), Proteína del Cemento 1 (CEMP1) y Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (CAP)^{9, 10}.
 - **CGF** es el principal factor mitogénico del cemento humano y bovino. Actúa de forma sinérgica con el factor de crecimiento epidural (EGF), e induce diversas vías de señalización asociadas con la mitogénesis; promueve la migración y el crecimiento de las células progenitoras presentes en las estructuras adyacentes hacia la matriz de dentina y participa en su diferenciación a cementoblastos¹².
 - **CEMP-1** fue aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos (células derivadas de un cementoblastoma humano) cultivados *in vitro*. Es una proteína que participa en la diferenciación de los cementoblastos y promueve la mineralización de la matriz cementoide y de células no osteogénicas a través de la nucleación de cristales de fosfato octacálcico, lo que la convierte en una candidata importante para la regeneración de cemento y/o hueso, también promueve la adhesión de células del ligamento periodontal, células osteoblásticas del hueso alveolar y fibroblastos gingivales. Es una proteína única que tiene varias propiedades como inductor de la mineralización, proliferación, diferenciación y adhesión celular¹⁴⁻¹⁶.
 - **CAP** promueve la adhesión de fibroblastos gingivales, desempeña un papel importante en el reclutamiento y diferenciación celular durante la formación del cemento

radicular^{14, 15}. Está involucrada en procesos de adhesión, migración y mineralización¹¹. Ulteriormente se detallará a profundidad.

La proteína CAP ha sido aislada, caracterizada y purificada a partir de cemento humano y bovino mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal contra CAP (anti-CAP) de bovino (3G9); se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal así como en cementoblastos putativos *in vitro* e *in vivo*¹⁰. CAP también ha sido identificada en células derivadas de tumores humanos^{143, 144}. El gen de la proteína de adhesión del cemento se localiza en el cromosoma 10p13-p14 y tiene 6 exones¹⁴⁵. El ARN mensajero que codifica para la proteína de 140 aminoácidos se denomina PTPLA/CAP, y contiene los exones 1 y 3 de los seis del gen PTPLA/CAP. El ADNc está conformado de 1435 pares de bases¹⁷.

La proteína de adhesión del cemento radicular (CAP) es homónimo de PTPLA (expresada en el desarrollo y etapas posnatales de músculo cardíaco y en menor medida en músculo esquelético) y codifica para dos isoformas de 288 y 140 aminoácidos, respectivamente. La secuencia de **CAP** con ACCESSION/ locus AY455942, tiene 1435 nucleótidos y su marco de lectura abierta codifica para una proteína de **140 aminoácidos**, nucleótidos 37 a 457 (MGRLTEAAAAGSGSRAAGWAGSPPTLLPLSPTSPRCAATMASSDEDGTNGGASEAGEDRE APGERRRLGVLATAWLTIFYDIAMTAGWLVLAIAMVRFYMEKGTGRGLYKSIQKTLKFFQTFALLE VSFPSCCFSIAVIFM). Los 140 aminoácidos de la proteína CAP le confieren un **peso molecular de 14.920, carga eléctrica neutra (pI 7.78), hidrofóbica, movilidad relativa de 54–57 KDa** y su localización es citoplasmática en un 94.19% debido a la carencia de péptido señal¹⁴³.

De los 140 aminoácidos, 125 aminoácidos de la Terminal-N son idénticos a PTPLA, la cual codifica para 288 aminoácidos. El resto del carboxilo terminal de CAP constituye el sitio de *splicing* donador en el exón 2 de PTPLA. PTPLA/CAP posee dos sitios transmembranales y la proteína se trunca después del segundo sitio transmembranal. Esto elimina la secuencia de PTPLA "IVHCLIGIVPT" la cual es el sitio activo de la fosfatasa. Recientemente, se clonó e identificó un ARNm a partir de una biblioteca derivada de una línea celular de un fibroma cemento-osificante humano, que codifica para una isoforma truncada de la 3-hidroxiacil-CoA-dehidratasa 1 ó PTPLA (mayormente expresada en el desarrollo y etapas posnatales del músculo cardíaco y en menor medida en músculo esquelético)¹⁴⁵.

La familia de genes identificada como Proteínas Tirosinas parecidas a las Fosfatasa (PTPL por sus siglas en inglés), posee el sitio activo de la familia de las Proteínas Tirosinas Fosfatasa (PTPasas), con la diferencia de que una prolina reemplaza a la altamente conservada arginina. La familia de las PTPLs está conformada por lo menos de tres miembros, los cuales fuera del sitio catalítico no comparten secuencias homólogas con alguna otra familia de las PTPasas. PTPLA, uno de los tres miembros de la familia de las PTPL, es una proteína donde la substitución de arginina por prolina podría inactivarla; de ahí que, pueda carecer de actividad fosfatasa o tener una actividad anti-fosfatasa y por lo tanto, representar una clase distinta de PTPasas^{144, 145}.

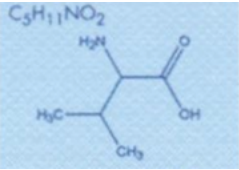
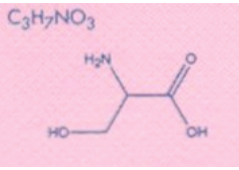
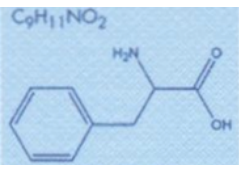
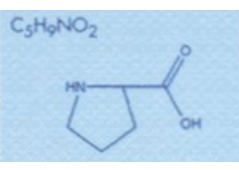
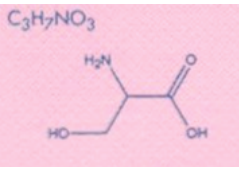
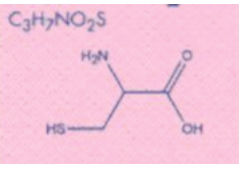
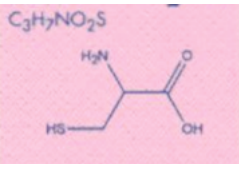
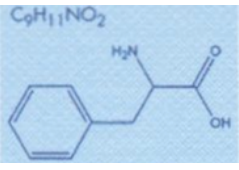
gagagctggc tgcgcgagc cccctgcgcg ctgcac	36
ATG GGG CGC CTG ACG GAA GCG GCG GCA GCG GGC AGC GGC TCT CGG	81
M G R L T E A A A A G S G S R	15
GCT GCA GGC TGG GCA GGG TCC CCT CCC ACG CTC CTG CCG CTG TCT	126
A A G W A G S P P T L L P L S	30
CCC ACG TCC CCC AGG TGC GCG GCC ACC ATG GCG TCC AGC GAC GAG	171
P T S P R C A A T M A S S D E	45
GAC GGC ACC AAC GGC GGC GCC TCG GAG GCC GGC GAG GAC CCG GAG	216
D G T N G G A S E A G E D R E	60
GCT CCC GGC GAG CGG AGG GCG CTG GGG GTC TTG GCC ACC GCC TGG	261
A P G E R R R L G V L A T A W	75
CTC ACC TTC TAC GAC ATC GCC ATG ACC GCG GGG TGG TTG GTT CTA	306
L T F Y D I A M T A G W L V L	90
GCT ATT GCC ATG GTA CGT TTT TAT ATG GAA AAA GGA ACA CAC AGA	351
A I A M V R F Y M E K G T H R	105
GGT TTA TAT AAA AGT ATT CAG AAG ACA CTT AAA TTT TTC CAG ACA	396
G L Y K S I Q K T L K F F Q T	120
TTT GCC TTG CTT GAG GTA AGT TTT CCA TCA TGC TGT TTT TCT ATT	441
F A L L E V S F F S C C F S I	135
GCT GTA ATA TTT ATG TGA a cattttttgt tgtgcacaaat	480
A V I F M *	140
caatatgatt ttgctgatta cataccacct atggatttgc tgaatgccaa tgttgacagt	540
ggtttattta atgttttcta ttattgacgt aatgattttt ttctatttgc ttacagatag	600
ttcactgttt aattggtgag tttttgtctc aattttatcac ttttattata aattgccttt	660
agggcaatag ttcaactgtt ttcttttta aggaattgta cctactctcg tgattgtgac	720
tggggcccaa gtgagttcaa gaatctttat ggtgtggctc attactcaca gtataaaacc	780
agtaagtgc acaaacatgt tgtctacttg agcctgcagg aaagctttcc atcatagga	840
atctaaaaata ttaacatttg tatatttcag gagggtgaa gttgggacaa aaaggagtgtg	900
ggtttgagtt ttagatgttg tgcattgact tagtgcctta gcagaatgac ttgatacac	960
aaacaaacc aaatattggc atcttagatc cgtaatatat tctcctttga tttttccag	1020
ttttgaaat cagtattcag gttctgtcaa ataacctgca gaaaatgttc tttctatag	1080
aagttcttt tcaatccaag ttgtctcttt tgattatgta atcgaagtgtg tcagtataca	1140
attattatt tctggccagc cgcagtgcc caccactgta atcccagcac ttggggaggc	1200
caaggcgggt ggatcacctg aggtcaggag tttagacca gcctggccaa catggtgaaa	1260
ccctgttct actaaaaata caaaaattaa ccaggcgtgg gggcgagcac ctggaatccc	1320
agctactcag gaggcaggg cagaagaatc gcttgaacc gagaggcaaa ggttcattg	1380
agctgagatt gtgccactgc actccagcct gggcgacaga gcgagactcc gtctg	1435

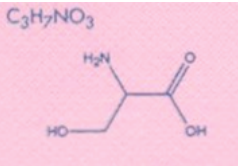
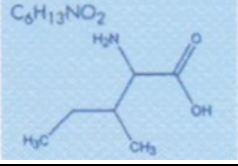
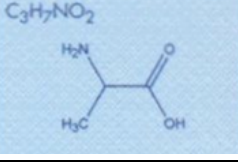
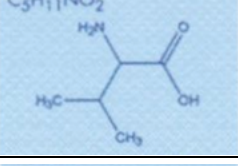
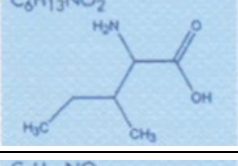
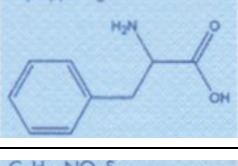
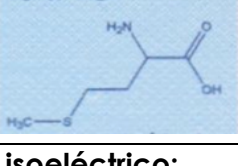
Figura 7. ARN MENSAJERO PTPLA/CAP. La secuencia codifica para una proteína de 140 aminoácidos denominada PTPLA/CAP. Esta isoforma dos se caracteriza por tener 15 aminoácidos (color rojo) no encontrados en la isoforma uno, también llamada PTPLA.

Los **15 aminoácidos (VSFSPCCFSIAVIFM, peso isoelectrico, pi: 5.48, peso: 1.65 KDa)** del carboxilo terminal, los cuales al no ser compartidos por otra secuencia, hacen única esta región de la proteína. De estos 15 aminoácidos constitutivos (Figura 7), 10 son hidrofóbicos y 5 hidrofílicos (Tabla 6), por lo cual, se considera un péptido hidrofóbico de estructura globular. Se considera un *splicing* alternativo del gen; tomando en cuenta que solo estos 15 aminoácidos pueden darle la especificidad de función a esta proteína, por lo cual, se sugiere el uso de esta secuencia, ya que su síntesis es más factible económica y técnicamente en comparación a la sustracción de una proteína (Figura 8 y 9). Cabe mencionar que, el *splicing*

alternativo de la proteína PTPLA/CAP ocurre en el sitio activo de la proteína PTPLA (288 aminoácidos).

Tabla 6. Péptido PTPLA/CAP

Secuencia aminoácidos: VSFPSCCFSIAVIFM				
	Código 1 letra	Código 3 letras	Aminoácido	
	V	Val	Valina	Hidrofóbico No polar
	S	Ser	Serina	Hidrofílico Polar, sin carga
	F	Phe	Fenilalanina	Hidrofóbico No polar
	P	Pro	Prolina	Hidrofóbico No polar
	S	Ser	Serina	Hidrofílico Polar, sin carga
	C	Cys	Cisteína	Hidrofílico Polar, sin carga
	C	Cys	Cisteína	Hidrofílico Polar, sin carga
	F	Phe	Fenilalanina	Hidrofóbico No polar

	S	Ser	Serina	Hidrofílico Polar, sin carga
	I	Ile	Isoleucina	Hidrofóbico No polar
	A	Ala	Alanina	Hidrofóbico No polar
	V	Val	Valina	Hidrofóbico No polar
	I	Ile	Isoleucina	Hidrofóbico No polar
	F	Phe	Fenilalanina	Hidrofóbico No polar
	M	Met	Metionina	Hidrofóbico No polar
Peso isoeléctrico:	pI: 5.48			
Peso:	1.65 KDa			

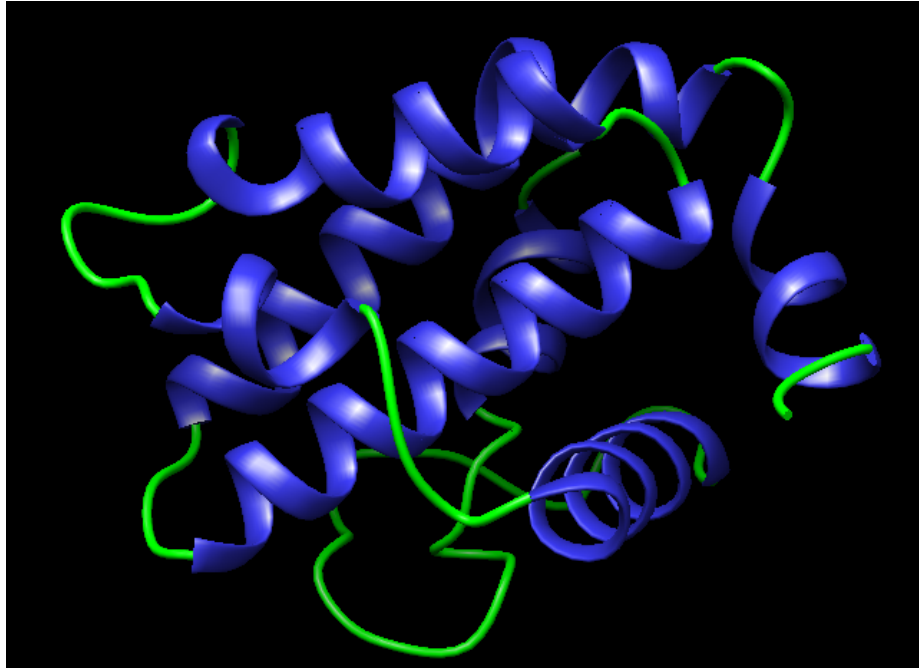


Figura 8. Modelo teórico de la proteína CAP; formado por α hélices y estructuras aleatorias.



Figura 9. Modelo teórico de la proteína CAP; de rosa, carboxilo terminal del péptido PTPLA/CAP, de azul claro, grupo amino.

En términos prácticos, CAP es expresada por células del folículo dental y promueve su adhesión y diferenciación^{14, 146, 147}. Las células del ligamento periodontal se unen fuertemente a CAP y forman tejido mineralizado parecido a cemento radicular y/o hueso *in vitro*^{144, 145}.

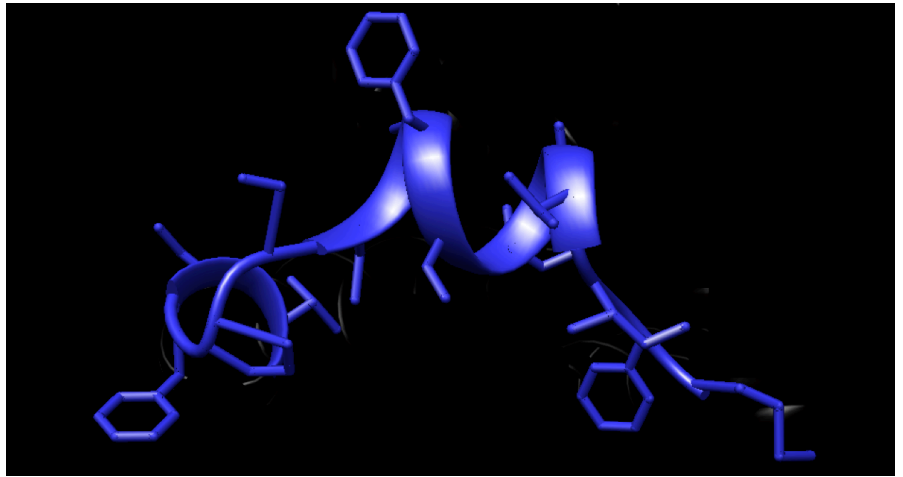


Figura 10. Modelo teórico del péptido PTPLA/CAP; estructura secundaria con cadenas laterales de la secuencia de los aminoácidos: VSFPSCCFSIAVIFM, valina-serina-fenilalanina-prolina-serina-cisteína-cisteína-fenilalanina-serina-isoleucina-alanina-valina-isoleucina-fenilalanina-metionina

El papel biológico CAP (Figura 10) es muy importante y trascendental ya que está involucrada en el papel quimiotáctico de células del ligamento periodontal y del hueso alveolar hacia la superficie radicular; la adhesión está mediada por el receptor de las integrinas $\alpha 5\beta 1$, teniendo una alta afinidad por la fibronectina, hidroxiapatita, dentina y cemento radicular. Aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina así como la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización. Se ha demostrado que en fibroblastos gingivales, la proteína CAP activa la vía de MAPK, mediada por ERK2, induciendo la expresión de c-fos, el cual es un factor de transcripción que participa en la proliferación celular. De igual manera, se ha demostrado que CAP induce el aumento de la proliferación celular en células troncales derivadas del ligamento periodontal humano¹⁴⁰.

CAP es aislada únicamente de la matriz de cemento⁹ localizada en cementoblastos y en cemento, y producida por líneas celulares derivadas de tumores de cemento; CAP está fuertemente asociada con el fenotipo cementoblástico. Esta proteína no solamente promueve la adhesión selectiva de células osteoblásticas, sino que también, entre las células del ligamento periodontal; aquellas que se unen fuertemente a CAP son capaces de formar, *in vitro*, un tejido mineralizado parecido al cemento y dentro de su función principal, está la **NUCLEACIÓN DE CRISTALES DE HIDROXIAPATITA** en un sistema libre de células *in vitro* (Figura 11)¹⁰.

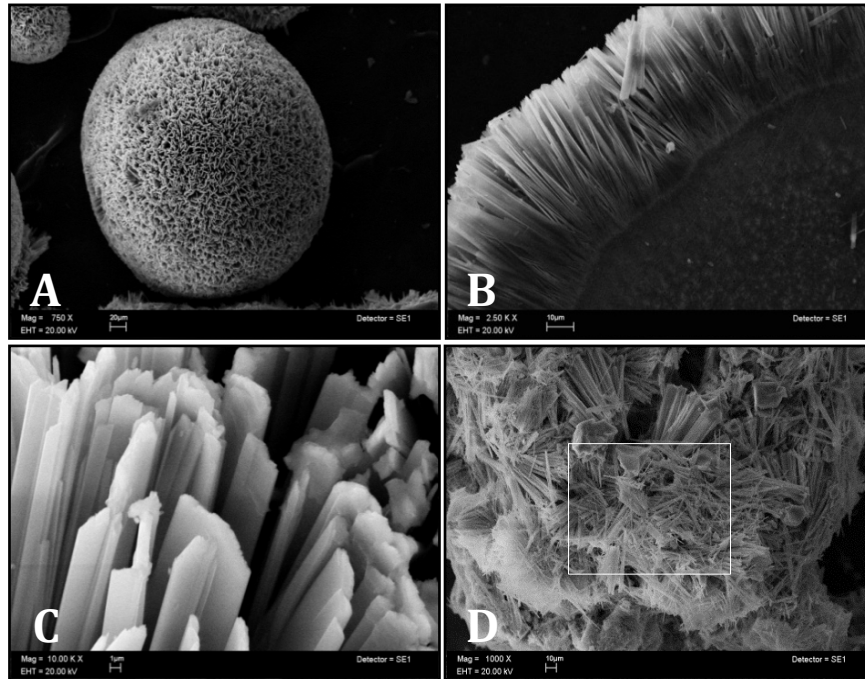


Figura 11. Las imágenes de SEM muestran formaciones cristalinas laminares que crecen a partir de un núcleo agrupadas en esférulas (A y B). El tamaño de las esférulas es variable, obteniendo un promedio cercano a los 160 μm . Se observan cristales de hidroxiapatita inducidos en un sistema libre de células en presencia del péptido. Nótese la formación de microesferas y la disposición de los cristales poliédricos (C y D).

Los estudios hechos por Yokokoji y Narayanan (2001), muestran que CAP como componente de la matriz, induce el ciclo celular mediante mecanismos comunes a otras moléculas. Saito y Narayanan (1999) demostraron que la adhesión mediada por CAP induce eventos en la fase G1, mediante el aumento de la expresión de ciclina D1. La transición de la fase G1 a S del ciclo celular no solo depende del acúmulo de ciclinas sino también de la regulación de inhibidores Cdk como p21 y p27. CAP regula los niveles de la proteína p21, contribuyendo a la progresión del ciclo celular. Saito y Narayanan (1999) demostraron que la adhesión mediada por CAP, en fibroblastos gingivales, induce la activación sostenida de ERK-2, la cual es necesaria para la expresión de AP-1, c-fos, c-jun y la expresión de la proteína reguladora ciclina D1 (AG, 2011). En hibridaciones en secciones de ratón, realizadas por Uwanogho y col. (1999), la expresión del ARNm de PTPLA se encontró en el corazón, hígado, pulmón, ganglio trigeminal y raíz dorsal en etapas embrionarias; así como, en el músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, testículo y riñón en etapas posnatales. A través de Northern Blot, Li y col. (2000), reportaron que en el humano la expresión de PTPLA está limitada a corazón de feto y de adulto, y en menor medida al músculo esquelético y liso, concluyendo su participación en el desarrollo y diferenciación cardíaca, así como, en otros eventos celulares¹⁴⁰.

MICROTOMOGRAFÍA

En los últimos años, ha crecido enormemente el uso de alta resolución de imágenes de microtomografía computarizada (μ TC) para evaluar la morfología trabecular y el hueso cortical en especímenes de animales y humanos. En la actualidad, hay disponibles varios sistemas de μ TC, y como resultado, hay varias aplicaciones y programas para la adquisición, evaluación y resultados de imágenes; la falta de consistencia y homogeneidad hace que los datos sean difíciles de interpretar o que sean imposibles de comparar entre diferentes estudios. Por lo cual, se instituyó un comité internacional para realizar una guía en la que se estandarizó la adquisición, análisis y evaluación de imágenes¹⁴⁸.

Estas guías pretenden dictar un enfoque para la evaluación de la microestructura ósea en modelos animales; proporcionan recomendaciones en relación con la terminología y las unidades estándar, lo que debe incluirse en la descripción de los métodos utilizados para un experimento dado, y un conjunto mínimo de variables de resultados que deben ser reportadas y son suficientemente flexibles para aplicarse a una amplia variedad de protocolos experimentales y para dar cabida a los futuros desarrollos en la adquisición y/o evaluación de imágenes.

Hasta hace poco, las técnicas histológicas cuantitativas se consideraban el estándar de oro para evaluar la arquitectura del hueso cortical y trabecular. Aunque el análisis histológico proporciona información única sobre la celularidad y los índices dinámicos de la remodelación ósea, tienen limitaciones con respecto a la evaluación de la microarquitectura ósea debido a que los parámetros estructurales se derivan del análisis estereológico de un par de secciones en 2D (asumimos la interpretación de una estructura real de 3D –tercera dimensión- al supuesto de una estructura subyacente plana en 2D –dos dimensiones-) ¹⁴⁹.

Fue por primera vez en 1980 que Feldkamp¹⁴⁸ describió el μ TC como el estándar de oro para la evaluación de la morfología ósea y la microarquitectura en ratones y en otros pequeños modelos animales *ex vivo*. El microtomógrafo utiliza datos de atenuación de rayos X adquiridos en múltiples ángulos de visión para reconstruir una representación 3D del espécimen que caracteriza la distribución espacial de la densidad del material, que es suficiente para la investigación de estructuras tales como trabéculas óseas de ratón que tienen anchuras de aproximadamente 30 a 50 μ m¹⁵⁰.

En diversos estudios se ha establecido la excelente reproducibilidad y exactitud del microtomógrafo en las mediciones de la morfología ósea. La precisión de las mediciones de la morfología μ TC ha sido evaluada por la comparación de ellas con medidas tradicionales de histomorfometría 2D tanto en animales como en humanos. Estos estudios muestran que las mediciones morfológicas en 2D y 3D para el μ TC correlacionan muy bien con las mediciones de histomorfometría en 2D [$r= 0.84-0.92$]¹⁵¹⁻¹⁵³.

Hay muchas ventajas de utilizar μ TC para la evaluación de la masa ósea y la morfología de los especímenes extirpados (el aparato sólo cuenta con un pequeño espacio para el análisis del tejido, de tal forma que de tratarse de una especie grande, tiene que ser desarticulada la región para poder ser analizada)^{154, 155}:

1. Se permite la medición directa 3D de la morfología trabecular, tales como el grosor trabecular y la separación, en lugar de deducir estos valores basados en modelos 2D estereológicos, como se hace con las evaluaciones histológicas estándar¹⁵⁶.
2. En comparación con la histología en 2D, se analiza un volumen significativamente mayor de interés¹⁵⁷.
3. Las mediciones se pueden realizar con un rendimiento mucho más rápido que un análisis histológico típico de histomorfometría debido a que el hueso primero debe de descalcificarse, lo que significa mayor tiempo de espera para obtener los resultados¹⁵⁸.
4. La evaluación de la morfología ósea en los escaneos μ TC no es destructiva; por lo tanto las muestras se pueden utilizar posteriormente para otros ensayos, tales como los histológicos o ensayos mecánicos.
5. Por último, el μ TC puede utilizarse para proporcionar una estimación de la mineralización de tejido óseo por comparación de la atenuación de los rayos X en el hueso con la de los estándares de hidroxapatita, aunque esto debe hacerse con cuidado debido a las limitaciones de la fuente de rayos X policromáticos típicos para instrumentos de escritorio¹⁵⁹.

