

11282



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

**“INDUCCION DE ESTRUCTURAS ÓSEAS
Y PARAÓSEAS CON EPIPLÓN MAYOR,
PERIOSTIO Y POLVO
DESMINERALIZADO DE HUESO”.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS
PRESENTA
DANIEL ASCENCIO GONZALEZ

MEXICO 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICO ESTA TESIS

A todos mis seres queridos:
Familia
Amigos
Amigos Maestros
Colaboradores.

A todos los que
alentaron, ayudaron y a pesar
de todo creyeron en mí y en el
proyecto.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE:

FECHA:

FIRMA:

DANIEL

Daniel Ascencio González
22. Septiembre 2004


INDICE

- ❖ Lista de abreviaturas
- ❖ Introducción.
- ❖ Planteamiento de la línea de investigación
- ❖ Antecedentes históricos de los trasplantes
- ❖ Antecedentes de estudios experimentales
- ❖ Historia de la Ingeniería Tisular
- ❖ Marco teórico del proyecto
- ❖ Reparación de las heridas. Restitución tisular
- ❖ Reparación de las fracturas
- ❖ ¿Regeneración o reparación tisular?
- ❖ Tejido y remodelado óseo
- ❖ Elementos celulares:
 - a.- Células osteogénicas
 - b - Células indiferenciadas
 - c.- Células óseas
 - d.- Osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento y osteoclastos.
 - i. Osteoblastos.
 - ii. Osteocitos
 - iii. Células de revestimiento
 - iv. Osteoclastos.
- ❖ Factores de crecimiento óseo
- ❖ Factores locales de crecimiento óseo
- ❖ Matriz extracelular
- ❖ Regeneración ósea normal.
- ❖ Inducción ósea.
- ❖ Antecedentes históricos de osteoinducción
- ❖ Inducción experimental de hueso heterotópico
- ❖ Formación heterotópica ósea por inducción celular
- ❖ Inducción heterotópica ósea por BMP
- ❖ Osteoinductividad de la BMP
- ❖ Fuentes de BMPs
 - i. Origen y actividad de las BMPs
 - ii. Medio ambiente para lograr la inducción heterotópica
 - iii. Capacidad y respuesta de las células blanco para provocar la inducción.
- ❖ Modelos animales de inducción heterotópica ósea.
- ❖ Morfogénesis
- ❖ Morfogénesis en sinergia.
- ❖ Morfogénesis, Regeneración e Ingeniería Tisular.
- ❖ Principios de regeneración de los tejidos esqueléticos
- ❖ Elementos celulares.
 - I. Células adultas troncales
 - II. Control interno. Destino de las células troncales.
 - III. Control externo. El nicho de las células troncales
 - IV. Plasticidad

INVESTIGACION EXPERIMENTAL

- ❖ Justificación
- ❖ Hipótesis
- ❖ Objetivo
- ❖ Material y métodos.
- ❖ Animales de experimentación
- ❖ Implantes
 - Polvo de desmineralizado de hueso.
 - La colágena tipo I (esponja de fibroquel)
- ❖ Grupos de estudio
- ❖ Técnica quirúrgica
- ❖ Técnica de preparación del plasma enriquecido en plaquetas (PRP)
- ❖ Obtención de especímenes
- ❖ Análisis cualitativo y cuantitativo de la capacidad osteogénica del modelo experimental.
 - Examen macroscópico.

- Examen histológico e inmunchistoquímica.
 - Estadística
- ❖ Resultados
 - Observaciones clínicas
 - Examen histopatológico
 - Análisis Histomorfométrico
 - Inmunchistoquímica y Detección de TFG β y BMPs
- ❖ Discusión.
- ❖ Conclusión.
- ❖ Glosario de términos
- ❖ Bibliografía

LISTA DE ABREVIATURAS.

aFGF	Factor de crecimiento fibroblástico ácido
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BMP	Proteína morfogénica de hueso
DMP	Matriz desmineralizada de hueso (polvo desmineralizado de hueso)
DOPCs	Células precursoras osteoprogenitoras determinadas
IOPCs.	Células precursoras osteoprogenitoras inducibles
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación
HSC	Célula troncal hematopoyética
ICC	Injerto colgajo compuesto (periostio, epiplón, plasma enriquecido en plaquetas, polvo desmineralizado de hueso, fibrina)
IGF-I	Factor de crecimiento insulinoide I.
IGF-II	Factor de crecimiento insulinoide II.
MSCs	Células mesenquimatosas madre, tronco, o troncales.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDH	Polvo desmineralizado de hueso.
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PGE	Prostaglandina de la serie E
PRP	Plasma enriquecido en plaquetas
TGFβ-1	Factor de crecimiento y transformación beta1
TGFβ-2	Factor de crecimiento y transformación beta2
TNF	Factor de necrosis tumoral.
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

INTRODUCCION.

En la actualidad, nuevas estrategias terapéuticas emergen de los estudios experimentales y clínicos e inician su aplicación tanto en el terreno de la ingeniería de los tejidos como en la terapia génica.

La biología celular y molecular ha permitido estudiar de una manera integral los complejos fenómenos de la regeneración tisular, la morfogénesis y de esta manera conocer mejor los procesos de inducción tisular.

Los estudios multidisciplinarios de los procesos fundamentados en la biología celular, molecular, química, física, matemáticas e ingeniería, aplicados a estudios experimentales y clínicos han modificado los conceptos quirúrgicos, y ofrecen ahora, nuevas expectativas para lograr la regeneración tridimensional de los tejidos.¹

Actualmente, la biotecnología se ha incorporado a la práctica clínica diaria, y de esta forma la ingeniería tisular surge como una disciplina nueva, tanto en el terreno experimental como en el clínico. El objetivo primordial, es lograr la regeneración integral de órganos y tejidos, *restituto ad integrum*, en vez de solamente obtener el proceso de reparación tisular.²

De igual forma, la regeneración ósea es un proceso continuo en los vertebrados, se atribuye a la respuesta de diversos fenotipos celulares, en la cual interactúan múltiples señales moleculares que inducen el proceso, ocurren este durante el desarrollo fetal, la esqueletogénesis, la osteogénesis consecutiva a la restitución tisular postraumática y la inducción tisular ósea.^{1,2,3}

La restitución anatómica y funcional del esqueleto, constituye en el momento actual un reto, tanto en el terreno de la investigación experimental como en la práctica clínica. Fenómenos celulares y moleculares semejantes, ocurren durante el proceso de restitución de las fracturas, el trasplante y la inducción ósea, se han estudiado, con diversas perspectivas y en múltiples modelos experimentales, sin embargo, aún múltiples preguntas deben ser contestadas.³

Esta tesis revisa, la historia del trasplante óseo, los principales estudios experimentales y clínicos del fenómeno de inducción ósea, establece la diferencia entre los fenómenos de reparación y regeneración tisular, particularmente la del esqueleto, a partir de células indiferenciadas durante el proceso de reparación de las fracturas, los fundamentos de la inducción tisular, los conceptos actuales del desarrollo embriológico óseo, la anatomía, la fisiología, la biología celular y molecular de las células progenitoras, las matrices extracelulares, los factores de crecimiento sistémicos y locales y su interacción durante los procesos de remodelación normal, inducción y regeneración ósea.

Se mencionan los antecedentes más relevantes en la investigación del proceso de la osteoneogénesis, analiza los modelos experimentales de inducción ósea heterotópica, y plantea el estado actual en la ingeniería tisular del esqueleto.

Por otra parte, propone como apoyo a la hipótesis de esta tesis, dos modelos de estudio de inducción heterotópica extraesquelética de tejidos óseos y paraóseos.

El primer modelo propuesto, se forma en el denominado "injerto colgajo compuesto" (ICC), conformado, por un colgajo de epiplón, un injerto de periostio del cráneo y el implante de colágena tipo I, el grupo de estudio testigo se forma con un colgajo de epiplón y colágena tipo I. El segundo modelo reúne, células con capacidad progenitora, una matriz extracelular y factores bioactivos, o de crecimiento, todos incluidos en un injerto colgajo de epiplón, los tejidos incluidos son: el periostio y plasma enriquecido en plaquetas, (PRP), y elementos como fibrinógeno, trombina, y cloruro de calcio, los implantes empleados son la matriz desmineralizada de hueso (DBM), en forma de polvo de hueso desmineralizado (DBP) y colágena tipo I (Fibroquel®), los grupos testigo se forma con los elementos mencionados excepto el periostio.

Se describe la técnica quirúrgica, original del autor, la técnica para obtener plasma enriquecido en plaquetas, y la manera de inducir el fenómeno de desgranulación de las plaquetas, y de esta forma obtener factores de crecimiento autólogos, analiza los resultados clínicos, y los apoya con estudios anatomopatológicos, histomorfometría, e inmunohistoquímica, se discuten y se analizan los resultados obtenidos en el trabajo experimental y el potencial del modelo experimental para la aplicación clínica futura.

PLANTEAMIENTO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

En 1984, en la tesis presentada para optar al grado de Maestro en Ciencias Médicas, en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, el autor reveló con un modelo experimental original, una forma de inducción ósea heterotópica mediante el trasplante de periostio de cráneo dentro de un injerto colgajo compuesto, fabricado con epiplón, sobre la pared abdominal de perros jóvenes. A la vez se observó la formación de músculo estriado y liso, médula ósea al parecer hematopoyética y a la postre médula grasa. Se atribuyó lo anterior a la diferenciación y ulterior desarrollo de células troncales multipotenciales.⁴

Los resultados obtenidos dieron lugar al planteamiento de múltiples preguntas.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LOS TRASPLANTES.

Tradicionalmente, los cirujanos han trasplantado diversos tejidos para reconstruir órganos y tejidos, han recurrido a elementos tan diversos como el tendón y el hueso entre otros, utilizados como una estructura de soporte "puente" o "andamio", con la función de interconectar los tejidos fundamentalmente, han sido usados con guías conductoras, de otra forma se ha trasplantado matrices extracelulares con células vivas, o combinadas con factores de crecimiento, asimismo, se ha intentado por diversos métodos, mejorar las condiciones del lecho receptor de los tejidos, para fomentar, inducir y promover un medio ambiente local óptimo.⁵

La historia de la reconstrucción de los tejidos es pródiga, va desde la descripción Bíblica, que menciona literalmente; "el Señor durmió al hombre, tomó una costilla, y formó a la mujer". Hasta la leyenda del homotrasplante de un miembro, realizado por los santos Damián y Cosme, el hecho quedó plasmado en la obra pictórica del pintor florentino Fra Angélico.⁵

El primer comunicado de un trasplante óseo fue en 1668, y se atribuyó al cirujano holandés Job Van Mee'ren, sin embargo fue hasta 1908, que Lexer describió, la formación de hueso, con homoinjertos frescos de cadáveres, los huesos fueron usados como una estructura para la reconstrucción articular.⁶

En las últimas tres décadas, se han obtenido avances importantes en el tratamiento de la pérdida de los tejidos esqueléticos, con materiales aloplásticos, se ha conseguido el reemplazo total de la articulación de la cadera, así como de las articulaciones interfalángicas, con otros materiales aloplásticos, de otra forma, las resecciones amplias de tumores como el osteosarcoma, son tratadas con injertos autólogos o tejido de banco. En algunos casos se ha tenido éxito, sin embargo, los resultados aún no son completamente satisfactorios.

ANTECEDENTES DE ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Los primeros estudios experimentales para inducir hueso, con el uso de periostio, los realizó en 1867 Ollier, analizó el poder osteogénico del periostio, lo ubicó en la capa proliferativa conocida como *cámbium*, la formación de hueso la atribuyó a células osteoprogenitoras.⁷

Recientemente, los injertos libres de periostio han sido utilizados para formar hueso nuevo. Ritsila en su estudio, describió la manera, como en regiones bien vascularizadas se logra formar hueso, consideró al medio ambiente primordial para la viabilidad tisular, y la expresión de la capacidad osteogénica del periostio.⁸

Otra línea de investigación, para inducir la formación de hueso, fue la de Senn quien en 1889, utilizó por primera vez implantes descalcificados de hueso, para el tratamiento de la osteomielitis.⁹ Mas tarde, en 1950 Willestaedt, logro la inducción experimental heterotópica de hueso, utilizó en sus estudios sustancias inductoras,¹⁰ descubrió, como el extracto alcohólico de hueso de conejo, tenían la capacidad de formar hueso nuevo, al ser inyectado en el músculo estriado.

En 1965 Urist, en su trabajo clásico, dentro de la inducción experimental, describió el fenómeno de inducción ósea heterotópica en roedores, usó la matriz ósea, en esta identificó un grupo de proteínas, extraídas del hueso maduro de bovino, que al ser implantadas en los tejidos blandos, lograron inducir y formar hueso y cartílago.¹¹

Recientemente, estudios experimentales en animales, con técnicas de microcirugía, han intentado inducir la formación de hueso, con injertos óseos vascularizados en cámaras de cerámica,¹² otros lo han intentado en colgajos de periostio vascularizados, combinados dentro de cilindros porosos de hidroxiapatita.¹³ Finley usó trasplantes de periostio costal vascularizado en sitios heterotopicos, para forma hueso.¹⁴

El primer injerto óseo vascularizado, que utilizó la proteína morfogénica de hueso (BMP), como factor osificante lo realizó Khouri, sin embargo, sus estudios carecieron de validez.¹⁵ Estudios de inducción heterotópica ósea se ha intentado en ratas en colgajos en isla del músculo dorsal ancho.¹⁶

Actualmente, la inducción tisular es motivo de múltiples trabajos de investigación, fundamentalmente orientados al estudio del complejo multicelular y las interacciones célula-célula, célula-matriz, y las interacciones inductivas o permisivas, que favorecen la proliferación y la migración de las células

progenitoras. Otros motivos de estudio son: el mecanismo de acción de las señales inductivas moleculares durante la morfogénesis, la respuesta de diversos estímulos de las células troncales en ciclo de diferenciación, y la participación fundamental en el proceso de las diversas matrices extracelulares. De otra forma, se ha trasplantado matrices con células vivas, combinadas, con factores bioactivos o de crecimiento.

El éxito se ha logrado cuando las condiciones son óptimas en el lecho receptor de los injertos, esto implica fomentar, inducir y promover un medio ambiente local favorable. Normas fundamentales de la práctica quirúrgica habitual.^{17,18}

HISTORIA DE LA INGENIERÍA TISULAR.

La ingeniería tisular, como disciplina formal, se inició hace más de tres décadas. El término fue "acuñado" en 1987 por el Profesor Y. C. Fung, de la Universidad de California, en San Diego, sugirió el nombre a la nueva disciplina en la reunión de la Fundación Nacional de Ciencias, desde entonces ha tenido gran expansión.¹

De forma tradicional, la ingeniería tisular se ha practicado durante siglos en el ejercicio clínico diario, tanto al lado de la cama de los enfermos, como en el quirófano, con la premisa básica "la curación debe ser hecha por el mismo cuerpo". Los médicos han intentado mantener las funciones vitales en un medio ambiente óptimo, y de ésta forma lograr la curación. Básicamente se ha intentado neutralizar los factores adversos, mejorar el aporte de oxígeno y los nutrientes tisulares necesarios para la curación.¹

Un axioma fundamental en cirugía es la debridación oportuna del tejido necrótico, fuente de agentes químicos desfavorables, eliminar la escara, el espacio muerto, aproximar los tejidos viables para formar un puente, que oriente la forma y función del tejido, y de esta manera proporcionar estructura y protección del medio ambiente hostil, para finalmente favorecer el aporte vascular.

El manejo del medio ambiente debe aportar oxígeno adecuado y por otra parte es necesario eliminar los productos de deshecho, el mismo cuerpo realiza, si las condiciones son óptimas.

La ingeniería tisular enfoca las estrategias al micromedio ambiente, de manera opuesta a la curación tradicional que orienta sus estrategias al macromedio ambiente.¹

Diversos modelos experimentales se han desarrollado para generar tejidos funcionales, por el estudio y la comprensión de los conceptos básicos de organización desarrollo y función de los sistemas vivos y de las interacciones celulares.²⁰

La ingeniería tisular, trata de imitar los procesos de regeneración tisular, fundamentada en la biología de los tejidos, el desarrollo de la metodología y el control de los procesos físico químicos tisulares.¹

Potencialmente puede contribuir a solucionar una parte de la crisis de los trasplantes de órganos y tejidos, causada por la escasez de donadores, el alto costo y la infraestructura necesaria para realizar los procedimientos.¹

La estrategia básica es emplear un sistema biológico natural, que permita el desarrollo reemplazo, reparación, mantenimiento, y / o perfeccionamiento de la función de los tejidos.¹⁸

La propuesta es formar tejidos y órganos, los éxitos iniciales se ha logrado con sustitutos de piel, un tejido relativamente simple, cartilago y hueso, ahora la meta es la creación de órganos vitales como el riñón, el hígado, el páncreas o el corazón.¹

Ahora a las técnicas quirúrgicas se han integrado los conocimientos nuevos de la biología, química, física, matemáticas, la ingeniería del diseño de materiales, y las líneas de investigación buscan replicar los procesos biológicos, fundamentados en los principios biomiméticos del desarrollo embrionario y los procesos de regeneración tisular.¹⁸

La ingeniería tisular y el progreso de la biotecnología han tenido un profundo impacto, e inicia una nueva práctica de la medicina.

