

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

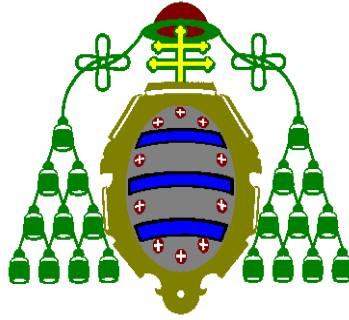
**Departamento de Cirugía y
Especialidades Médico-Quirúrgicas**

TESIS DOCTORAL

**MATRIZ PROTEICA TRIDIMENSIONAL DE
ORIGEN AUTÓLOGO EN LA
REGENERACIÓN DE DEFECTOS DE HUESO
LARGO**

María Fernández Villán

2015



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**Departamento de Cirugía y
Especialidades Médico-Quirúrgicas**

TESIS DOCTORAL

**MATRIZ PROTEICA TRIDIMENSIONAL DE
ORIGEN AUTÓLOGO EN LA
REGENERACIÓN DE DEFECTOS DE HUESO
LARGO**

María Fernández Villán

2015



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

| 1.- Título de la Tesis | |
|---|---|
| Español: MATRIZ PROTEICA TRIDIMENSIONAL DE ORIGEN AUTÓLOGO EN LA REGENERACIÓN DE DEFECTOS DE HUESO LARGO. | Inglés: DIMENSIONAL MATRIX PROTEIN OF ORIGIN AUTOLOGOUS IN THE REGENERATION OF LONG BONE. |
| 2.- Autor | |
| Nombre: MARÍA FERNÁNDEZ VILLÁN. | |
| Programa de Doctorado: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA. | |
| Órgano responsable: DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS (UNIVERSIDAD DE OVIEDO). | |

RESUMEN (en español)

OBJETIVO: La reparación de defectos óseos supone aún hoy en día un reto para los cirujanos reconstructivos. Los progresos alcanzados en la cirugía ortopédica han ampliado las posibilidades en el tratamiento tanto de los reemplazos articulares como de los tumores óseos y traumatismos, a menudo con la necesidad de abordar defectos óseos de gran tamaño. La Ingeniería Tisular es un intento de recrear la biología de un tejido. En el caso de la cirugía ortopédica y traumatología dicho tejido debería remedar las características del autoinjerto óseo (patrón oro en el tratamiento de defectos óseos). Esto se podría conseguir aportando una matriz osteoconductora, proteínas osteoinductoras y células osteogénicas para crear un equivalente de injerto óptimo para la regeneración ósea. En el presente estudio se evaluó un modelo de Ingeniería Tisular a partir de una novedosa matriz proteica porosa de origen plasmático autólogo sobre la que se sembraron células obtenidas a partir de médula ósea autóloga procedente de cresta ilíaca como técnica de implementación regenerativa.

MATERIAL Y MÉTODO: Se crearon defectos osteoperiósticos segmentarios de 10 mm en la diáfisis del radio de conejo. En 10 patas no se utilizó ningún implante ni injerto (grupo control). En otros 10 casos se implantó un soporte proteico tridimensional obtenido a partir de plasma autólogo cruzado con glutaraldehído y en un tercer grupo de 10 casos se añadieron células autólogas procedentes de médula ósea a dicho soporte proteico. Se realizaron controles mensuales radiográficos, análisis cuantitativos sobre imágenes radiográficas (densidad en el defecto, porcentaje de regeneración ósea) y estudios histológicos tras el sacrificio a los 6 meses postoperatorios.

RESULTADOS: Se objetivó en los dos grupos en los que se utilizó la matriz evaluada formación progresiva de hueso. El procesamiento digital de las imágenes confirmó este hecho, mientras que en el grupo control se encontró una ausencia de neoformación ósea. Dicha regeneración ósea es mayor y más llamativa si a la matriz se le añaden células procedentes de médula ósea autóloga obtenidas de cresta ilíaca, con diferencias estadísticamente significativas en las diferentes determinaciones temporales. Los hallazgos histológicos sugieren una excelente biocompatibilidad de la matriz con



imágenes de osteointegración en ausencia de respuesta inmune de rechazo.
CONCLUSIONES: La utilización de una novedosa matriz de proteínas globulares plasmáticas autólogas permite obtener regeneración ósea completa en defectos segmentarios de tamaño crítico en hueso largo del modelo experimental utilizado. Podría tratarse de una valiosa herramienta para la Ingeniería tisular en cirugía ortopédica y traumatología.