También este sistema (medición de unidades Hounsfield en microtomógrafo) otorga de manera sencilla una evaluación sobre las características del tejido neoformado (así como los cambios en la densidad mineral ósea, BMD) ya que las Unidades Hounsfield (UH) determinan valores de atenuación de los tejidos, teniendo una característica propia cada uno de ellos¹⁶⁰. El microtomógrafo crea

toda una nueva clase de detectores de PET de alta resolución sin zonas muertas para comprometer la sensibilidad.

La curva de calibración de las Unidades Hounsfield (usando la hidroxapatita), da como resultado la densidad mineral ósea (g/cm^3)¹⁶¹, sin embargo, este método no se utilizará en este proyecto debido a que por la falta de densidad de las trabéculas no nos permite la medición de la densidad ósea del tejido neoformado^{162, 163}.

Tamaño Voxel y resolución de la imagen

Un vóxel es la unidad discreta del volumen de exploración como resultado de la reconstrucción tomográfica. Se trata de un volumen 3D que representan dos dimensiones dentro de la rebanada y el grosor del corte. Típicamente, los voxels de las imágenes μTC tienen las tres dimensiones iguales, por lo que se describen como voxels isotrópicos. Idealmente, debería de utilizarse el tamaño de vóxel más pequeño (es decir, más alta resolución de escaneado); sin embargo, las exploraciones de alta resolución requieren largos tiempos de adquisición, ya que deben recoger más proyecciones y generar grandes conjuntos de datos. Por lo tanto, se debe considerar cuidadosamente el equilibrio entre el tamaño de voxel y el tiempo de exploración. Las diferencias en el tamaño del vóxel (por ejemplo, 10 a 20 μm) tienen poco efecto en la evaluación de las estructuras con espesor relativamente grande (es decir, de 100 a 200 μm), tales como el hueso cortical o trabéculas en los seres humanos o modelos animales grandes.

Sin embargo, al analizar estructuras más pequeñas como las trabéculas de ratón, rata o conejo con dimensiones aproximadas de 20 a 60 μm , el **tamaño del voxel puede tener efectos muy significativos en los resultados**¹⁵⁵.

Región de interés

Al configurar la adquisición de exploración, es fundamental asegurar que hay una cantidad suficiente de la muestra escaneada para permitir mediciones de la morfología y densidad fiables y reproducibles.

La región de interés (ROI, por sus siglas en inglés, *region of interest*) debe estar basada en la ubicación del punto de inicio de la exploración o de la región contorneada de interés y el tamaño (es decir, la longitud) de la región. El punto de partida debe ser definido como un absoluto (milímetros) o la distancia relativa (porcentaje) de un punto de referencia reproducible, como la meseta tibial proximal, la placa de crecimiento metafisaria, la media de la diáfisis, o en otro sitio

anatómico adecuado. El tamaño de la región de escaneado debe ser definida como la distancia (por ejemplo, proximal o distal) desde el punto de partida. Las distancias deben informarse en unidades del SI (milímetros o micro metros); el número de cortes se puede determinar conociendo fácilmente el tamaño del voxel.

La evaluación de hueso trabecular requiere una ROI adecuada, se debe tener una consideración especial de la distancia en la que se encuentra la ROI dentro de la diáfisis de huesos largos (que principalmente es hueso cortical). Si la ROI se encuentra demasiado lejos de la diáfisis, disminuirá la media de la fracción relativa del volumen de hueso contenida en la región metafisaria. **Para representar la arquitectura ósea trabecular con precisión, la región de interés (ROI) deberá contener por lo menos de tres a cinco longitudes intertrabeculares.** A la mitad de la diáfisis, las mediciones de espesores corticales 3D deberán basarse en que la ROI es más larga y la cortical es más gruesa; de lo contrario, se subestimarán el espesor¹⁶⁴.

Otra cuestión importante se refiere a la definición de la ROI cuando se comparan muestras de hueso de diferentes tamaños (longitud del hueso). El objetivo en estos casos será elegir una ROI que sea anatómica y biomecánicamente comparables entre las muestras. Por lo tanto, en situaciones en las que la longitud del hueso difiere entre los grupos, se recomienda obtener una ROI de tamaño uniforme y sobremuestrear los huesos más cortos y disminuir las muestras de los huesos más largos.

Entonces, puede ser más apropiado para definir la ROI como un porcentaje de la longitud del hueso o buscar puntos de referencia de fácil identificación, en lugar de definir la zona de interés como un tamaño constante.

Los distintos fabricantes de μ TC ofrecen diferentes paquetes de software para el cálculo de los índices para el cálculo de la morfología y densidad ósea; sin embargo, para que los resultados sean confiables, todos los algoritmos deben ser implementados utilizando las referencias indicadas por las guías internacionales (tabla 7 y 8), y el nombre de los índices y unidades siempre deben ser estandarizados¹⁶⁵.

Tabla 7. Definición y descripción de los resultados en 3D obtenidos de la microarquitectura trabecular ósea

Abreviatura	Variable	Descripción	Unidad estándar
TV	Volumen total	Volumen de la región entera de interés	mm ³
BV	Volumen óseo	Volumen de la región segmentada del hueso	mm ³
BS	Superficie ósea	Superficie de la región segmentada del hueso	mm ²
BV/TV	Fracción de volumen óseo	Relación entre el volumen del hueso segmentado y el volumen total de la región de interés	%
BS/TV	Densidad de superficie ósea	Relación entre la superficie del hueso segmentado y el volumen total de la región de interés	mm ² /mm ³
BS/BV	Superficie ósea específica	Relación entre la superficie del hueso segmentado y el volumen del hueso segmentado	mm ² /mm ³
Conn.D	Densidad de conectividad	Medida del grado de conectividad de las trabéculas normalizado por TV	1/mm ³
SMI	Índice de la estructura del modelo	Indicador de la estructura de las trabéculas; SMI será de 0 para placas paralelas y 3 para barras cilíndricas	
Tb.N	Número trabecular	Medida de la cantidad promedio de número de trabéculas por unidad de longitud	1/mm
Tb.Th	Grosor trabecular	Media del grosor de las trabéculas, evaluadas a través de métodos directos en 3D	mm
Tb.Sp	Separación trabecular	Media de la distancia entre las trabéculas, evaluadas a través de métodos directos en 3D	mm
Tb.Th.SD	Desviación estándar del grosor trabecular	Medida de la homogeneidad del grosor de las trabéculas, evaluadas a través de métodos directos en 3D	mm
Tb.Sp.SD	Desviación estándar de la separación trabecular	Medida de la homogeneidad de la separación de las trabéculas, evaluadas a través de métodos directos en 3D	mm
DA	Grado de anisotropía	1= isotrópica, >1= anisotrópica por definición; DA= longitud más larga dividida por la longitud más corta del vector de intercepción	Dimensiones variables
MIL	Longitud media de intercepción	Mediciones de anisotropía estructural	Dimensiones variables

Tabla 8. Definición y descripción de los resultados en 3D obtenidos de la morfología cortical ósea

Abreviatura	Descripción de la variable	Unidad estándar
Tf.Ar	área total de la sección transversal al interior del periostio	mm ²
Ct.Ar	Área de hueso cortical= volumen cortical (Ct.V)/(número de rebanadas o crecimientos x grosor de las mismas)	mm ²
Ma.Ar	Área medular (o médula ósea)	mm ²
Ct.Ar/Tf.Ar	Fracción del área cortical	%
Ct.Th	Promedio del grosor cortical	mm
Ps.Pm	Perímetro del periostio	mm
Ec.Pm	Perímetro endocortical	mm
/ap	Momento de inercia sobre el eje anteroposterior	mm ⁴
/ml	Momento de inercia sobre el eje mediolateral	mm ⁴
/max	Máximo momento de inercia	mm ⁴
/min	Mínimo momento de inercia	mm ⁴
J	Momento polar de inercia	mm ⁴
Ct.Po	Pososidad cortical: volumen de poros en una región (Po.V, mm ³)/volumen total de compartimentos del hueso cortical (Ct.V, mm ³)	%
Po.N	Número de poros	<i>n</i>
Po.V	Volumen total de poros	mm ³
AvgPo.V	Promedio del volumen de poros = Po.V/Po.N	mm ³
Po.V.SD	Desviación estándar del volumen de poros	mm ³
Po.Dn	Densidad del poro= número de poros (Po.N, <i>n</i>) / volumen total de compartimentos del hueso cortical Ct.V (mm ³)	mm ⁻³

Morfometría ósea trabecular

El método estándar de describir cuantitativamente la arquitectura del hueso es a través del cálculo de los índices morfométricos, también conocidos como morfometría cuantitativa. En el pasado, las características de microarquitectura de hueso trabecular y cortical se han investigado mediante el examen de las secciones 2D de biopsias de hueso, junto con el cálculo de parámetros morfométricos utilizando métodos estereológicos.

Considerando que algunas mediciones como BV/TV y la relación del volumen-superficie del hueso (BS/TV) se puede obtener directamente a partir de imágenes 2D, varios parámetros clave, incluyendo el grosor trabecular (Tb.Th), la separación trabecular (Tb.Sp), y el número trabecular (Tb.N), se derivan indirectamente después de asumir un modelo de estructura fija tal como una estructura en forma de varilla o de placa. Estos modelos altamente idealizadas pueden ser

considerados como dos extremos de un espectro, donde la arquitectura real es una mezcla de ambas varillas y placas, con la composición precisa de diferentes sitios esqueléticos, estado de la enfermedad, el tratamiento, y la edad. Así, las correlaciones entre Tb.Th, Tb.Sp y las mediciones hechas de Tb.N usando métodos 2D, requieren supuestos sobre la estructura subyacente y también necesitan mediciones independientes del modelo 3D de estos parámetros y los modelos en 2D pueden variar. Por lo tanto, las desviaciones en la estructura trabecular de la placa o de otros modelos óseos, conducirán a errores impredecibles en los parámetros derivados indirectamente. Por esta razón, y para aprovechar al máximo las medidas volumétricas, se recomienda que los algoritmos independientes del modelo 3D se utilicen para el cálculo de la microarquitectura del hueso trabecular de las imágenes obtenidas por el microtomógrafo¹⁶⁵.

Los índices morfométricos básicos son: la medición de volumen óseo (BV) y el volumen total de interés (TV). Estos índices se pueden derivar de cualquiera método de conteo de voxel simple o un método más avanzado de volumen, también conocido como cubos volumétricos de marcha (VOMACs por sus siglas en inglés, *volumetric marching cubes*) donde, el último método puede ser más preciso para estructuras pequeñas o muy complejas. La relación de estas dos medidas se denomina fracción de volumen óseo (BV/TV). Otra medida básica es la superficie del hueso (BS), la cual se calcula por triangulación de la superficie del objeto usando un algoritmo de marcha-cubos. La densidad de superficie del hueso (BS/TV) y la superficie específica del hueso (BS/BV) pueden derivarse fácilmente dividiendo el volumen total o el volumen de hueso, respectivamente. Como se señaló anteriormente, la media de espesor trabecular (Tb.Th), la media de la separación trabecular (Tb.Sp), y la media del número trabecular (Tb.N) deberán basarse en cálculos en 3D, es decir, es un método de la esfera de ajuste, donde el grosor de la medida de las esferas y su separación están enfocadas con el objeto de determinar el diámetro de la mayor esfera posible que puede estar instalada a través de cada voxel que está completamente contenida dentro del objeto (o de fondo) y luego promedie estos diámetros. Este enfoque produce un espesor razonable promedio de la estructura o del fondo de la estructura ósea, donde el último refleja la media de la separación trabecular (Figura 12)¹⁶⁶.

La media del número trabecular se calcula como la inversa de la media de la distancia entre la mitad del eje de la estructura, que se deriva a través del método de la transformación de la distancia.

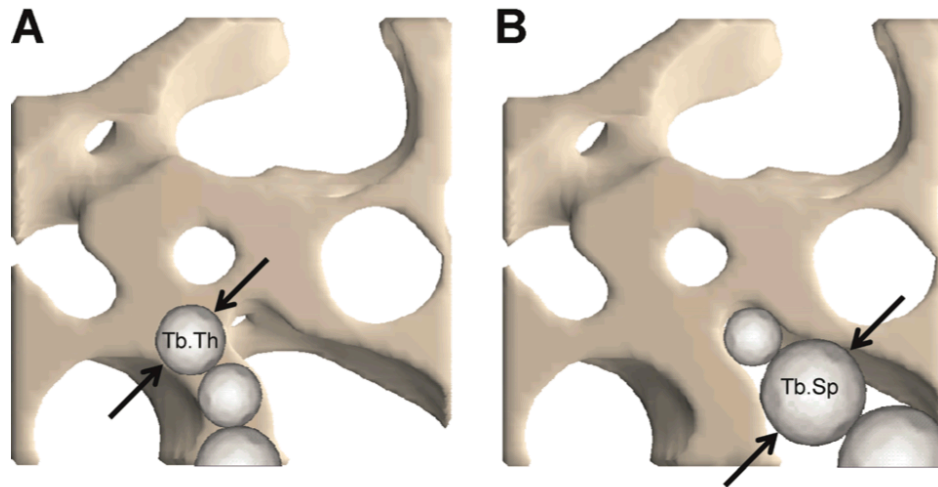


Figura 12. Representación esquemática del algoritmo utilizado para el método directo de 3D para calcular el grosor trabecular (A) y la separación (B). Las distancias 3D se calculan por el ajuste esferas dentro de la estructura (es decir, para evaluar el promedio del grosor trabecular) o dentro y al fondo (espacio de la médula, es decir, para evaluar el promedio de la separación trabecular). El diámetro medio de las esferas representa el espesor del objeto, y la desviación estándar del diámetro representa la variabilidad en el espesor del objeto. (Imagen obtenida del artículo *Guidelines for bone microstructure assessment using μ CT* -cortesía de Andrés Laib, PhD, Scanco Medical AG-).

Una ventaja de este enfoque para el cálculo de la morfometría trabecular es que no sólo se calcula por promedios, sino que también las medidas pueden ser calculadas por medio de la variación de esas medidas y pueden ser expresadas por la desviación estándar. Varios estudios muestran que, el grado de anisotropía (es decir, una descripción de cómo se orientan los elementos estructurales) junto con la fracción de volumen de hueso, pueden explicar una parte significativa de las propiedades mecánicas de una estructura en 3D. Por lo tanto, se han propuesto varios métodos para estimar la anisotropía del hueso trabecular, incluyendo los basados en la longitud media de intercepción (MIL), la orientación del volumen (VO), la distribución de volumen de las formas trabeculares (SVD), y la distribución de la longitud de esas mismas formas (SLD).

Se desarrolló un índice denominado *conectividad* (Conn), el cual caracteriza la redundancia de las conexiones trabeculares. La conectividad se deriva del número de Euler, dicho número es una medida topológica fundamental que cuenta el número de objetos, el número de cavidades de la médula totalmente rodeada por hueso, y el número de conexiones que deben ser rotas para dividir la estructura en dos partes. Dado que la conectividad depende del tamaño de la

estructura, es más apropiada para presentar este índice como una densidad [densidad de conectividad (Conn.D)] dividiéndola por el volumen total¹⁶⁷.

Para estimar las características de las trabéculas óseas, se mide el índice de la estructura del modelo (SMI) que fue desarrollado por Hildebrand. Este índice es de 0 cuando las paredes trabeculares son perfectas, 3 para las barras/piso son perfectas, y 4 para esferas perfectas. Sin embargo, aunque este índice fue diseñado para producir valores en el rango de 0 a 4, puede suceder que los valores fuera de este rango produzcan valores muy altos o muy bajos de fracción de volumen del hueso, y la interpretación de estos valores sea difícil¹⁶⁸.

Densidad mineral del tejido óseo

Aunque el microtomógrafo se ha usado principalmente para generar información acerca de la estructura ósea, también se puede utilizar para estimar la densidad mineral del tejido (TMD, por sus siglas en inglés *tissue mineral density*). La TMD se diferencia de la densidad mineral ósea (DMO) en la que la densidad mineral se calcula a partir del valor medio de la atenuación de sólo el tejido óseo y no incluye los valores de atenuación de voxels sin hueso, como se hace para la densidad mineral ósea (ya sea por volumen o área).

El coeficiente de atenuación lineal medido por μ TC, se puede convertir a la densidad física (mg/cm^3 de HA), dependiendo de la densidad física y la densidad de los electrones del hueso. Debido a que al igual que la cantidad de tejido mineralizado y el grado de mineralización varían entre los huesos, el genotipo, o los tiempos durante el crecimiento y envejecimiento, el μ TC proporciona una media para incorporar una medida de mineralización en un diseño de estudio que es rápido y no destructivo en comparación con los métodos tradicionales para evaluar mineralización, como la microrradiografía cuantitativa, la microscopía electrónica de retrodispersión, o el contenido de ceniza¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

Análisis de datos óseos mediante programa BoneJ

Para fines de investigación, los huesos comúnmente se registraban por tomografía computarizada (TC) y/o microtomografía (μ TC), desafortunadamente, muchas de esas imágenes pesaban más de 1 GB, y no existía un software gratis (la mayoría requieren de una cuota costosa de licencia por equipo) que pudiera procesar grandes conjuntos de datos (> 60 MB), o que tuviera todas las características requeridas.

Por lo cual, se desarrolló *BoneJ*, un programa que es funcional, flexible, de procesamiento de imágenes de dominio público y el cual puede ser aplicado a mediciones óseas estándares (programa validado <0,01%). *BoneJ* presenta varias ventajas para los usuarios de software de morfometría ósea. Se integra con diverso ecosistema de complementos de *ImageJ*, por lo que se puede realizar una serie personalizable de procesos para obtener resultados experimentales de una amplia gama de formatos de archivo de imagen sin tener que cambiar entre los programas o plataformas. Además, se puede automatizar una secuencia de pasos de procesamiento de imágenes con un macro y se pueden aplicar a un lote de imágenes, con esto se mejora el flujo de trabajo al reducir el tiempo dedicado a ejecutar manualmente los comandos¹⁶⁹.

Este programa está diseñado principalmente para medir la geometría del hueso, pero los parámetros no se limitan al hueso y se puede generalizar a muchas espumas, vigas, partículas o poros, como lo que se encuentra en los alimentos, materiales de ingeniería, estructuras biológicas y el suelo. A diferencia de los programas comerciales, *BoneJ* está disponible de forma gratuita; también es independiente del hardware del escáner, por lo que se puede conseguir sin tener que comprar un escáner y se puede utilizar en una ubicación diferente al dispositivo donde se adquirieron las imágenes (que muchas veces se encuentran alojados en hospitales, laboratorio de un colaborador o una instalación de sincrotrón, etc.). *BoneJ* está escrito en el lenguaje de programación Java, así que donde quiera que haya un entorno de ejecución de Java (JRE), se puede utilizar *ImageJ* y *BoneJ*. Java se puede instalar comúnmente en Microsoft Windows, Unix y sistemas operativos tipo Unix (incluyendo Mac OS X y GNU/Linux), por lo que *BoneJ* es independiente del sistema operativo del sistema. Si el hardware, el sistema operativo y JRE son de 64 bits, el tamaño de la imagen máxima que puede ser procesada por *BoneJ* está limitado sólo por la memoria física instalada. El programa funciona en la mayoría de las computadoras modernas, pero para procesar y visualizar grandes conjuntos de datos, se recomienda ejecutarlo en un sistema de 64 bits con la mayor cantidad de memoria RAM y el mayor número de núcleos de CPU como sea posible, y con un adaptador de gráficos acelerados por hardware. El libre acceso a los métodos complementa perfectamente el requisito de muchas revistas para el acceso abierto a los datos y, además reduce la barrera de la replicación de los estudios. El desarrollo de programa es financiado principalmente por becas de investigación gubernamentales, por lo que se propaga ampliamente para crear el mayor bien público.

4. Definición del problema

La necesidad de moléculas que promuevan la regeneración ósea es ampliamente reconocida. El problema a resolver radica en proponer una formulación capaz de promover y/o estimular la formación de hueso, sin que este crecimiento resulte incontrolable y/o ectópico, replicando así, los procesos fisiológicos normales para la formación de hueso.

El estudio del cemento radicular a lo largo de los años, ha derivado en grandes aportaciones para la biología molecular así como para la regeneración periodontal. Recientemente, los estudios sobre CEMP1 y PTPLA/CAP se han enfocado en la regeneración de tejidos mineralizados en defectos óseos de tamaño crítico en animales pequeños, obteniendo buenos resultados, por lo que esto nos lleva a plantearnos:

¿Se formará hueso en un defecto severo de la tibia del conejo, colocando el péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP) a diferentes tiempos (dos, cuatro y cinco meses)? y, en caso de promover la neoformación ósea, ¿qué cantidad de hueso se formará? así como, ¿cuál es la calidad/densidad del hueso formado con la aplicación del péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP)?.

5. Justificación

Después de la sangre, el hueso es el tejido humano que se emplea con más frecuencia como injerto. La demanda de tejidos u otros sustitutos para reconstruir los defectos del aparato locomotor está en constante aumento. Los injertos tisulares se han impuesto progresivamente como posibilidad terapéutica en casi todos los campos de la cirugía. La idea de trasplantar una parte de un organismo sin vida a otro vivo y enfermo, ha sido objeto de múltiples intentos fallidos durante décadas. El Registro Nacional Articular de Inglaterra, ha recopilado datos de reemplazo de articulaciones de cadera y rodilla, conteniendo más de 1,4 millones de operaciones en dicho reporte (2003 al 2013); aunque otros autores recopilan datos de 1.000.000 de prótesis articulares por año en el mundo¹⁷⁰. Se calcula que anualmente se invierten 500 millones de dólares en injertos óseos en los Estados Unidos y se realizan 289 mil procedimientos anuales en los que se tiene que colocar algún injerto óseo¹¹³. En México 1 de cada 12 mujeres mexicanas y 1 de cada 20 hombres mexicanos de más de 50 años sufrirán una fractura de cadera. El costo directo total de las fracturas de cadera/injertos óseos estimado en 2006 fue un poco mayor a 97 millones de dólares (costo individual por evento de 4,365.50 dólares); la estimación para el año 2025 varía de 213 a más de 466 millones de dólares y de 555 a 4,088 millones de dólares para el año 2050¹⁷¹.

Debido a la gran afluencia y requerimientos de injertos óseos, es obvia la necesidad de contar con alternativas al autoinjerto óseo, y en particular de contar con un sustituto ideal del hueso^{172, 173}.

Los defectos óseos severos, representan un problema y un reto clínico en su tratamiento, algunas de las opciones incluyen: autoinjerto vascularizados y no vascularizados, aloinjertos, xenoinjertos, aloplásticos y prótesis fabricadas a la medida. Dentro de los cuales, los injertos de hueso autólogo se consideran el "estándar de oro" para el tratamiento de la regeneración ósea, sin embargo, presentan algunos inconvenientes. Por lo cual, consta una fuerte necesidad clínica en busca de alternativas para desarrollar materiales que superen los inconvenientes de dichos injertos.

Con el advenimiento de la ingeniería tisular, se abre una nueva opción para la regeneración ósea; que une los conocimientos de biología celular, ingeniería biomecánica, biomateriales y ortopedia. En general, involucra la asociación de

células con andamios naturales o sintéticos que reproduzcan así, un modelo tridimensional¹⁷⁴.

Las nuevas tecnologías terapéuticas de la ingeniería tisular, inducen la regeneración ósea empleando factores de crecimiento, células osteogénicas, membranas biocompatibles o la combinación de estas medidas terapéuticas¹⁷⁵.

La implantación de péptidos (PTPLA/CAP) que induzcan la regeneración ósea es importante para la utilización clínica en regeneración ósea y periodontal, debido a que poseen un alto potencial osteogénico, no son inmunogénicos, son fáciles de obtener y de manejar y no precisan costos elevados. Así mismo, la utilización de un vehículo biocompatible acarreador (colágena reabsorbible), facilita la rápida vascularización y por ende, la neoformación ósea, disminuyendo así, la necesidad de la utilización de sitios donadores de hueso (reduciendo su morbilidad), resorción y desvitalización de los injertos, transmisión de infecciones, costos elevados, fisioterapia y anestesia general, entre otras.

6. Objetivos

- Objetivo general
 - Determinar si el péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP) estimula la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico (10 mm) en la tibia de conejos Nueva Zelanda.
- Objetivos específicos
 - Evaluar si el péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP) promueve la neoformación ósea con características histológicas similares al hueso sano.
 - Determinar la cantidad de tejido neoformado por el péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP) en el defecto de tamaño crítico en la tibia de conejos Nueva Zelanda en los conejos experimentales en comparación con los conejos de los grupos controles.
 - Calcular la densidad del tejido neoformado por el péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP) en el defecto de tamaño crítico en la tibia de conejos Nueva Zelanda experimentales.

7. Hipótesis

- **Hipótesis de trabajo**

1. El péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP), induce la regeneración ósea en defectos segmentales de tamaño crítico en la tibia de conejos Nueva Zelanda.
2. La regeneración ósea inducida por el péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP), tendrá las características histológicas de un hueso sano y vital.
3. Los grupos controles 1 y 2 con el defecto segmental de tamaño crítico tibial, no regenerará hueso en comparación al grupo experimental.

- **Hipótesis nulas**

1. El péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP), no induce la regeneración ósea en defectos segmentales de tamaño crítico (10 mm) en la tibia de conejos Nueva Zelanda.
2. La regeneración ósea inducida por el péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (PTPLA/CAP), no tendrá las características histológicas de un hueso sano y vital.
3. Los grupos controles 1 y 2 con el defecto segmental de tamaño crítico tibial, regenerarán hueso en comparación al grupo experimental.

8. Metodología

- Tipo de estudio

Estudio experimental: experimental, comparativo y abierto.

- Población en estudio

Se utilizaron 9 conejos adultos blancos, cepa Nueva Zelanda, machos, de 6 meses de edad (2,800 – 3,600 mg), criados en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

- Selección y tamaño de la muestra

Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico. Se seleccionaron 9 conejos (siguiendo el examen de Dunnett: múltiples comparaciones de tratamientos contra un análisis de poder de control usando un resumen de las simulaciones del grupo de control y dos grupos de tratamiento⁶¹, comparar la media del tratamiento con la media del control¹⁷⁶).