MARCO TEÓRICO DEL PROYECTO

Los tejidos biológicos están conformados por la triada constituida por células, matriz extracelular (complejo de secreciones celulares inmovilizadas en espacios ininterrumpidos de células) y un sistema de señales moleculares, las acciones coordinadas participan en la activación diferencial de genes o cascada de genes, que secretan productos de transcripción y son responsables de la formación y diferenciación tisular.^{1,2}

La regeneración tisular repite las etapas del desarrollo embrionario, en los tejidos adultos, el fenómeno depende fundamentalmente de procesos biológicos, físicos, químicos, y de la interacción de células, matriz extracelular y factores de crecimiento bioactivos. La proporción y el tiempo en el que participa cada elemento logran inducir la regeneración tisular.^{1,2}

La regeneración ósea se fundamenta, en la hipótesis de que células progenitoras sanas son reclutadas o liberadas en el sitio de restitución, regeneran el tejido dañado o perdido en un medio ambiente propicio.²

Los fenómenos de restitución tisular se expresan en dos vertientes, la reparación o la regeneración. En tanto, la consecuencia final de la reparación es la formación de una cicatriz fibrosa, sin las propiedades normales morfológicas y funcionales del tejido, el resultado final en los procesos de regeneración tisular es la formación de un tejido de características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas semejante al original.^{1,2}

REPARACIÓN DE LAS HERIDAS. RESTITUCIÓN TISULAR.

La curación normal de las heridas puede ser dividida operacionalmente en dos estadios diferentes. Inicialmente las plaquetas liberan el producto de sus gránulos y otros elementos de la coagulación, localmente se depositan, en una secuencia precisa.

Continúa el proceso, con la migración de neutrófilos, monocitos y fibroblastos dentro de la herida, se inicia inmediatamente con la aparición de la lesión y se prolonga los primeros días: los macrófagos de la heridas (derivados de los monocitos circulantes), los fibroblastos se activan e inician la cascada de expresión de nuevos genes, el resultado es la síntesis de *de novo* de factores de crecimiento, y proteínas como la colágena de la matriz extracelular, citocinas, y la proliferación de los fibroblastos. Mas tarde la remodelación del tejido activa la colágena, el recambio tisular inicia a las dos semanas y concluye un año mas tarde.¹

Diferentes factores locales favorecen la migración celular y la activación de los fibroblastos en la herida. Sin embargo, las plaquetas circulantes están invariablemente asociadas con la curación de las heridas y en la actualidad se conoce claramente los factores liberados, estos se almacenan en compartimentos intracelulares, como los gránulos α de las plaquetas, estos factores atraen neutrófilos, monocitos, fibroblastos y otras células específicas de cada tejido como del músculo liso. En el momento actual, se considera a las plaquetas como mediadores importantes al inicio del proceso inflamatorio del tejido circundante y durante los procesos de reparación y remodelación de los tejidos.

Mas tarde, las plaquetas inician el proceso de la coagulación con la liberación de trombina, la exposición en la superficie celular, y de la matriz extracelular, como la colágena, síntesis de moléculas como prostaglandinas y leucorinas como una respuesta autocrina, en actividades extracelulares contribuyen en los estadios tempranos de la curación. Estos factores inician la activación transcripcional de los genes que sirven para atraer células inflamatorias localmente.¹

REPARACIÓN DE LAS FRACTURAS.

La reparación de la fractura es un proceso biológico complejo, en la cual la integridad estructural y funcional requiere ser restaurada, mediante el proceso biológico de la regeneración ósea.²¹

Está claramente establecido, que la reparación de las fracturas se lleva a cabo mediante dos procesos: el de osificación endocondral, en donde el hueso formado tiene un precursor cartilaginoso que sirve de patrón para la restitución tisular, el otro proceso, de osificación intramembranosa, ocurre por medio de la condensación células de origen mesenquimatoso, en el sitio de restitución.^{21,22}

La regeneración ósea es un proceso organizado, depende fundamentalmente del proceso de angiogénesis, el evento se inicia con el reclutamiento de células mesenquimatosas al sitio de fractura, y la inducción de éstas células no diferenciadas, hacia la línea osteoblástica y condroblástica, que inducen la generación de hueso o cartilago nuevo, mas tarde sucede el proceso de remodelación a lo largo de las líneas de fuerza, de acuerdo a las leyes de Wolf.^{21,22}

Múltiples factores de crecimiento participan de manera crítica en la curación de las fracturas, en este proceso biológico están involucradas interacciones complejas de factores locales y sistémicos, en cual los factores de crecimiento son esenciales. Actualmente en el área de la investigación clínica se empiezan a utilizar para inducir la regeneración ósea, durante +

la reparación de las fracturas.^{21,22}

Diversos factores promueven la migración de células del mesenquima indiferenciadas, estos son producidos de manera autocrina o paracrina, la interacción compleja de mediadores locales, inicia la migración de células indiferenciadas mesenquimatosas propician la proliferación y diferenciación en el sitio de la fractura, en el micromedio ambiente influye en la codificación de los genes, para la secreción del tipo de matriz que necesitan las células encargadas de los procesos de restitución tisular.^{21,22}

En el sitio de fractura las células dañadas, por el trauma y los macrófagos liberan interleucina I (IGF I) y el factor de necrosis tumoral (TNF), ambos producen vasodilatación y la expresión de los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), de moléculas de adhesión como P-selectina y E-selectina, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es liberado desde los macrófagos activados, estimulan la expresión del plasminógeno y la procologenasa. Los PMN se adhieren a la selectina, unidos entran al espacio intersticial, después de la unión intracelular con las moléculas de adhesión. El incremento de la permeabilidad vascular permite la extravasación de las plaquetas, células rojas sanguíneas y factores de la coagulación.

Los PMN son atraídos por quimiotaxis al sitio de la lesión, se inicia la endocitosis, el microdebridamiento de tejidos y de microorganismos por la activación local de los macrófagos. El exudado sanguíneo avanza para formar el hematoma que rodea la fractura bajo el control del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); el factor de crecimiento y transformación beta (TGF β); y el factor de crecimiento fibroblástico b (bFGF).

En el tejido de granulación, la hipoxia estimula a los macrófagos para la producción y liberación de factores como IGFs , bFGF y mediadores quimiotácticos que promueven la proliferación de fibroblastos e inducen el fenómeno de angiogénesis.²²

Durante el proceso de inflamación aguda el blastema progresa, PMNs, monocitos y macrófagos, desarrollan células epiteloideas que se unen a células gigantes multinucleadas. Los fibroblastos empiezan a producir diversos isotipos de colágena que poseen la capacidad de unirse selectivamente y atraer a factores de crecimiento osteogénico.^{21,22}

En el momento actual se sabe que, factores de crecimiento como: TGF β , BMPs y bFGF son elementos estratégicos para optimizar la interacción de las células osteogénicas, directamente en donde el hueso nuevo lo requiere. Las células precursoras osteogénicas inducibles se extravasan y pueden ser activadas, por las BMPs y logran diferenciarse hacia la línea osteoblástica.^{23,24}

Los precursores de células osteogénicas determinadas confinadas al canal medular remanente y las situadas en la capa profunda del periostio, pueden llegar a activarse por medio de la interacción de las BMPs, y proliferar hacia la línea osteoblástica, este proceso inicia el depósito de hueso nuevo. La fibronectina y productos de la degradación de la matriz extracelular facilitan la conversión de monocitos a osteoclastos, los cuales inician el proceso de resorción del hueso nuevo formado. El proceso de depósito de hueso nuevo, el remodelado continúa hasta que la regeneración ósea es indistinguible del tejido original.^{23,24}

¿REGENERACIÓN O REPARACIÓN TISULAR?

La regeneración y la reparación en el ámbito celular, ocurre esencialmente a través de dos procesos muy diferentes. Obviamente, son mecanismos similares a los que se llevan a cabo durante los procesos de morfogénesis en el embrión y en el feto, la regeneración de los tejidos ocurre de manera habitual. Excepcionalmente, ocurre en niños neonatos en condiciones normales, pero no en niños mayores ni en adultos. Esta diferencia es atribuida al predominio de células progenitoras indiferenciadas durante las etapas del desarrollo tempranas del embrión y del feto, y la escasez progresiva de las mismas en las etapas posteriores de la vida.²

Cuando ocurre después de la etapa embrionaria y fetal, la regeneración es un proceso relativamente lento, imita y repite la secuencia de algunas de las etapas de la vida embrionaria. En contraste, el proceso de reparación es rápido, y el resultado final es la cicatrización.

Axiomáticamente, el tejido cicatricial no da lugar a una restitución tisular fisiológica. Durante el proceso produce una respuesta inflamatoria aguda, se sella el sitio de la lesión, para minimizar la diseminación de bacterias y la contaminación fungal de la herida, proporciona una sustitución rápida por tejido fibroso y forma solamente un puente de unión cicatricial con la expedita proliferación de tejido fibroso, que a la postre origina un puente de tejido de cicatriz.²

TEJIDO Y REMODELADO ÓSEO.

El esqueleto es un órgano dinámico, de alta especialización celular, sujeto a un proceso de regeneración continuo, conformado por células de gran especificidad, una matriz extracelular de tejido conectivo mineralizado y no mineralizado, espacios como la médula ósea, los canales vasculares, canalículos y lagunas. Durante el desarrollo y crecimiento cada hueso es esculpido hasta lograr forma y tamaño de cada hueso. Una vez alcanzada la maduración esquelética, la regeneración tisular a lo largo de la vida, el hueso viejo es reemplazado continuamente por hueso nuevo, en el mismo sitio, el proceso de remodelado óseo regenera el total del esqueleto adulto cada 10 años.^{21,22}

El propósito del remodelado del esqueleto adulto aun no está claro. En los huesos que soportan carga, el proceso al parecer sirve para la reparación del daño por fatiga, prevenir el envejecimiento excesivo y las consecuencias, del acumulo de tejido óseo viejo. Durante la etapa de crecimiento sirve para expandir la cavidad medular, y aumentar el grosor trabecular.²⁰

ELEMENTOS CELULARES

a.-Células osteogénicas

Las células osteogénicas que forman hueso, sufre el proceso de diferenciación, desde células troncales mesenquimatosas indiferenciadas hasta el estadio final, la línea osteoblástica, de otra forma, pueden continuar por dos vías, una principal de células precursoras osteoprogenitoras determinadas (*DOPCs*) y otra de células precursoras osteoprogenitoras inducibles (*IOPCs*).^{25,26}

La línea *DOPCs*, en la embriogénesis está relacionada íntimamente con condensaciones celulares responsables de la formación ósea, son células troncales capaces de proliferar, se localizan en la superficie ósea del periostio específicamente en el "cambium", el endosteo, la duramadre y el estroma medular peritrabecular, su diferenciación puede ser irreversible cuando llegan al estado de maduración y expresan el fenotipo osteoblástico.^{25,26}

La línea *IOPCs*, está representada por células progenitoras pluripotenciales, que tienen capacidad de diferenciarse en tejidos como el conectivo, óseo, cartilaginoso, fibroso, muscular, o adiposo y por otra parte en pueden diferenciarse en células gliales, las células progenitoras se localizan en la médula ósea, el periostio y los pericitos especializados de la vasculatura, las *IOPCs* son reguladas por una variedad de morfógenos solubles, que pueden promover la expresión de fenotipos celulares distintos, e inducir a la diferenciación de células de la línea osteoblástica por medio de la interacción de las BMPs, factores de crecimiento y con otros elementos de la sangre circulante.^{25,26,27}

Las células mesenquimatosas, adheridas a la capa endotelial de los vasos, son los pericitos, estos derivan de las células del estroma óseo medular, condrocitos, células musculares y adipositas.²⁷

Las células multipotenciales troncales del mesenquima, son precursoras de la línea osteoblástica, migran del tejido conectivo vecino, por otra parte, los precursores de los osteoclastos son células hematopoyéticas de la línea monocito / macrófago, que llega al hueso por la vía sistémica.²⁶

b.- Células indiferenciadas

Las células mesenquimatosas indiferenciadas troncales pueden ser potencialmente preosteoblastos y osteoblastos, están localizadas en el canal óseo, endosteo, periostio y médula ósea, migran de los tejidos circundantes o de la sangre, los pericitos vasculares son una fuente potencial de preosteoblastos, las células permanecen indiferenciadas, hasta recibir el estímulo para diferenciarse en osteoblastos, puede ser la fractura, la que inicia la liberación de la cascada de factores de

crecimiento y estimula la migración, proliferación y diferenciación celular y a la postre es la responsable del proceso de restitución ósea.^{25,26,27}

c.- Células óseas

Durante la formación, resorción, homeostasis mineral y reparación ósea, las células asumen formas especializadas, se identifican por su morfología, función y localización. Su origen fundamentalmente, es la línea de células indiferenciadas mesenquimatosas troncales, preosteoblastos, osteoblastos, células de revestimiento, osteocitos y la línea celular tronco hematopoyética, formada por monocitos circulantes medulares, preosteoclastos y osteoclastos.²⁴

d.-Osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento y osteoclastos.

i.-Osteoblastos.

Las funciones más relevantes de los osteoblastos son la síntesis, secreción y organización de la matriz extracelular ósea orgánica^{23,24}, el control del flujo electrolítico en el líquido extracelular, y la mineralización de la matriz ósea. Hormonas activas, factores de crecimiento, iones, lípidos metabólicos y esteroides regulan la actividad osteoblástica tanto local como sistémica. La generación de la cascada de señales intracelulares moleculares, es específica para cada tipo de células óseas. La hormona paratiroidea y las citocinas locales estimulan a los osteoblastos para liberar mediadores que activen a los osteoclastos.^{23, 24}

El polímero precursor de la proteína, la colágena tipo I, es el producto más importante de la formación osteoblástica, está constituido por una extensión peptídica, una cadena triple que se acopla, interconecta y forma puentes cruzados de piridinolina, elemento característico y único del tejido óseo.²⁴

Los osteoblastos formadores de hueso sintetizan otras proteínas, como la osteocalcina, la osteonectina, ambas constituyen entre el 40% al 50% de las proteínas no colágenas de hueso, se encuentran incorporadas a la matriz ósea.^{23,24}

Otras proteínas derivadas de los osteoblastos son los glicaminoglicanos, se unen al núcleo de una o dos proteínas: PGI o biglicano y la decorina, ambas involucradas en la regulación de fibrinogénesis de la colágena, proteínas menores como la osteopontina, la sialoproteína de hueso, la fibronectina, la vitronectina y la trombospondina, tienen como función ligar factores de crecimiento e interactúan con las integrinas.^{23,24}

Las células que produce la matriz osteoide son esenciales para la mineralización, contribuyen al proceso del depósito de hidroxiapatita, los osteoblastos son reguladores directos de las concentraciones locales de calcio y fósforo y favorecen la formación de hidroxiapatita.^{23,24}

La diferenciación de osteoblastos a partir de células de revestimiento representa solamente uno de los senderos que pueden seguir, además de formar hueso e incorporarse dentro de la matriz en forma de osteocitos.^{23,24}

Los osteoblastos activados pueden permanecer en la superficie del hueso, cuando disminuyen la actividad de síntesis, adoptan la forma aplanada de las células de revestimiento o bien, pueden sufrir la transformación hacia osteocitos.^{23,24}

ii.- Osteocitos

Comparte el linaje con los osteoblastos, el micromediambiente orgánico e inorgánico de la matriz ósea necesita de la especialización de los osteoblastos. Los osteocitos tienen actividad con la fosfatasa alcalina, posee receptores para la acción de la paratohormona (PTH), y funcionan como células mecanosensoriales, responde al estímulo mecánico, afectan la estructura y la masa ósea, las secreciones bioquímicas permiten la transducción mecánica de los estímulos²³

Los osteocitos representan una cifra superior al 90% de las células del esqueleto humano maduro, son diez veces más que los osteoblastos, se localizan contiguos al periostio, rodean a la matriz orgánica, y pueden mineralizarse. La interconexión entre osteocitos, osteoblastos y células de recubrimiento crea una red celular que coordina la formación, la resorción y el flujo de los iones minerales entre la matriz y el fluido extravascular dentro de los espacios óseos.^{23,24}

Los osteoblastos incluidos en las lagunas mineralizadas de la matriz ósea, son los osteocitos y se caracterizan por su morfología estrellada, semejante a la red de dendritas del sistema nervioso central. Normalmente, están espaciados a lo largo de la matriz mineralizada y en comunicación con otras células óseas de la superficie, por las múltiples extensiones de la membrana plasmática, la cual corren a lo largo de los canalículos, existe una comunicación con las células del estroma de la médula ósea, y con las extensiones dentro de las células endoteliales, en el interior de los sinusoides, que llegan a las paredes vasculares²³

La localización estratégica los osteocitos les confieren la función de células mecanosensoriales capaces de detectar la necesidad de aumento o reducción de la formación ósea durante la adaptación funcional del esqueleto y reparación que sucede durante el microdaño.²⁴

Los osteocitos reciben los cambios sensitivos del fluido intersticial (producido por las fuerzas mecánicas) a lo largo de los canaliculos y detectan la fluctuación de los niveles hormonales, particularmente la del factor insulinoide (IGF), prostaglandinas, ácido nítrico, estrógenos y glucocorticoides, estos circulan en el mismo fluido, influyen en su supervivencia y coordinan la respuesta de las células vecinas. Al parecer, la interrupción de la red formada por los osteocitos incrementa la fragilidad ósea.^{23,24}

iii. Células de revestimiento

La superficie del hueso normal en reposo, está cubierta por una capa de matriz de colágena no mineralizada, de 1 a 2 μm . de grosor, la capa superior esta formada por células aplanadas y elongadas, las denominadas células de revestimiento, descienden de las células osteoblasticas.^{23,24}

Las células de revestimiento tienen como acción fundamental, la unión de los osteoclastos a la superficie del hueso. este hecho dan lugar al proceso de resorción, está mediado principalmente por la acción de la hormona paratiroidea, los procesos de contracción y secreción de enzimas, remueven la capa delgada de osteoide que cubre la matriz mineralizada, estas acciones y posiblemente otras pueden tener un papel fundamental en la atracción de los osteoclastos a sitios específicos y la estimulación del proceso de resorción.^{23,24}

iv. Osteoclastos.