RESUMEN (en Inglés)

OBJECTIVE: The repair of bone defects represents, even today, a challenge for reconstructive surgeons. Progress made in orthopaedic surgery has allowed the expansion of possibilities in the treatment of both joint replacements and bone tumors and trauma, often together with the need to tackle large bone defects. Tissue Engineering is an attempt to recreate tissue biology. In the case of orthopaedic surgery and traumatology, such tissue should mimic the characteristics of autologous bone (gold standard in bone defect treatments). This could be done providing an osteoconductive scaffold, osteogenic cells and osteoinductive proteins to create an equivalent graft, which would be optimal for bone regeneration. In this study a Tissue Engineering model was evaluated from an innovative porous protein scaffold of autologous plasma origin, in which cells, derived from autologous bone marrow taken from the iliac crest, were sown as a technique of regenerative implementation.

MATERIAL AND METHODS: Segmental osteoperiosteal defects of ten mm were created in the diaphysis of a rabbit radius. In 10 legs, no implants or grafts were used (control group). In other 10 cases, a three-dimensional protein complex, which was obtained from autologous plasma crossed with glutaraldehyde, was implanted. Finally, in a third group of ten cases autologous cells from bone marrow were added to that protein complex. Radiographic monthly checks, quantitative analysis of radiographic images (defect density, percentage of bone regeneration) and histological studies were performed when sacrifice after 6-month postoperative.

RESULTS: The objective in the two groups which used the evaluated scaffold was progressive bone formation. The digital processing of images confirmed this fact, whereas in the control group an absence of new bone formation was found. This bone regeneration is bigger and more remarkable if cells from autologous bone marrow obtained from the iliac crest are added to the scaffold, with statistically significant differences in the different time measurements. Histologic findings suggest excellent biocompatibility of the scaffold with osseointegration images in the absence of immune rejection response.

CONCLUSIONS: The use of an innovative scaffold of autologous plasma globular proteins allows for complete bone regeneration in critical-sized segmental defects in the long bone of the experimental model used. It could be a valuable tool for Tissue Engineering in orthopaedic surgery and traumatology.

AGRADECIMIENTOS:

-A los directores: Prof. Miguel Ángel Suárez Suárez, Dr. Francisco Ferrero Manzanal y Prof. Antonio Murcia Mazón. Por sus aportaciones, consejos, supervisión científica y apoyo constante.

-A todo el personal del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias, por su amabilidad y disponibilidad. En especial por su ayuda en el procesamiento de muestras y preparación y desarrollo de la matriz a Eva García, Marta Pevida y Sara Llames. A Paz y Rosana por recibirme con una sonrisa como si fuera de la casa.

-Al Dr Álvaro Meana por su ayuda y apoyo científico en todas las fases del proyecto. Sin su idea nada de esto hubiera sido posible. Le agradezco sobre todo su infinita paciencia y haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto.

-A los veterinarios Agustín Brea y Teresa Sánchez y a todo el personal del Bioterio de la Universidad de Oviedo por su ayuda con las cirugías experimentales y el cuidado de los animales.

-Al personal de la Unidad de Metabolismo Óseo y Mineral del HUCA, en especial a la Dra. María Álvarez Viejo por su labor en el procesamiento del material histológico.

-A Tania Iglesias Cabo, de la Unidad de Consultoría Estadística de la Universidad de Oviedo, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos.

-Al Dr. Pedro García González por el estudio radiográfico de las muestras.

-A M^a Luisa López Avello, por su inestimable ayuda en la búsqueda bibliográfica.

-Al servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Jove, especialmente al Dr Luis Ovidio González Vázquez por sus aportaciones en los estudios de microscopía óptica.

-A los diferentes servicios y unidades que nos han brindado apoyo tecnológico y/o metodológico.

Dedicado a mi familia

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1 EL TEJIDO ÓSEO: | 2 |
| 1.1 Tipos de tejido óseo: | 2 |
| Hueso fibrilar: | 2 |
| Hueso laminar: | 2 |
| Hueso esponjoso:..... | 3 |
| Hueso compacto o cortical: | 3 |
| 1.2 Componentes del tejido óseo:..... | 3 |
| La matriz orgánica:..... | 3 |
| La matriz inorgánica:..... | 8 |
| El componente celular:..... | 9 |
| 1.3 Osteogénesis: | 12 |
| 2 TRATAMIENTO DE LOS DEFECTOS ÓSEOS: | 13 |
| 2.1 Propiedades de los injertos y sustitutos óseos:..... | 13 |
| Osteogenicidad: | 13 |
| Osteoinducción:..... | 14 |
| Osteoconducción:..... | 14 |
| 2.2 Clasificación de los injertos óseos:..... | 15 |
| Composición tisular: | 15 |
| Características anatómicas: | 15 |
| Aporte sanguíneo:..... | 15 |
| Método de conservación: | 16 |
| Manipulaciones adicionales: | 16 |
| Según la disparidad genética entre el donante y el receptor:..... | 16 |
| Lugar de implantación:..... | 16 |
| 2.3 Opciones de tratamiento de los defectos óseos:..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| Autoinjerto: | 17 |
| Aspirado de médula ósea:..... | 18 |
| Aloinjerto o injerto heterólogo:..... | 19 |
| Transporte óseo: | 19 |
| Técnica de membrana inducida: | 19 |
| Regeneración tisular guiada (RTG):..... | 21 |
| Sustitutos óseos:..... | 23 |
| 3 INGENIERÍA TISULAR: | 26 |
| 3.1 Células osteoformadoras: | 27 |
| Células troncales:..... | 27 |
| Células diferenciadas:..... | 30 |
| Células modificadas genéticamente:..... | 30 |
| 3.2 Matrices celulares o “scaffolds”:..... | 31 |
| Propiedades de las matrices: | 32 |
| Tipos de matrices:..... | 33 |
| 3.3 Factores de crecimiento:..... | 34 |
| Factores de crecimiento transformantes (TGF):..... | 35 |
| Factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF): | 35 |
| Factores de crecimiento fibroblástico (FGF): | 35 |
| Factores de crecimiento plaquetarios (PDGF): | 35 |
| Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs):..... | 35 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 39 |
| 1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:..... | 40 |
| 2 HIPÓTESIS: | 40 |
| 3 OBJETIVO: | 40 |
| MATERIAL Y MÉTODO..... | 41 |
| 1 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES:..... | 42 |