Promedio de tamaño de muestra de 3 para un tamaño total de muestra de 9. Este diseño logra un poder de 0,9945 y un poder pareado de 0.9945 utilizando el Test de Dunnett. La tasa de error promedio es de 0.050 y la tasa de error en este estudio, se calcula de 0.048 . El promedio de la desviación estándar de la distribución es 1.0 . Estos resultados se basan en 2000 muestras Monte Carlo de la hipótesis nula con distribuciones: $N(M_0 S)$; $N(M_0 S)$; y $N(M_0 S)$ y las distribuciones alternativa: $N(M_0 S)$; $N(M_0 S)$; y $N(M_1 S)$. Otros parámetros utilizados en la simulación fueron: $M_0 = 0.0$, $M_1 = 5.0$, y $S = 1.0$ ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

- Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Inclusión

Conejos machos, cepa Nueva Zelanda sanos, de 6 meses de edad (2,800 – 3,800 mg) obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Exclusión

Conejos con enfermedades sistémicas, lesiones tisulares, con un peso menor a los 2,500 mg, y mayor a los 4,000 mg, conejos hembras.

Eliminación

Conejos que desarrollen enfermedades óseas, fractura de tibia, osteomielitis, necrosis avascular, infección tisular y muerte por causas no consecuentes al estudio, como enfermedades infectocontagiosas (virus, hongos, bacterias), las cuales, en caso de presentarse, serán evaluadas por un Médico Veterinario Zootecnista.

- Variables (grupo experimental, grupo control 1 y grupo control 2, ver Tabla 9 y 10)

Tabla 9. VARIABLES INDEPENDIENTES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación	Categorías	Escala de medición
Edad	Cantidad de años, meses y días cumplidos a la fecha de aplicación del estudio.	Edad del animal, registrada en meses cumplidos al momento de la cirugía dada por el registro del animal a la entrada al bioterio.	Cuantitativa	4 a 8 meses	Razón
Peso	Peso del conejo en una báscula granataria estandarizada.	Se tomará la medición del animal en ayunas, mediante una báscula granataria regulada en gramos.	Cuantitativa	Gramos 2,800 – 3,000 3,001 – 3,200 3,201 – 3,400 3,401 – 3,600 3,601 – 3,800	Intervalo
Defecto óseo segmental	Defecto óseo de espesor total, que abarca sus seis paredes óseas (incluyendo ambas tablas corticales).	Bloque óseo de espesor total, producido con micromotor y fresa quirúrgica.	Cuantitativa	1-5 paredes óseas= defecto óseo no segmental 6 paredes óseas= defecto óseo segmental	Intervalo
Defecto óseo crítico	Los defectos óseos creados no regeneran espontáneamente a lo largo de la vida del animal (también conocidos como defectos de tamaño crítico). Por tanto, cualquier defecto que tenga capacidad de regeneración	Defecto óseo de 10 mm de longitud, medido durante la intervención quirúrgica con un calibrador electrónico estandarizado.	Cuantitativa	0-7 mm = defecto no crítico 7.1 – 10 mm= defecto crítico	Intervalo

	espontánea se llamará de tamaño no crítico.				
Péptido (PTPLA/CAP)	El gen de la proteína de adhesión del cemento (CAP) se localiza en el cromosoma 10p13-p14, se considera un <i>splicing</i> alternativo del gen PTPLA), tiene 140 aminoácidos y un peso molecular de 14.920 KDa, su carga eléctrica es neutra (pI 7.78) y una movilidad relativa de 54-57 Kda. Se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro bovino y humano; inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal; así como en cementoblastos putativos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Rollo de esponja (10 x 50 mm) gelatinosa hemostática absorbible embebida de péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular (3,420 µg medido con micropipetas calibradas).	Cuantitativa	1. Con péptido 2. Sin péptido	
Tiempo	Medida efectuada sobre los cambios que se producen en el universo; secuencia actual de eventos que están	Lapso que transcurre entre el evento quirúrgico y la eutanasia del animal para su análisis microtomográfico e	Cuantitativa	1. 12 semanas (3 meses) 2. 16 semanas (4 meses)	Razón

ocurriendo (pasado, presente y futuro). histológico, programado secuencialmente.

3. 20 semanas (5 meses)

Tabla 10. VARIABLES DEPENDIENTES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Clasificación	Categorías	Escala de medición
Formación de tejido fibroso	Tejido que histopatológicamente presenta matriz extracelular, Fibronectina tisular, fibroblastos, proteoglicanos, colágena, miofibroblastos y células endoteliales.	Se harán dos evaluaciones para corroborar la presencia de tejido fibroso: 1. Cuando se observe histológicamente la presencia de tejido que presenta matriz extracelular, fibronectina tisular, fibroblastos, proteoglicanos, colágena, miofibroblastos y células endoteliales; observado a través del microscopio óptico. 2. Cuando por medición microtomográfica, las unidades Hounsfield sean más de 50 y menos de 90.	Cuantitativa	1. Micras 2. Unidades Hounsfield	Razón
Formación de tejido cartilaginoso	Tejido que histopatológicamente presenta matriz cartilaginosa, formación de lagunas, condrocitos,	Se harán dos evaluaciones para corroborar la presencia de tejido cartilaginoso: 1. Cuando se observe	Cuantitativa	1. Micras 2. Unidades Hounsfield	Razón

	condroblastos y pericondrio.	<p>histológicamente la presencia de tejido que presenta matriz cartilaginosa, formación de lagunas, condrocitos, condroblastos y pericondrio; observado a través del microscopio óptico. Se tomará en cuenta el porcentaje de tejido cartilaginoso encontrado en la brecha del defecto óseo.</p> <p>2. Cuando por medición microtomográfica, las unidades Hounsfield sean más de 90 y menos de 130.</p>			
Formación de tejido óseo	<p>El hueso es un tejido conectivo especializado, cuya matriz extracelular está calcificada e incluye las células que lo secretan. Tejido que histopatológicamente presenta matriz ósea (hidroxiapatita), osteonas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.</p>	<p>Se harán dos evaluaciones para corroborar la presencia de tejido mineralizado:</p> <p>1. Cuando se observe histológicamente la presencia de tejido que presenta matriz ósea (hidroxiapatita), osteonas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos; observado a través del microscopio óptico. Se tomará en cuenta el porcentaje de mineralización encontrado en la brecha del defecto óseo.</p>	Cuantitativa	<p>1. Micras</p> <p>2. Unidades Hounsfield</p>	Razón

2. Cuando por medición microtomográfica, las unidades Hounsfield sean más de 500 y menos de 1800.

- Selección de los grupos

Se constituyeron tres grupos de trabajo, dentro de los cuales, dos grupos fueron de control. Los animales fueron asignados aleatoriamente a cada una de las diferentes condiciones para formar así, el total de la población (N=9). Cada grupo estuvo constituido por 3 conejos, detallados a continuación:

Grupo 1 (experimental, n=3):

3 conejos a los cuales se les realizó el defecto segmental de tamaño crítico (10 mm) en la tibia derecha + colocación de osteosíntesis + Gelfoam® (esponja gelatinosa hemostática absorbible) embebida con 3,420 µg (3.4 mg) del péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular PTPLA/CAP + recubrimiento de dicho defecto óseo con OsseoGuard® (membrana de colágena reabsorbible).

Grupo 2 (control 1, n=3):

3 conejos a los cuales se les realizó el defecto segmental de tamaño crítico (10 mm) en la tibia derecha + colocación de osteosíntesis + Gelfoam® + recubrimiento de dicho defecto óseo con OsseoGuard®.

Grupo 3 (control 2, n=3):

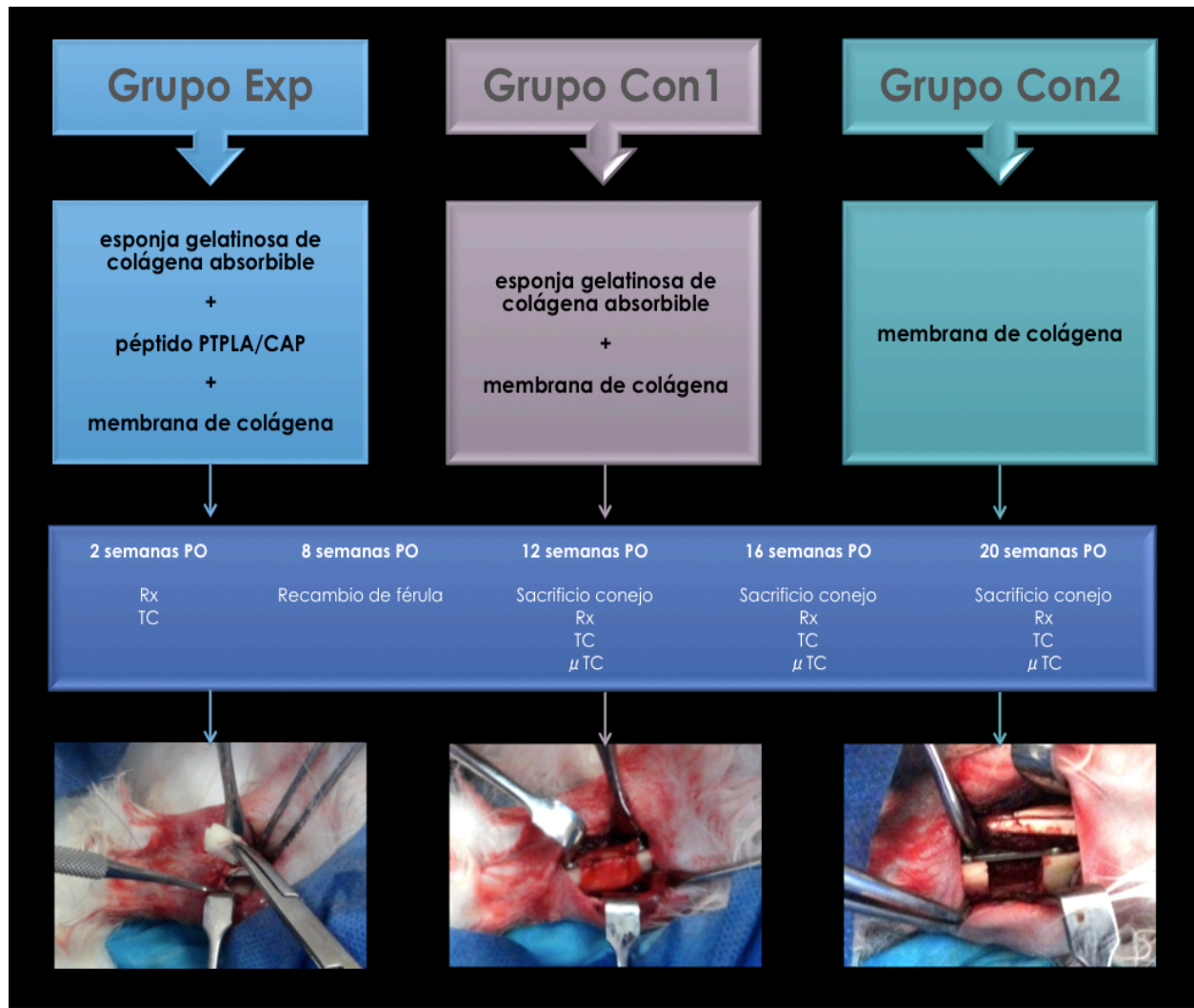
3 conejos a los cuales se les realizó el defecto segmental de tamaño crítico (10 mm) en la tibia derecha + colocación de osteosíntesis + recubrimiento de dicho defecto óseo con OsseoGuard®.

- Métodos de registro y procesamiento

Los datos obtenidos, serán capturados en una base de datos. Posteriormente, los datos serán codificados para ser analizados en el paquete estadístico SPSS.

- Plan de análisis de los datos

Se realizará un análisis descriptivo para cada una de las variables involucradas. Utilizando análisis de varianza (ANOVA), con el programa estadístico SPSS.



PRUEBA PILOTO

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biología Periodontal en conjunto con el bioterio de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El estudio experimental se realizó bajo el Consentimiento de la Comisión de Ética. Los conejos se trataron según las regulaciones legales de protección animal¹⁸⁰.

El objetivo de la prueba piloto, es identificar el tiempo operativo real de cada uno de los procedimientos quirúrgicos, radiológicos y tomográficos. Así como, estandarizar la logística de cada procedimiento, modificar o implementar los criterios que sean necesarios para el proyecto de investigación. La finalidad de practicar esta prueba en dos animales, fue mejorar y/o corregir, los problemas

surgidos en el pre, trans y postoperatorio del primer animal fue realizada de una forma secuencial para disminuir el ensayo-error para el segundo animal. Los resultados obtenidos de la prueba piloto, fueron de suma importancia para la ejecución del proyecto de investigación.

El primer y segundo cirujano así como el equipo de apoyo (instrumentista, circulante y técnico/encargado del bioterio), operaron a todos los animales tanto como en la prueba piloto como en el resto de los procedimientos experimentales.

Dos conejos fueron solicitados al bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, los cuales se aclimataron en sus conejeras durante 7 días.

El primer conejo fue sedado bajo los efectos sedantes intramusculares -ketamina (35 mg/kg) + xylazina (5 mg/kg)- se realizó una incisión de 3 cm en la zona anterior de la tibia (en la unión del tercio superior y medio de la extremidad inferior), exponiendo la tibia. Se efectuó una osteotomía en la unión del tercio superior; usando una calibrador electrónico, estandarizado y estéril, se midió un segmento de longitud de 10 mm. El segmento óseo de 10 mm de la diáfisis tibial, se removió y se colocó en formol al 10% para su preservación. Se colocó osteosíntesis rígida (una placa de titanio) en la brecha ósea. La brecha del segmento osteotomizado, no fue rellenado. El plano tisular profundo, fue cerrado con vicryl 5/0 y la piel con nylon 4/0. La herida quirúrgica se cubrió con Brosín® ungüento (sulfato de neomicina, clorhidrato de tetraciclina, acetato de prednisolona, vitamina A). La extremidad fue inmovilizada con férula de yeso. Inmediatamente al acto quirúrgico, el animal fue trasladado al Departamento de Imagenología de la misma División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se tomó la tomografía computarizada y una radiografía carpal. Se administró cefalexina (20 mg/kg) y meloxicam (0.6 mg/kg) durante cinco días. El animal fue examinado diariamente para valorar que la férula estuviese cumpliendo función. Al décimo día el animal presentó una gran escoriación circunferencial a la férula de yeso, por lo que la misma se retiró con una sierra eléctrica. Se hicieron las respectivas curaciones cutáneas y se colocó una férula tipo bota de fibra de vidrio; se administró analgésico y antibiótico durante cinco días. Al quinceavo día después del recambio de férula (de yeso a fibra de vidrio), el animal tuvo una refractura del segmento osteotomizado/osteosíntesis y desalojo de la férula. El animal fue reintervenido para la reducción de la fractura y se colocó una férula tipo vendaje de Jones; se administró analgésico y antibiótico durante siete días. El animal fue monitorizado en las subsecuentes semanas sin volver a presentar complicaciones.

El segundo conejo fue intervenido con el procedimiento arriba descrito; las modificaciones son las siguientes: la incisión se hizo en el lado derecho de la tibia

y se aumentó la longitud de la incisión a 5 cm para mejorar la visibilidad, el vendaje de Jones tuvo una longitud mayor, agregándosele dos reglas de madera para darle soporte a la fijación. Por tal motivo, la toma de la tomografía y de la radiografía postquirúrgica se modificaron ligeramente (posición) para obtener resultados fidedignos. El seguimiento a corto plazo del animal fue correcto y sin complicaciones.

TÉCNICA QUIRÚRGICA

Los 9 conejos Nueva Zelanda (2,800–3,800 mg) fueron operados con el Consentimiento de la Comisión de Ética de la DEPEI de la Facultad de Odontología, UNAM. Los conejos se trataron según las regulaciones legales de protección animal. Todos los animales fueron climatizados en sus jaulas individuales durante 7 días con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz de 12 hrs iniciando a las 7 a.m., en cuartos a 18-22°C con el 30-70% de humedad.

Se formarán tres grupos diferentes, con 3 conejos en cada uno (ampliamente descritos en párrafos anteriores). Un grupo experimental y dos grupos controles, sin variación de dosis y con estandarización de una misma técnica quirúrgica para todo el estudio experimental.

Grupo 1 experimental: esponja gelatinosa hemostática absorbible (Gelfoam®) + péptido PTPLA/CAP + membrana de colágena (OsseoGuard®).

Bajo sedación intramuscular -ketamina (35 mg/kg) + xylazina (5 mg/kg) se realiza tricotomía de la pata derecha, se realiza antisepsia con yodopovidona espuma, retirando el exceso con PBS (buffer fosfato salino, por sus siglas en inglés); se sujeta la pata colocándola en posición decúbito lateral, se infiltra la región a intervenir con lidocaína con epinefrina (0.5-1 ml/kg). Se realiza una incisión de 5 cm en el lado derecho de la tibia (en la unión del tercio superior y medio de la extremidad inferior), se diseca por planos hasta localizar tejido duro y se expone la tibia. Se efectúa una osteotomía recta en la unión del tercio superior y medio de la tibia usando un micromotor de baja velocidad y fresa de fisura de carburo 701 L con irrigación profusa de PBS; usando un calibre electrónico calibrado y estandarizado, se mide un segmento de longitud de 10 mm y se marca con una segunda osteotomía lineal paralela. Se coloca una miniplaca de titanio OsteoMed® (osteosíntesis rígida), sistema 2.0 mm de 6 perforaciones con puente de 10 mm, se fija con 3 tornillos de 2 x 8 mm en el segmento proximal y 3 tornillos

de 2 x 10 mm en el segmento distal. Una vez colocada la mini placa, se procede a hacer la osteotomía de 10 mm de la diáfisis tibial, removiendo el segmento, mismo que al ser retirado, se coloca en formaldehído al 10% para su preservación y ulterior control histológico. Se coloca una segunda miniplaca de titanio del sistema 2.0 mm de 6 perforaciones con puente de 10 mm, paralela a la antes descrita -en el lado contralateral de la futura brecha ósea-, ésta es fijada con osteosíntesis semirrígida (cerclaje circunferencial) con alambre calibre 20 .

Se retira el periostio que se encuentre adyacente al defecto óseo recién creado. La brecha del segmento osteotomizado, es rellena con un rollo de esponja gelatinosa hemostática absorbible (Gelfoam®) embebida previamente con péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular PTPLA/CAP (Figura 13). El defecto óseo, así como la esponja gelatinosa hemostática absorbible, son recubiertos circunferencialmente con una membrana de colágena reabsorbible (OsseoGuard®). Se procede a cerrar por planos tisulares, suturando el plano profundo con Vicryl® 5/0 y la piel con Nylon® 4/0. La herida quirúrgica se cubre con Brosín® ungüento (sulfato de neomicina, clorhidrato de tetraciclina, acetato de prednisolona, vitamina A). Se feruliza la pata derecha con vendaje Robert Jones. En el postquirúrgico inmediato, el animal es trasladado al Departamento de Imagenología, DEPEI-UNAM, donde se toman los estudios correspondientes (tomografía computarizada y radiografía carpal). Se administró cefalexina (20 mg/kg) y meloxicam (0.6 mg/kg) durante cinco días. Después de las cirugías, los animales continuaron enjaulados individualmente con su régimen de agua y alimentos *ad libitum*. A la sexta semana se hizo el recambio del vendaje Robert Jones y luego fueron sacrificados siguiendo los principios éticos para su eutanasia (sobredosis de pentobarbital 50 mg/kg) a la 12^{va}, 16^{va} y 20^{va} semana obteniéndose las tibias derechas para su análisis.

Grupo 2 – control 1: esponja gelatinosa hemostática absorbible (Gelfoam®) + membrana de colágena (OsseoGuard®).

Bajo sedación intramuscular y usando la misma técnica quirúrgica para el Grupo 1, se realiza la osteotomía del segmento de 10 mm. Se realiza la osteosíntesis rígida y semirrígida (miniplacas de titanio y cerclaje circunferencial). Se retira el periostio adyacente al defecto óseo. La brecha del segmento osteotomizado, es ocupada con un rollo de esponja gelatinosa hemostática absorbible (sin péptido PTPLA/CAP). El defecto óseo y la esponja gelatinosa hemostática absorbible (Gelfoam®), son recubiertos con la membrana de colágena reabsorbible (OsseoGuard®). La herida quirúrgica es cerrada por planos muscular y cutáneo. La incisión es cubierta con Brosín® ungüento. Se coloca vendaje

Robert Jones. En el postquirúrgico inmediato, el animal es trasladado al Departamento de Imagenología, DEPeI-UNAM, donde se toman los estudios correspondientes (tomografía computarizada y radiografía carpal). Se administró cefalexina (20 mg/kg) y meloxicam (0.6 mg/kg) durante cinco días. El animal fue examinado diariamente para valorar que la férula estuviese cumpliendo función. A la sexta semana se hizo el recambio del vendaje Robert Jones. Los animales continuaron en control en el bioterio. Fueron sacrificados a la 12^{va}, 16^{va} y 20^{va} semana obteniéndose las tibias derechas para su análisis.

Grupo 3 – control 2: membrana de colágena (OsseoGuard®).

Bajo sedación intramuscular y usando la misma técnica quirúrgica para el Grupo 1, se realizará la ostectomía del segmento de 10 mm. Se coloca la osteosíntesis antes mencionada. Se retirará el periostio que se encuentre adyacente al defecto óseo, y éste es recubierto con una membrana de colágena reabsorbible (OsseoGuard®). Se cierran los planos muscular y cutáneo. La herida quirúrgica se cubre con Brosín® ungüento y se coloca vendaje Robert Jones. En el postquirúrgico inmediato, el animal es trasladado al Departamento de Imagenología, DEPeI-UNAM, donde se toman los estudios correspondientes. Se administró cefalexina (20 mg/kg) y meloxicam (0.6 mg/kg) durante cinco días. El animal fue examinado diariamente para valorar que la férula estuviese cumpliendo función. A la sexta semana se hizo el recambio del vendaje Robert Jones. Los animales continuaron en control en el bioterio. Fueron sacrificados a la 12^{va}, 16^{va} y 20^{va} semana obteniéndose las tibias derechas para su análisis.

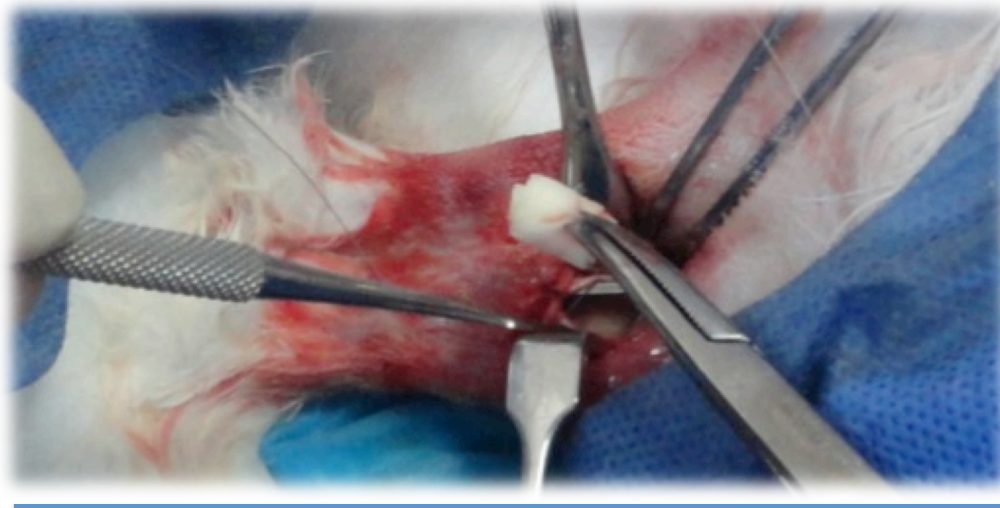
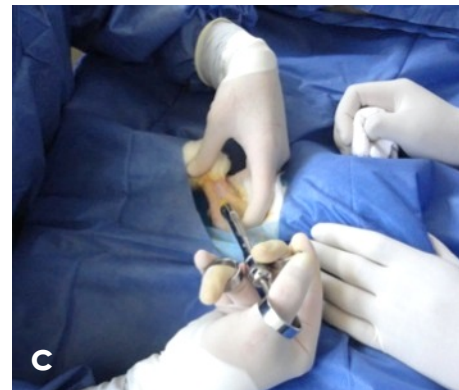
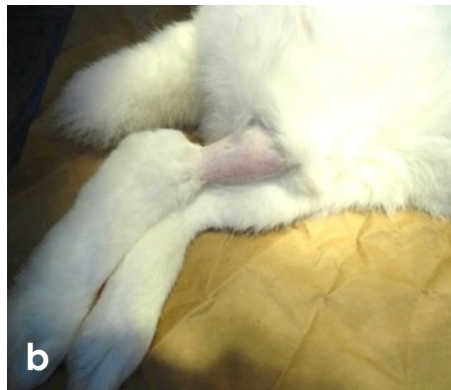


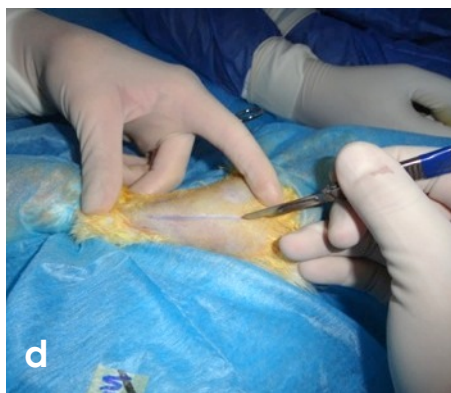
Figura 13. Fotografía clínica donde se observa el defecto óseo producido en la tibia, así como la esponja reabsorbible embebida con el péptido, antes de ser colocada en el defecto crítico y segmental.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO EXPERIMENTAL

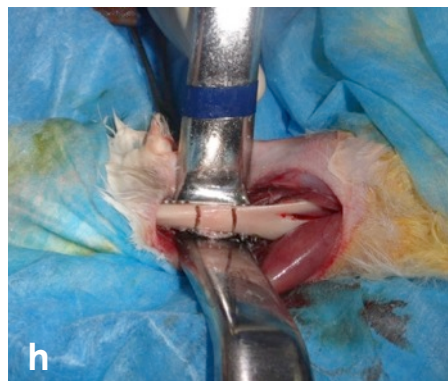
A continuación se detalla visual y cronológicamente el procedimiento quirúrgico de un animal experimental (conejo 12).