Los osteoclastos maduros son usualmente células grandes, de 50 a 100 μm de diámetro, multinucleadas, con mitocondrias abundantes, lisosomas numerosos, y ribosomas libres.

La morfología característica más común del osteoclasto es el borde ondulado, en forma de dedos, con un sistema complejo de proyecciones de la membrana, que tiene la función de resorber la matriz calcificada del hueso.^{23,24} Los osteoclastos derivan de las células troncales de la línea hematopoyética, monocito / macrófago, de la médula ósea, la sangre circulante, hueso esponjoso o de la superficie del periostio, donde crean la depresión conocida como laguna de Howship. Estas estructuras están rodeadas completamente por otra área especializada en el citoplasma, la llamada zona clara, de apariencia uniforme, y bloques de filamentos semejantes a los de la actina. La zona clara delimita el área de unión entre los osteoclastos y la superficie del hueso, sella las distintas áreas de la superficie del hueso en donde se efectúa la excavación característica de la resorción del osteoclasto. La función de la zona clara es sellar la superficie del hueso y forma el micromedio ambiente favorable para el proceso de resorción. Los precursores de los osteoclastos en el hueso

cortical forman túneles, crean las cavidades de resorción, por medio de la secreción de proteasas ácidas, acidifican el pH y finalmente destruyen la matriz ósea.^{23,24}

El componente mineral de la matriz ósea es disuelto en el ambiente ácido del sitio de la resorción, creado por la acción de la bomba de protones ATP-*driven* (H⁺ATPasa vacuolar) situada en el borde ondulado de la membrana. Los componentes proteicos de la matriz, principalmente la colágena, sufren la degradación por las metaloproteinasas y catepsinas K, B y L secretadas por el osteoclasto dentro del área de resorción ósea.^{23,24}

Los osteoclastos no pueden adherirse a la capa de colágena no mineralizada que cubre la superficie del hueso, otras células de recubrimiento probablemente secretan colagenasa, para remover la matriz antes de que los osteoclastos se unan al hueso. Una teoría propone que el objetivo de los precursores localizados específicamente en el hueso, dependen de una señal guiada, que tiene su origen en las células de recubrimiento que están programadas para formar osteocitos, células con la capacidad de remodelar en un tiempo y sitio específico al hueso.^{23,24}

En el hueso trabecular los osteoclastos se mueven de un lado a otro, hasta completar las cavidades de resorción, y las células mononucleares activan la formación de nuevos osteoclastos.^{23,24}

Recientemente, se ha demostrado la participación de la fibronectina en la producción de hueso y su relación con la osteopontina (sialoproteína I de hueso), osteocalcina (proteína Gla) y la llamada conexión osteoclasto - osteopontina OPN, así como la interrelación entre la osteopontina y los macrófagos. Se ha determinado el origen común del osteoclasto en las células sanguíneas blancas y los macrófagos, y su unión con la osteopontina durante la fagocitosis.^{23,24}

En resumen: el fenotipo de cada tipo de célula ósea es controversial, los osteoblastos son capaces de sintetizar, la matriz extracelular en forma de fibras de colágena tipo I, secretar fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, y osteoprotegerina, durante el proceso de biomineralización.

Los osteoblastos y los osteocitos responden a la paratohormona. Los osteocitos desciende de los osteoblastos y se localiza dentro del hueso, mantienen algunos de los organelos de los osteoblastos, su morfología facilitan la comunicación a través de los canaliculos, por sus diversas formas estrelladas, además poseen un refinado aparato mecanosensorial que sirve para la homeostasis ósea. El osteoclasto es una célula multinucleada gigante asociada al proceso de resorción en las lagunas de Howship, y está relacionado con proteínas como la fosfatasa tartrato resistente, la calcitonina, la anhidrasa carbónica II y las subunidades a y b de los receptores de vitronectina, elaboran enzimas proteolíticas y crean el micromedio ambiente para la resorción de la matriz mineralizada del hueso.

FACTORES DE CRECIMIENTO ÓSEO

La capacidad de reparación y regeneración del hueso después de una lesión y el consecuente remodelado, la respuesta al estrés físico es extraordinaria. La formación osteoblástica y la resorción osteoclástica establece el delicado balance que mantiene el equilibrio homeostático del volumen óseo. Los mecanismos fundamentales de formación y resorción son regulados por hormonas como la calcitonina, la hormona paratiroidea y por factores locales de crecimiento, ejercen su acción de forma autocrina o paracrina en la proliferación celular y la biosíntesis. Estos procesos biológicos son esenciales para mantener el volumen constante del hueso en situaciones fisiológicas o patológicas, estos mecanismos reguladores representan un papel importante durante el crecimiento normal, en la adolescencia y en estados patológicos, tales como la osteoporosis o la curación de las fracturas.

FACTORES LOCALES DE CRECIMIENTO ÓSEO

Desde el descubrimiento original de Urist, en 1965, fragmentos óseos implantados subcutáneos o intramuscular inducen la formación de hueso, la identificación y entendimiento de los mediadores químicos inició el descubrimiento de los factores osteoinductores de crecimiento.¹¹

Los factores de crecimiento son polipéptidos específicos, que actúan como reguladores locales de la actividad celular, ejercen su función biológica a lo largo de la unión de los receptores transmembrana en las células blanco, el espacio de la matriz extracelular, y el espacio intracelular. Estimula la activación de las proteínas cinasas específicas.^{29,30}

In vitro y en múltiples estudios clínicos los factores de crecimiento han demostrado su participación en la proliferación celular, diferenciación, quimiotaxis y síntesis proteica, actúan de manera crítica en muchos de los procesos, de la restitución tisular, la curación de las fracturas, y particularmente durante la regeneración ósea.^{30,31}

Estos factores se producen de forma autocrina o paracrina, y están involucrados en una compleja interacción con factores reguladores locales y sistémicos, inician la migración de células indiferenciadas mesenquimatosas y su diferenciación en el sitio de fractura. En el microambiente influyen en los genes que codifican el tipo de matriz celular.³²

La propia matriz ósea contiene numerosos factores de crecimiento, tales como la proteína morfogénica de hueso (BMPs), el factor de crecimiento y transformación beta ($TFG\beta$), los factores semejantes a la insulina I y II (IGFI; IGFII), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y los factores fibroblástico de crecimiento ácido y básico (aFGF y bFGF).³¹

Los factores de crecimiento tienen funciones y localizaciones diversas, muchos son liberados inmediatamente después de la lesión o a lo largo del proceso de curación, la transcripción y translación de otros mediadores no se inicia hasta después de que la lesión ocurrió. Todos los mediadores funcionan con receptores de membrana y actúan en la célula a través de señales moleculares, que inducen la proliferación celular y la diferenciación en el caso de osteoprogenitores de las colonias formadoras de fibroblastos y del estroma medular.³²

Por otra parte, las plaquetas circulantes están invariablemente asociadas con la curación de las heridas, en la actualidad se conocen claramente los factores que son liberados, estos se almacenan en compartimentos intracelulares, tales como en los gránulos α de las plaquetas, estos factores atraen

neutrófilos, monocitos, fibroblastos y otras células específicas de cada tejido como el músculo liso. En el momento actual, se considera a las plaquetas como mediadores importantes, para el inicio del proceso inflamatorio del tejido circundante a la lesión y después durante los procesos de reparación y remodelación de los tejidos.³³

Más tarde, las plaquetas inician el proceso de la coagulación, con la liberación de trombina, la exposición de la superficie celular de la matriz extracelular, la colágena, síntesis de moléculas como prostaglandinas y leucorinas, como una respuesta autocrina, en actividades extracelulares contribuyen en los estadios tempranos de la curación. Estos factores inician la activación transcripcional de los genes que sirven para atraer células inflamatorias localmente.^{34,35}

Con el advenimiento de la tecnología recombinante se ha podido producir de algunas proteínas y factores de crecimiento osteoinductivos, y han probado ser una potencial solución.³⁰

Los mediadores químicos identificados actualmente son miembros de la superfamilia de los TFG β , incluyen a las BMPs excepto BMP1 y la subclase BMP de los factores de crecimiento y diferenciación 1 a 10, inhibinas activinas, genes nodal relacionados y el factor derivado glial neurotrófico, aFGF y bFGF, PDFG e IFGs.³⁰

Actualmente, los factores de crecimiento derivados de las plaquetas son motivo de múltiples trabajos de investigación dentro del campo de la curación de las fracturas y la ingeniería tisular.³⁵

MATRIZ EXTRACELULAR

Durante el proceso de desarrollo de los tejidos, la matriz extracelular (ME) es la fuente principal de información de la función celular.²³

Al inicio del desarrollo embrionario, esencialmente hay células que aumentan en número, en una secuencia rápida de divisiones del huevo fertilizado, desde el estadio de blástula, en la etapa temprana de mórula, y dan inicio a la secreción temprana de componentes de la matriz extracelular, como la colágena. La aparición temprana de colágena durante la etapa de la embriogénesis, es significativa porque además de propiciar la unión celular, reconocer los receptores de integrina, liga la colágena con otras moléculas, inmoviliza muchos los productos secretados por las células. Si estos productos no fueran inmovilizados, escaparían y no contribuirían a la diversidad molecular de la ME. Conforme el desarrollo progresa continúan la biosíntesis y secreción de moléculas instructivas estructurales que dan lugar a la formación de la matriz extracelular.

Es el elemento crucial que requieren las células y coopera en un compiejo multicelular para la división celular y la morfogénesis. Gradualmente se adapta regionalmente, a tejidos específicos y órganos.²³

El desarrollo del complejo de la matriz extracelular crece con moléculas que ligan y unen a la colágena con otros subconjuntos de moléculas.²³

El origen de la ME esta ligado directamente al diseño tisular programado; donde células individuales, grupos pequeños de células, comunidades de células, y grandes masas de las células, son rodeadas por redes de fibrillas y de fibras de colágena.^{2, 23}

En cualquier diseño de ME, el producto de la célula se enriquece por las secreciones paracrinas y endocrinas y por los productos de células circulantes libres, como los macrófago, linfocitos, neutrófilos, y célula cebadas.²³

Durante los procesos de desarrollo y regeneración tisular ósea la secuencia de genes de manera activa crea la matriz extracelular definitiva. El producto final es un material sumamente complejo de alta diversidad molecular y microarquitectura específica.^{2,23}

La estructura es un componente crítico en la ingeniería tisular, porque proporciona en medio tridimensional para la quimioatracción, crecimiento y desarrollo de tejidos nuevos.³

REGENERACIÓN ÓSEA NORMAL.

El esqueleto de los vertebrados tiene la capacidad de regeneración, tanto en la vida embrionaria, como durante los procesos de restauración de las fracturas, de otra forma, a lo largo de la vida, durante el modelado continuo permite prevenir el microdaño acumulado por el uso, la formación nueva de tejido óseo mantiene la homeostasis mineral, en la que participan fundamentalmente las células troncales del mesénquima, por los fenómenos de replicación y división.^{21,22}

Diversas células multipotenciales poseen la capacidad de diferenciarse en linajes mesenquimatosos como: osteoblastos, condrocitos, adipocitos, mioblastos y son acertadamente llamadas, " células mesenquimatosas troncales, tronco, madre, o tallo" (MSC), éstas se han aislado de la médula ósea y del periostio tanto del hombre, como del perro, la rata, el pollo, el ratón y el conejo.^{21,22}

Actividades celulares ordenadas y reguladas caracterizan a la regeneración ósea normal, da principio con la inflamación, proliferación, diferenciación de células osteogénicas, la formación de la matriz extracelular, la mineralización y el eventual remodelado óseo. Ocurren en un medio ambiente de señales mecánicas y bioquímicas, reveladas por la expresión de la cascada de hormonas, factores de crecimiento, citocinas endógenas o exógenas, en el tejido dañado, favorecen la migración, proliferación y síntesis celular, la fuerza mecánica se transmiten a la matriz extracelular, para dar inicio al ensamble y patrón de la actividad celular orquestada.^{21,22,23}

Las MSC, por definición, tienen amplia capacidad de diferenciación, sin perder la capacidad multipotencial, actualmente representan una opción en la terapia celular, donde las células son aisladas e implantadas para la regeneración de los tejidos. En la vida postnatal, un número potencial de MSC, está involucrado en la homeostasis del hueso, cartílago, músculo y tendón.^{20, 37, 38,39,}

El éxito en la reparación y regeneración ósea depende de la cascada de señales moleculares, viabilidad de las células progenitoras, el aporte nutricional y la apropiada estabilidad mecánica.^{21,22,}

INDUCCIÓN ÓSEA.

Es un proceso de pasos múltiples: principia con la quimiotaxis de poblaciones celulares, mesenquimatosas troncales, que residen en sitios extraesqueléticos, continúan con la proliferación de células osteoprogenitoras, por medio de acciones autocrinas y paracrinas, de otra manera responden al estímulo de otras células y por acción endocrina a factores humorales, sufre la diferenciación final en los fenotipos condroblástico y osteoblástico.^{11,18}

El proceso de inducción ósea, está regulado por la osteogenina y la proteína morfogénica de hueso (BMP), la purificación, aislamiento y clonación de estas proteínas y de otros factores de crecimiento tales como el de crecimiento y transformación (TGF beta 1 y beta 2), el de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento insulinoide 1 y 2 (IGF 1 y IGF 2), y el factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF bFGF), han permitido conocer que estos factores puede promover, mantener e inducir la formación de hueso nuevo. Los tipos celulares que responden a las BMPs son las células osteoblásticas u osteoprogenitoras.^{30, 31}

La presencia de factores de crecimiento y diferenciación en el hueso, ha sido demostrada por la implantación de la matriz de hueso desmineralizado, en tejidos subcutáneos, la cual da lugar a la formación de cartilago nuevo, la morfogénesis ósea, y formación de médula ósea hematopoyética.¹¹

Células mesenquimatosas no especializadas pueden diferenciarse en células formadoras de hueso en presencia de un agente inductor, el inductor es producido por los osteoblastos, liberado por la matriz y por ciertas células epiteliales.²⁷

Las células que responden al estímulo de un agente inductor, son las denominadas células inducibles (IOPCs), de manera continua se producen a lo largo de la vida, poseen la capacidad de mantenerse por sí mismas y la facultad de diferenciarse en varios tipos de mecanocitos como repuesta a un estímulo mecánico.²⁸

Fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, y células reticulares son miembros del sistema celular del estroma y son los llamados mecanocitos. No se conoce si existe un intercambio de precursores de los mecanocitos con diferentes órganos, sin embargo, estas células han sido identificadas en la sangre.²⁸

Una vez diferenciados en condroblastos u osteoblastos, las IOPCs pierden la capacidad de proliferar y en ocasiones formar hueso ectópico en una estructura temporal, el hueso neoformado se mantiene si persiste el estímulo inductivo.^{25,26}

En otras palabras, la inducción ósea es la secuencia en cascada de múltiples pasos que repite la morfogénesis del esqueleto en el embrión. Los puntos clave en la cascada son la quimiotaxis, la mitosis y la diferenciación. En el caso de la inducción experimental con agentes inductores, la quimiotaxis es la migración directa de las células, como respuesta a gradientes químicos de señales liberadas de la matriz insoluble desmineralizada del hueso. ^{11, 31, 30, 51}

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE OSTEOINDUCCIÓN

Osteoinducción es el proceso por el cual un tejido indiferenciado o producto su derivado, puede diferenciarse en hueso.³¹ El fenómeno fue claramente definido por Hugginns en 1931, su clásico y elegante estudio experimental lo demostró en perros, con el implante del epitelio de transición de la vejiga en los músculos de la pared abdominal, provocó la formación ectópica de hueso⁴⁰, esta misma línea de investigación la continuó, Friedenstein en 1968⁴¹. Por otra parte, Willstaedt describió el fenómeno de osteoinducción por medio de extractos alcohólicos de hueso, las sustancias indujeron la formación de hueso cuando se inyectaron en el músculo.⁴² Se manifestó el proceso por la hipertrofia del cartílago, y la formación nueva de una matriz, este fenómeno también puede ser inducido por la matriz desmineralizada de hueso, el epitelio de transición de la vejiga y agentes osteogénicos, de otra forma el sistema de reacción involucra células de tejido mesenquimatoso competentes capaces de diferenciarse hacia la línea osteoblástica, en donde la participación de la BMP-4 es fundamental.³²

Urist en su estudio clásico, describió el fenómeno de la inducción ectópica de hueso, por intermedio de la implantación intramuscular de la matriz desmineralizada de hueso (DBM) en conejos y ratas. Esta revelación fue la clave para dar inicio de la extensa investigación de las sustancias inductivas ósea contenida en la matriz.¹⁰ Subsecuentes investigaciones demostraron que proteínas de bajo peso molecular pueden ser extraídas de la DBM, tienen actividad osteogénica, son las ahora bien identificadas y denominadas proteínas morfogénicas de hueso (BMPs).^{11,31}

Fundamentalmente, durante los complejos procesos de la regeneración esquelética, se requiere de tres elementos: células, factores de crecimiento y diferenciación y una matriz estructural. Todos los factores son indispensables para la lograr la regeneración ósea.²⁴

Zimmerman, detalló la inducción embrionaria, con el modelo organizador de Spemann, como un proceso regulado por la interacción de los sistemas de inducción y reacción efectividad con la combinación de los elementos.⁴⁴

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE HUESO HETEROTÓPICO.

En condiciones normales, el esqueleto ostenta la capacidad de formar hueso, como repuesta al trauma, en vez de tejido cicatricial, y el proceso de formación ósea continúa adaptándose a las demandas funcionales, estas condiciones son esenciales e indispensables para el desarrollo de las funciones estructurales y metabólicas del tejido óseo.⁴³

El hueso formado en continuidad con el mismo, se designa como ortotópico, cuando se forma fuera del esqueleto se denomina heterotópico, y es el resultado de patología traumática, tumoral, lesiones neurológicas, la fibrodiasplasia osificante progresiva, o en la miositis osificante experimental y clínica.^{43,44,45,46.}

El hueso heterotópico tiene todas las características anatómicas y funcionales del hueso ortotópico también la médula ósea, el tejido deriva de las células mesenquimatosas presentes en todo el organismo, sin embargo, solamente se forma en determinadas regiones, la formación de este tipo de tejido repite los procesos del desarrollo embrionario, que inicia con la fase morfogénica y concluye con la de citodiferenciación.^{43,44}

En sitios ortotópicos la inducción ósea no se puede diferenciar de otros procesos como la reparación, la osteoconducción, la regeneración ósea y la formación de hueso por las células *DOPCs*^{25.}

Existen diferentes métodos experimentales en animales para formar hueso heterotópico: por trauma de los tejidos blandos,⁴³ por el trasplante de células del estroma medular con capacidad de formar hueso,⁴³ por la inducción o interacción entre células mesenquimatosas indiferenciadas, el trasplante de células epiteliales,^{43,44, 45} el implante de la proteína morfogénica de hueso (BMP) y de la matriz desmineralizada de hueso.¹¹

Las células osteoprogenitoras determinadas (DOPCS), son las células troncales localizadas en la superficie del hueso y en estroma de la médula ósea. El trasplante autólogo de estas células da origen al hueso heterotópico y es capaz de provoca osteoneogénesis, las células del periostio del *cambium* contienen células osteoprogenitoras que responden al estímulo del hueso cortical.²⁶

No se necesitan de agentes inductores para que las células osteoprogenitoras determinadas (DOPCS) logren inducir la formación del tejido óseo.^{25,26.}

Experimentalmente, una suspensión de células de médula ósea colocada en cámaras de difusión, al ser implantadas en el músculo estriado o en la cavidad peritoneal forma hueso, el tejido formado es histológicamente indistinguible del hueso normal.⁴⁷

El hueso heterotópico se coloniza con médula ósea, sin embargo, las células hematopoyéticas no derivan de la misma población de células osteogénicas originadas en las células troncales hematopoyéticas⁴⁴

El hueso heterotópico inducido y la médula ósea están compuestos por líneas celulares diferentes. El hueso heterotópico es formado por la línea *IOCPs*, en este caso solamente forma hueso en presencia de un inductor y depende de su presencia continua, la sustancia es producida por los osteoblastos y se libera desde la matriz ósea en diversas condiciones.¹¹ Se afirma que las *IOCPs* pueden migrar de células de origen hematopoyético e incorporarse al proceso de inducción ósea por la vía sistémica.⁴⁷

También, células no especializadas del mesenquima pueden diferenciarse en células formadoras de hueso en presencia de agentes inductores. Puede producirse cambios en la expresión fenotípica en algunas células epiteliales, y por la respuesta de otras células o diferentes sustancias químicas. Las células pueden estar en el músculo esquelético, en el tejido conectivo en gran cantidad, o en otros sitios donde es posible inducir el proceso fácilmente. Las *DOPCS* son probablemente responsables de la reconstitución de la cavidad medular después de trauma o ablación.⁴⁸

La inducción experimental de hueso heterotópico ha llegado a ser el método más útil para el estudio del proceso de osteoneogénesis posfetal y la regulación del metabolismo óseo.⁴⁴

FORMACIÓN HETEROTÓPICA ÓSEA POR INDUCCIÓN CELULAR.

La inducción de cartílago y hueso ocurre como resultado de un periodo corto de tiempo de la producción de una sustancia inductiva, como respuesta diversos tipos de células epiteliales tienen la capacidad de inducir la formación de hueso. Los procesos bioquímicos del proceso de inducción se desconocen, sin bien, se ha postulado que células epiteliales secretan estímulos inductivos, estos pueden mediar a través de una interacción directa entre células epiteliales y las *IOCPS*.⁴³

En la osteoinducción heterotópica se forma cartílago y hueso nuevo, cuando las BMPs, células epiteliales o neoplásicas son trasplantadas.^{43,44}

INDUCCIÓN HETEROTÓPICA ÓSEA POR LA BMP.

Con sustancias inductoras, la formación experimental heterotópica de hueso, por vez primera, la realizó Levander y la continuó Willestaedt⁴² descubrió que el extracto alcohólico de hueso de conejo tenían la capacidad de formar hueso nuevo, cuando lo inyectó por vía intramuscular. Mas tarde, en 1965 Urist, describió el fenómeno por el heterotrasplante de matriz ósea en roedores, identificó un grupo de proteínas extraídas del hueso maduro de bovino, que implantadas en los tejidos blandos tenían la capacidad de inducir la formación de hueso y de cartilago. Al grupo de glicoproteínas las denominó como las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), el grupo de sustancias bioactivas pertenece al subgrupo de los factores de crecimiento y transformación, familia relacionada con factores de crecimiento y transformación.^{11,30}

La participación de las BMPs es fundamental durante la embriogénesis,, participan en el desarrollo de diversos tejidos blandos, hueso y los dientes, en especies tan diversas como la drosophila melanogaster, muchos vertebrados y en el humano.³²

Los miembros de las familias BMPs y del TFG β , son morfógenos pleiotrópicos, con diversos efectos en la proliferación y diferenciación celular, movilidad y síntesis de la matriz extracelular, son reguladores poderosos de la diferenciación de cartilago y hueso en el desarrollo embrionario y en la vida postnatal y son los mediadores solubles en la morfogénesis tisular y la regeneración ósea.^{49,50}

Las BMPs y la OPs tienen la capacidad de inducir la formación de novo de hueso en sitios extraesqueléticos, al recapitular el desarrollo embriológico, esta prerrogativa descrita originalmente para las BMPs y las OPs, se ha extendido a otros miembros de las BMPs, particularmente de la familia de los TFG β .^{49,50}

OSTEOINDUCTIVIDAD DE LA BMP.

La BMP induce a células osteoprogenitoras, a formar osteoblastos y osteocitos, el proceso es conocido como osteopromoción. La osteoinductividad de las BMPs es multifacética, actúa tanto como un agente quimiotáctico, como factor de crecimiento y de diferenciación. Como agente quimiotáctico inicia el reclutamiento de células troncales osteoprogenitoras hacia el sitio de lesión. Los efectos locales de las BMPs inician con la migración de las células mesenquimatosas troncales al área de la lesión, la función como factor de crecimiento es estimular el proceso de angiogénesis y la proliferación de células troncales alrededor de los tejidos mesenquimatosos, como factor de diferenciación promueve la maduración de células madre a condrocitos, osteoblastos y osteocitos.⁴⁹

Las BMPs localmente producen factores de crecimiento, estimulan el crecimiento óseo y la vascularización *in situ*, este proceso es denominado osteoinducción. Este hecho puede explicar el mecanismo requerido en la angiogénesis y la invasión vascular durante el proceso de morfogénesis, reparación de las fracturas y la regeneración ósea.^{53,54} Existen evidencias de la compleja interacción autocrina y paracrina de factores de crecimiento liberados por los fibroblastos, y plaquetas en el sitio de lesión.³⁵

FUENTES DE BMPS

Recientemente, se ha aislado y clonado la expresión de los genes que codifican a las BMPs, las proteínas forman parte de la superfamilia de los factores de crecimiento y transformación beta (TGF β) incluidas las tres diferentes subfamilias: BMP-2, BMP-3, BMP-7. La BMP-3 nativa y la BMP-4 recombinante se pueden unir a la colágena tipo IV de la membrana basal.³⁶

En el momento actual, existen tres formas de obtener factores de crecimiento y diferenciación: primero por la extracción de factores de la matriz ósea de animales y humanos, segundo por la producción de solo un factor por las células huésped, con el uso de la tecnología recombinante^{54,65} y tercero por terapia génica, la liberación del gen o cDNA que codifica a la BMP de las células locales en el sitio de la formación de hueso.^{54,55}

i. Origen y actividad de las BMPs

Las BMPs se han purificado parcialmente, de la matriz ósea en diversas especies, incluido el hombre, de otra forma se ha obtenido del osteosarcoma humano, del ratón y de la dentina.³⁰ Tiene relación íntima con la colágena, la DBM que contiene otros factores biológicos activos además de la BMP, en experimentos cuantitativos se ha demostrado que dependen de una o más sustancias como factores de crecimiento o citocinas.³²

ii. Medio ambiente para lograr la inducción heterotópica.

Es fundamental el medio ambiente local para lograr el proceso de osteoinducción, el trasplante de matriz desmineralizada de hueso DBM lo induce. Por otra parte, tanto los factores locales de crecimiento incluidos en el implante como los producidos en el lecho y las hormonas sistémicas, forma el medio ambiente.¹¹ Recientemente un gran número de factores de crecimiento se han identificado en la matriz ósea, múltiples factores se produce localmente y están involucrados en la inducción tisular.^{48,49}

El trasplante en roedores produce una reacción inflamatoria, entre los 5 y 10 días. El número de células mesenquimatosas observadas dependen del sitio de implante, es significativo tanto en músculo como en hueso, en este último se producen en gran cantidad, sin embargo, el número de células mesenquimatosas es bajo en hígado y bazo. Después de la primera semana el número de células

inflamatorias alrededor del implante de DBM, disminuye y las células mesenquimatosas migran al interior del implante.⁵⁹

Se reabsorbe la DBM, y múltiples condrocitos se observan dentro de la cavidad del implante. Entre la segunda y tercera semana, el cartílago es reemplazado por hueso y médula ósea que rodea al implante. La matriz vieja se reabsorbe activamente y se inicia el crecimiento interno de nuevos capilares. El implante inicia su fase de mineralización para la formación de hueso nuevo. Las células del mesenquima trasplantadas dentro del implante tienen la capacidad de diferenciarse en condroblastos y osteoblastos, en el interior de sitios que no tienen células con competencia osteogénica.⁵⁹

Concomitante con el desarrollo de hueso heterotópico, en la rata se ha observado el crecimiento de nervios que contienen neuropeptidos. Estos hallazgos sugieren la influencia neurogénica en la diferenciación celular del cartílago y el hueso.⁴³

iii. Capacidad y respuesta de las células blanco para provocar la inducción.

La inducción heterotópica de hueso y la capacidad de respuesta al estímulo de la DBM, varía, está en relación directa a la capacidad inductora, y parece ser dependiente de la especie y la edad. La respuesta está relacionada con la tasa metabólica general de cada especie, los animales jóvenes generalmente forman más cantidad de hueso que los viejos, el heterotrasplante de DBM en roedores muestra buena respuesta al fenómeno de la inducción, esta se debe a la alta velocidad metabólica de la especie, comparativamente la rata forma más hueso que el conejo. Vertebrados mayores como primates y humanos muestran baja respuesta a la inducción del heterotrasplante de DBM en sitios heterotópicos. En sitios ortotópicos la inducción es operacional en primates y es diferente a la observada en la formación heterotópica ósea de roedores y lagomorfos, que no forman hueso en sitios ortotópicos.^{43, 60}

Estos hallazgos sugieren que el sitio de implantación es importante para la inducción ósea, así como la interacción con las células del estroma de la médula ósea, es crucial principalmente en los primates.⁶⁰

Las células progenitoras son escasas, por ejemplo en la médula ósea del adulto joven existe una célula nucleada osteoprogenitora por cada 50 000 y en el anciano solamente es una de cada 1. 200 000.⁶¹

MODELOS ANIMALES DE INDUCCIÓN HETEROTÓPICA ÓSEA.

En los modelos experimentales de osificación heterotópica de hueso, la implantación de BMPs en un sitio heterotópico, es el método más frecuentemente usado, el pionero fue Urist, quien encontró que el extracto de matriz desmineralizada de hueso indujo la osificación heterotópica cuando la implantó subcutánea o intramuscular en roedores.¹¹

Estos experimentos fueron ampliados por el mismo Urist y más tarde otros investigadores, quienes demostraron que también se puede inducir el proceso en diferentes mamíferos, Wozney, en 1988 logró purificar la fracción activa de la matriz de hueso desmineralizada.³⁰ Y Wang, finalmente purificó otros factores inductores óseos.⁶²

MORFOGÉNESIS

La palabra morfogénesis proviene de las raíces griegas *morphe* (forma) y *genenan* (producir), es fundamentalmente, es la evolución y desarrollo de la forma.

Se define como el desarrollo en secuencia, de las etapas previstas dentro del programa genético, el patrón de formación, el plan de desarrollo corporal y la arquitectura de imagen: en espejo bilateral y simétrica de la estructura musculoesquelética, que culmina con la forma adulta.

Por ejemplo, la formación de sangre a partir de una sola célula, la "hematopoyética tronco o madre", tiene la capacidad de desarrollar una o varias líneas celulares que representa el objetivo básico de la morfogénesis. Este proceso es la hematopoyesis que es la formación de la sangre.

Varias fases están involucradas en la derivación de las células funcionales, las células hematopoyéticas provienen de una célula con la capacidad de renovación, la que puede desarrollar cualquier tipo de la célula sanguínea y con características bien definidas que las distingue de otras células.

La secuencia en cascada de la morfogénesis ósea, ha permitido aislar los morfógenos de hueso, y entender claramente las propiedades de la matriz extracelular, la regulación del ámbito celular y los factores bioactivos que actúan durante estos procesos.²

MORFOGÉNESIS EN SINERGIÁ.

Se puede inducir por medio de morfógenos, estos se han identificado en embriones de ranas, con diferentes formas tanto por hibridización sustrativa o por clonaciones, esta información se ha podido extrapolar al ratón y al hombre.

En la última década se ha demostrado que durante los procesos morfogénicos, actúan factores de crecimiento tales como el insulinoide I y II (IGFI; IGFI), los factores de crecimiento y transformación (TFG beta 1 y beta 2), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF, bFGF).^{2,60}

Durante el proceso, los osteoblastos producen factores bioactivos, que ejercen sus acciones de manera autocrina o paracrina, son reguladas por hormonas sistémicas, y por el estrés mecánico local.²³

Los miembros de las familias de las BMPs y TFG- β son factores pleiotrópicos, con efectos directos en la proliferación y diferenciación celular, así como, en la movilidad y síntesis de la matriz extracelular. Existen tres isoformas en los mamíferos de TFG- β , que son homólogas con los miembros de la familia de las BMPs (BMP-2, BMP-6 y las proteínas osteogénicas 1 y 2 ([OP-1 y OP-2]), estas proteínas son las más abundantes en la matriz extracelular del hueso, las isoformas de TFG- β participan en la homeostasis y la fisiología ósea.⁵⁴

La BMP, es considerada como un factor de crecimiento, se secreta y almacena en la matriz ósea, esta involucrada en la diferenciación osteoblástica de forma autocrina y paracrina, inician la secuencia en cascada de la formación del cartilago y el hueso. Sus efectos pleiotrópicos durante la quimiotaxis, mitosis y diferenciación, estimulan a los fenotipos osteogénicos y condrogénicos.⁵¹

MORFOGÉNESIS, REGENERACIÓN E INGENIERÍA TISULAR.