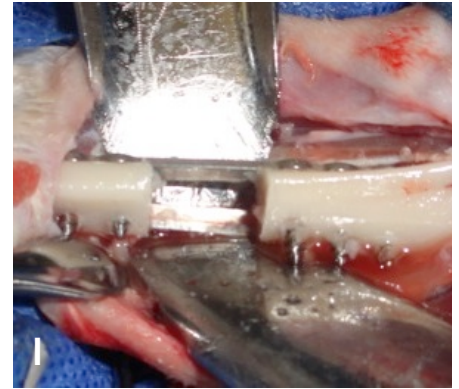
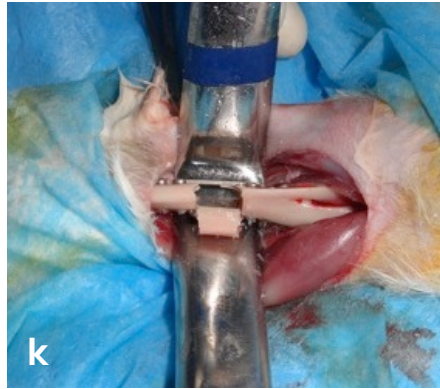
a. Tricotomía, **b.** Antisepsia, **c.** Infiltración de lidocaína



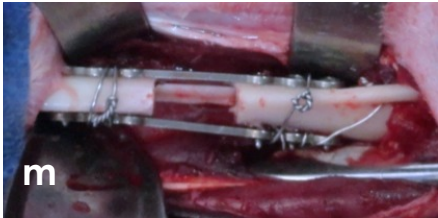
d. Incisión, **e.** Disección, **f.** Plano profundo-tibia



g. Primera osteotomía lineal, **h.** Medición y segunda osteotomía lineal, **i.** Colocación de mini placa y tornillos de titanio



j, k y l. Osteotomía 10 mm



m. Colocación de segunda mini placa de titanio con cerclajes de alambre, **n.** Membrana de colágena reabsorbible, **o.** Cierre circunferencial de defecto segmental crítico



p. Sutura por planos tisulares, **q.** Cierre de piel y colocación de antiséptico, **r.** Férula de Robert Jones

CONTROLES POSTQUIRÚRGICOS RADIO Y TOMOGRÁFICOS INMEDIATOS



Conejo Experimental (Exp)



Conejo Control 1 (Con 1)



Conejo Control 2 (Con 2)



Conejo Experimental (Exp)



Conejo Control 2 (Con 2)



MICROTOMOGRAFÍA

El uso de alta resolución de microtomografía computarizada de imágenes (μ TC) para evaluar la morfología trabecular y cortical ha crecido enormemente, por lo tanto, los análisis morfométricos deben basarse en algoritmos 3D que no se basen en suposiciones acerca de la estructura subyacente



Figura 14. Microtomógrafo Albira del Instituto Nacional de Cancerología, México. Una revolución en sistemas de imagen preclínica en PET / SPECT / CT.

siempre que sea posible (Figura 14). Inicialmente se había propuesto la medición de unidades Hounsfield con el fin de otorgar de manera sencilla una evaluación sobre las características del tejido neoformado (así como los cambios en la densidad mineral ósea, BMD) ya que las Unidades Hounsfield (UH) determinan valores de atenuación de los tejidos, teniendo una característica propia cada uno de ellos. El microtomógrafo crea toda una nueva clase de detectores de PET de alta resolución sin zonas muertas para no comprometer la sensibilidad; la curva de calibración de las Unidades Hounsfield (usando un filtro triple de hidroxapatita), da como resultado la densidad mineral ósea (g/cm^3). El sistema Albira está fabricado para medir las unidades Hounsfield (UH), sin embargo, no está calibrado en unidades de atenuación (UH), con lo que obtendríamos una curva de calibración para convertir UH en densidad mineral ósea, DMO (BMD, por sus siglas en inglés, bone mineral density) en g/cm^3 ; para lo cual, fue necesario la utilización de un bloque de hidroxapatita ("Hydroxyapatite Phantom") para la calibración y estandarización del aparato. La calibración es necesaria para relacionar los valores tomográficos con los valores minerales equivalentes, normalmente en miligramos por centímetro cúbico (mg/cm^3) de hidroxapatita de calcio (HA) de un filtro/fantasma ("hydroxyapatite phantom") de estado sólido. Debido a la excelente linealidad de los sistemas modernos de μ TC, la calibración es posible con sólo dos puntos, aunque algunos fabricantes utilizan hasta cinco puntos, cubriendo un rango de 0 hasta $1000 \text{ mg}/\text{cm}^3$ de HA (Figura 15).

Las mediciones de la densidad del tejido o la densidad aparente deben ser reportados en miligramos por centímetro cúbico de HA en lugar de los valores generales tomográficos con el objetivo de minimizar la dependencia del fabricante (los diferentes sistemas a menudo utilizan diferentes escalas y valores

tomográficos). Son muchos los factores (por ejemplo, la corrección de haz de endurecimiento, etc.) los que pueden influir en los resultados de densidad por lo que la calibración debe realizarse rutinariamente de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

La curva de calibración se puede utilizar posteriormente para obtener unidades de DMO para muestras de hueso reflejado con el sistema Albira CT (Figura 16). Este protocolo de aplicación proporciona instrucciones para generar una curva de calibración de densidad mineral ósea. Se proporcionan directrices para la generación de volúmenes apropiados de interés (VOI) para fantasmas y regiones del espécimen^{160-162, 180}.

Los resultados representativos que se utilizan en este protocolo, están basados en un estudio en ratones, en lo cuales, se hizo una serie de tomas microtomográficas a los fémures de los roedores utilizando el filtro/fantasma de hidroxapatita.

Se registraron los valores medios. Se utilizó la fórmula de la curva de calibración para convertir los resultados de la unidad de atenuación a las unidades de DMO. Una imagen de rayos X en 2D también fue adquirida mediante el In-Vivo MS PRO FX. La densidad de los huesos largos del fémur se analizó utilizando el Software Densidad Carestream Molecular Imaging el cual permite analizar una radiografía de imágenes planas.

La fórmula curva de calibración se utilizó para convertir los resultados de la unidad de atenuación a las unidades de DMO. Ex vivo se volvieron a hacer las mediciones anteriormente realizadas con Albira CT BMD, rayos X en 2D y el Software Densidad Carestream Bone, proporcionando resultados similares y diferencias estadísticamente significativas para todos los animales ($p = 0,02$). Mientras que el protocolo se validó en un modelo murino puede ser posible adaptarlo por lo tanto, a un método para otras especies, incluyendo muestras ex vivo de conejo.



Figura 15. "Hydroxyapatite Phantom" para la calibración del sistema Albira.

Después de estandarizar la densidad ósea, se modificó el método para la lectura y recolección de los datos, debido a que por lo pequeño y poco mineralizado de las trabéculas óseas, no eran estadísticamente significativos los resultados del tejido neoformado, por tal condición, se hizo una búsqueda más estricta para la lectura del hueso mineralizado en pequeñas especies. Por lo que al informar sobre los resultados de μ TC en pequeñas especies, el conjunto mínimo de variables que

se deben utilizar para describir la morfometría ósea trabecular incluye fracción del volumen óseo y el número, el grosor y la separación trabecular. El conjunto mínimo de variables que se deben utilizar para describir la morfometría cortical ósea incluye: **el área total de la sección transversal, el área de cortical ósea, la fracción de área del hueso cortical, y el grosor cortical.**

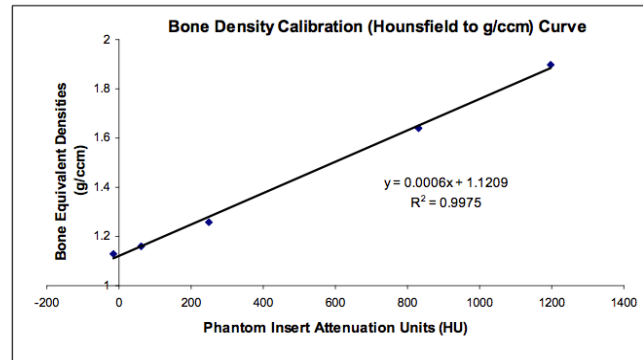


Figura 16. Curva de calibración ósea utilizando el "Hydroxyapatite Phantom"

El área osteoide y mineralizada formada como efecto de los tratamientos, se normalizó al área total del defecto de tamaño crítico. Los resultados se analizaron utilizando el programa AxioVisionLE 4.3.6 Software (Zeiss, Alemania). Adicionalmente las muestras de cada condición (12, 16 y 20 semanas), se analizaron por medio de μ TC utilizando un sistema tridimensional, para su posterior evaluación (con el objeto de visualizar el volumen del nuevo hueso formado y cuantitativamente examinar la microarquitectura del tejido óseo regenerado).

La toma de microtomografías se realizó en un PET, SPECT, CT Albira® en el Instituto Nacional de Cancerología, Departamento de Medicina Nuclear. Se utilizó una fuente de rayos X de 35 micras (tamaño nominal de punto), 50 kVp máx, 1 mA máx, CT-Good HD-LV, con un offset de 158 mm. La reconstrucción 3D se realizó a máxima intensidad de proyecciones con el software del aparato. Para evaluar la calidad/densidad del hueso neoformado, se midió la densidad ósea de las imágenes tomadas con el microtomógrafo por medio del programa Bone J, se realizaron tres mediciones por muestra en la zona del defecto y del hueso control (adyacente) de la tibia, para comparar ambas densidades, los datos resultantes se analizaron con una prueba de ANOVA.

El Técnico Radiólogo, fue estandarizado (CCI .92, IC 95%). Los datos obtenidos, fueron capturados en una base de datos. Posteriormente, los datos se codificaron para ser analizados en el paquete estadístico SPSS. Se realizó un análisis descriptivo para cada una de las variables involucradas, utilizando análisis de varianza (ANOVA).

HISTOMORFOLOGÍA

Las tibias desarticuladas fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Bucal de la DEPEI-UNAM. Los especímenes se encontraban fijados en formaldehído al 10% y fueron descalcificados con EDTA 10%, pH 7.4 disuelto en 0.5% de formaldehído a 4°C por 10 días. De ellos, se obtuvieron cortes histológicos a 5 micras de grosor para realizar la tinción con hematoxilina y eosina como control para las inmunofluorescencias. Se realizaron tinciones específicas hacia fenotipo condroide: azul de alciano (3%) y safranina, para determinar la presencia de subpoblaciones celulares que expresen las glicoproteínas de fenotipo condroblástico; tricrómica de Masson (que nos ayuda a determinar la mineralización de las fibras de colágena) .

El análisis histomorfológico se hizo mediante microscopía óptica (Carl Zeiss, Alemania), se utilizó el software Pro Plus® del mismo microscopio. Se tomaron microfotografías de los cortes histológicos con el fin de analizar las zonas correspondientes a los bordes del defecto, la naturaleza del material regenerado y observar los patrones de regeneración ósea, la presencia de reacción inflamatoria, la presencia de tejido conectivo, condroblastos, condrocitos, osteocitos, osteonas, conductos de Havers, zonas de mineralización, osteoblastos, vascularización, osteoclastos y matriz osteoide.

El Patólogo certificado fue estandarizado y se compararon sus respectivas mediciones (CCI .92, IC 95%). Los datos obtenidos, fueron capturados en una base de datos. Posteriormente, los datos se codificaron para ser analizados en el paquete estadístico SPSS. Se realizó un análisis descriptivo para cada una de las variables involucradas, utilizando análisis de varianza (ANOVA) y prueba de t pareada.

INMUNOFLUORESCENCIA

Para detectar CEMP I y colágenas involucradas en la osificación endocondral, las laminillas se desparafinaron en xileno (2 veces por 10 minutos), se deshidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%) durante 9 minutos, seguidas de un lavado con PBS al 10x (5 minutos). Las secciones se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-PEP-CAP, anti-colágena II, anti-colágena X y anti-colágena XI a una concentración de 1:100 diluido en BSA, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto y se dejó incubado durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron con PBS 10X más Tween 1X (por 5

minutos) y 2 lavados más de PBS 10X (5 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo y la enzima conjugada Isotiocinato de fluoresceína siguiendo las instrucciones del fabricante a una concentración de 1:75 diluido en 10X PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Al término de este tiempo, se realizaron los lavados de la misma forma descrita en la incubación del anticuerpo primario, se montaron con DABCO. Todos los lavados se realizaron con agitación constante.

9. Resultados

Los bloques osteotomizados y las tibias desarticuladas fueron incluidas en formaldehído al 10%. Se procesaron en el Laboratorio de Patología Bucal de la DEPEI-UNAM; las brechas/puentes tisulares se teñieron con azul de alciano, tricrómica de Masson y safranina para ser examinadas por medio de microscopía óptica. Todos los análisis histomorfométricos fueron analizados por un Patólogo Bucal certificado (CCI 0.92). Ver anexo.

Las siguientes microfotografías fueron tomadas a 10x (Figuras 17 a 20). El animal en cuestión es el experimental con 5 meses de seguimiento. Las microfotografías corresponden a la zona más representativa de la neoformación tisular. Nótese que el modelo de crecimiento es endocondral, teniendo zonas de cartílago hipertrófico y otras tantas de hueso mineralizado con respecto a los controles 1 y 2 (Figura 21 a 27).

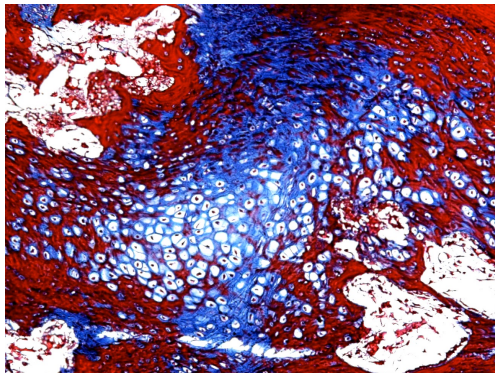
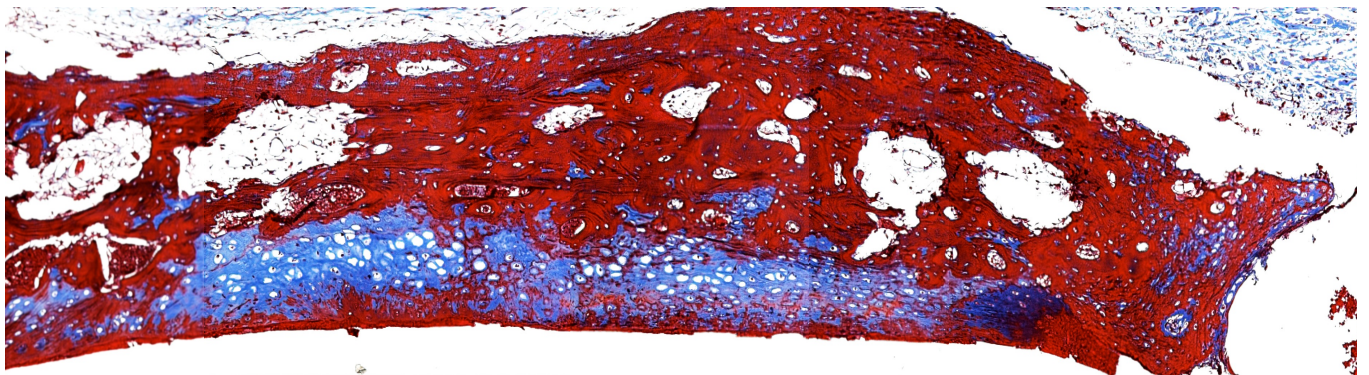


Figura 17. Tricrómica de Masson

Tinción específica para colágena, tiñendo la colágena de azul; roja cuando ya está mineralizada.



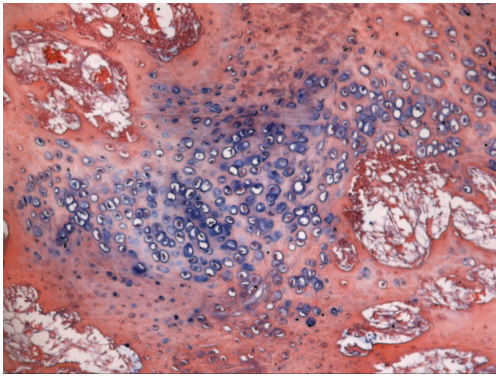


Figura 18. Azul de alciano

Tinción específica para glicoproteínas hacia fenotipo condroblástico de color azul.

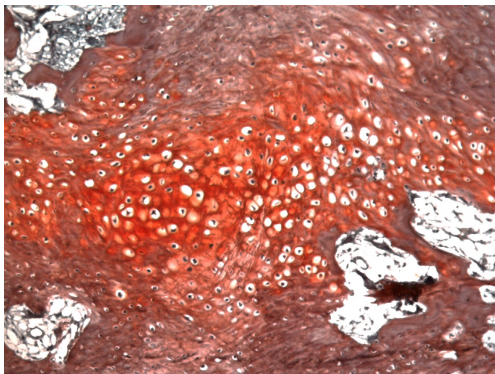
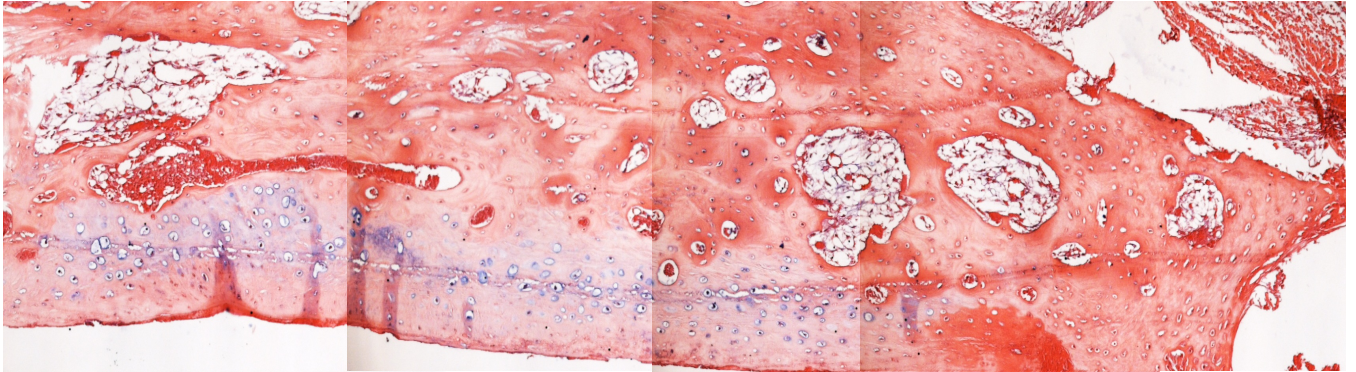


Figura 19. Safranina

Tinción específica para condroblastos.



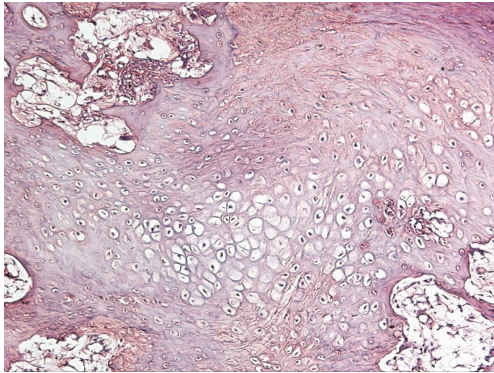
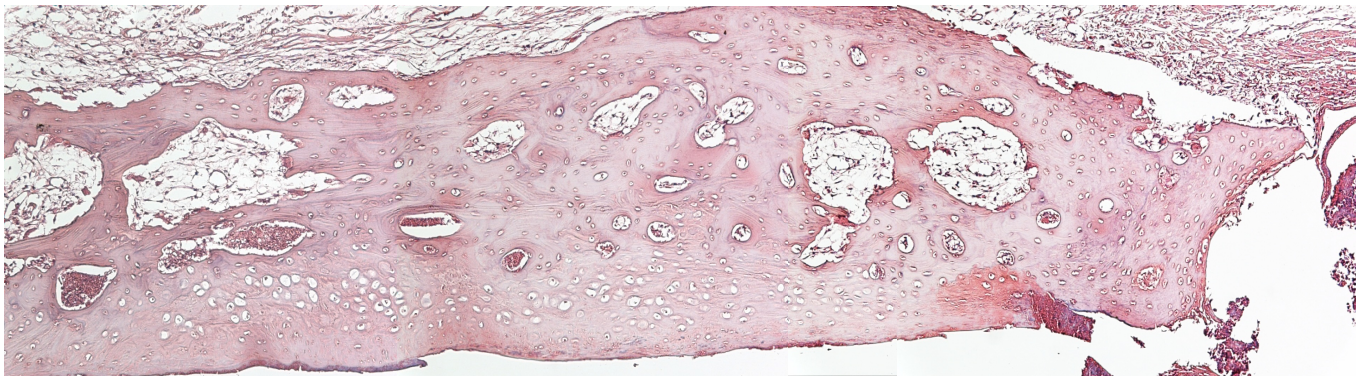


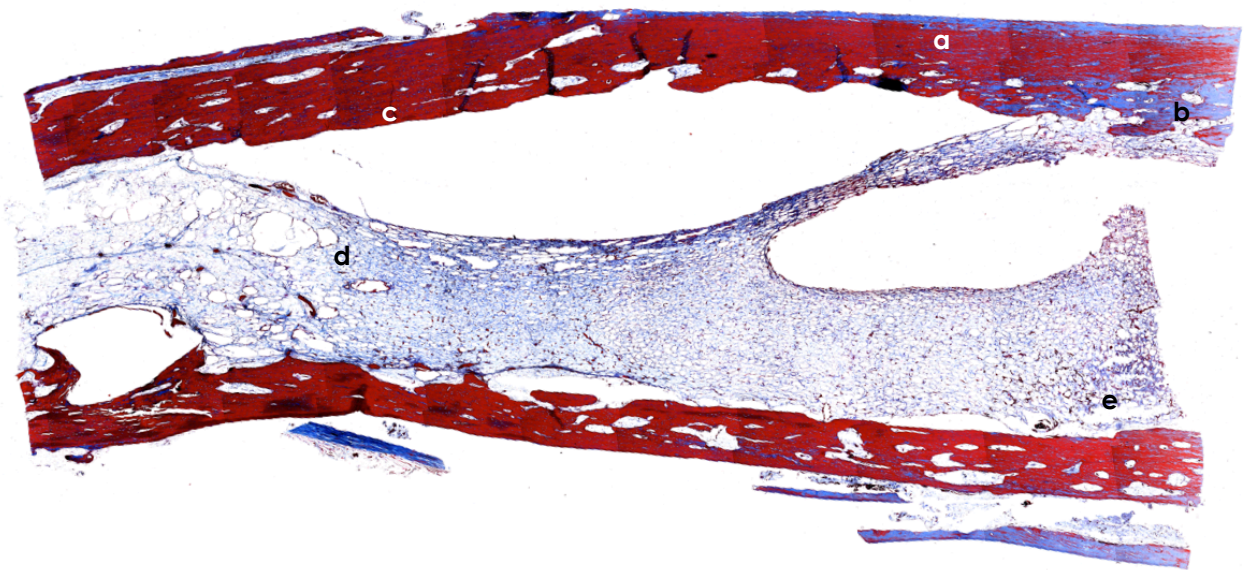
Figura 20. Hematoxilina y Eosina

Tinción base para la referencia de las inmunofluorescencias.



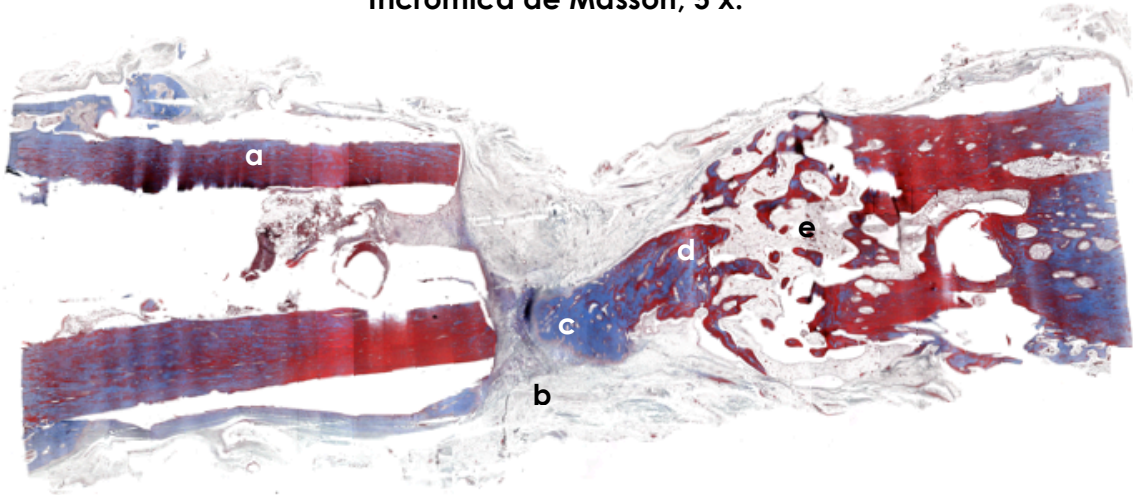
Se observa fragmento de hueso cortical y trabecular, ambos vitales, entremezclados con abundantes áreas de tejido hematopoyético, constituidas principalmente por médula amarilla, el hueso se dispone entremezclado con diversas áreas de tejido conjuntivo laxo y denso bien vascularizado. Se observa también un área transicional de formación ósea, área comprendida por cartílago activo que denota áreas de transformación ósea y un área que comprende una zona de fibrosis.

Figura 21. Corte histológico de segmento osteotomizado (10 mm) de la tibia de conejo Nueva Zelanda, considerado como el hueso de referencia para los controles (hueso sano), Tricrómica de Masson, 5 x. Fotografía aumentada de tamaño para apreciar las características histológicas del hueso de los conejos.



En el corte histológico se observa fragmentos de hueso cortical (a), trabecular (b) y compacto (c) vitales, entremezcladas con extensas áreas de tejido conjuntivo denso y laxo bien vascularizado (d) y médula ósea, principalmente amarilla, se observan también escasas áreas de hemorragia (e).

Figura 22. Corte histológico a los 5 meses (20 semanas), CONEJO EXPERIMENTAL, Tricrómica de Masson, 5 x.



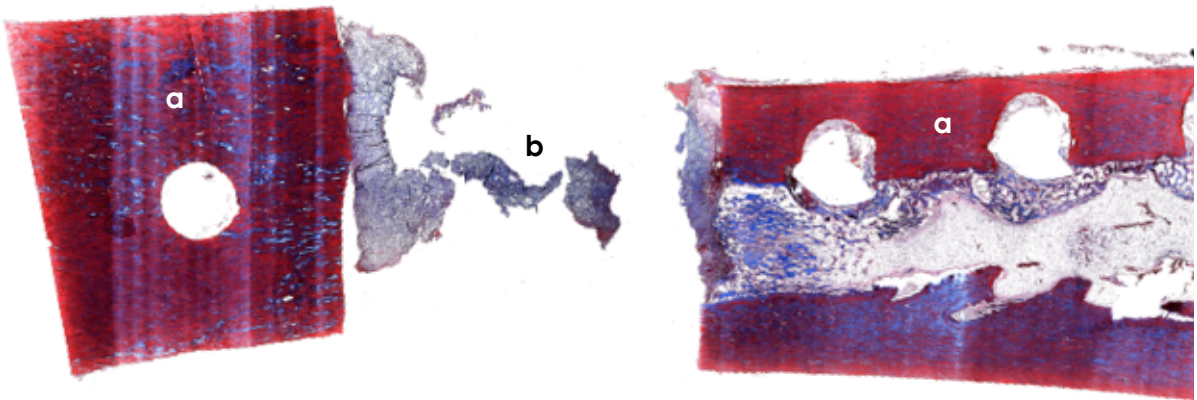
Se observa un fragmento de hueso vital, el cual presenta diversas áreas de calcificación, el hueso cortical y trabecular es vital (a), presenta hacia el centro del corte una extensa zona de fibras de colágena dispuestas en forma condensada (b), se observa también una zona de cartílago vital el cual está activo y está generando calcificación ósea de tipo endocondral (c). Estas áreas se encuentran entremezcladas con áreas de tejido hematopoyético correspondiente a médula amarilla y en menor grado roja (d); dispuesto todo sobre una matriz de tejido conjuntivo fibroso denso y laxo bien vascularizado (e).

Figura 23. Corte histológico a los 5 meses (20 semanas), CONEJO CONTROL 1 (esponja gelatinosa hemostática absorbible + membrana de colágena), Tricrómica de Masson, 5



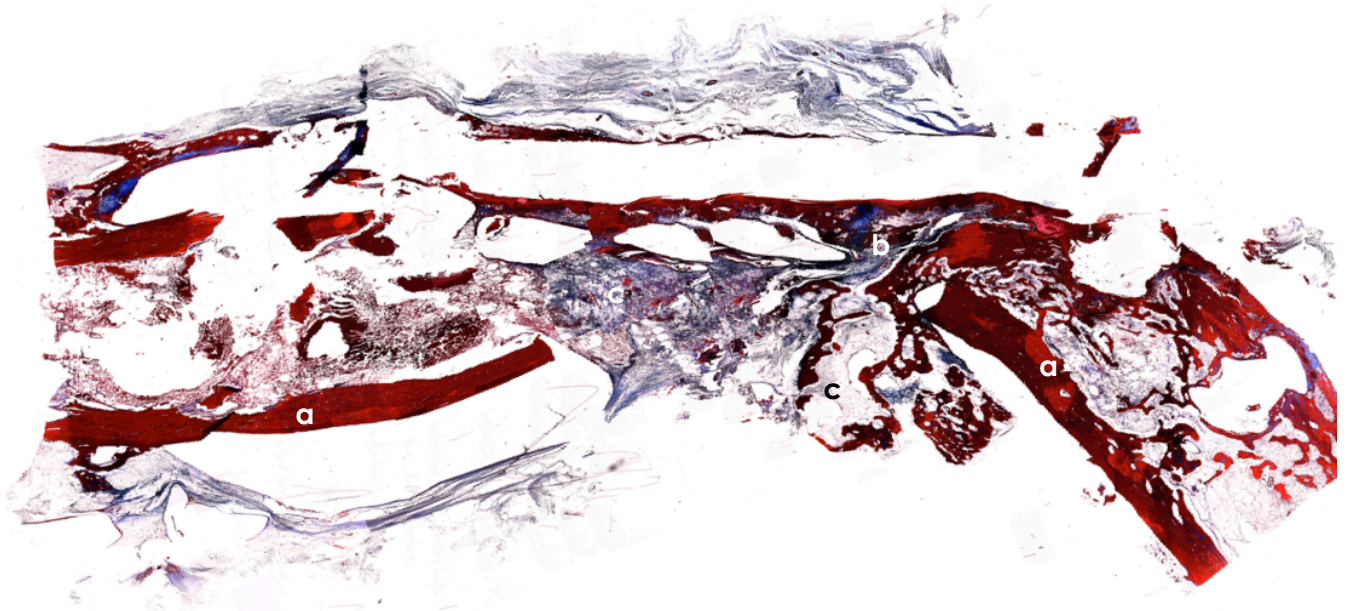
Se observan dos fragmentos óseos compuestos por hueso vital, cortical y trabecular entremezclado con áreas de médula amarilla y roja (a). Hacia el centro se observa abundante tejido fibroso compuesto por colágeno dispuesto todo sobre tejido conjuntivo fibroso denso y laxo abundantemente vascularizado (b), se observa proliferación epitelial (c).

Figura 24. Corte histológico a los 5 meses (20 semanas), CONEJO CONTROL 2 (membrana de colágena), Tricrómica de Masson, 5 x.



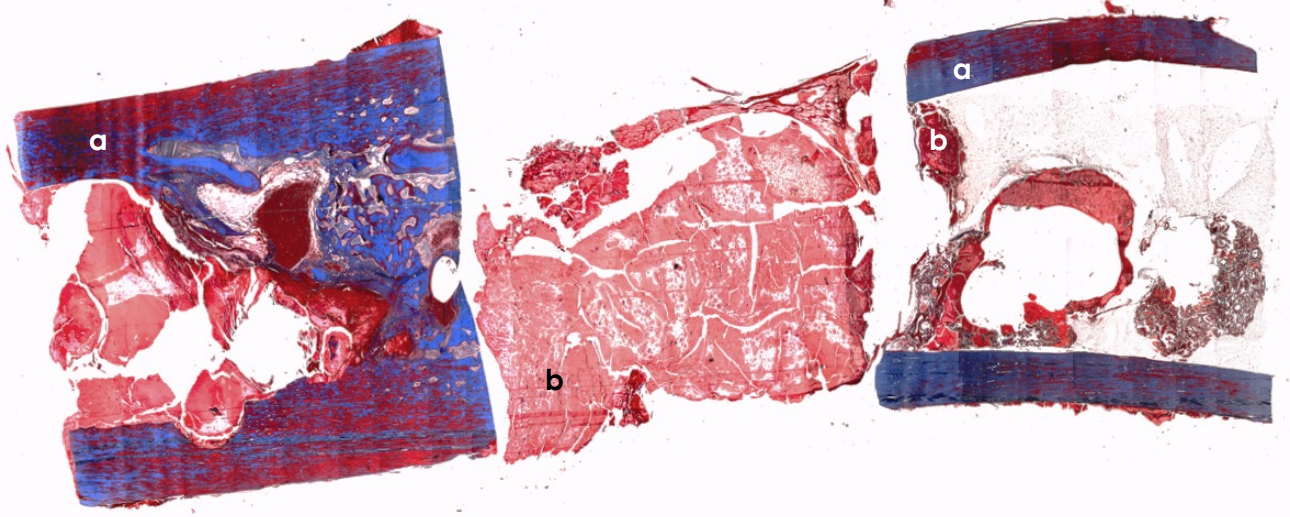
Se observan dos fragmentos de tejido óseo compuesto por hueso cortical y trabecular vital entremezclados con áreas de médula amarilla (a). En el centro se observa un área de hemorragia mezclada con plasma.

Figura 25. Corte histológico a los 4 meses (16 semanas), CONEJO EXPERIMENTAL, Tricrómica de Masson, 5 x.



Se observa un fragmento óseo constituido por hueso cortical y trabecular entremezclado con áreas de médula amarilla y roja (a); se observan también áreas de reparación fibrosa mezcladas con áreas de cartilago activo y vital, que se encuentran generando un área de calcificación del tipo endocondral (b). Dispuesto todo sobre áreas de tejido conjuntivo fibroso denso y laxo bien vascularizado (c).

Figura 26. Corte histológico a los 4 meses (16 semanas), CONEJO CONTROL 1, Tricrómica de Masson, 5 x.



Se observan dos fragmentos óseos constituidos por hueso laminal y trabecular vitales (a), entremezclados con médula amarilla y extensas áreas de hemorragia reciente y plasma dispuestos sobre tejido conjuntivo fibroso denso y laxo bien vascularizado (b).

Figura 27. Corte histológico a los 4 meses (16 semanas), CONEJO CONTROL 2, Tricrómica de Masson, 5 x.



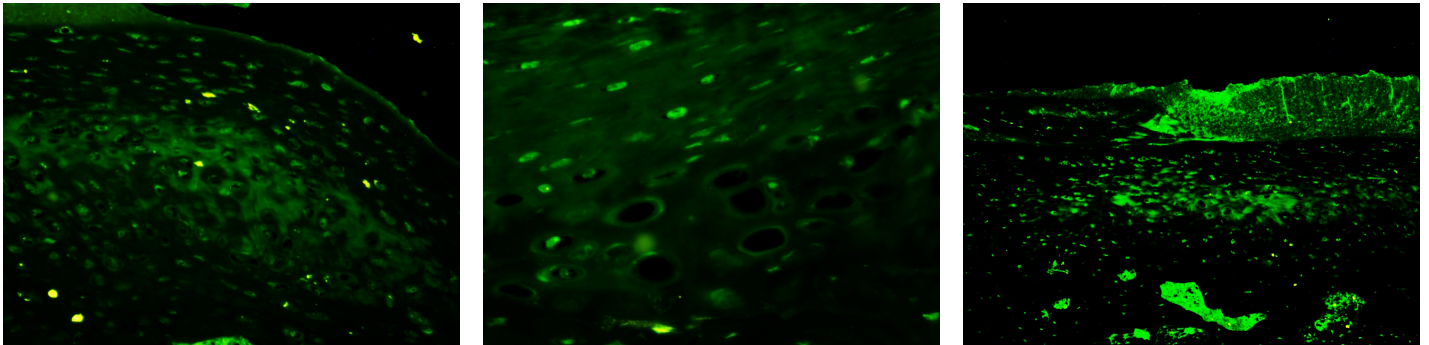
Se observan dos fragmentos óseos compuestos por hueso vital, cortical y trabecular (a) entremezclado con escasas áreas de médula amarilla (b). Hacia el centro, en la brecha ósea, no se observa tejido (c).

Inmunofluorescencias

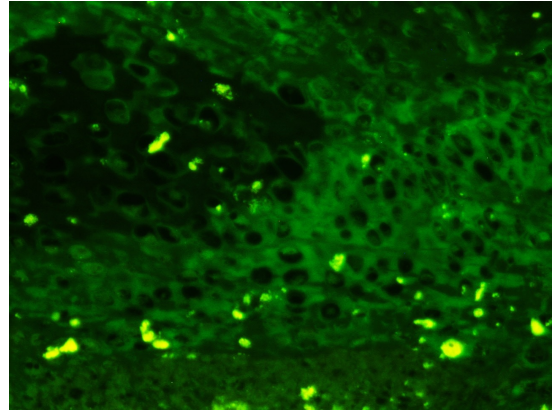
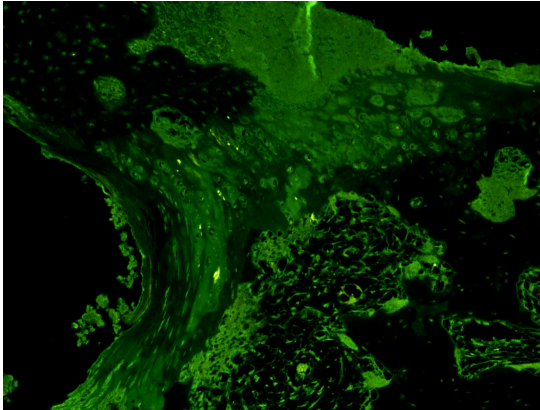
Las laminillas se observaron al microscopio de fluorescencia, tomando fotografías a 20x y 40x utilizando el programa (Zeiss, Thornwood, NY). Dichas imágenes se utilizaron para la descripción de la expresión de la inmunotinción celular. Las laminillas de inmunofluorescencia fueron comparadas con su correspondiente laminilla teñida con la tinción de rutina (hematoxilina y eosina), en orden para establecer la relación topográfica entre las áreas positivas. La positividad e intensidad de la inmunotinción, fueron evaluadas de acuerdo al consenso de diferentes evaluadores, como se ha descrito en artículos relacionados, tomando como parámetros: negativo (-), positivo ligero (+) y positivo intenso (++)

Las inmunofluorescencias fueron positivas hacia los marcadores condroblásticos y CEMP I, colagenas involucradas en el proceso de osificación endocondral: II matriz (SOX9, factor de transcripción), X cartílago hipertrófico y XI cartílago hipertrófico (SOX9, factor de transcripción).

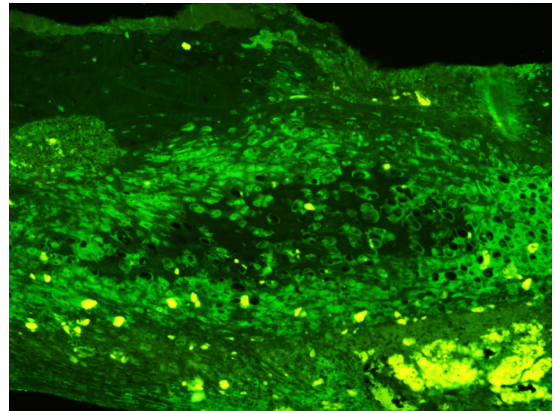
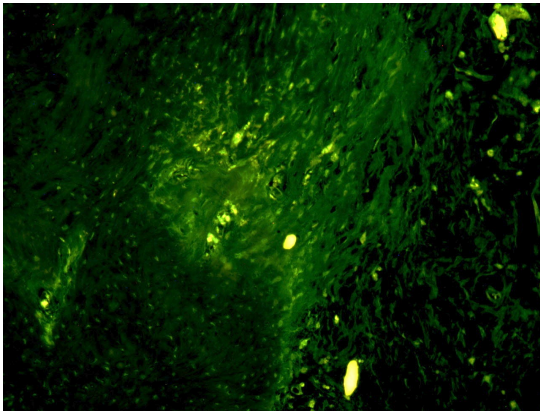
CEMP I



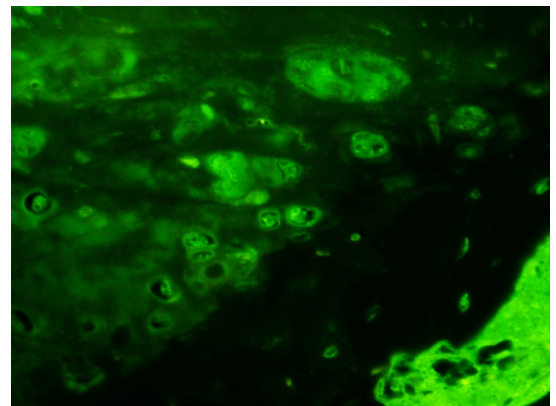
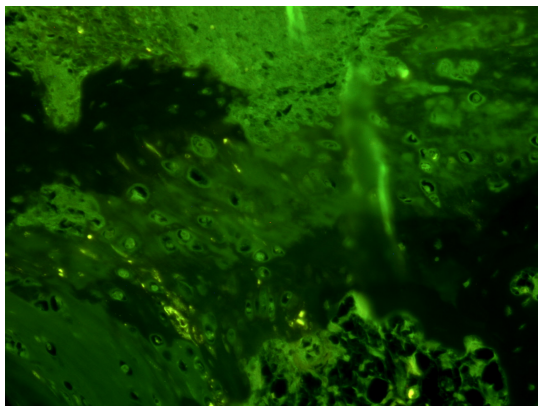
Colágena II



Colágena X



Colágena XI



Microtomógrafo

Las imágenes fueron adquiridas en el microtomógrafo Albira, Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular μ PET/SPECT/CT, Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM a cargo del Dr. Luis Alberto Medina, del Instituto Nacional de Cancerología.

Muestras óseas

Se recibieron muestras óseas de la tibia de conejos con un defecto segmental de 10 mm, el hueso se mantenía unido con dos placas de titanio. Se reporta que en el caso del grupo experimental, el defecto inicialmente fue cubierto con material reabsorbible embebido con un péptido (PTPLA/CAP), el grupo 2 o control 1, el defecto fue rellenado únicamente con material reabsorbible y el grupo 3 o control 2, no fue recubierto con ningún tipo de material o péptido.

Micro-Tomografía Computarizada (μ TC)

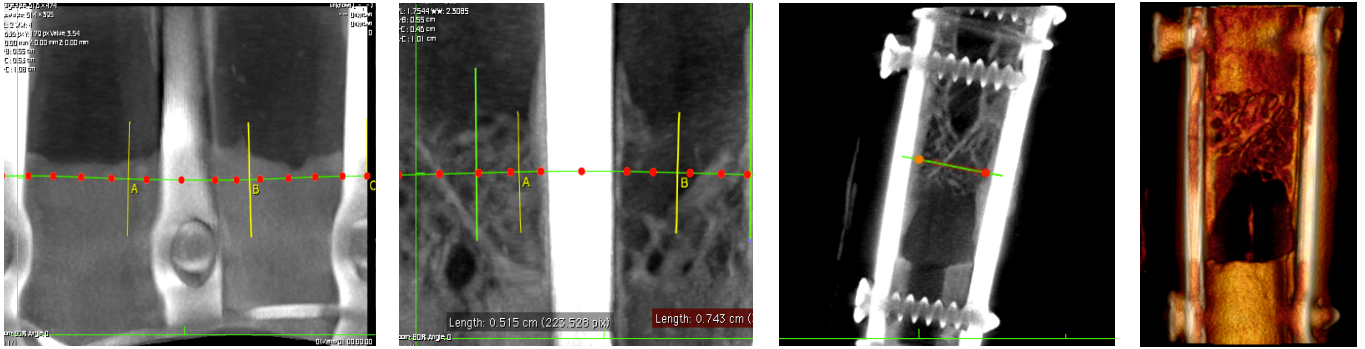
Se realizó μ TC de alta resolución en un equipo Albira ARS (Oncovisión, España) con los siguientes parámetros: 45 kVp, 0.4 mA, tamaño de pixel de $20\mu\text{m}$ y de voxel de $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$. Número de proyecciones: 600 y tiempo por proyección: 1 segundo. La reconstrucción de las imágenes se realizó con el propio software del equipo Albira utilizando el método de Retroproyección Filtrada (FBP).

Análisis de regeneración ósea

El análisis se basó en una evaluación histomorfométrica de las propiedades estructurales del hueso trabecular en la zona regenerada (Figuras 28 a 30). Se evaluaron los siguientes parámetros, utilizando las utilidades del software *BoneJ* dentro del paquete de análisis *ImageJ* (Figura 31):

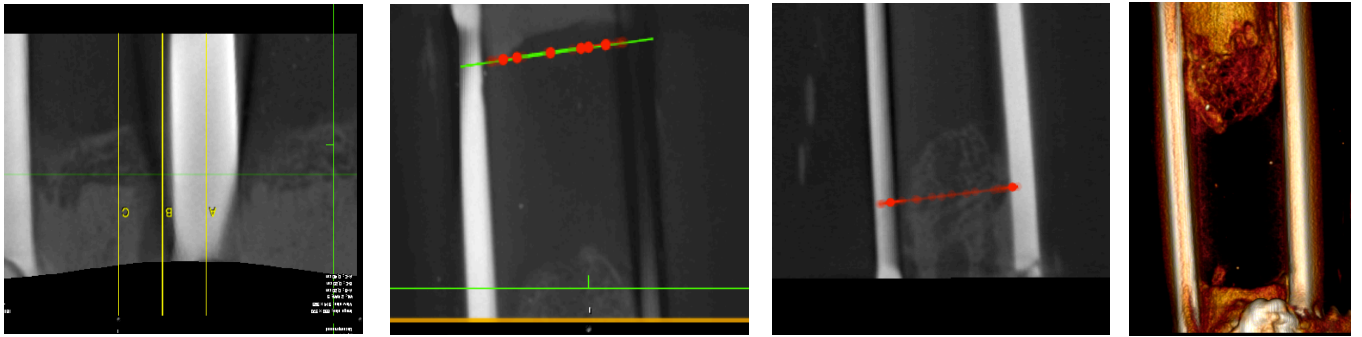
- **Densidad volumétrica (% BV/TV):** porcentaje de hueso trabecular en el Volumen de Interés (VOI) analizado.
- **Espesor trabecular (Tb.Th):** espesor promedio de la trabécula (mm).
- **Espacio trabecular (Tb.Sp):** espacio promedio intratrabecular (mm).
- **Número trabecular (Tb.N):** Número promedio de trabécula por unidad de longitud (1/mm).

Figura 28. Grupo 1 (experimental)



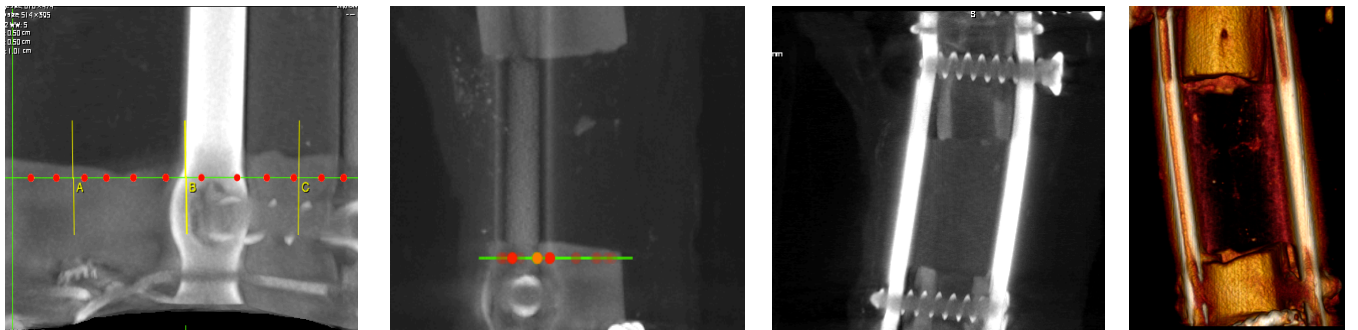
Se observa la neoformación ósea por medio de las trabéculas dispuestas a lo largo de la brecha crítica.

Figura 29. Grupo 2 (control 1)



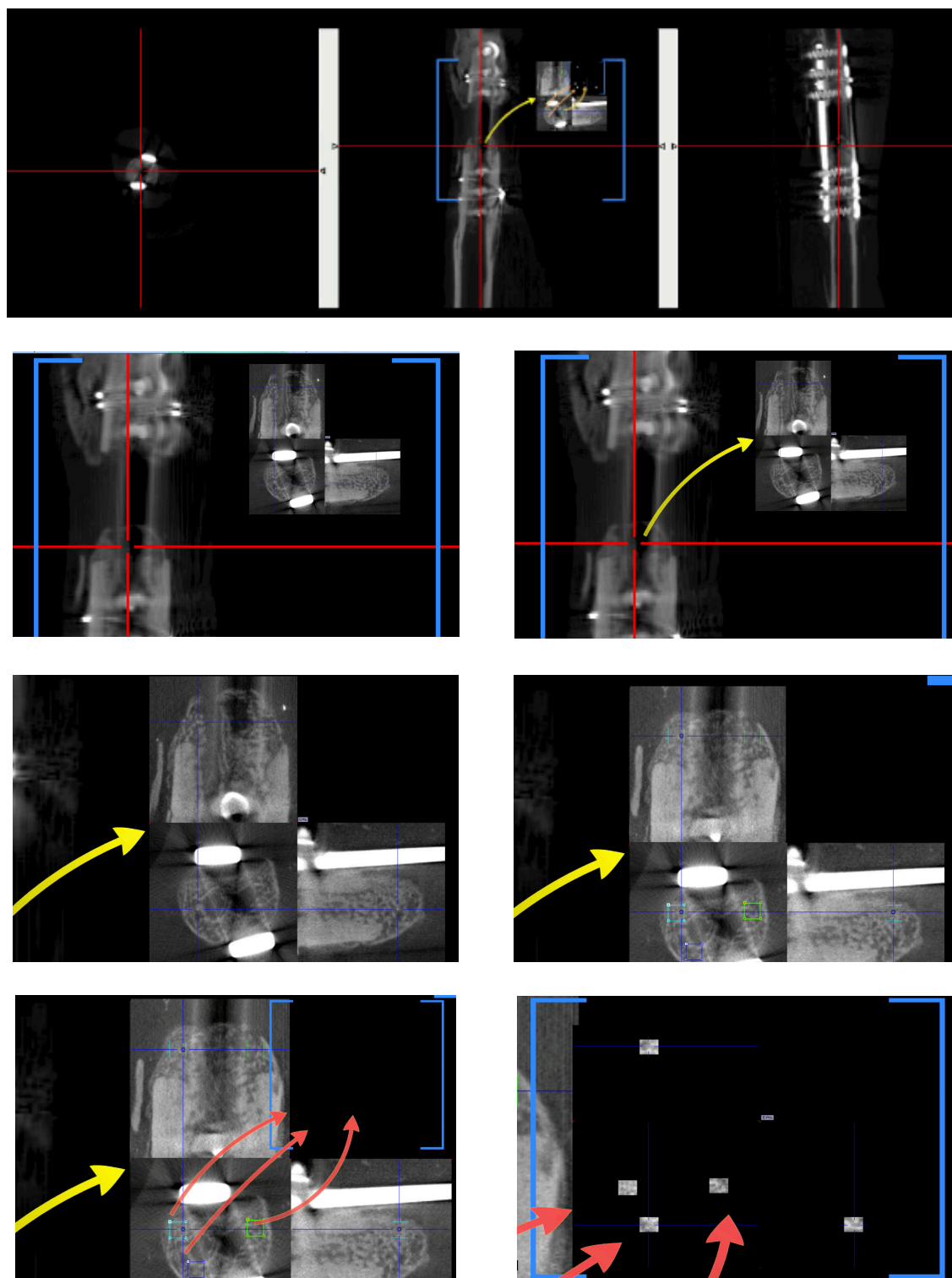
Se observa tejido fibroso con zonas pequeñas de mineralización en la zona mesial de la brecha crítica.