Los nuevos conocimientos en la morfogénesis, la biología celular, molecular y la regeneración y de otra manera los principios de diseño de biomateriales se han aplicado y han dado origen a la ingeniería tisular.

La regeneración tisular recapitula el desarrollo embrionario y la morfogénesis.

Señales inductivas morfogénicas, la repuesta de células troncales y la estructura de la matriz extracelular participan en los procesos de morfogénesis y son los postulados de la ingeniería tisular.

Dentro del contexto del microambiente creado participan: células, proteínas o moléculas de adhesión como las fibronectinas y lamininas, la estructura de la matriz extracelular, esta puede ser sustituida por "biomateriales biomiméticos", tales como colágena, hidroxiapatita, proteoglicanos, además de la participación de múltiples señales morfogénicas.

De los tejidos del cuerpo humano, el hueso ha sido considerado como uno de los que tiene el singular poder de regeneración, el proceso imita la secuencia en cascada de la morfogénesis y es el paradigma que se aplica en la ingeniería tisular.^{1,2, 3}

Los estudios tradicionales de señales morfogénicas en embriones, han demostrado que la proteína morfogénica de hueso (BMPs), es la señal primordial inductora ósea, ésta puede ser aislada de la matriz desmineralizada de hueso del adulto, la que induce la condrogénesis y la osteogénesis y tiene además acciones extraesqueléticas.¹¹

PRINCIPIOS DE REGENERACIÓN DE LOS TEJIDOS ESQUELÉTICOS.

Históricamente, los cirujanos han intentado diversos procedimientos para facilitar la reparación de los tejidos esqueléticos.

La clásica observación de la extraordinaria capacidad de regeneración tisular en la amputación de distal de los dedos en pacientes muy jóvenes enfatiza el potencial biológico de la regeneración del tejido conectivo en la etapa postnatal inmediata, los estudios experimentales de la regeneración de los anfibios, han dado fundamento a los principios de manejo en la regeneración tisular.¹⁸

Diversos estudios experimentales, han intentado repetir los procesos biológicos básicos de la regeneración tisular que actualmente son conocidos como procesos biomiméticos. La aplicación de estos principios, permite lograr la regeneración de los tejidos y esta nueva disciplina es conocida como la ingeniería tisular.^{1,3}

En el desarrollo de los procesos biomiméticos están fundamentalmente involucradas las células, unidades básicas funcionales clave, capaces de formar tejidos. Células altamente diferenciadas tienen funciones específicas, vida media y finalmente mueren, en el proceso conocido como apoptosis, o la muerte celular programada. Cada tejido tiene la capacidad de reemplazar cada célula muerta con células nuevas diferenciadas a partir de células progenitoras en una secuencia controlada que se conoce como el recambio tisular.³

ELEMENTOS CELULARES.

I. CÉLULAS ADULTAS TRONCALES:

Recientemente se ha estudiado, durante la etapa del desarrollo el potencial de las células embrionarias, que se conservan normalmente dentro de los tejidos adultos en poblaciones pequeñas.

Las células troncales adultas pluripotenciales son derivadas de su contraparte embriológica, las troncales adultas indiferenciadas no comprometidas, responden a señales del micromedio ambiente del lecho receptor, se diferencian y producen una progenie de células maduras.⁶³

En reposo las células troncales, sufren divisiones celulares que dan origen a células hijas, estas tienen probabilidades finitas de originar células troncales o progenitoras comprometidas, las células de los mamíferos están dentro de esta categoría.⁶⁵

II. CONTROL INTERNO. DESTINO DE LAS CÉLULAS TRONCALES.

El comportamiento de las células troncales, depende de reguladores autónomos, que modulan el proceso por intermedio de señales externas, y por otra parte los reguladores intrínsecos que son proteínas, propician divisiones celulares asimétricas, los factores nucleares controlan la expresión genética y las modificaciones cromosómicas en las células descendientes troncales y no troncales y finalmente el número de divisiones necesarias para aumentar la población celular.⁶³

III. CONTROL EXTERNO. EL NICHOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES

El control de las señales externas en las células troncales colectivamente está señalado por la estructura del micromedio ambiente, en el "nicho", que es importante tanto en los tejidos como en la población celular, involucran una interacción compleja de señales de corto y largo alcance entre las células troncales, sus descendientes y las células vecinas.⁶⁵

Una fuente de las células troncales o madres adultas es la médula ósea, las células troncales hematopoyéticas, permiten la renovación de los elementos sanguíneos, otras fuentes se encuentran en otros tejidos adultos, como el cerebro, el músculo esquelético, la pulpa dentaria, el hígado, el recubrimiento del tracto intestinal y el páncreas, son consideradas como multipotenciales, forman grupos únicos, y son difíciles de aislar en sus formas puras.^{64, 65,66.}

IV. PLASTICIDAD

La plasticidad de las células adultas troncales resulta de la mezcla de estas con otros tipos celulares, naturalmente pueden generar un tejido en particular. Algunas de estas células tienen la capacidad de migrar por la vía sanguínea a tejidos lesionados o a otros sitios en el cuerpo, se encuentran estas células en el hígado y bazo del feto, por otra parte en la sangre de la placenta y del cordón umbilical.⁶⁷

Poseen la capacidad de renovarse después del trauma, diversas enfermedades y el proceso de envejecimiento mediante reproducciones idénticas, de sí mismas. A lo largo de la vida, son consideradas como un reservorio para la regeneración de los tejidos y órganos. El control de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular se lleva a cabo por señales intercelulares emergentes de factores de crecimiento, citocinas y moléculas de adhesión celular.

Existen evidencias de que las células troncales hematopoyéticas (HSCs) son plásticas y bajo ciertas circunstancias pueden participar en la regeneración de diversos órganos y tejidos.⁶⁷

Las células adultas troncales secretan factores de crecimiento, movilizan y protegen a otras células residentes, en el tejido en el cual incrementan los efectos favorables para el trasplante.

Las células troncales de la médula ósea y del tejido mesodérmico pueden dar origen a los tres tipos principales de células cerebrales derivadas del ectodermo, a su vez las células troncales del cerebro pueden diferenciarse en células sanguíneas y músculo.^{68,69,70}

El descenso en el número o plasticidad de las poblaciones de células troncales contribuyen al envejecimiento y a las enfermedades crónicas degenerativas.^{71,72}

La notable plasticidad de estas células sugiere que células endógenas o cultivadas *in vitro* o trasplantadas, pueden ser la forma de reemplazo que permita restituir la pérdida o disfunción de las poblaciones celulares senescentes, hecho frecuentemente encontrado en las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, hematopoyéticas y la diabetes mellitus.⁷¹

Estos descubrimientos han fomentado la especulación de, si estas células en el humano adulto, tienen las características de plasticidad que permitan el cambio de precursores celulares a otros tejidos y si efectivamente estas características efectivamente pueden ser usadas para la producción de tejidos con fines terapéuticos.⁷²

En resumen, el inicio de la formación ósea durante el desarrollo embrionario, la osteogénesis postnatal y la regeneración ósea, generan una compleja cascada de procesos morfogénicos y moleculares, la que

crea la construcción de estructuras multicelulares para la organización precisa del hueso mineralizado, los eventos son : la formación del osteoide que se mas tarde se mineralizará, los elementos celulares que participan son : los osteoblastos como células formadoras de hueso, los osteoclastos o células que producen la resorción y el remodelado óseo y finalmente los osteocitos: células vivas dentro de la nueva estructura mineralizada de la matriz ósea.

En el momento actual, dilucidar la naturaleza y la interacción entre las señales moleculares, células y matrices extracelulares, que gobiernan el inicio de la formación ósea, es uno de los máximos retos de la biología del desarrollo, celular, molecular y de la ingeniería tisular.

INVESTIGACION EXPERIMENTAL

JUSTIFICACION

Tradicionalmente, las deformidades óseas congénitas, de crecimiento, desarrollo, traumáticas o degenerativas, requieren de injertos óseos autólogos para su reconstrucción, particularmente, en niños frecuentemente las zonas donadoras son insuficientes, además de la morbilidad y secuelas como dolor, infección, hematoma y en ocasiones la toma de injertos produce deformidades secundarias, por otra parte la resorción impredecible del injerto óseo, además del tiempo quirúrgico adicional, justifican la búsqueda de otras formas para obtener injertos óseos.¹⁷

Esta tesis propone dos modelos de inducción experimental de hueso heterotópico, como modelo de estudio de la osteogénesis postnatal, el método de inducción es considerado como el estándar de oro dentro de los estudios experimentales, por las siguientes razones.¹¹

- i) El implante de la DBM en los músculos de la pared abdominal forma hueso en un porcentaje alto y reproducible.
- ii). El hueso obtenido por inducción, es morfológico, fisiológico y metabólicamente idéntico al hueso ortotópico.
- iii.) Se puede determinar con precisión la cantidad de hueso nuevo, formado durante el proceso, en sitios en donde normalmente el hueso no se forma, por lo tanto, el tejido formado es nuevo
- iiii). Es posible controlar la secuencia del proceso de inducción con el implante de la DBM.
- iiiii). La tasa de formación y resorción ósea puede ser estudiada con el uso de isótopos cinéticos y métodos bioquímicos cuantitativos.
- iiiiii). La inducción es operativa en sitios heterotópicos, comparativamente con el proceso osteoconducción en donde el hueso formado no se puede distinguir del tejido creado en el sitio ortotópico.^{11, 27,38,47,48}

HIPÓTESIS

El trasplante de un injerto libre de periostio de cráneo, implantado en un medio ambiente vascularizado como el epiplón, modulado por la acción del polvo desmineralizado de hueso, el plasma enriquecido en plaquetas, con altas concentraciones de factores de crecimiento y transformación autólogos, en una biomatriz de colágena tipo I, propicia la migración e invasión de células osteoprogenitoras, y deben dar lugar a la neoformación de hueso ectópico.⁴

OBJETIVO

Fue investigar los procesos reguladores de la formación ectópica de estructuras óseas y paraóseas, la interacción entre las células osteoprogenitoras del pericitio, los factores de crecimiento y transformación, contenidos en el plasma enriquecido en plaquetas y liberados por medio de la desgranulación de los gránulos alfa de las plaquetas y el poivo desmineralizado de hueso, la matriz extracelular tuvo la función de anclaje o adhesión celular, dentro de un entorno vascular, los factores angiogénicos aportados por el sistema vascular del epiplón permitieron que la composición de los diversos elementos iniciara la cascada de regeneración tisular.

El protocolo de estudio fue aprobado por los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría y el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM- 062-ZOO-1999, Diario Oficial, 22 de agosto 2001.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Este trabajo de investigación es un diseño experimental, descriptivo y comparativo

El protocolo de estudio fue aprobado por los comités de Ética e Investigación del Instituto Nacional de Pediatría de acuerdo a la legislación mexicana.

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Perros de camada, edades de 4 a 6 meses y peso de 4 a 12 Kg

Criterios de inclusión.

Perros de camada, edades de 4 a 6 meses y peso de 4 a 12 Kg

Criterios de eliminación.

- i.- Dehiscencia de sutura de herida quirúrgica en región abdominal
- ii.- Evidencia clínica de infección en la zona quirúrgica, salida de material purulento por la herida en abdomen.
- iii.- Enfermedad sistémica relacionada o no con la intervención quirúrgica.

Se estudiaron veinte y dos perros criollos, de camada, de 4 a 5 meses de edad, con peso entre 4 a 12 Kg, se mantuvieron con alimento para cachorros. Al momento de la cirugía estaban sin enfermedades infecciosas o parasitarias ostensibles.

IMPLANTES

○ POLVO DE DESMINERALIZADO DE HUESO.

- El polvo desmineralizado de hueso (PDH) se adquirió en ("*Veterinary Transplant Services, inc*", *Seattle; Washington*). El PDH, se obtuvo de perros sanos vacunados, a los que se les practicaron pruebas serológicas para detectar enfermedad por garrapatas y brucela. Después del sacrificio de los animales, los huesos se obtuvieron en condiciones estériles, se mantuvieron 14 días en cultivo para detectar bacterias y el proceso de elaboración fue en campanas de flujo laminar HEPA. Se eliminó, periostio, cartilago, médula ósea y lípidos, se lavaron con agua estéril caliente y alcohol, el hueso en estas condiciones se cortó en fragmentos de un cm., se secaron con aire y fueron molidos hasta obtener partículas de 500 micras.
- El proceso de desmineralización del hueso, se efectuó, según las técnicas publicadas, con 0.6N HCl, se mantuvo con pH menor a 6.5, se usaron antibióticos, durante 14 días. Los huesos fueron mantenidos en cultivo y se empacaron y congelaron a -70° en condiciones estériles. todo el proceso fue trabajado en campanas de flujo laminar.¹¹

○ LA COLÁGENA TIPO I (ESPONJA DE FIBROQUEL),

- Fue usada como matriz extracelular, el biomaterial compuesto de colágena tipo I y polivinilpirrolidona, fue proporcionada por los "*Laboratorios Aspid, División Farma, S.A. de C.V. México*".

GRUPOS DE ESTUDIO.

El primer grupo de estudio (n= 6) lo formó dos modelos que fueron identificados como, el colgajo injerto compuesto (ICC) izquierdo y el derecho.

La denominación de ICC obedece a el uso de una mezcla de tejidos e implantes, conformados por tejidos como el epiplón, en todos los casos pediculado y dependiente de la rama principal de la arteria gastroepiplóica derecha, un injerto libre de periostio de cráneo, de la región libre de músculo, las

dimensiones fueron proporcionales al cráneo del animal, 3 ml. de plasma enriquecido en plaquetas, los implantes utilizados fueron esponja de colágena tipo I y polivinilpirrolidona (fibroquel), de la misma dimensión del periostio y 0.4 ml de polvo desmineralizado de hueso (PDH).

El ICC izquierdo se formó con un injerto de periostio del cráneo, en forma de cilindro que tuvo la función de continente y el contenido fue esponja de colágena tipo I, con dimensiones semejantes a las del periostio, todos los elementos fueron envueltos en el colgajo de epiplón.

El ICC derecho se formó con esponja de colágena tipo I, como contenido, con dimensiones semejantes a la contralateral, el epiplón, tuvo la función de continente en este lado. Ambos ICCs, fueron colocados sobre la pared abdominal, no fue incluido el periostio.

El segundo grupo de estudio (n= 14) se formó, también con dos modelos semejantes al primer grupo experimental de ICC.

El del lado derecho incluyó polvo de hueso desmineralizado, esponja de colágena tipo I, como implantes y plasma enriquecido en plaquetas, 10 000 UI de trombina bovina y 1 ml. de cloruro de calcio al 10%. fueron incluidos todos en un colgajo de epiplón.

Los ICC del lado izquierdo obtuvieron todos los elementos, además de un injerto de periostio del cráneo, semejante a los del primer grupo. A uno y otro colgajo se le agregó 10 000 UI de trombina bovina y 1 ml. de cloruro de calcio al 10%. Todas las mediadas fueron iguales en relación a dimensiones de periostio, esponja de colágena tipo I, plasma enriquecido en plaquetas, unidades de trombina bovina y cloruro de calcio.

TÉCNICA QUIRÚRGICA

En todos los animales, se realizó inducción anestésica con rompum (xilacina) 1.5 mg/kg y anestésico (pentobarbital 16 mg/kg., atropina 0.5 mg/kg de peso, con intubación endotraqueal, la anestesia general se mantuvo con inhalación de etrane (enflurane) al 2%, cuando las condiciones fueron adecuadas, se practicó tricotomía de cráneo y pared abdominal, se protegieron los globos oculares, en posición decúbito esternal. En condiciones asépticas, a través de una incisión en la línea media del cráneo, en la porción libre de músculo con un elevador de periostio, se tomó un injerto libre de periostio en donde se identificaron las fibras de Sharpey, las dimensiones fueron proporcionales al cráneo de cada animal, se tuvo cuidado en no tomar partes de músculo, ni fragmentos de hueso cortical de la tabla externa del cráneo, se identificó y marcó la capa profunda del

periostio (*cámbium*) y se mantuvo en inmersión en solución fisiológica de cloruro de sodio a 39 ° centígrados.

En posición de decúbito dorsal, en el abdomen se practicó incisión en la línea media, se abordó la cavidad abdominal, se identificó la curvatura mayor del estómago, y el epiplón mayor, con este tejido se formaron dos colgajos uno derecho y otro izquierdo, con pedículos en la arteria gastroepiplóica derecha, se electrocoagularon los vasos sangrantes. Sobre los músculos rectos abdominales, se practicaron incisiones paramedias, izquierda y derecha, para permitir la emergencia de los colgajos de epiplón sobre los músculos rectos abdominales y se disecó una cavidad entre el músculo y el tejido celular subcutáneo para colocar sobre la pared abdominal los colgajos compuestos.