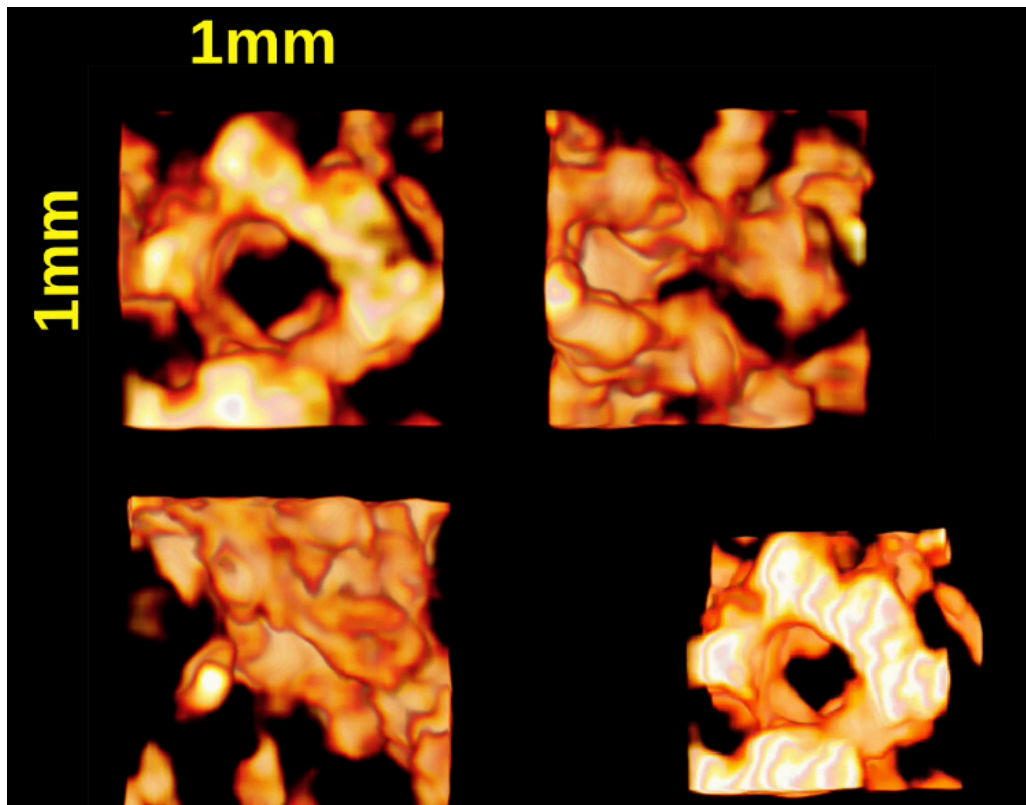
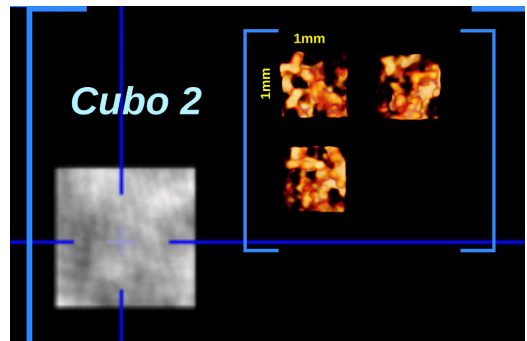
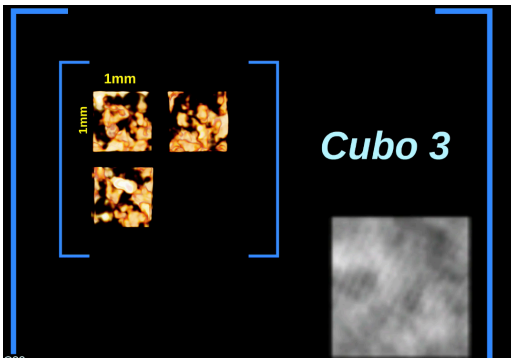
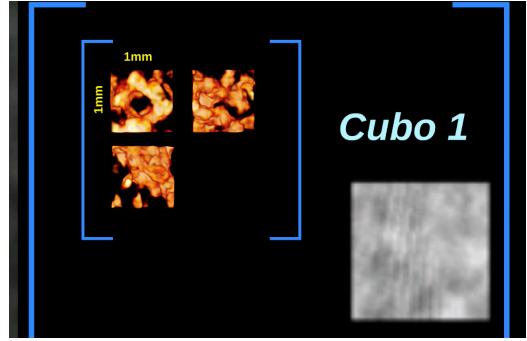
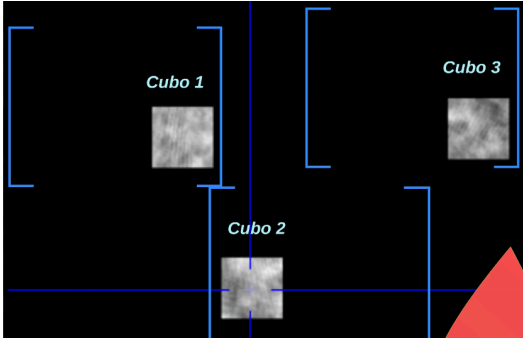
Figura 30. Grupo 3 (control 2)



No se observa ningún tipo de tejido neoformado en la zona mesial de la brecha crítica.

Figura 31. Secuencia para la reconstrucción 3D así como para la obtención de la densidad ósea (descrita ampliamente en los antecedentes). Modelo experimental.





El análisis de estos parámetros se realizó sobre un VOI de $2.5 \times 2.5 \times 2.5 \text{ mm}^3$ posicionado en una sección de hueso regenerado, tal como se ilustra en las siguientes figuras (Figura 31 a 33).

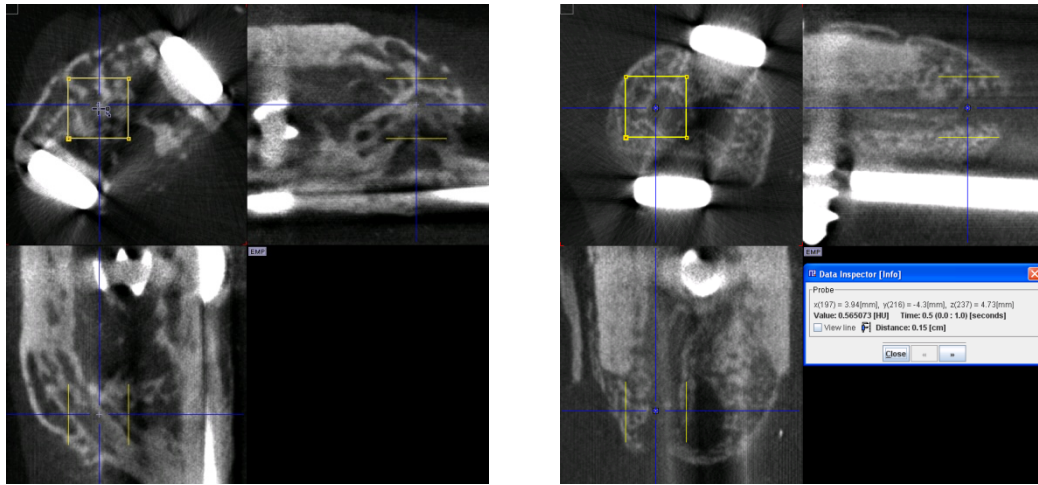


Figura 32. Se presentan los cortes transversal, coronal y sagital del segmento de tibia de los conejos experimentales respectivamente. El recuadro en amarillo indica la ubicación y márgenes del VOI sobre el tejido óseo regenerado. Se observa una mejor estructura trabecular en el conejo experimental a los 5 meses.

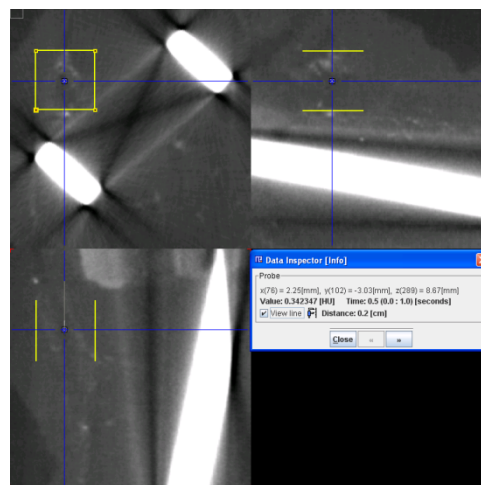
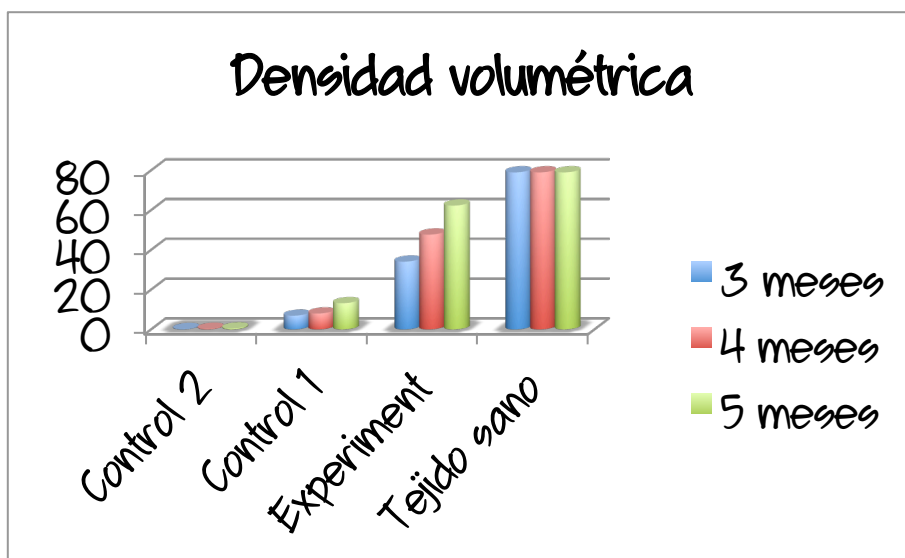


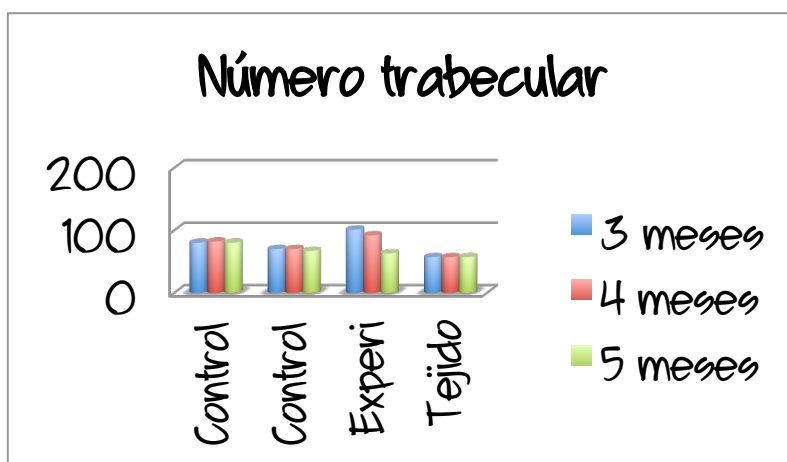
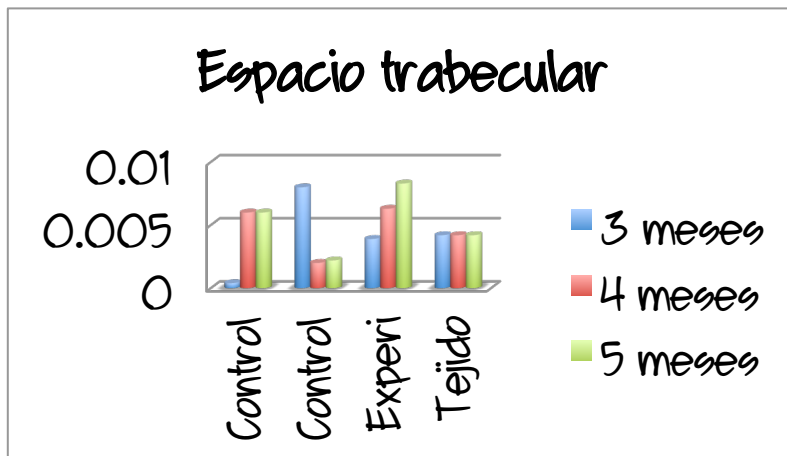
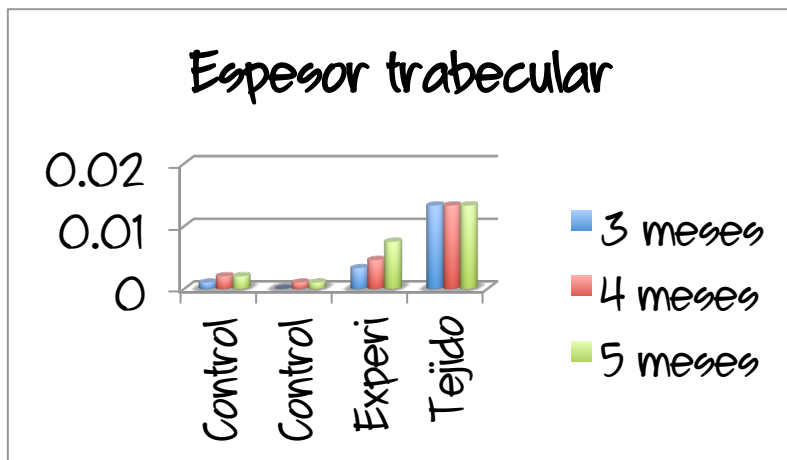
Figura 33. Cortes transversal, coronal y sagital del segmento de tibia de conejo control. Aunque se observa una pequeña estructura ósea en el borde del corte del segmento, ésta no es cuantificable para los parámetros de interés. Se observa un artefacto geométrico en forma de cruz que es resultado de la presencia de la lámina de titanio, el cual se intensifica al no haber tejido óseo en el espacio vacío.

La siguiente Tabla número 11 muestra el análisis de los resultados. Los valores de referencia se calcularon en una sección del hueso fuera del defecto y de la región regenerada. Se realizó el cálculo de densidad ósea, resultando en 1.55 g/cc.

Tabla 11. Regeneración ósea							
Conejo	Tiempo	%BV/TV	Tb.Th (mm)	Std. Dev (mm)	Tb.Sp (mm)	Desv. Están. (mm)	Tb. N (1/mm)
		Densidad volumétrica	Espesor trabecular		Espacio trabecular		Número trabecular
Referencia tejido sano		79.0	0.0133	0.0091	0.0042	0.0024	57
Control 1	3 meses	6.9	0	0.0010	0.0008	0.0010	70
Control 1	4 meses	8.0	0.001	0.0011	0.0020	0.0012	70
Control 1	5 meses	13.2	0.001	0.0013	0.0022	0.0012	67
Control 2	3 meses	0.2	0.001	0.0010	0.0004	0.0008	80
Control 2	4 meses	0.3	0.002	0.0016	0.0006	0.0009	82
Control 2	5 meses	0.5	0.002	0.0014	0.0006	0.0009	80
Experimental 3	3 meses	34.1	0.0033	0.0017	0.0039	0.0027	101
Experimental 3	4 meses	47.7	0.0046	0.0029	0.0063	0.0051	92
Experimental 3	5 meses	62.3	0.0075	0.004	0.0083	0.008	63

Densidad volumétrica (% BV/TV): porcentaje de hueso trabecular en el Volumen de Interés (VOI) analizado; Espesor trabecular (Tb.Th): espesor promedio de la trabécula (mm); Espacio trabecular (Tb.Sp): espacio promedio intratrabecular (mm); Número trabecular (Tb.N): Número promedio de trabécula por unidad de longitud (1/mm).





El caso de la densidad volumétrica, el control 1 (0.001) y control 2 (0.000), si hay diferencias con respecto al grupo experimental (donde no hay diferencia). Es decir, el grupo experimental si muestra una densidad volumétrica similar al del tejido sano (0.063). Para espesor trabecular, el control 1(0.001), control 2 (0.001) y el grupo experimental (0.022), si muestran diferencias, es decir, son diferentes al tejido sano. En lo que respecta al espacio trabecular, el control 1 (0.235) y el grupo experimental (0.098) sí son similares al tejido sano, el control 2 no lo es (0.001). Para el número trabecular, el control 1 (0.007) y el control 2 (0.001), no son parecidos al hueso sano, el grupo experimental (0.132) sí es similar al tejido sano. Ver tablas en la sección A en el apartado de anexo.

La correlación entre el tiempo y las mediciones óseas son las siguientes: en el caso de la densidad volumétrica si son significativas (0.05), es decir, que a mayor tiempo, mayor formación de la densidad volumétrica (relación entre los 3 a 4 meses -0.023-, de los 4 a los 5 meses -0.028- y de los 3 a 5 meses -0.005- respectivamente). Para el espesor trabecular, entre el tiempo de 3 y 4 meses -0.018-, la correlación es significativamente diferente, por lo tanto, a mayor tiempo, si existe un aumento de espesor trabecular, pese a que entre los 4 a 5 meses -0.082-, no se observa correlación. Si hay diferencia de medias, entre el primer periodo parece que hay mayor actividad para la formación del espesor trabecular que los meses siguientes. En el espacio trabecular, entre el mes 4 a 5 meses -0.025- se observa una correlación estadísticamente significativa, por lo cual, una vez que se formó el espesor trabecular, los siguientes meses se hace más amplio el espacio trabecular. No hay correlación ni diferencia de medias en el número trabecular esto se puede deber al corto tiempo de la duración del estudio o al tamaño de la muestra (3 a 4 meses -0.162-, 4 a 5 meses -0.889-, 3 a 5 meses -0.727-). Ver tablas en la sección B en el apartado de anexo.

10. Discusión

El hueso humano es considerado el injerto óseo único que cumple con las características de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción, sin embargo, en algunas ocasiones conlleva más riesgos que

beneficios, como los recaudos por transmisiones virales (el riesgo actual de transmisión viral a través de injertos musculoesqueléticos una vez realizados los controles que exige la normativa de la Asociación Americana de Bancos de Tejidos es de 1 caso por millón), cicatrices, dolor, necesidad imperiosa de sitio donante y procedimientos con costos elevados, entre otros. De esta forma se minimiza cada vez más el uso de estos injertos como primera elección en la rehabilitación de defectos óseos¹⁸¹.

Empero, no se puede hacer a un lado los requerimientos mundiales para obtener injertos óseos; sólo por citar un ejemplo, se prevé que las fracturas de cadera en todo el mundo aumenten de 1.2 millones (1990) a 2.6 millones para el 2025 y a 4.5 millones para el 2050, suponiendo que no haya ningún cambio en la incidencia específica por edad y sexo¹⁸².



- 3 millones de pacientes que sufren de defectos óseos debidos a accidentes de tráfico y enfermedades óseas
- 800 000 injertos óseos al año en todo el mundo
- 40% de la población mundial sufre algún grado de periodontitis
- 500 millones de dólares en injertos óseos al año

Estos porcentajes se incrementan año con año, por lo que la demanda de materiales para la reparación y regeneración ósea es urgente y el mercado industrial es enorme

En los últimos años, los avances tecnológicos han permitido mejorar sustancialmente los métodos para la síntesis de biomateriales de origen odontológico¹⁸³, como la Proteína de Adhesión del Cemento Radicular (*Cementum Attachment Protein* o CAP, por sus siglas en inglés) la cual, es una proteína que se caracteriza por promover selectivamente la migración, adhesión y mineralización de células putativas cementoblásticas a partir de una población heterogénea de células derivadas del ligamento periodontal^{18,145}. Como ya se había planteado anteriormente, CAP es aislada únicamente en la matriz de cemento¹⁰, localizada en cementoblastos¹⁰⁰ y en cemento¹⁸, producida por líneas celulares derivadas de tumores de cemento¹⁰; por lo que se conoce que CAP está fuertemente asociada con el fenotipo cementoblástico¹⁴⁵.

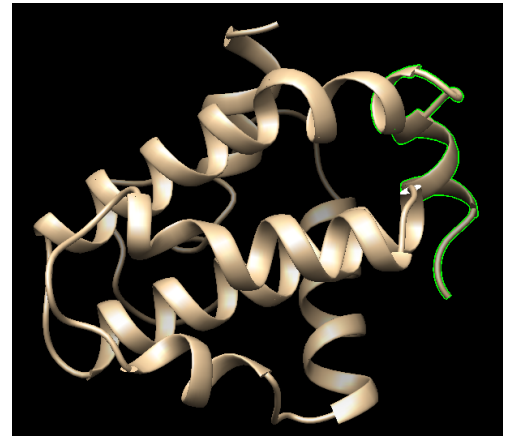


Figura 34. Proteína CAP en el cual se observa el péptido señalado de color verde.

En los hallazgos encontrados en nuestros resultados, la regeneración ósea está presente en todos nuestros animales experimentales, esto es compatible con los datos encontrados en la literatura: la proteína no solamente promueve la adhesión selectiva de células osteoblásticas, sino también entre las células del ligamento periodontal, las cuales se unen fuertemente a CAP y las cuales, también son capaces de formar, *in vitro* (Figura 34), un tejido mineralizado parecido al cemento¹⁴⁴.

El proceso de biomineralización ocurre en los diversos sistemas biológicos, en donde la formación y organización está altamente regulada. En los vertebrados, los cristales de hidroxapatita constituyen la fase mineral, la cual se deposita en la matriz orgánica. Recordando, para que ocurra la nucleación de los cristales de hidroxapatita es necesario que haya una fuente saturada de iones de calcio y fosfatos, y la participación de una o varias biomoléculas. También se ha demostrado que las proteínas asociadas a la formación de cristales, son proteínas ricas en aminoácidos ácidos (ácido aspártico, ácido glutámico y serina), con alta afinidad por la hidroxapatita, como es el caso de nuestro péptido PTPLA/CAP. La proteína CAP tiene regiones ácidas y ricas en serina, SSDED (42-46), SEAGEDRE (53-60), y EVSFPS (125-130). Es una proteína de 140 aminoácidos de los cuales 4 son residuos ácido aspártico (2.9%), 8 residuos de ácido glutámico (5.7%) y 12 serina (8.6%); y su carga eléctrica es neutra (pI 7.72). Pitaru y cols⁹⁵. demostraron que CAP tiene alta afinidad por la hidroxapatita y por la fase mineral de la

superficie radicular, estudios que también explican nuestros hallazgos. Los resultados muestran que CAP, es capaz de inducir la formación de cristales de calcio desde el día 1 de cultivo (las esférulas formadas tienen una relación de Ca/P que indican una fase mineral estable: hidroxiapatita); nosotros demostramos que la neoformación ósea presenta trabéculas óseas con una densidad mineral compatible con hidroxiapatita.

Ya se mencionó que CAP/PTPLA es un splicing alternativo (isoforma 2) del gen CAP/PTPLA y que el análisis *in silico* de CAP/PTPLA muestra que el splicing alternativo ocurre en el sitio activo de PTPLA (isoforma 1), y que sus 15 aminoácidos del carboxilo terminal son únicos y distintos a los de la proteína PTPLA (isoforma 1); basados en los resultados obtenidos por CAP, se fundamenta que el péptido PTPLA/CAP induce un cambio celular mineralizante,

osteoblástico/cementoblástico, mostrando un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina, así como de la formación de nódulos de calcio, debido a que modula la expresión de proteínas asociadas al proceso de mineralización.

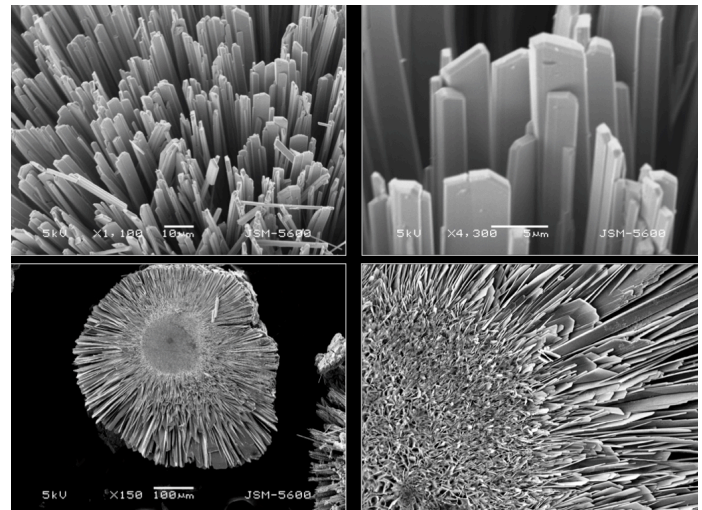


Figura 35. Cristales de hidroxiapatita inducidos en un sistema libre de células en presencia del péptido. se observa la formación de microesferas y disposición de los cristales en forma de hojuelas y cristales poliédricos.