Los animales se mantuvieron aislados hasta la recuperación del procedimiento anestésico, después se trasladaron a jaulas convencionales.

Todos los animales, sobrevivieron a los procedimientos quirúrgicos del experimento y después fueron mantenidos con alimento y agua *ad libitum*.

TÉCNICA DE PREPARACIÓN DEL PLASMA ENRIQUECIDO EN PLAQUETAS (PRP)

A los animales del segundo grupo, dos horas antes de la cirugía, se les tomó 5 ml de sangre, se centrifugó durante 20 minutos a 5600 rpm, para separar las células por gradiente de densidad en tres componentes básicos, el menos denso, plasma pobre en plaquetas (PPP), el siguiente gradiente de densidad, plasma rico en plaquetas (PRP) incluido en el "buffy coat", y el más denso, correspondiente a células de la fórmula roja.^{34,35}

Las plaquetas producto de la centrifugación, contienen factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β 1)^{34,35} La cuenta de plaquetas en el PRP fue superior a la cuenta basal de plaquetas. Tab. 1

TABLA 1 CUENTA DE PLAQUETAS

338% de incremento

Cuenta basal de plaquetas del plasma obtenido	Cuenta de plaquetas del PRP
232.000	785.000
(111.000- 523.000)	595.000- 1.100.000

La mezcla del PRP, PDH, trombina, cloruro de calcio y colágena formó un material fácilmente moldeable 1 a 2 minutos después de ser mezclados y permitió la formación de un cilindro de dimensiones iguales al injerto de periostio, los tejidos fueron aproximados con sutura continua de nylon monofilamento 5 ceros, cuidando de no lesionar los vasos, los ICC formados, fueren colocaron sobre la pared abdominal, se cerró la pared abdominal y la piel.

OBTENCIÓN DE ESPECIMENES

Los especímenes fueron obtenidos después de la intervención quirúrgica los días de posoperatorio 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 60, 120 y 150,

Bajo anestesia general con los mismos medicamentos anestésicos y dosis, en condiciones estériles, el animal en decúbito dorsal, se practicó incisión en la línea media del abdomen, se diseccionó el tejido celular subcutáneo hasta obtener los especímenes, los tejidos mostraron excelente vascularidad, no había adherencias significativas. Por disección roma, fácilmente los especímenes fueron separados del lecho, se liberaron e identificaron los pedículos del epiplón, se ligaron y fueron seccionados.

Todos los animales fueron sacrificados, al concluir la toma de los especímenes.

ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LA CAPACIDAD OSTEOGÉNICA DEL MODELO EXPERIMENTAL.

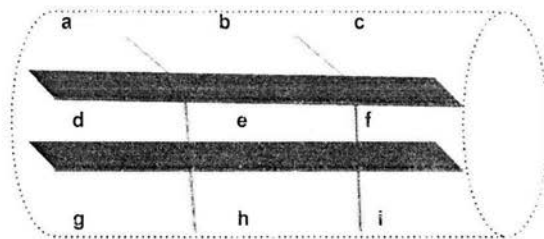
○ EXAMEN MACROSCÓPICO.

Los tejidos de ambos grupos experimentales fueron tomados los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 60, 90, 120, 150.

Los especímenes mantuvieron la forma cilíndrica formada en la cirugía.

Todos los especímenes fueron fijados en una solución de formal al 10 %, por los menos 24 hrs., los ICCs del lado izquierdo de ambos grupos, por la dureza del tejido, fue necesario someterlos al proceso de descalcificación en solución de ácido fórmico al 10% durante 3 días.

Se tomaron fotografías macroscópicas de los especímenes, se midieron en sus diámetros mayor y menor. Fueron cortados según el esquema anexo cada bloque de tejido (a,b,c,d,e,f,g,h,i,j)se incluyeron en bloques de parafina para cortes histológicos.



Esquema de la forma de corte para cada espécimen e identificación.

o EXAMEN HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICA.

Para la identificación de los sitios de formación de tejidos se dividió en cuadrantes y se fijaron por inmersión en formaldehído al 10% diluido en solución de buffer fosfato. Después de tres días de descalcificación con ácido fórmico, el tejido se incluyó en parafina y se obtuvieron cortes que fueron tiñeron con hematoxilina y eosina. Por lo menos dos cortes fueron examinados de cada cuadrante y de cada espécimen. En estos cortes el porcentaje de área de los diferentes tejidos inducidos, fue determinado por medio de un analizador de imagen Zidas Zeiss (Carl Zeiss LTD Hert, UK).

El examen microscópico de los especímenes se llevó a cabo sin informar al patólogo que examinaron el tipo de espécimen que examinaría.

Para el estudio histológico de los especímenes se colocaron en bloques de parafina, se cortaron y se tiñeron con H y E.

El estudio de inmunohistoquímica de los implante, se realizó con la incubación con anticuerpos policlonales de conejo contra TFGβ (isoformas 1,2, y 3) y BMP 2 y 4 (Santa Cruz Lab, Cal. U.SA)

diluidas 1/200 en PBS. La fijación de anticuerpos fue detectada usando anticuerpos anticabra- anticonejo marcados con peroxidasa (Dako) y diaminobenzidina. La hematóxilina se usó como contraste de tinción.

En el examen inmunohistoquímico, las preparaciones fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo contra TFG β (isoformas 1, 2, y 3) y BMPs 2 y 4 (Santacruz Lab. Cal, USA) diluidas 1/200 en PBS. La fijación de anticuerpos fue detectada usando anticuerpos anticonejo marcado con peroxidasa (Dako) y diaminobenzidina. La hematoxilina fue utilizada como contraste de tinción.

o **ESTADÍSTICA:**

En un analisis de varianza (ANOVA) se usó para determinar la significación estadística entre el porcentaje de hueso, tejido adiposo y fibromuscular entre el lado derecho e izquierdo en ambos grupos experimentales. Una $p < 0.05$ fue considerada como significativa.

RESULTADOS

o **OBSERVACIONES CLÍNICAS**

Hasta la toma de los especimenes, no hubo evidencia de infección, o reacción inflamatoria significativa, en ambos lados de los ICCs, en ningún animal.

La palpación durante el tiempo de observación de los ICCs en el primer grupo del lado izquierdo (periostio y colágena tipo I), mostró consistencia más dura comparativamente al lado derecho (epiplón y colágena tipo I), donde la consistencia fue mas blanda.

En los del segundo grupo la consistencia de los ICCs del lado izquierdo (periostio, PDH, 3 ml de PRP, 10 000 UI de trombina, 0.4 ml de PDH, y esponja colágena tipo I (fibroquei) fue mas dura comparada con la del lado contra lateral, en los que no fue incluido el periostio. En ambos grupos la forma cilíndrica original se mantuvo.

o **EXAMEN HISTOPATOLÓGICO**

❖ **ANÁLISIS HISTOMORFOMÉTRICO**

Después de cuatro semanas de formación de los ICCs, el análisis morfométrico de los implantes del lado izquierdo del grupo I, revelaron entre el 15 -20% de los ICC estaban constituidos por hueso trabecular maduro, el tejido fibroso constituía entre el 45 y 60%, mientras que el adiposo correspondió 30-45% (Fig 1). El hueso trabecular se encontraba cubierto por números osteoblastos y algunos

osteoclastos rodeados de tejido mesenquimatoso vascularizado (Fig. 3A). En contraste los ICCs del lado derecho, sin periostio, el tejido analizado estaba constituido por tejido adiposo (60-70%) y tejido fibroso (35-50%), sin evidencia de tejido óseo. (Fig. 1). En ambos implantes, áreas pequeñas de músculo estriado y fascículos nerviosos se observaron (2-4%) . Después de 60 días, la cantidad de hueso trabecular maduro representó entre el 33 -50% de los ICCs del lado izquierdo, mientras que el tejido adiposo disminuyó (23-30%), en tanto el tejido fibroso mantuvo esta proporción (Fig 1) . Los ICCs del lado derecho aumentaron la proporción de tejido fibroso (70-80%), mientras disminuyó el tejido adiposo (30-35%), sin tejido óseo demostrable (Fig 1) . En contraste en el grupo 1 el análisis histomorfométrico de ambos implantes en el grupo dos, se demostró áreas pequeñas de tejido óseo (3-7%) al día 7 (Fig. 2) . El porcentaje de hueso trabecular aumento progresivamente después de 3 semanas, y alcanzó su valor mas alto (45-70%) después de 4 meses de evolución (Fig 2): Este fue un resultado inesperado, puesto que el implante del lado derecho no incluyó el periostio en sus componentes. El porcentaje de tejido fibroso y adiposo fue similar en ambos lados (Fig 2)

❖ INMUNOHISTOQUÍMICA Y DETECCIÓN DE TFG β Y BMPS.

Desde el día 7 ambos ICCs del grupo experimental 2 mostraron intensa inmunotinción a TFG β en macrófagos, capilares, células endoteliales y fibroblastos localizados en el tejido de granulación, tejido muscular y en el tejido mesenquimatoso que rodeaba a las trabéculas óseas pequeñas (Fig.3 B).

El día 28 en el espécimen del lado izquierdo del grupo 1 y en ambos ICCs del grupo 2 mostraron intensa inmunotinción a TFG β de macrófagos, fibroblastos y en la capa de músculo liso de arterias de mediano calibre (Fig 3 C) Un número considerable de osteoblastos y osteoclastos localizados en la superficie de las trabéculas óseas tuvieron fuerte inmunoreactividad a TFG β (Fig.3D). Esta distribución y la intensa inmunotinción disminuyó al día 120. En contraste. . Los ICC del lado derecho del grupo 1 mostraron actividad inmunotinción intermedia en algunos macrófagos y vasos sanguíneos (datos no mostrados)

En ambos implantes y comparados en los mismos tiempos, del grupo experimental 2, la detección de BMPs 2 y 4, mostraron intensa reactividad en el tejido fibroso mesenquimatoso que rodeaba a las trabéculas óseas (fig 3 E), y en algunos osteocitos y osteoblastos los días 21 y 28 después de formación de los ICC. Tejido de granulación, específicamente tejido conectivo rodeo a los vasos neoformados, los cuales mostraron fuerte inmunoreactividad a BMPs, particularmente los días 7 y 14 (Fig. 3F). Después de 4 meses rastros de inmunoreactividad a BMP fue vista en el tejido fibroso cercano

a las trabéculas. Los ICC del lado izquierdo del grupo experimental 1 mostraron un patrón similar de inmunotinción a BMP, mientras que en los ICC del lado derecho no mostraron inmunoreactividad a BMPs, durante todo el experimento.

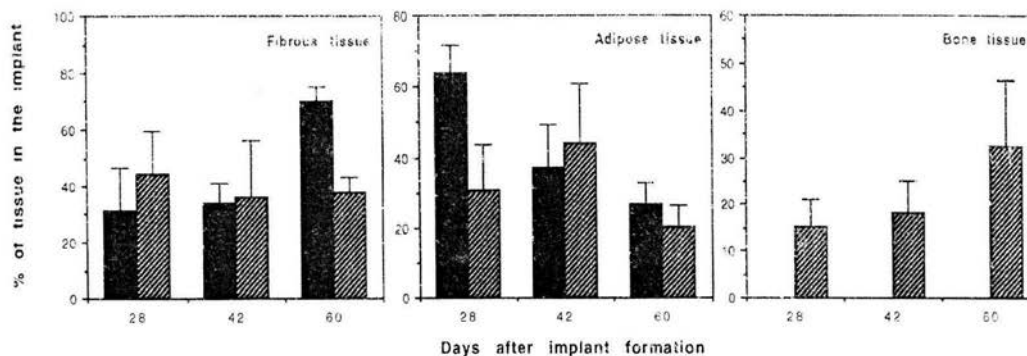


Figura 1.

Análisis morfométrico de los injertos colgajos compuestos (ICCs) del grupo experimental I

Los Injertos colgajos compuestos (ICCs) del lado derecho formados por colágena tipo I, incluidos en epiplón (columnas en negro) se comparan con los ICCs del lado izquierdo formados por colágena tipo I envueltos con periostio y epiplón (columnas con líneas). El hueso heterotópico se produjo solamente en los ICCs del lado izquierdo. Cada columna representa el promedio de dos animales por grupo comparados al mismo tiempo de obtención de especímenes en los dos diferentes experimentos (cuatro animales en total) al menos cuatro laminillas de cada colgajo fueron analizadas.

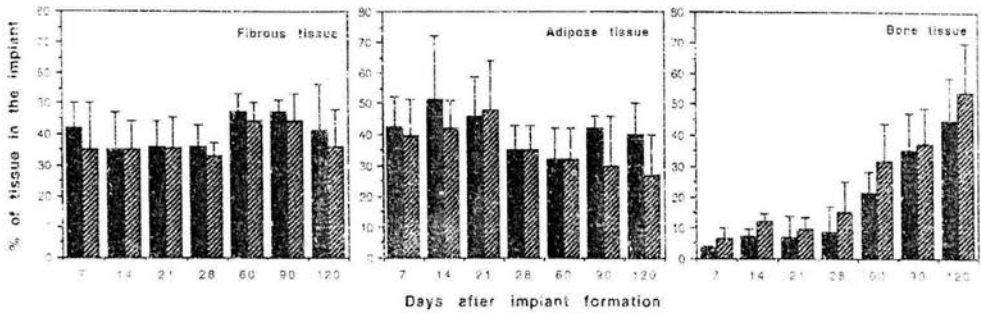


Figura 2. Análisis morfométrico de los ICCs del grupo experimental 2

Los ICCs del lado derecho se formaron con la mezcla de polvo desmineralizado de hueso, plasma enriquecido en plaquetas, trombina de bovino y cloruro de calcio y esponja de colágena tipo I, envueltos en epiplón (columnas negras), los implantes del lado izquierdo se conformaron de todos los elementos mas periostio (columnas con líneas). En ambos grupos se formó hueso heterotópico. Cada columna representa el promedio y la desviación estándar de dos animales por grupo comparados al mismo tiempo en los dos diferentes experimentos (cuatro animales en total) al menos cuatro laminillas de cada colgajo fueron analizadas

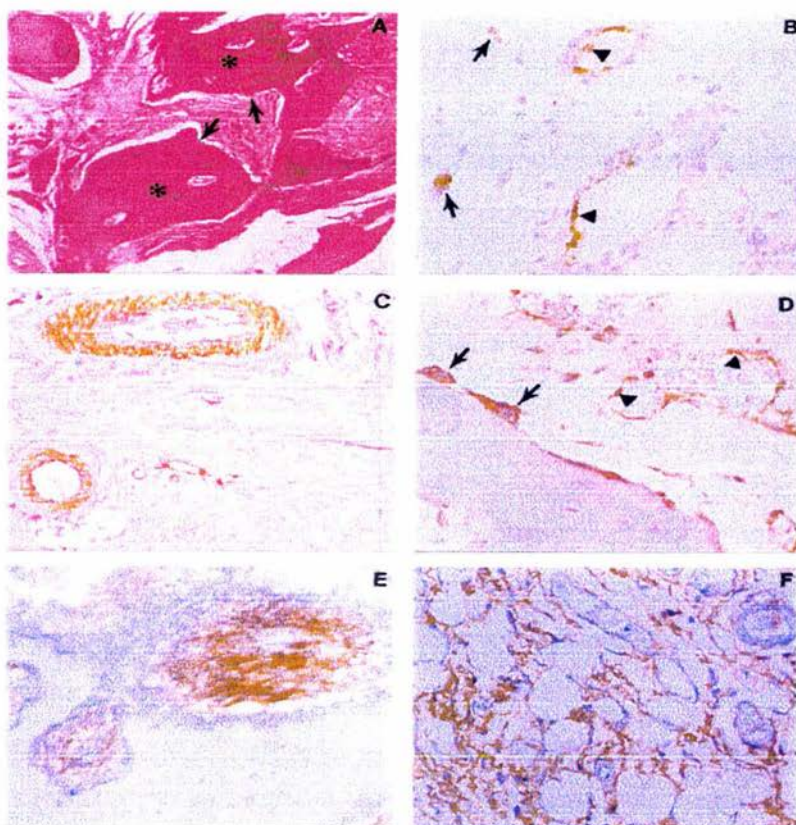


Fig.3 Representación histológica y de inmunohistoquímica de los ICCs izquierdo y derechos del grupo experimental 2.

(A) Hueso trabecular (asterico), rodeado por osteoblastos (flechas) y osteoclastos (puntas de flechas) del ICC derecho, espécimen a los 28 días d. (B) Fuerte tinción del factor de crecimiento y transformación beta (TFG β) inmunotinción en macrófagos (flechas) y células endoteliales (puntas de flechas) en el tejido de granulación en el ICC espécimen, a los 7 días. (D). Osteoblastos (flechas) y células endoteliales (puntas de flechas) muestra fuerte inmunoreacción al TFG β en el implante izquierdo espécimen a los 60 días. (E) Tejido conectivo próximo a hueso trabecular fuerte inmunotinción a la proteína morfogénica de hueso (BMP) 2 y 4 en el ICC del lado izquierdo espécimen a los 28 días. (F) Inmunoreacción de BMP en el tejido conectivo que rodea a vasos sanguíneos en el ICC derecho, espécimen a los 14 días.

Todas las microfotografías se tomaron a 200 X de magnificación.

DISCUSIÓN.

Fundamentalmente, la inducción del tejido óseo requiere, tres elementos que deben interaccionar en tiempo preciso, determinado, en un proceso puntual regulado. Estos elementos son células osteoprogenitoras, la función estructural de soporte corresponde a la matriz extracelular particularmente la colágena tipo I, por otra parte deben actuar factores osteoinductivos, locales y sistémicos, regulados por sistemas de retroalimentación, autocrinos, paracrinos, endocrinos y sistémicos.^{2,3}

Esta tesis, presenta los resultados de un modelo original de inducción experimental de hueso heterotópico, que integra, células osteoprogenitoras, factores osteoinductivos, considerados como factores de crecimiento y diferenciación y una matriz extracelular estructural.

La contribución celular, osteoprogenitora fue aportada por la capa proliferativa del periostio, *el cambium*, que contiene células con capacidad osteoprogenitoras, y además se considera a su capa proliferativa como una fuente importante de BMPs, que en este caso, seguramente logró promover el reclutamiento y diferenciación de las células osteoprogenitoras, hacia la línea celular que indujo la formación de hueso.⁷³

Desde el punto de vista de la estructura del injerto colgajo compuesto, el trasplante de periostio, además tuvo la función de aislar los implantes y tejidos, y permitió mantener la forma de cilindro original, y de otro modo impidió la infiltración del tejido fibroso circundante. Este aislamiento, facilitó la disección de los implantes⁴

La colágena tipo I, fue la matriz extracelular de soporte.^{55,74}

La unión del implante de la matriz desmineralizada de hueso (DBM), y el PRP incrementaron la cantidad y la calidad de las sustancias con poder osteoinductivo.⁷⁵

Por otra parte, la gran vascularidad del epiplón contribuyó a la nutrición y oxigenación de los elementos, el propio tejido, aportó tanto con factores angiogénicos como de crecimiento, todos los elementos crearon el micromedio ambiente propicio para lograr tanto la restitución tisular como la inducción extraesquelética de hueso.^{76,77,78}

La integración del periostio, esponja de colágena tipo I, y epiplón fue eficaz para producir hueso heterotópico (implante izquierdo, grupo 1) en tanto el otro implante, sin periostio, fue incapaz de formar hueso (implante derecho, grupo 1)

La regeneración tisular ósea, se inicia, por el aporte cualitativo y cuantitativo de factores de crecimiento, tales como el PDGF, TFG β , BMPs, y el factor de crecimiento insulinoide (IGF).

La concentración de factores de crecimiento y diferenciación como el PDGF, TFG β y otros es mayor en las plaquetas que en otros tejidos.^{34,35,79} Este hecho, nos alentó a utilizar al PRP, como una forma natural y fisiológica de aportar factores de crecimiento y diferenciación con cualidades de osteoinductividad en los modelos de estudio. La acción sinérgica de TFG β , PDGF e IGF, seguramente, permitió que las células mesenquimatosas no diferenciadas, pudieran sufrir los procesos de inducción, diferenciación, activación de fibroblastos, osteoblastos, la producción y depósito de matriz de colágena, lo cual produjo, la diferenciación de los pericitos del endotelio vascular y el crecimiento de capilares dentro del implante.²⁷ Probablemente, por esta razón, fue posible la inducción y formación de hueso en los implantes que no tuvieron periostio (implantes derecho del grupo experimental 2). En estos implantes, las plaquetas concentradas en un volumen pequeño de plasma, representó la fuente de diversos factores de crecimiento, y por otra parte y la incorporación de sustancias como la fibrina facilitó la adhesión junto con la trombina y por otra parte el cloruro de calcio, activó la secreción de PDGF y TFG β contenido dentro de los gránulos alfa de las plaquetas.^{34,35,7}

Es importante mencionar, que las altas concentraciones de TFG β logradas tienen una importancia fundamental en la actividad quimiotáctica de los monocitos y la activación de los macrófagos, que representó también una fuente importante de TFG β .^{80,81,82}

Los resultados de inmunohistoquímica mostraron claramente que después del día 21, el implante tenía numerosos macrófagos mezclados en el tejido de granulación con fuerte inmunotinción de TFG β , así como fibroblastos y miofibroblastos que mostraron, intensa inmunotinción. También, las células del músculo liso de la pared vascular, demostraron fuerte inmunotinción.

Otra función del PRP, en la inducción tisular fue la adición de fibrina y fibrinógeno que de esta forma, participaron como proteínas con función inductiva, además la actividad desempeñada como factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)⁸³ al provocar el estímulo para la proliferación de las células endoteliales.⁸⁴ Técnicamente, el fibrinógeno facilitó la mezcla entre el PDH y la esponja de colágena, dando una consistencia suave que permitió moldear fácilmente y dar la forma cilíndrica al implante, el hecho permite dar diversas tamaños y formas al implante.⁸⁵ Esta forma fue conservada en el tejido neoformado de hueso y que seguramente puede servir en casos de autotrasplante.

La ECM tuvo diferentes funciones, sirvió como soporte para la neovasculatura, células parenquimatosas y nervios, fue la fuente de señales moleculares de adhesión, que permitió concentrar y liberar factores de crecimiento que favorecieron la mitosis y la diferenciación celular⁵⁵. La propia ECM proporcionó la estructura para la adhesión celular y el crecimiento tisular, además de

soporte, protección y forma, permitió optimizar la supervivencia celular y la integración de los elementos del implante.

La inclusión de DBM, incorporó la BMP y el TGF β , la BMP tuvo múltiples funciones tanto a nivel extracelular como en la organogénesis y la regeneración esquelética. La BMP considerada como un factor de crecimiento, actúa como una señal proteica extracelular que permite la unión con los receptores de membrana, el TGF β y los otros factores liberados por las plaquetas y las células osteoprogenitoras.⁶⁶

La esponja de colágena tipo I, funcionó como una ECM, osteoinductiva y un sistema de liberación de las BMPs eficaz.⁵⁴ Las características físicas de la esponja de colágena propició el crecimiento vascular, histológicamente fue demostrada por el abundante tejido fibrovascular observado en los especímenes. El propio tejido fibrovascular tuvo intensa inmunotinción con BMP, desde la primera semana de formación del implante, este hecho sugiere que el tejido fue una importante fuente de BMP. Con respecto al DBP puede ser otro factor importante, tuvo la función de guía de instrucción, para la liberación de las BMP⁵⁴ y sirvió como quimiotáctico de células pluripotenciales, la propia BMP pudo inducir la diferenciación de las células del endotelio vascular y la diferenciación hacia la línea osteoblástica.⁶⁷

La supervivencia de todos los injertos y colgajos depende de la neoformación vascular.⁷⁷

En este estudio la neovascularización fue fundamental, ya que permitió mantener la fisiología y la integración de los diferentes elementos del implante. Otro elemento fundamental para la vascularización del implante fue el epitelio.⁷⁷ El flujo vascular incrementó las concentraciones de oxígeno y contribuyó a inducir la producción de células osteoprogenitoras a partir de las células mesenquimatosas perivasculares.^{67,88} Durante la angiogénesis, el VEGF incrementó la permeabilidad capilar, y por lo tanto el aporte de hormonas y factores de crecimiento sistémicos, también, permitió mantener los niveles altos de oxígeno y propició el proceso de osificación intramembranosa, demostrada en este trabajo.⁶⁴

Además, los niveles altos de las presiones parciales de oxígeno en los procesos de restitución y regeneración tisular son primordiales, estos niveles permiten la fagocitosis y la capacidad germicida que evita la infección.^{26,36}

Este proceso de inducción ósea contrasta con el proceso de inducción heterotópica por medio de la implantación de DBP, que da lugar al proceso de osificación endocondral, probablemente porque en este proceso el flujo vascular es menor y las concentraciones de oxígeno son bajas, condiciones propicias para la osificación endocondral.

Otra ventaja del uso de los colgajos de epiplón fue la liberación de factores de crecimiento contenidos en el epiplón y la activación de las llamadas "manchas lactescentes" ("milky-spot") los macrófagos produjeron el brote de nuevos capilares e invadieron la red de tejido fibroso creada. El estudio de inmunohistoquímica mostró fuerte inmunoreactividad a TGF β en las células endoteliales de los vasos de neoformación.⁸⁸

Este estudio experimental, es un modelo original de autoinducción heterotópica, en el cual se logró la generación de hueso, músculo liso, estriado, y nervio periférico

La inducción de células con capacidad osteoprogenitora, con la matriz extracelular y factores de crecimiento crearon un micromedio ambiente propicio, que permitió la organización funcional de los tejidos de neoformación, los diversos injertos e implantes se integraron a un sistema vascularizado, y de esta manera se logró la formación de tejidos de *novo*.

Las estrategias utilizadas en el diseño de los modelos, fueron técnicas de trasplante de tejidos, con el concentrado plaquetario se obtuvo una fuente de factores de crecimiento locales, en tanto los sistémicos fueron concentrados por el aporte vascular, todos permitieron crear un medio ambiente que de forma continua aportó factores de crecimiento durante todo el tiempo de la inducción ósea experimental, y las acciones sinérgicas e interdependientes de los procesos de osteogénesis y angiogénesis favorecieron la generación tisular de *novo* en un sitio heterotópico de tejidos óseos y paraóseos.

CONCLUSIÓN.

Es posible inducir la formación de hueso heterotópico en la pared abdominal con implantes de colágena, con periostio y epiplón, de otra forma conjugando esponja de colágena, DBP, mezclados con PRP, cloruro de calcio y trombina incluidos en un colgajo de epiplón con o sin periostio se logra la generación de tejido óseo de *novo*.

La eficacia de este tejido óseo de neoformación puede ser utilizado como un autotrasplante. sin embargo, tendrá que ser estudiado en cuanto a sus características físicas, estabilidad, químicas y evolución clínica al ser colocado en el lecho receptor.

BIBLIOGRAFIA:

1. Beel, E. Tissue engineering in perspective xxxv- xli: en Lanza,R:P., Langer, R., Vacanti, J.: Principles of tissue engineering Academic Press 2a Edition 2000
2. Reddi, A.H.: Morphogenesis and tissue engineering. 81-91. en Lanza,R:P., Langer, R., Vacanti,J.: Principles of tissue engineering. Academic Press 2ª Edition 2000
3. Caplan, A.I., Goldberg, V.M.: Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissue. Clin Orthop. Res 367S. S12-S16 1999
4. Ascencio, D.: Poder Osteogénico, Mielogénico y Miogénico del Periostio, formación de hueso, médula ósea. músculo liso y músculo estriado por autoinducción en el epiplón mayor (Modelo Experimental en perros). Tesis par obtener grado académico de maestría en ciencias Médicas. UN.A.M. 1984.
5. Bunn, H.T. Animal bones and archeological inference. Science 215: 494-496 .1982
6. Phemister, D.B.: The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. Surg.Gyn Ob. 19: 303 -333. 1914.
7. Ollier citado por: Glowacki, J. Mulliken,J.B., Demineralized Bone Implants.: Clinics in Plastic Surgery. Vol 12 – 2. 233 241. 1985
8. Ritsila, V., Alhopuro,S., Rintala, A.: Bone formation with free periostium : An experimental study.Scand. J. Plastic. Reconstructive Surgery. 6: 52.1972.
9. Senn, N. . On the healing of aseptic bone cavities by implantation of aseptic decalcified bone. Am J Med Sci (New series) 98: 219. 1989.
10. Willestaedt, H., Levander, G., Hult,L.:Studies in osteogenesis Acta Orthop Scand 19.419. 1950.
11. Urist, M.R., Bone: Formation by autoinduction. Science 150.893.1965
12. Mizumoto, S., Inada, Y., Weiland, A.J.: Fabrication of vascularized bone grafts using ceramic chambers . J. Microsurg 9 441. 1993
13. Inoue, K., Ohguhi, H., Yamina, H.: Osteogenic capacity of vascularized periostium supported by porous hydroxiapatite,. Bioceramics. 7 : 341-347. 1994
14. Finley, J.M., Acland, R.D., Wood, M.R.: Revascularized periostial grafts . A new method to produce functional new bone without bone grafting. . Plastic Reconstr Surg. 61. 1, 1978
15. Khorl, R.K., Koudsi, B., Reedi, H.: Tissue transformation into bone in vivo. A potential application: JAMA. 266: 1953. 1991
16. Viljanen, W.,Lindholm, T.S. : Heterotopic osteoinduction in a rat membrane-isolated latissimus dorsi island flap. A pilot study. Ann Chir Gynaecol. 82. 55 1993
17. Glowacki, J. Mulliken, J.B.: Demineralized. Bone Implants Clinics in Plastic Surgery. Vol 12 – 2. 233 - 241. 1985.
18. Hebrok M., Melton, D.A.: Inductive Phenomena 73-81 in Lanza, R:P., Langer, R., Vacanti,J.: Principles of tissue engineering. Academic Press 2ª Edition 2000
19. Vacanti, C. A., Bonassar, L.J.: An overview of tissue engineered bone Clin Orthop, : Supl S375-S381. 1999.
20. Zandstra, P. W., Nagy, A.: Stem cell bioengineering. Annu. Rev. Biomed. Eng. 3:275-305. 2001

21. Frost H.M.: The biology of fracture healing. An overview for clinician. Part I. Clin Orthop 248:283-293.1989.
22. Frost H.M.: The biology of fracture healing. An overview for clinician. Part II. Clin Orthop 248:294-309.1989
23. Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J. Cooper, R.R., Recker, R.: Bone Biology.Part I Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. J. Bone and Joint Surg. 77. A 8. 1256-1275.1995
24. Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J. Cooper, R.R., Recker, R. : Bone Biology.Part II Formation, form, modeling, remodeling and regulation of cell function. J. Bone and Joint Surg. 77.A.8 1276-1290 .1995
25. Owen, M.: The origin of bone cells. Int. Review ,Cytol. 28:213 , 1970
26. Owen, M.: The origin of bone cells in the postnatal organism. Arthritis Rheum. 23: 1074.1980
27. Schor, A.M., Canfield,A. E., Sutton, A.B., Arciniegas, E., Allen, T.D.: Pericyte Differentiation. Clin Orthop . 313. 81-91.1995
28. Friedenstein, A. J.: Precursor cells of mechanocytes. Int. Rev. Cytol47:327. 1976.
29. Kale, A.A., Di Cesare, P.E. : Osteoinductive agents. Basic science and clinical applications. Am J Orthop; 24:752-761. 1995
30. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.m., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick,R.M. Wang, E.A.: Novel regulators of bone formation : Molecular clones and activities. Science 242: 1528-1534, 1988.
31. Urist, M.R., Mikulski ,A.J., Nakagawa, M., Yen, K.: A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. Am J Physiol; 232:C115-127. 1977
32. Goldring, S.R., Goldring, M.B.: Cytokines and skeletal physiology. Clin Orthop; 324:13-23. 1996
33. Antonaides HN, Williams IT. Human platelet-derived growth factor: Structure and functions. Federation Proc; 42:2630-2634. 1983
34. Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele S.R., Strauss J.E, Georgeff. K.R.: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg.Oral Med. Oral Pathol. 85:638-646. 1998.*
35. Marx, R.E.: Platelet-rich plasma: A source o multiple autologous growth factor for bone grafts. In Lynch Se, Genco R.J. Marx R.E: (eds) Tissue Engineering application in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago Quintessence 71-82 1999 *
36. Gooch KJ, Blunk T, Tennant CJ, Vunjak-Novakovic G, Langer R and Freed LE, in: Frontiers of Tissue Engineering, Patrick CW, Mikos AG and McIntire LV (Hrsg.), Elsevier Science Ltd., Oxford, 61-82 1998.
37. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp 1988; 136:42-60.
38. Caplan, A.I.: Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9:641-50.
39. Prockop, D.J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science; 276:71-4. 1997
40. Huggins, C.B.: The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract. Arch. Surg. 22; 377 1931
41. Friedenstein, A. Y.: Induction of bone tissue by transitional epithelium. Clin. Orthop 5921, 1968.
42. Willestaedt, H., Levander,G., Hult,L.:Studies in osteogenesis Acta Orthop Scand 19.419. 1950