Los resultados obtenidos en las brechas osteotomizadas de los conejos experimentales demuestran regeneración ósea basado en un modelo endocondral (importante remarcar que el periostio fue removido, por lo que la regeneración ósea obtenida en nuestros resultados, no tiene relación con la inducción celular del periostio)¹⁸⁴.

Si bien se sabe que los condrocitos son las células presentes en varios tipos de cartilago y son responsables del crecimiento y el mantenimiento del tejido, éstos son células únicas que realizan múltiples funciones, incluyendo la síntesis de matriz y la degradación de la misma, que en otros tejidos se lleva a cabo por más de un tipo de célula (por ejemplo, la formación de hueso por los osteoblastos y la resorción ósea por los osteoclastos). La formación y eliminación (remodelación)

de los tejidos cartilagosos requiere la proliferación celular regulada, crecimiento, síntesis de proteínas de matriz extracelulares, producción y la activación de las enzimas que degradan la matriz, y en algunos casos, calcificación de la matriz y la muerte celular¹⁸⁵.

El cartílago que es un tejido altamente especializado, está constituido por condrocitos y pocas células progenitoras, que se organizan en varias capas, como la capa fibrosa mineralizada de condrocitos hipertróficos y maduros que se encuentran en contacto directo con el hueso subcondral; la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés, *extracellular matrix*) de los condrocitos que es distinta de la de otros tejidos conectivos. Vinatier explica que la ECM se compone de una red de fibras colágenas que dan al tejido su forma, la fuerza y la fuerza de tracción y, proteoglicanos que dan resistencia a la compresión. Contiene grandes cantidades de proteoglicanos agregados que están unidos con polímeros de ácido hialurónico a través de una proteína de enlace y predominantemente, colágena II (80-90 % de la colágena total), IX y XI¹⁸⁶.

Con respecto a la osificación endocondral, dependiendo de su origen, los huesos muestran distintos modos de formación y propiedades de señalización distintas, que deben tenerse en cuenta cuando se estudia la biología del hueso o su aplicación a entornos clínicos.

Placa de crecimiento tibial de ratón

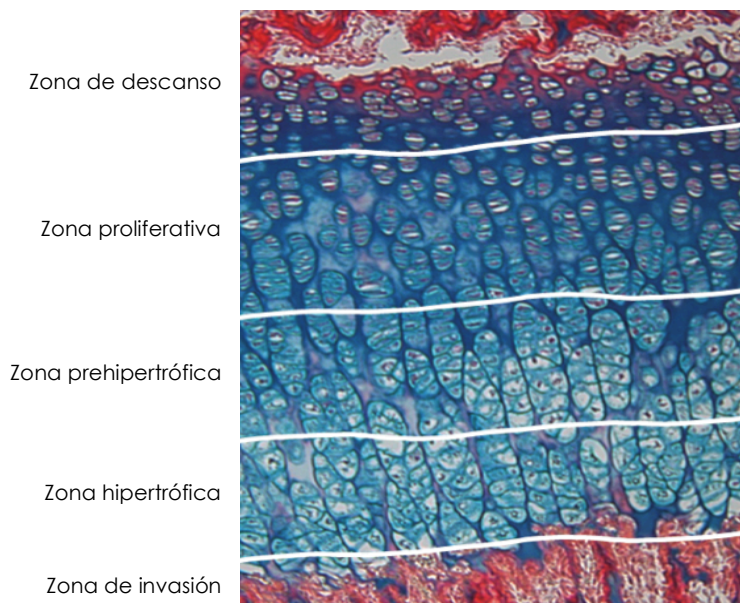


Figura 36. Organización de un cartílago de crecimiento tibial murino de 15 días de edad. Microfotografía de hematoxilina de Weigert/azul de alciano/rojo sirio. Se pueden distinguir diferentes zonas de la placa de crecimiento de acuerdo a los cambios en la morfología y la disposición de las células. Tomado de: *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders*, Rita Dreier, *Arthritis Research & Therapy* 2010, 12:216.

La osificación endocondral (OE) es importante para el desarrollo, crecimiento y la reparación de los huesos largos. La OE es iniciada por la formación de "plantillas" (premolde, esbozo) de cartílago de los futuros huesos, constituido por células progenitoras mesenquimales, que se condensan y se diferencian en condrocitos (Figura 36). Dentro de estos esbozos de hueso, las células del cartílago diferenciado transitan a través de una cascada de acontecimientos temporoespaciales de los últimos eventos diferenciados que secuencialmente incluyen proliferación y varias etapas de maduración, que terminan en la hipertrofia de los condrocitos. Después de la invasión de vasos sanguíneos desde el hueso subcondral, la mayoría de las células hipertróficas se someten a apoptosis y el esbozo de cartílago es remodelado por hueso trabecular.

Cada fase de OE está acompañada por un cambio en la forma celular o arreglo celular y la expresión de un repertorio específico de proteínas. La colágena I, además de las colágenas III y V, es el principal componente fibrilar de células progenitoras mesenquimales indiferenciadas. Después de la diferenciación en condrocitos, las células dejan de producir colágena I, III, y V, para empezar a expresar los componentes del cartílago típicos, incluyendo colágenos II, IX, y XI y los proteoglicanos agregano.

Durante esta etapa de diferenciación, los condrocitos en reposo son pequeños, uniformes y se caracterizan por tener bajas tasas de proliferación. Estas células se producen solas o en parejas, y en el resto de la zona de la matriz extracelular ocupan más espacio que las células. En la etapa proliferativa adyacente, los condrocitos se dividen varias veces y las células planas se organizan en columnas longitudinales. Ahora, el repertorio de expresión incluye: colágenas II, VI, IX, XI matrilina 1 y agregano. Durante la prehipertrófia, se expresa *lhh* (por sus siglas en inglés, *Indian hedgehog*). También, la diferenciación en condrocitos hipertróficos induce la producción de colágena X¹⁸⁷.

Durante la formación de hueso endocondral, los condrocitos hipertróficos actúan como una interfaz funcional esencial entre el cartílago y el hueso, mediante el acoplamiento de la condrogénesis a la osteogénesis. La formación de hueso endocondral es controlada por una variedad de factores y vías de señalización. Los condrocitos hipertróficos expresan una serie de factores de crecimiento y proteínas de la matriz, y muchas líneas de evidencia circunstancial sugieren su participación en la osteogénesis. La osteogénesis se produce en lugares adyacentes a los condrocitos hipertróficos. Esta regla se aplica a todos los huesos

endocondrales, grandes o pequeños, sin excepción. Existen múltiples artículos que apoyan esta aseveración¹⁸⁸.

Chung (2001) reportó que la manipulación de la señalización del PTHrP (péptido relacionado la hormona paratiroidea o con su receptor) de los condrocitos en ratones, conducía a la aparición o desaparición de los condrocitos hipertróficos sin cambiar la señal de la PTHrP en los otros tejidos, de tal forma que, su aparición o desaparición influenciaba la osteogénesis de los tejidos adyacentes durante el desarrollo del hueso endocondral; estas observaciones también establecen que los condrocitos hipertróficos son responsables de la invasión vascular. A fin de verificar el papel de los condrocitos hipertróficos a nivel celular, se trabajó con ratones quiméricos que fueron sometidos a hipertrofia ectópica en la placa de crecimiento, y la formación de condrocitos hipertróficos ectópicos fue asociada con la formación de hueso ectópico. Por múltiples estudios se sabe que las lesiones cartilaginosas tienen una pobre capacidad de cicatrización debido a su falta de regulación sistémica, y de innervación e irrigación. Además, los condrocitos que están rodeadas por una matriz extracelular, a diferencia de la mayoría de los tejidos, no pueden migrar del sitio sano intacto al de la lesión. Las lesiones que están en el hueso subcondral, pueden inducir una reacción sistémica y generar tejido reparativo. El nuevo tejido consiste predominantemente de colágena tipo I, que resulta en la formación de fibrocartilago¹⁸⁹.

Con lo cual, se acepta la hipótesis de trabajo, sustentando que la neoformación cartilaginosa y ósea del péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular, (PTPLA/CAP) influye como un inductor/estimulador de la regeneración ósea en defectos segmentales de tamaño crítico, con características histológicas y con una densidad ósea similar al de un hueso sano y vital.

Tomando en cuenta las consideraciones y los criterios que debe cumplir un injerto ideal, pocos son los materiales que cubren estas características (tener capacidad para producir hueso por proliferación celular de osteoblastos viables transplantados ó por osteoconducción de células a lo largo de la superficie del injerto, poseer la facultad de producir hueso por osteoinducción de las células mesenquimatosas recogidas en el injerto, remodelación del hueso inicialmente formado en hueso laminar maduro, mantenimiento del hueso maduro a través del tiempo sin que la función cause pérdida del mismo, permitir la estabilidad del implante cuando es colocado simultáneamente con el injerto, bajo riesgo de infección, fácil de utilizar, baja antigenicidad y alto nivel de seguridad/infecciones

cruzadas). Con lo anteriormente expuesto, el péptido PTPLA/CAP y cubre la mayoría de los requisitos para los materiales injertables ideales. De hecho, las aplicaciones clínicas son bastas (ingeniería tisular, fracturas complejas, fusión espinal, injertos óseos, tratamiento de defectos óseos debido a trauma, remoción de lesiones neoplásicas, infecciones óseas, alteraciones craneofaciales, integración ósea de implantes dentales y ortopédicos, reparación de defectos óseos secundarios a periodontitis, preservación alveolar e injertos de elevación de seno maxilar, tratamiento de fracturas por osteoartritis u osteoporosis, entre otras).

11. Conclusiones

En los últimos años, la ciencia de la ingeniería tisular ha ampliado notablemente sus aplicaciones ortopédicas y odontológicas incrementando el número de estrategias integrales, desde sus sistemas de liberación hasta los nuevos sustitutos óseos. Las tecnologías terapéuticas de la ingeniería tisular, inducen la regeneración ósea empleando factores de crecimiento, y células osteogénicas, entre otros; sin embargo, existe una nueva opción, el péptido PTPLA/CAP aparentemente sin efectos secundarios indeseables. El péptido incrementa e induce la regeneración ósea en una mayor extensión y más rápidamente, lo cual, evidentemente, mejora la efectividad clínica e impacta en el costo del tratamiento.

Todos nuestros resultados sugieren que el péptido **maximiza la regeneración ósea** (probablemente incrementa la diferenciación de células progenitoras hacia osteoblastos/condroblastos para formar tejido óseo) hasta del 70% en un modelo endocondral. La colocación de 3,420 µg de péptido sintético derivado de la proteína de adhesión del cemento radicular PTPLA/CAP, en los defectos segmentales y críticos de las tibias de los conejos experimentales, mostraron osteoregeneración en la mayor parte de la brecha.

Con base en estos resultados, se abre una posibilidad más para los tratamientos clínicos (Ingeniería tisular, fracturas complejas, fusión espinal, injertos óseos, tratamiento de defectos óseos debido a trauma, remoción de lesiones neoplásicas, infecciones óseas, alteraciones craneofaciales, integración ósea de implantes dentales y ortopédicos, reparación de defectos óseos secundarios a periodontitis, preservación alveolar e injertos de elevación de seno maxilar, tratamiento de fracturas por osteoporosis, etc.), ya que sus ventajas clínicas con respecto a otros sustitutos óseos son múltiples: no promueve el sobrecrecimiento óseo, no presenta efectos colaterales (hematomas idiopáticos, presión en el tracto intestinal, calcificaciones arteriales, presión sobre los troncos nerviosos), no produce reacción inmune o rechazo, es muy bien tolerado por los sujetos (mamíferos), es **osteoinductivo**, desempeña un papel similar a la proteína nativa, promueve el depósito de sales de calcio y fosfato, nucleación de cristales de hidroxapatita, y controla el autoensamble del proceso de mineralización *in vivo*, fácil de sintetizar artificialmente, bajo costo de producción (gran escala), el péptido tiene una masa molecular pequeña, por lo que la formulación puede ser más abundante y evita el uso de biotecnología de proteínas recombinantes (BMP). Empero, aunque los resultados son consistentes en los efectos positivos de

osteoregeneración, esta investigación abre la posibilidad de trabajar en nuevas líneas de investigación acerca del uso a largo plazo, múltiples dosificaciones, uso en huesos no largos y farmacocinética, entre otras.



Conflicto de interés

Esta investigación experimental, corresponde y pertenece a la línea de investigación del Dr. Higinio Arzate (DGAPA-UNAM IN216711, CONACYT 13095), Jefe del Laboratorio de Biología Periodontal de la División de Estudios de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México, por lo que toda información relacionada a su publicación o reproducción total y/o parcial, deberá ser consultada previamente (harzate@unam.mx).

12. Referencias Bibliográficas

1. Kofron MD, Li X, Laurencin CT. Protein and gene-based tissue engineering in bone repair. *Current opinion in biotechnology*. 2004 Oct; 15(5): 399-405.
2. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260 (5110): 920-6. Epub 1993/05/14.
3. Laurencin CT, Ambrosio AM, Borden MD, Cooper JA, Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 1999, 19-46.
4. Lanza RP LR, V. J. (S. Diego, Ed.) *Principles of Tissue Engineering* Academic Press. 2000.
5. Ratner RD HA, S. J. *Biomaterials Science*. Academic Press (S. Diego, Ed.). 1996.
6. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater*. 1991 Fall; 2 (3): 187-208.
7. Freeman E 1994 Periodontium. In: Ten Cate AR (ed.) *Oral Histology*, 4th Ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, MO, U.S.A., pp. 276-312.
8. Grant DA, Stern IB, Listgarten MA 1988 Cementum. In: Grant DA, Stern IB, Listgarten MA (eds.) *Periodontics*, 6th Ed. The CV Mosby Company, St. Louis, MO, U.S.A., pp. 76-93.
9. Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan AS. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in culture. *Bone Miner*. 1992 Jul; 18 (1): 15-30.
10. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J*. 1992 Aug; 6 (11): 2990-5.
11. Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res*. 2002 Aug; 81(8): 541-6.
12. Grzesik W, Cheng H, Oh J, Kuznetsov S, Mankani M, Uzawa K, Robey PG, Yamauchi M. Cementum-forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells. *J Bone Miner Res*. 2000 Jan; 15 (1): 52-9.
13. Handa K, S. M. Handa K1, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, Toyoda M, Teranaka T, Narayanan AS. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res*. 2002; 43 (2-3): 406-8.
14. Saito A, S. Y. Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M. Prolonged ectopic calcification induced by BMP-2-derived synthetic peptide. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jul 1; 70 (1): 115-21.
15. Saito M, I. M. Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan AS. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*, 2001 Sep; 29 (3): 242-8.
16. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res*. 1996 May; 11 (5): 686-92.
17. Álvarez-Pérez MA, N. S.-D. Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human

- cementum-derived protein (CP-23). *Bone*. 2006 Mar; 38 (3): 409-19. Epub 2005 Nov 2.
18. Pitaru S, Narayanan SA, Olson S, Savion N, Hekmati H, Alt I, Metzger Z. Specific cementum attachment protein enhances selectively the attachment and migration of periodontal cells to root surfaces. *J Periodontal Res*. 1995 Sep; 30 (5): 360-8.
19. Salgado A, Coutinho O, Reis R. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience*. 2004 Aug 9; 4 (8): 743-65.
20. Baron R. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2nd edition, Raven Press. 1993 New York 1993, p. 3.
21. Temenoff, L. Lu, A. G. Mikos. *Bone Engineering*. 1st edition, Em squared. 1999 Toronto, p. 454.
22. Aubin, F. Liau. *Principles of Bone Biology*. 1st edition, Academic. 1996 San Diego, CA, p. 51.
23. Sikavitsas VI, Temenoff J, Mikos A. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 2001 Oct; 22 (19): 2581-93.
24. Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone. In: Favus M, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. New York: Raven Press, 1993. p. 39.
25. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone Biology. *J Bone Jt Surg* 1996; 77A: 1256-89.
26. Robey PG. The biochemistry of bone. *Endocrinol Metab Clin North America* 1989; 18: 859-902.
27. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 1999; 13S: S101-12.
28. Cowin SC. Bone poroelasticity. *J Biomech* 1999; 32: 217-38.
29. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera M, del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Jan 1; 11 (1): E47-51.
30. Inaoka T, Lean JM, Bessho T, Chow JWM, Mackay A, Kokubo T, Chambers TJ. Sequential analysis of gene expression after an osteogenic stimulus: c-fos expression is induced in osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 264-70.
31. Tanaka K, Matsuo T, Ohta M, Sato T, Tezuka K, Nijweide PJ, Katoh Y, Hakeda Y, Kumegawa M. Time-lapse microcinematography of osteocytes. *Miner Electrolyte Metab*. 1995; 21: 189-92.
32. Salzstein RA, Pollack SR, Mak AFT, Petrov N. Electromechanical potentials in cortical bone-a continuum approach. *J Biomech* 1987; 20: 261-70.

33. Hillsley MV, Frangos JA. Bone tissue engineering: the role of interstitial fluid flow. *Biotech Bioengng.* 1994; 43: 573-81.
34. Turner CH, Takano Y, Owan I, Murrell GAC. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am J Physiol* 1996; 270: E634-9.
35. Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Mineral Res* 2000; 15: 209-17.
36. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone remodeling and remodeling. *Calcified Tissue Int*, 1993; 53 Suppl 1: S102-6; discussion S106-7.
37. Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone* 2000; 26: 417-22.
38. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, Alobera M, del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006 Mar 1; 11 (2): E151-7.
39. Roden RD, J. Principles of bone grafting. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America.* 2010 Aug; 22 (3): 295-300, v. doi: 10.1016/j.coms.2010.06.001.
40. Chen JH, Liu C, Simmons C. Bony up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *Journal of biomechanics.* 2010, 43 (1), 108-18.
41. Chambers TJ, Evans M, Gardner JN, Turner-Smith A, Chow JNM. Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading. *Bone Miner* 1993; 20: 167-78.
42. Olsen BI, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annual review of cell and developmental biology.* 2000; 16: 191-220.
43. Hojo H, Ohba S, Yano F, Chung UI. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *J Bone Miner Metab.* 2010 Sep; 28 (5): 489-502. doi: 10.1007/s00774-010-0199-7. Epub 2010 Jul 6.
44. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschlegel ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, Schell H, van Griensven M, Redl H, Hutmacher DW. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials.* 2009 Apr; 30 (12): 2149-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.050. Epub 2009 Feb 10.
45. Roodman GD KN. Interleukin-6: A potential autocrine/paracrine agent in Paget's disease of bone. *J Clin Invest.* 1992; 89, 46-52.
46. Reich KM, Gay CV, Frangos JA. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol* 1990; 143: 100-4.
47. Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; 3: 269-305.
48. Rosen V, Thies RS. Adult skeletal repair. In: *The cellular and molecular basis of bone formation and repair.* New York: Springer, 1995. p. 97-142.
49. Caplan A, Boyan B. Endochondral bone formation: the lineage cascade. In:

Hall B, editor. Bone, vol. 8. London: CRC Press, 1994. p. 1-46.

50. Scammell BE, Roach HI. A new role for the chondrocyte in fracture repair: endochondral ossification includes direct bone formation by former chondrocytes. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996 Jun; 11 (6): 737-45.

51. Marx R. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2007; 19: 455-66.

52. Pocock NA, Eisman JA, Hooper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Ebert S. Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *J Clin Invest*. 1987 Sep; 80 (3): 706-10.

53. Canalis RF, Burstein FD . Osteogenesis in vascularized periosteum. *Arch Otolaryngol*. 1985 Aug; 111 (8): 511-6.

54. Ritsila V, Alhopuro, Rintala A. Bone formation with free periosteum. An experimental study. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1972; 6 (1): 51-6.

55. Hofbauer LC KS, D. C. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*. 1999 (140), 4367-70.

56. Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol*. 2002 Aug; 147 (2): 269-73.

57. Joukov V, Pasujola K, Kaipainen A. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 15, 290, 1996.

58. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2576, 1996.

59. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* , 2000 Aug; 21 (4): 393-411.

60. Canalis E, Economides AN, Gazzo E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*. 2003 Apr; 24 (2): 218-35.

61. Reed E. *Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences*. Brooks/Cole Pacific Grove, California. 1982.

62. Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP. 2000. Indian Hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein- dependent and - independent pathways. *Development* 127:543-48.

63. Brighton CT, Hunt RM. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 1997;11:244-53.

64. Yoo J, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop* 1998;355:73-81.

65. Kernek CB, Wray JB. Cellular proliferation in the formation of fracture callus in the rat tibia. *Clin Orthop* 1973;91:197-209.

66. Romana MC, Masquelet AC. Vascularised periosteum with cancellous bone graft: an experimental study. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Apr; 85 (4): 587-92.
67. Bassett C, A. L. Clinical implication of cell function in bone grafting. *Clin Orthop Relat Res*. 1972 Sep; 87: 49-59.
68. Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG. Bone tissue engineering. *Nature Med* 1995;1:1322-4.
69. Louis P, Gutta R, Said-Al-Naief N, et al. Reconstruction of the maxilla and mandible with particulate bone graft and titanium mesh for implant placement. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66:235-45.
70. Albee FH. The fundamental principles involved in the use of the bone graft in surgery. *Am J Med Sci* 1915; 149:313-25. 2. Tomford WW, Mankin HJ. Bone Banking. Update on Methods and materials. *Orthop Clin North Am* 1999; 30:565- 70.
71. Ortiz Cruz EJ, Campo Loarte J, Martínez Marín, Canosa Sevillano R. Estructura y organización de un banco de huesos y tejidos. *Rev Ortop Traumatol* 2000; 44:127-38.
72. Oteiza Urbanell C, Leyes Vence M, Leiva Leon J, Arriola Guenaga FJ, 5. Amillo Garayoa S. Estudio comparativo de distintos métodos para la detección de contaminación bacteriana en aloinjertos óseos. *Rev Ortop Traumatol* 1995; 39:502-4.
73. Segur Vilalta J M , Suso Vergara S, García Ramiro S, Combalía Aleu A, Ramón Soler R. Factores de contaminación de los aloinjertos óseos. *Rev Ortop Traumatol* 1997; 41:584-7.
74. Wilson PD. Experience with a bone bank. *Ann Surg* 1947; 126:932-46. 7. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* 2000; 371:10-27.
75. Behairy Y, Jasty M. Bone grafts and bone substitutes in hip and knee surgery. *Orthop Clin North Am* 1999;30:661-71.
76. Canosa Sevillano, Pérez Blanco R. Diferentes alternativas de reconstrucción, biológicas y con biomateriales, de los defectos óseos. *Rev Ortop Traumatol* 1992; 36B:128-34.
77. Langer, Vacanti JP, Vacanti CA, Atala A, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Tissue Engineering: Biomedical Applications. 1995 Summer; 1(2): 151-61. doi: 10.1089/ten.1995.1.151.
78. Oest ME, Dupont KM, Kong HJ, Mooney DJ, Guldberg RE. Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *J Orthop Res*. 2007 Jul; 25 (7): 941-50.
79. Palmer SH, Gibbons CLMH, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg* 1999; 81 B:333-5.
80. Tagil M. The morselized and Impacted bone graft. Animal experiments on

proteins, impaction and load (Thesis). *Acta Orthop Scand* 2000; 71(Suppl 290):1-40.

81. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. *Clin Orthop* 1996; 324:55-65.

82. Wang G, Yang H, Li M, Lu S, Chen X, Cai X. The use of silk fibroin/hydroxyapatite composite co-cultured with rabbit bone-marrow stromal cells in the healing of a segmental bone defect. *J Bone Joint Surg Br.* 2010 Feb; 92 (2): 320-5. doi: 10.1302/0301-620X.92B2.22602.

83. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989; 3 (3): 192-5.

84. Laurie SW, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE. Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Reconstr Surg* , 1984 Jun;73(6):933-8. 73 (6), 933-8.

85. Fowler BL, Dall BE, Rowe DE. Complications associated with harvesting autogenous iliac bone graft. *Am J Orthop (Belle Mead NJ).* 1995 Dec; 24 (12): 895-903.

86. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Aug; (329): 300-9.

87. Glat PM, Staffenberg DA, Karp NS, Holliday RA, Steiner G, McCarthy JG. Multidimensional distraction osteogenesis: the canine zygoma. *Plast Reconstr Surg.* 1994 Nov; 94 (6): 753-8.

88. Block MS, Brister GD. Use of distraction osteogenesis for maxillary advancement: preliminary results. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons.* 1994 Mar; 52 (3): 282-6; discussion 287-8.

89. Karp NS, Thorne CH, McCarthy JG, Sissons HA. Bone lengthening in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg.* 1990 Mar; 24 (3): 231-7.

90. Orban JM, Marra KG, Hollinger JO. Composition options for tissue-engineered bone. *Tissue engineering.* 2002 Aug;8(4): 529-39.

91. Boone DW. Complications of iliac crest graft and bone grafting alternatives in foot and ankle surgery. *Foot Ankle Clin.* 2003 Mar; 8 (1): 1-14.

92. Cacchioli A. The critical sized bone defect: morphological study of bone healing. *Fac Medic Vet di Parma.* 2006 (26), 97-110.

93. Mankin HJ, Ortiz Cruz EJ, Bibiloni J. Resultados a largo plazo y futuro de los trasplantes con aloinjertos óseos. *Rev Ortop Traumatol* 1996; 40:556-61.

94. Cara JA, Gil Albarova J, Amillo S, Cañadell J. Utilización de aloinjertos masivos en la cirugía reconstructiva tumoral. *Rev Ortop Traumatol* 1992; 36B:8-16.

95. Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg.* 2007 Aug; 77 (8): 626-31.

96. Jansen JA, Vehof JW, Ruhé PQ, Kroeze-Deutman H, Kuboki Y, Takita H, Hedberg EL, Mikos AG. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *J Control Release.* 2005 Jan 3; 101 (1-3): 127-36.

97. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991;263:30-48.

98. Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 1996;323:24-8.
99. Winn SR, Udulag H, Hollinger JO. Carrier systems for bone morphogenetic proteins. *Clin Orthop* 1999; 367S:95-106.
100. Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M. Prolonged ectopic calcification induced by BMP-2-derived synthetic peptide. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2004 Jul 1; 70 (1): 115-21.
101. Seol YJ, Park YJ, Lee SC, Kim KH, Lee JY, Kim TI, Lee YM, Ku Y, Rhyu IC, Han SB, Chung CP. Enhanced osteogenic promotion around dental implants with synthetic binding motif mimicking bone morphogenetic protein (BMP)-2. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2006 Jun 1; 77 (3): 599-607.
102. Lin X, Elliot JJ, Carnes DL, Fox WC, Peña LA, Campion SL, Takahashi K, Atkinson BL, Zamora PO. Augmentation of osseous phenotypes in vivo with a synthetic peptide. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2007 Apr; 25 (4): 531-9.
103. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. 1996 Jul 1; 10 (13): 1580-94.
104. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res*. 1997 Aug; 76 (8): 1460-70.
105. Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol*. 1998 Feb; 69 (2): 129-37.
106. Geesink RG, Hoednagels NH, Bulstra SK. Osteogenic activity of OP-1 bone morphogenetic protein (BMP-7) in a human fibular defect. *J Bone Joint Surg Br*. 1999 Jul; 81 (4): 710-8.
107. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol*. 1988 Oct; 255 (4 Pt 1): E416-21.
108. Cochran DL, Jones AA, Lilly LC, Fiorellini JP, Howell H. Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use of endosseous implants: 3-year results of a pilot study in humans. *J Periodontol*. 2000 Aug; 71 (8): 1241-57.
109. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000 Sep 15; 43 (1): 65-92.
110. Franceschi RT. Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J Dent Res*, Biological approaches to bone regeneration by gene therapy. *J Dent Res*. 2005 Dec; 84 (12): 1093-103
111. Koh JT, Zhao Z, Wang Z, Lewis IS, Krebsbach PH, Franceschi RT. Combinatorial gene therapy with BMP2/7 enhances cranial bone regeneration. *J Dent Res*. 2008 Sep; 87 (9): 845-9.
112. Kwon B, Jenis LG. Carrier materials for spinal fusion. *Spine J*. 2005 Nov-Dec; 5 (6 Suppl): 224S-230S.
113. Tagil M. The morselized and Impacted bone graft. Animal experiments on proteins, impaction and load (Thesis). *Acta Orthop Scand Suppl*. 2000 Feb; 290: 1-40.

114. Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J Tissue Eng Regen Med*. 2008 Jan; 2 (1): 1-13. doi: 10.1002/term.63
115. Wozney JM, Seeherman HJ. Protein-based tissue engineering in bone and cartilage repair. *Current opinion in biotechnology*. 2004 Oct; 15 (5): 392-8.
116. Chadderdon RC, Shimer AL, Gilbertson LG, Kang JD. Advances in gene therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2004 Nov-Dec; 4 (6 Suppl): 341S-347S.
117. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Mar; (360): 71-86.
118. Rimondini L, Nicoli-Aldini N, Fini M, Guzzardella G, Tschon M, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb; 99 (2): 148-54.
119. Gugala Z, Gogolewski S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *J Orthop Trauma*. 1999 Mar-Apr; 13 (3): 187-95.
120. Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res*. 2006 Jul; 24 (7): 1438-53.
121. Al Pearce, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar 2; 13: 1-10.
122. Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2001 Feb; 54 (2): 209-15.
123. Richards RG, Stiffanic M, Owen GR, Riehle M, Curtis AS. Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. *Cell Biol*. 2001; 25 (12): 1237-49.
124. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J*. 1998; 18: 118-23.
125. Gilsanz V, Roe TF, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O, Boechat MI. Effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. *Am J Physiol*. 1988 Oct; 255 (4 Pt 1): E416-21.
126. Léniz P, Forriol F. Estudio de la Incorporación de tres tipos de hueso esponjoso (autoinjerto, aloinjerto congelado y liofilizado). Modelo experimental en corderos. *Rev Ortop Traumatol* 1999; 43:300-4.
127. Reifenrath J, Gottschalk D, Angrisani N, Besdo S, Meyer-Linderberg A. Axial forces and bending moments in the loaded rabbit tibia in vivo. *Acta Vet Scand*. 2012 Mar 30; 54: 21. doi: 10.1186/1751-0147-54-21.
128. Chen CS, Mrksich M. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol. Prog*. 14, 356, 1998.
129. Gutta R, Baker R, Bartolucci A. Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size? *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67:1218-25.

130. Rohanizadeh R, Swain MV, Mason RS. Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Mar; 19 (3): 1173-82. Epub 2007 Aug 15.
131. Damien CJ, Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater*. 1991 Fall; 2 (3): 187-208.
132. Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG. Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials* 2001; 22:1279-88.
133. Freed, L.E., and Vunjak-Novakovic, G. Tissue engineering of cartilage. In Bronzino, J.D., ed, *CRC Handbook of Biomedical Engineering* 1778, 1995.
134. Djagny VB, Wang Z, Xu S. Gelatin: a valuable protein for food and pharmaceutical industries: review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2001 Sep; 41 (6): 481-92.
135. Olsen D, Yang C, Bodo M, Chang R, Leigh S, Baez J, Carmichael D, Jarvinen M, Polarek J. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Nov 28; 55 (12): 1547-67.
136. Sela M, Arnon R. Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. Antigenicity of polypeptidyl gelatins. *Biochem J*. 1960 Apr; 75: 91-102.
137. Li RK, Yau TM, Weisel RD, Mickle DA, Sakai T, Choi A, Jia ZQ. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000 Feb; 119 (2): 368-75.
138. Sivakumar M, Panduranga Rao K. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelatin composite microspheres. *Biomaterials*. 2002 Aug; 23 (15): 3175-81.
139. Centra M, Ratych RE, Cao GL, Li J, Williams E, Taylor RM, Rosen GM. Culture of bovine pulmonary artery endothelial cells on Gelfoam blocks. *FASEB J*. 1992 Sep; 6 (12): 3117-21.
140. Montoya G. La proteína recombinante de adhesión del cemento radicular (hrCAP) induce la diferenciación de células troncales derivadas del ligamento periodontal humano y regula el proceso de mineralización in vitro. Tesis, 2011, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria.
141. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*. 2001 Sep; 45 (5-6): 695-706.
142. Gonçalves PF. Dental cementum reviewed: development, structure, composition, regeneration and potential functions. *Braz J Oral Sci*. 2005, 4 (12).
143. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone*. 2006 Mar; 38 (3): 409-19. Epub 2005 Nov 2.
144. Liu, HW, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res*. 1997 Oct; 12 (10): 1691-9.
145. BarKana I, Narayanan AS, Grosskop A, Savion N, Pitaru S. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces in vitro. *J Dent Res*. 2000 Jul; 79 (7): 1482-8.
146. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, Sampath Narayanan A. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*. 2002 Nov; 31 (5): 606-11.

147. Kemoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate J, Narayanan AS, Brunel G, Salles JP. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007 Aug; 329 (2): 283-94. Epub 2007 Apr 19.
148. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989 Feb; 4 (1): 3-11.
149. Kapadia RD, Strouo GB, Badger AM, Koller B, Levin JM, Coatney RW, Dodds RA, Liang X, Lark MW, Gowen M. Applications of micro-CT and MR microscopy to study pre-clinical models of osteoporosis and osteoarthritis. *Technol Health Care.* 1998 Dec; 6 (5-6): 361-72.
150. Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D, Benhamou CL. Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different X-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices. *Med Phys.* 2009 Apr; 36 (4): 1286-97.
151. Waarsing JH, Day JS, Weinans H. An improved segmentation method for in vivo microCT imaging. *J Bone Miner Res.* 2004 Oct; 19 (10): 1640-50. Epub 2004 Jul 12.
152. Alexander JM, Bab I, Fish S, Muller R, Uchiyama T, Gronowicz G, Nahounou M, Zhao Q, White DW, Chorev M, Gazit D, Rosenblatt M. Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Min Res.* 2001 Sep; 16 (9): 1665-73.
153. Barbier A, Martel C, de Vernejoul MC, Tirode F, Nys M, Mocaer G, Morieux C, Mirakami H, Lacheretz F. The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional X-ray microcomputed tomography. *J Bone Miner Metab.* 1999; 17 (1): 37-44.
154. Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamps LA, Goulet RW, Jesion G. Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res.* 1990 Nov; 8 (6): 833-42.
155. Muller R, Koller B, Hidebrand T, Laib A, Gianolini S, Ruegsegger P. Resolution dependence of microstructural properties of cancellous bone based on three-dimensional micro-tomography. *Technology and Health Care.* 1996 Apr; 4 (1): 113-9.
156. Fanuscu MI, Chang TL. Three-dimensional morphometric analysis of human cadaver bone: microstructural data from maxilla and mandible. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Apr; 15 (2): 213-8.
157. Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Baslé MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res.* 2005 Jul; 20 (7): 1177-84. Epub 2005 Feb 14.
158. Akhter MP, Lappe JM, Davies KM, Recker RR. Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. *Bone.* Jul; 41 (1): 111-6. Epub 2007 Apr 10.
159. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *J Bone Miner Res.* 2010 Jul; 25 (7): 1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.
160. Irwin R, Lin HV, Motyl KJ, McCabe LR. Normal bone density obtained in the absence of insulin receptor expression in bone. *Endocrinology.* 2006 Dec; 147 (12): 5760-7. Epub 2006 Sep 14.

161. Vizard DL, Wood DO, Papineni RV, Feke GD, Orton SP, McLaughlin WE. Computer Methods and Programs In Biomedicine. 2010 Jul; 99 (1): 88-97. doi: 10.1016/j.cmpb.2010.01.003. Epub 2010 Feb 4.
162. Robertson G, Xie C, Chen D, Award H, Schwarz EM, O'keefe RJ, Guldberg RE, Zhang X. Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2/ mice. Bone. 2006 Oct; 39 (4): 767-72. Epub 2006 May 30.
163. Broulík PD, Broulikova K. Raloxifen Prevents Bone Loss in Castrated Male Mice. Physiology Research. 2007; 56 (4): 443-7. Epub 2006 Aug 22.
164. Harrigan TP, Jasty M, Mann RW, Harris WH. Limitations of the continuum assumption in cancellous bone. J Biomech. 1988; 21 (4): 269-75.
165. Fajardo RJ, Muller R. Three-dimensional analysis of nonhuman primate trabecular architecture using micro-computed tomography. Am J Phys Anthropol. 2001 Aug; 115 (4): 327-36.
166. Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. J Bone Miner Res. 1988 Apr; 4 (1): 1-5.
167. Odgaard A, Gundersen HJ. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. Bone. 1993 Mar-Apr; 14 (2): 173-82.
168. Hildebrand T, Ruegsegger P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. Comput Methods Biomech Biomed Engin. 1997; 1 (1): 15-23.
169. Doube M, Klosowski MM, Arganda-Carreras I, Cordelieres FP, Dougherty RP, Jackson JS, Schmid B, Hutchinson JR, Shefelbine SJ. BoneJ: free and extensible bone image analysis in ImageJ. Bone. 2010 Dec; 47 (6): 1076-9. doi: 10.1016/j.bone.2010.08.023. Epub 2010 Sep 15.
170. England, A. R. Hip, knee, ankle, elbow, and shoulder replacement procedures had been reported to the NJR. The 10th Annual Report of the National Joint Registry for England. 2008March.
171. Khan SN, Hidaka C, Sandhu HS, Girardi FP, Cammisa FP Jr, Diwan AD. Gene therapy for spine fusion. Orthop Clin North Am 2000 Jul; 31 (3): 473-84.
172. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. Part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. J Bone Joint Surg 1995;77A:1256-75.
173. Buckwalter JA, Glimcher M J , Cooper RR, Recker R. Bone biology. Part II. J Bone Joint Surg 1995; 77A: 1276-89.
174. Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. Orthop Clin North Am 1999; 30:591-8.
175. Reddi AH. Symbiosis of biotechnology and biomaterials: applications in tissue engineering of bone and cartilage. J Cell Biochem, 1994 Oct; 56 (2): 192-5.
176. L., D. Non-Uniform Random Variate Generation. Springer-Verlag New York. 1986.
177. J., H. Multiple Comparisons: Theory and Methods. Chapman & Hall London. 1996
178. MaN. Mersenne twister: A 623-dimensionally equidistributed uniform pseudorandom number generator. ACM Trans On Modeling and Computer Simulations. 1998.

179. Mukerjee H. Comparison of Several Treatments With a Control Using Multiple Contrasts. *Journal of the American Statistical Association*. 1987; 82 (399), 902-10.
180. Gutteridge F, Bankowski Z, Curran W, Dunne J. The structure and functioning of ethical review committees. *Soc Sci Med*. 1982; 16 (20): 1791-800.
180. Broulík PD, Broulikova K. Raloxifen Prevents Bone Loss in Castrated Male Mice. *Physiology Research*. 2007; 56 (4): 443-7. Epub 2006 Aug 22.
181. Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am*. 2000 Jul; 31 (3): 351-6.
182. Sanchís olmos v. El banco de huesos del Hospital Provincial de Madrid. *Acta Ortop Traum Ibérica*. 1953; 1: 3-12
183. Kale AA, DiCesare PE. Osteoinductive agents: basic science and clinical applications. *Am J Orthop* 1995; 24:752-61.
184. Simpson A. The blood supply of the periosteum. *J Anat* 1985;140:697–704.
185. Ford JL, Robinson DE, Scammell BE. The fate of soft callus chondrocytes during long bone fracture repair. *J Orthop Res* 2003;21:5461.
186. Reddi AH,. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue engineering*. 2000 Aug; 6 (4): 351-9.
187. Franceschi RT. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and extra- cellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:40- 57.
188. Takushima A, Kitano Y, Harii K. Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J Surg Res* 1998;78:68–77.
189. Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, Khosla S. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol*. 2002 Aug; 147 (2): 269-73.

13. Anexos

Formatos de recolección de datos.

Conejo:		Fecha de nacimiento:		Edad:	
Fecha de ingreso al blatería:		Peso al ingresar al blatería:		Peso al día de la cirugía:	
Fecha de cirugía:			Cirujano:		
1 ^{er} ayudante:			2 ^{do} ayudante:		Circulante:
Complicaciones quirúrgicas:					
Observaciones quirúrgicas:					
Colocación de: (encerrar en un círculo)					
		Péptido		Espónja gelatinosa	Membrana colágena
Antibiótico: (fecha)					
Analgésico: (fecha)					
Vendaje de Jones: (fecha de cambios)					
Radiografía: (fecha)					
Tomografía: (fecha)					
Microtomografía: (fecha)					
Observaciones:					

Especificaciones del microtomógrafo Albira

PET System and Capabilities	
Detector Type	LYSO single crystal, PSPMT and PET electronics
Number of Detectors	8 per ring up to 3 rings
Depth of Interaction Correction	State-of-the-art DOI correction based upon the distribution of the light detected in the detector
Sensitivity Greater Than	3 ring: 9% 2 ring: 5% 1 ring: 3%
Resolution Center FOV (mm)	3 ring: < 1.1 2 ring: < 1.2 1 ring: < 1.3
FOV (transaxial mm)	80
FOV (axial mm)	3 ring: 148 2 ring: 94 1 ring: 40
SPECT System and Capabilities	
Detector Type	CsI (Na) single crystal, PSPMT, and SPECT electronics, 2 detectors per instrument
Maximum Sensitivity (cps/MBq)	S108: 1000 S102: 650
Energy Range (keV)	S108: 30 - 400 S102: 40 - 250
Energy Discrimination	14% at 140 keV
Collimators Provided	S108: 1 pinhole, 9 pinhole S102: 1 pinhole, 5 pinhole
FOV (mm)	S108: 30 - 140 S102: 20 - 80
Reconstruction Times	<= 5 min
Acquisition Times (60 projections)	<= 30 min
Minimum Resolution (mm)	S108: <= 0.6 S102: <= 0.8
CT System and Capabilities	
Minimum Voxel Size (μm)	<35 μm
X-ray Focal Spot Size (Nominal μm)	35
Energy Range (kVp)	10-50
Max Current (mA)	1
FOV (transaxial x axial mm)	70 x 70
Detector Pixels	2400 x 2400
Physical Specifications	
Footprint (W x D x H m)	2.2 x 0.9 x 1.6
Recommended Area (W x D x H m)	3 x 2.5 x 2
Bore Size	105 mm
Animal Monitoring	Internal video camera allows users to monitor the status of their mouse from the workstation
Compatible with Most Commercial Gas Anesthesia	Yes
Computer Supplied	Acquisition workstation, reconstruction workstation with dual quad core processors, and storage unit with 3 TB of disk space, scalable options available
Electrical Requirements	110 VAC 15 A 220 VAC 8 A

Escalas de medición, Unidades Hounsfield

Caracterización de los tejidos	
Unidades Hounsfield	
Aire	-1000
Agua	0
Músculo	35-70
Tejido fibroso	60-90
Cartílago	80-130
Hueso trabecular	150-900
Hueso cortical	900-1800
Dentina	1600-2400
Esmalte	2500-3000

Calidad ósea	
Densidad	Unidades Hounsfield(88)
D1	1250
D2	850-1250
D3	350-850
D4	150-350
D5	<150

Prueba de Coeficiente de correlación intraclase (CCI, 0.92) de análisis histomorfométricos.

Coeficiente de correlación intraclase

	Correlación intraclase ^b	Intervalo de confianza 95%		Prueba F con valor verdadero 0			
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1	gl2	Sig.
Medidas individuales	,929 ^a	,857	,966	27,207	29	29	,000
Medidas promedio	,963 ^c	,923	,983	27,207	29	29	,000

► Modelo de efectos mixtos de dos factores en el que los efectos de las personas son aleatorios y los efectos de las medidas son fijos.

- El estimador es el mismo, ya esté presente o no el efecto de interacción.
- Coefficientes de correlación intraclase de tipo C utilizando una definición de coherencia, la varianza inter-medidas se excluye de la varianza del denominador.
- Esta estimación se calcula asumiendo que no está presente el efecto de interacción, ya que de otra manera no es estimable.

Estadísticos de fiabilidad

Alfa de Cronbach	N de elementos
,963	2

Resumen del procesamiento de los casos

	N	%
Casos Válidos	30	100,0
Excluidos ^a	0	,0
Total	30	100,0

a. Eliminación por lista basada en todas las variables del procedimiento.

Sección A

DATASET ACTIVATE Conjunto_de_datos1.

T-TEST

/TESTVAL=79
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=DV1 DV2 DV3
/CRITERIA=CI (.95).

Prueba T

[Conjunto_de_datos1] C:\Users\NATHALIE\Documents\FABIOLA.sps

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
DV1	3	9,3667	3,36502	1,94279
DV2	3	,3333	,15275	,08819
DV3	3	48,0333	14,10295	8,14234

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 79					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
DV1	-35,842	2	,001	-69,63333	-77,9925	-61,2742
DV2	-891,996	2	,000	-78,66667	-79,0461	-78,2872
DV3	-3,803	2	,063	-30,96667	-66,0003	4,0670

T-TEST

/TESTVAL=0.0024
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=ESPAT1 ESPA2 ESPA3
/CRITERIA=CI (.95).

Prueba T

[Conjunto_de_datos1] C:\Users\NATHALIE\Documents\FABIOLA.sps

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
ESPAT1	3	,001667	,0007572	,0004372
ESPA2	3	,000533	,0001155	,0000667
ESPA3	3	,006167	,0022030	,0012719

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0.0024					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
ESPAT1	-1,677	2	,235	-,0007333	-,002614	,001148
ESPA2	-28,000	2	,001	-,0018667	-,002154	-,001580
ESPA3	2,961	2	,098	,0037667	-,001706	,009239

T-TEST

/TESTVAL=0.0133
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=ET1 ET2 ET3
/CRITERIA=CI (.95).

Prueba T

[Conjunto_de_datos1] C:\Users\NATHALIE\Documents\FABIOLA.sps

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
ET1	3	,000667	,0005774	,0003333
ET2	3	,001667	,0005774	,0003333
ET3	3	,005133	,0021502	,0012414

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0.0133					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
ET1	-37,900	2	,001	-,0126333	-,014068	-,011199
ET2	-34,900	2	,001	-,0116333	-,013068	-,010199
ET3	-6,579	2	,022	-,0081667	-,013508	-,002825

T-TEST

/TESTVAL=57
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=NT1 NT2 NT3
/CRITERIA=CI (.95).

Prueba T

[Conjunto_de_datos1] C:\Users\NATHALIE\Documents\FABIOLA.sps

Estadísticos para una muestra

	N	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media
NT1	3	69,000000	1,7320508	1,0000000
NT2	3	80,666667	1,1547005	,6666667
NT3	3	85,333333	19,8578280	11,4649223

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 57					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
NT1	12,000	2	,007	12,0000000	7,697347	16,302653
NT2	35,500	2	,001	23,6666667	20,798232	26,535102
NT3	2,471	2	,132	28,3333333	-20,996246	77,662913

Sección B

Prueba T

[Conjunto_de_datos1] C:\Users\NATHALIE\Documents\FABIOLA.sps

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	DENSIDADVOLUMETRIC A1	13,7333	3	17,95337	10,36538
	DENSIDADVOLUMETRIC A2	18,6667	3	25,43665	14,68586
Par 2	DENSIDADVOLUMETRIC A2	18,6667	3	25,43665	14,68586
	DENSIDADVOLUMETRIC A3	25,3333	3	32,63776	18,84342
Par 3	DENSIDADVOLUMETRIC A1	13,7333	3	17,95337	10,36538
	DENSIDADVOLUMETRIC A3	25,3333	3	32,63776	18,84342

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	DENSIDADVOLUMETRIC A1 y DENSIDADVOLUMETRIC A2	3	,999	,023
	DENSIDADVOLUMETRIC A2 y DENSIDADVOLUMETRIC A3	3	,999	,028
Par 3	DENSIDADVOLUMETRIC A1 y DENSIDADVOLUMETRIC A3	3	1,000	,005

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	DENSIDADVOLUMETRIC A1 - DENSIDADVOLUMETRIC A2	-4,93333	7,52219	4,34294	-23,61949	13,75282	-1,136	2	,374
	DENSIDADVOLUMETRIC A2 - DENSIDADVOLUMETRIC A3	-6,66667	7,31118	4,22111	-24,82864	11,49531	-1,579	2	,255
Par 3	DENSIDADVOLUMETRIC A1 - DENSIDADVOLUMETRIC A3	-11,60000	14,68571	8,47880	-48,08132	24,88132	-1,368	2	,305

Prueba T

[Conjunto_de_datos1] C:\Users\NATHALIE\Documents\FABIOLA.sps

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	ESPESORTRA1	,0014333	3	,00169214	,00097696
	ESPESORTRA2	,0025333	3	,00185831	,00107290
Par 2	ESPESORTRA2	,0025333	3	,00185831	,00107290
	ESPESORTRA3	,0035000	3	,00350000	,00202073
Par 3	ESPESORTRA1	,0014333	3	,00169214	,00097696
	ESPESORTRA3	,0035000	3	,00350000	,00202073

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	ESPESORTRA1 y ESPESORTRA2	3	1,000	,018
Par 2	ESPESORTRA2 y ESPESORTRA3	3	,992	,082
Par 3	ESPESORTRA1 y ESPESORTRA3	3	,988	,100

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	ESPESORTRA1 - ESPESORTRA2	-,00110000	,00017321	,00010000	-,00153027	-,00066973	-11,000	2	,008
Par 2	ESPESORTRA2 - ESPESORTRA3	-,00096667	,00167432	,00096667	-,00512590	,00319256	-1,000	2	,423
Par 3	ESPESORTRA1 - ESPESORTRA3	-,00206667	,00184752	,00106667	-,00665616	,00252283	-1,938	2	,192

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	ESPACIOTRA1	,0017000	3	,00191572	,00110604
	ESPACIOTRA2	,0029667	3	,00297041	,00171497
Par 2	ESPACIOTRA2	,0029667	3	,00297041	,00171497
	ESPACIOTRA3	,0037000	3	,00406325	,00234592
Par 3	ESPACIOTRA1	,0017000	3	,00191572	,00110604
	ESPACIOTRA3	,0037000	3	,00406325	,00234592

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	ESPACIOTRA1 y ESPACIOTRA2	3	,991	,085
Par 2	ESPACIOTRA2 y ESPACIOTRA3	3	,999	,025
Par 3	ESPACIOTRA1 y ESPACIOTRA3	3	,996	,060

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	ESPACIOTRA1 - ESPACIOTRA2	-,00126667	,00110151	,00063596	-,00400298	,00146965	-1,992	2	,185
Par 2	ESPACIOTRA2 - ESPACIOTRA3	-,00073333	,00110151	,00063596	-,00346965	,00200298	-1,153	2	,368
Par 3	ESPACIOTRA1 - ESPACIOTRA3	-,00200000	,00216333	,00124900	-,00737401	,00337401	-1,601	2	,250

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	NUMEROTRA1	83,6667	3	15,82193	9,13479
	NUMEROTRA2	81,3333	3	11,01514	6,35959
Par 2	NUMEROTRA2	81,3333	3	11,01514	6,35959
	NUMEROTRA3	70,0000	3	8,88819	5,13160
Par 3	NUMEROTRA1	83,6667	3	15,82193	9,13479
	NUMEROTRA3	70,0000	3	8,88819	5,13160

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	NUMEROTRA1 y NUMEROTRA2	3	,968	,162
Par 2	NUMEROTRA2 y NUMEROTRA3	3	-,174	,889
Par 3	NUMEROTRA1 y NUMEROTRA3	3	-,416	,727

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	NUMEROTRA1 - NUMEROTRA2	2,33333	5,85947	3,38296	-12,22239	16,88905	,690	2	,562
Par 2	NUMEROTRA2 - NUMEROTRA3	11,33333	15,30795	8,83805	-26,69372	49,36039	1,282	2	,328
Par 3	NUMEROTRA1 - NUMEROTRA3	13,66667	21,12660	12,19745	-38,81472	66,14806	1,120	2	,379

Estadísticos de muestras relacionadas

		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1	A	4,7186	35	1,30251	,22017
	B	4,9697	35	,98505	,16650

Correlaciones de muestras relacionadas

		N	Correlación	Sig.
Par 1	A y B	35	,920	,000

Prueba de muestras relacionadas

		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior				Superior
Par 1	A - B	-,25114	,55256	,09340	-,44095	-,06133	-2,689	34	,011