43. Ekelund, A., Brosjö, O., Nilsson, O.: Experimental Induction of Heterotopic Bone. *Clin Orthop.*: 102-112. 1991.
44. O'Connor, J. P.: Animal Model of Heterotopic Ossification *Clin. Orthop.*. 346: 71-80 1998
45. Michelsson, J. E. Rauschnig, W.: Pathogenesis of experimental heterotopic bone formation following temporary forcible exercising of immobilized limbs. *Clin. Orthop.* 176: 265. 1983
46. Cohen RB. Hahn GV. Taba JA. : The natural history of heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia osifican progresiva. *J. Bone Joint Surg.* 75 A. 215-219. 1993
47. Prockop, D.J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 276: 71-74. 1997
48. Urist, M. R., Silverman, B.F. Bürning, K., Dubuc, F. L., Rosenberg, J., M.: The bone induction principle. *Curr. Orthop. Related Research.* 53: 243-283. 1967
49. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16:247-52. 1998;
50. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage. inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Eng*; 6:351-9. 2000
51. Urist, M.R. Bone morphogenetic protein: The molecularization of skeletal system. *J. Bone Miner, Res*; 12. 343. 1997.
52. Parffit, A. M.: Mechanism of coupling: A role for the vasculatura. *Bone.* 26. 4 319-323. 2000
53. Karsenty, G.: The complexities of skeletal biology. *Nature* 423, 316 - 318 2003
54. Reddi AH.: Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 16, 247-252. 1998**
55. Reddi AH: Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside. *Biochemical Society Transactions* 28, 4. 345 349 2000
56. Goldstein, S.A., Patil, P.V., Moalli, M.R. : Perspectives on of tissue engineered bone *Clin Orthop.*: S 367. S419- S423. 1999
57. Szilvassy, S.J. Boning up on tissue engineering. *Trends Biotrech.* 18.12. 482. 2000 8. 1276 1289. 1995
58. Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M., Kadiyala, S.: The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg* 80A: 985-996. 1998)
59. Bauer, F. C. H., Nilsson, O. S., Tömkvist, H.: Formation and resorption of bone induced by demineralized bone matrix implants in rats *Clin. Orthop.* 191.139. 1984.
60. Ripamonti U, Duneas N.: Tissue Morphogenesis and regeneration by morphogenetic proteins. *Plast Reconst Surg.* 101, 1 227-239. 1998
61. -Beresford, J. N.: Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin. Orthop.* 240:270, 1989.
62. Wang, E.A., Rosen, V. D., Aleandro J.: Recombinant human bone morphogenetic protein induce bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 872220--2224. 1990
63. Haynesworth, S.E., Reuben, D., Caplan, A.I.: Cell-based tissue engineering therapies: The influence of whole body physiology. *Adv Drug Delivery Rev.* 33-3-14. 1998

64. Malouf, N. N., Coleman, W. B., Grisham, J. W., Lining, R. A., Madden, V. J., Sproul, M., Anderson, P. A. W. Adult-Derived Stem Cells from the Liver Become Myocytes in the Heart in Vivo. *Am.J.Pathol.* 158:1929-1935.2001.
65. Watt F. M., Hogan B. L. M.: Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. 267, 5457. 1427-1430. 2000
66. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., Shi, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S.A.* 10:1073. 24030 - 24037. (2000).
67. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.T.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284; 143-147, 1999.
68. Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., McKercher, S. R. Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow. *Science* 290: 1779-1782 (2000).
69. Uchida, N. ; et al "Direct isolation of human central nervous system stem cells"; *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 97, 14720-14725. 2000.
70. Bjornson, J. et al : "Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo"; *Science* 283, 534-537; Jan. 22, 1999
71. Rao, M., S., Mattson, M.P.: "Stem cells and aging: expanding the possibilities"; *Mech Ageing Dev* 122(7), 713-734. 2001
72. Minguell, J. J., Erices, A., Conget, P.: Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*. 226:507-520.2001
73. Canalis, E., Burstein, F. D.: Osteogenesis in vascularized periosteum *Arch. Otolaryngol.* 111: 511, 1985.
74. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. PartII. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng*; 8(1):1-11.2002
75. Garg, A.: The use of platelet rich plasma to enhance the success of bone grafts around dental implants . *Dental Implantology Update*. March 11,3 2001
76. Beelen, R.H.J.: The greater omentum: Physiology and immunological concepts. *Neth J Surg* 43:145-151, 1991.
77. Cartier, R., Brunette, I., Hashimoto, K.: Angiogenic factor: A possible mechanism for neovascularization produced by omental pedicles. *J Thorac Cardiovasc Surg* 99:264-268, 1990
78. Greenlangh, D. G.: The role of growth factors in wound healing. *J. Trauma*. 41, 159-167, 1996
79. Howes, R., Bowness, J. M., Grotendorsh, G. R., Martin, G. R., Reddi, A. H.: Platelet derived growth factor enhances demineralized bone matrix induced cartilage and bone formation. *Calcif. Tiss.Int.* 42:34, 1988
80. Maugué J.: Receptor for the TGF- β family- *Cell* 69.1067-1070. 1992
81. Maugué J.: TGF β signaling receptor, transducers, and Mad protein. *Cell* 85: 947-950. 1996
82. Bonewald, L.F., Dallas, S.L.: Role of active and latent transforming growth factor β in bone formation. *J Cell Biochem* 55:350-357. 1994
83. Saadeh, P.B., Mehrara, B.J., Steinbrech, D.S., Dudziak, M.E., Greenwald, J.A., Luchs, J.S., Spector, J.A., Ueno, H., Gittes, G.K., Longaker, M.T.: Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. *Am J Physiol* Oct; 277 :C628-33 1999.

84. Harada S, Rodan SB, Rodan GA: Expresión and regulation of vascular endotelial growth factor in osteoblasts. Clin Orthop 313: 76-80, 1995
85. Winterbottom, N., Kuo, M, J., Nguyen, K., Reich, C. J., Trent, K.J., Rondinone, J. F., Shargill, N. S.: Antigenic Responses to Bovine Thrombin Exposure During Surgery: A Prospective Study 309 patients J Appli Res Clin ExpTherap. 2, 1. 1-10. 2002
86. Reddi, A.H.: Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals stem cells, and biomimetic biomaterials. Tissue Eng 6, 351-359.2000
87. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, González R, Varela H.: Pericytes supplementary source of osteoblast in periosteal osteogenesis. Clin.Orthop.275: 280. 1992
88. Shimotsuma M, Shields JW, Simpson-Morgan MW, et al: Morpho-physiological function and role of omental milky spots as omentum-associated lymphoid tissue (OALT) in the peritoneal cavity. Lymphology 26:90-101, 1993**
89. Takada T, Kamei Y, Iwata T, et al: Effect of omental lipid fraction on enhancement of skin flap survival. Ann Plast Surg 41:70-74, 1998.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Afinidad:** La fuerza de unión de dos moléculas, tales como un antígeno con su anticuerpo, o una hormona y su receptor.
- **Angiogénesis:** Desarrollo de vasos sanguíneos, incremento de la vascularización.
- **Apoptosis:** Muerte celular como resultado de la inducción de un "suicidio" interno programado, considerado como normal y esencial en algunas etapas del desarrollo.
- **Autocrino:** Factor de crecimiento o molécula biológica activa, que producida por una célula, que actúa localmente para estimular al mismo tipo de célula en un tejido.
- **Autoinjerto:** (**autólogo**) Tejido u órgano trasplantado a un nuevo sitio del mismo individuo.
- **Biocompatible:** Material que puede funcionar en un medio ambiente biológico sin sufrir deterioro, un material o un sistema vivo.
- **Biodegradable:** Material que desaparece cuando es colocado en un ambiente biológico.
- **Biomaterial:** Sustancia compatible con la fisiología del cuerpo; es diseñado típicamente para ser usado en la terapia tisular y / o en ingeniería tisular.
- **Bioabsorbible:** Material que se descompone sus productos y se incorpora dentro de los procesos fisiológicos y bioquímicos normales.
- **Biomimético:** Estructura del cuerpo (anatómica) o función (fisiológica) capaz de ser replicado o imitado.
- **(BMPs) Proteína Morfogénica de Hueso:** Proteína involucrada en la formación del hueso embrionario, participa en diversos estados de la formación, participa en los estadios tempranos de la morfogénesis y continúa en la vida posfetal. Representa un papel crítico en el desarrollo del sistema nervioso central y en la formación del hueso.
- **Canal haversiano:** Canal que se anastomosa libremente dentro del hueso cortical, contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, y colágena: una o la familia de proteínas fibrosas de gran fuerza tensil, encontrada en todos los vertebrados, es la proteína más abundante en los mamíferos, el elemento más abundante
- **Célula del estroma:** Célula no sanguínea derivada de la sangre, se localizan en la médula ósea o del hígado fetal, es capaz de mantener el crecimiento de células sanguíneas in vitro.
- **Célula de la médula ósea:** Se refiere tanto a células hematopoyéticas y mesenquimatosas localizadas en el estroma
- **Célula troncal adulta:** Célula indiferenciada que se encuentra en tejidos adultos diferenciados, puede renovarse por sí misma, con ciertas limitaciones, da origen a todos los tipos de células especializadas de los tejidos que le dieron origen
- **Célula troncal (Stem Cell):** Célula con capacidad de dividirse por periodos indefinidos en cultivos y puede dar origen a células especializadas
- **Célula troncal de la médula ósea:** Se refiere al menos a uno o dos tipos de células troncales multipotenciales hematopoyéticas y células mesenquimatosas troncales.
- **Célula troncal hematopoyética (HSC):** Célula que tiene su origen todas las células rojas y blancas.

- **Célula troncal pluripotencial:** Célula troncal con la capacidad de desarrollar células de todas las capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo)
- **Citocinas:** Término genérico de gran variedad de proteínas reguladoras, producidas y secretadas por células. permite la comunicación con otras células, una clase sin las interleucinas que funcionan como mediadores intercelulares durante la generación de una respuesta inmune.
- **Diferenciación:** En general, se define como el aumento en la especialización de organización de diferentes partes del embrión. En el desarrollo de los organismos multicelulares desde la fase de fertilización indiferenciada del huevo. En las células se refiere al desarrollo de estructura y función especializada desde precursores celulares no especializados, que ocurren en el desarrollo embrionario y con el reemplazo subsiguiente de ciertos tipos de células desde células troncales no especializadas.
- **Difusión:** Paso libre de moléculas, iones desde un sitio de alta concentración a otra de baja concentración.
- **Ensayo.** Técnica experimental para medir o cuantificar un fenómeno.
- **Estructura:** Construcción tridimensional biocompatible (en la que pueden sembrar células) que sirve como un tejido de implante temporal, generalmente es biodegradable y puede ser reemplazada por tejido natural.
- **Factores de crecimiento:** Componentes orgánicos y otros que requiere del carbono y fuentes de energía , necesarios en muchos organismos para el crecimiento y desarrollo y se incluyen las vitaminas, aminoácidos, purinas etc.; en general el termino se utiliza es específico de péptidos y proteínas que son liberados por ciertas células y se unen a receptores específicos de membranas celulares en sitios que influyen en las celulares a dividirse o mantenerse en quiescencia
- **Factor de crecimiento insulinoide** (IGF) péptido con funciones similares a la insulina, estimula la proliferación celular.
- **Fenotipo:** La expresión de estructura, función o conducta de un organismo o célula.
- **Factor de crecimiento derivado de las plaquetas** (PDGF): glicoproteína, factor de crecimiento que estimula la proliferación celular y la quimiotaxis en cartílago, hueso y otros tipos celulares después puede ser producido por células mesenquimatosas o liberadas por las plaquetas durante la coagulación.
- **Genómico:** Análisis del genoma (el grupo completo de genes) de un organismo, proporciona información estática relativa al gen y la composición de las proteínas de la célula.
- **Glicoproteína:** Proteínas que contiene carbohidratos en forma de cadenas con unidades de monosacáridos unidos a residuos de aminoácidos, componentes de las membranas y secreciones celulares.
- **Homoinjerto** (*aloinjerto*) Tejido u órgano trasplantado entre individuos de la misma especie, genéticamente no idénticos..
- **Hidroxiapatita:** $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ Mineral natural considerado como el más importante constituyente inorgánico de la matriz ósea.
- **In vivo:** Sistema desarrollado dentro de un sistema vivo o natural.
- **In vitro:** Sistema desarrollado fuera de un organismo vivo o sistema natural, se refiere habitualmente a sistemas artificiales experimentales tales como cultivos, o extractos celulares libres.

- **Ingeniería tisular:** La aplicación de los principios de las ciencias de la vida y la ingeniería para el desarrollo de sustitutos biológicos para la restauración o reemplazo de tejidos u órganos funcionales.
- **Isoinjerto:** Tejido u órgano trasplantado entre individuos genéticamente idénticos
- **Indiferenciado:** No tiene la capacidad de cambiar a un tipo especializado de célula.
- **Matriz Extracelular:** El micromedio ambiente contiguo a la célula, estructura de soporte, conecta y orienta las interacciones célula-célula y la formación del tejido conectivo. Red intrincada de macromoléculas que ocupan un espacio entre las células de los animales multicelulares: Es particularmente importante en el refuerzo del soporte de los tejidos. Bajo el microscopio de luz, aparece como una masa estructural de la sustancia fundamental incrustada en las fibras del tejido conectivo. La sustancia fundamental está constituida principalmente de proteoglicanos, mientras que las fibras están formadas principalmente de proteínas fibrosas tales como colágena. Dependiendo de las cantidades relativas y el tipo de los constituyentes macromoleculares, la matriz extracelular puede mostrar un número de formas que van desde las estructuras duras calcificadas como el hueso y el diente a la matriz transparente de la cornea.
- **Médula ósea:** Tejido vivo blando que llena la mayor parte de las cavidades del hueso y que contiene células troncales hematopoyéticas, que dan origen a las células blancas y rojas. Contiene también, células troncales mesenquimatosas (estroma), con diversos tipos celulares como condrocitos, osteoblastos.
- **Mesénquima :** Tejido conectivo que surge de las múltiples capas germinales, conformado de células no especializadas. Los diferentes tipos celulares del mesenquima dan origen a la colágena, músculo, cartilago y hueso.
- **Mitógeno:** Agente que estimula la producción del DNA y la división celular.
- **Molécula de adhesión / receptor de adhesión.:** Gran variedad de proteínas de la superficie celular y glicoproteínas que mediante el contacto y adhesión de las células o en la matriz extracelular. Algunos tipos de moléculas de adhesión se unen a una molécula idéntica de otras células, mientras que otras se unen a diferentes moléculas receptoras. Por ejemplo las caderinas, integrinas y selectinas.
- **Morfogénesis:** Capacidad de generar tejidos "genéricos o universales compatibles que resuelva el problema inmunológico del rechazo a la donación homóloga. Otra opción para el trasplante de tejidos, a través del desarrollo de la tecnología de las células troncales.
- **Multipotente:** Capaz de diferenciarse dentro de múltiples tipos celulares y asociarse con diferentes órganos.
- **Osificación:** Formación de hueso, reemplazo de cartilago por hueso.
- **Osteoblasto:** Célula formadora de hueso que secreta la matriz ósea.
- **Osteocalcina:** Proteína específica de hueso producida por los osteoblastos y que participa en el reclutamiento de los osteoclastos.
- **Osteoclasto:** Célula grande multinucleada que destruye el hueso y la matriz durante el remodelado de hueso.
- **Osteocito:** Célula no secretora y no que no se divide derivada de los osteoblastos, se encuentra en el hueso calcificado, participa en la homeostasis mineral ósea.
- **Osteogénesis:** Proceso de producción de tejido óseo.

- **Osteoide**: Material colágeno secretado por células óseas (osteoblastos) que forma la base del hueso y de la matriz ósea no calcificada.
- **Osteón**: Unidad compuesta por la sobreposición de cilindros (osteones), cada uno está constituido por capas concéntricas (láminas) de fibras colágenas, cada capa está en ángulo recto a la siguiente , rodean al canal central (canal Haversiano).
- **Paracrino**: Acción local (tales como factores de crecimiento) producida por una célula a otro tipo de célula dentro del mismo tejido.
- **Plasticidad**: La capacidad de una célula de diferenciarse más allá del tejido en el cual normalmente reside.
- **Polímero**: Molécula compuesta por muchas unidades repetidas
- **Sustancia fundamental**: matriz inerte intracelular y amorfo en la que se encuentran incluidos los elementos fibrosos de sostén del tejido conectivo.
- **Tejido adiposo**: Tejido conectivo en animales, constituido de células (adipocitos) llenos de gotas de grasa.
- **Tejido conectivo**: Tejido primario con múltiples formas y funciones como las de soporte, almacenaje, y protección : Es frecuentemente reconocido como distintivo de otros tejidos por la gran proporción de matriz extracelular
- **Totipotencial**: Capacidad ilimitada. Células que en las etapas tempranas del embrión tiene la capacidad de diferenciarse dentro de las membranas extraembrionarias y tejidos, en el embrión, y todos los tejidos posembriónicos y órganos.
- **Trófico**: Influencia de una célula o tejido en la dirección o movimiento crecimiento a otro.
- **Uniones cruzadas**: Conexión química o mecánica de cadenas de polímeros adyacentes, factores de crecimiento: término general de péptidos específicos o proteínas que son liberadas por ciertas células y que se unen a receptores de membrana específicos e influyen a las células a dividirse o a permanecer en estado de quiescencia.
- **Vascularización**: Proceso de infiltración de vasos sanguíneos: crítico para mantener a los tejidos vivos.
- **Viscoso**: Propiedad de un fluido que ofrece resistencia al flujo.