| | | |
|-----|--|----|
| 2 | DISEÑO DEL ESTUDIO:..... | 43 |
| 2.1 | Modelo: | 43 |
| 2.2 | Programación y aleatorización: | 44 |
| 3 | OBTENCIÓN DE LA MATRIZ PROTEICA TRIDIMENSIONAL:..... | 45 |
| 4 | OBTENCIÓN DE MATRIZ CON CÉLULAS PROCEDENTES DE MÉDULA ÓSEA: | 46 |
| 5 | PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:..... | 47 |
| 5.1 | Entorno:..... | 47 |
| 5.2 | Anestesia:..... | 47 |
| 5.3 | Profilaxis antibiótica:..... | 48 |
| 5.4 | Intervención:..... | 48 |
| | Grupo control: | 49 |
| | Grupos “matriz” y “matriz + mo”: | 50 |
| 5.5 | Postoperatorio:..... | 52 |
| 5.6 | Eutanasia de los animales:..... | 52 |
| 6 | ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR LA IMAGEN. ESTUDIO RADIOGRÁFICO:..... | 52 |
| 6.1 | Material: | 52 |
| 6.2 | Metodología:..... | 53 |
| 7 | ESTUDIO DE CUANTIFICACIÓN SOBRE IMÁGENES RADIOGRÁFICAS: 53 | |
| 7.1 | Material: | 53 |
| 7.2 | Metodología:..... | 54 |
| 7.3 | Variables de cuantificación radiológica estudiadas: | 55 |
| | 7.3.1 Porcentaje de regeneración ósea: | 55 |
| | 7.3.2 Densidad en el defecto: | 55 |
| 8 | TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS: | 56 |
| 8.1 | Material: | 56 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8.2 | Metodología:..... | 56 |
| 8.2.1 | Estudio estadístico del tipo de regeneración en el defecto:..... | 56 |
| 8.2.2 | Estudio descriptivo:..... | 56 |
| 8.2.3 | Análisis de regresión: | 56 |
| 8.2.4 | Análisis comparativo intergrupo:..... | 57 |
| 8.2.5 | Análisis comparativo de diferentes momentos temporales en un mismo grupo: | 57 |
| 8.2.6 | Análisis comparativo entre los distintos grupos y los diferentes momentos temporales:..... | 58 |
| 9 | ESTUDIO HISTOLÓGICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA: | 59 |
| 9.1 | Obtención de las muestras óseas: | 59 |
| 9.2 | Procesamiento de muestras óseas descalcificadas: | 59 |
| 9.3 | Procesamiento de muestras óseas no descalcificadas: | 60 |
| 9.4 | Tinciones óseas: | 61 |
| | Hematoxilina-eosina:..... | 61 |
| | Tinción Von Kossa: | 62 |
| | RESULTADOS | 64 |
| 1 | ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR LA IMAGEN: 65 | |
| | Estudio radiográfico: | 65 |
| | No regeneración:..... | 65 |
| | Regeneración parcial: | 65 |
| | Regeneración ósea completa:..... | 66 |
| 2 | ESTUDIO ESTADÍSTICO DEL TIPO DE REGENERACIÓN EN EL DEFECTO: | 68 |
| 2.1 | Comparación entre “tipo de regeneración” y “tipo de relleno del defecto”:..... | 68 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.2 | Análisis de las diferencias entre el tipo de regeneración y el relleno empleado en el defecto:..... | 69 |
| | Comparación grupos “MATRIZ” – “MATRIZ + MO”:..... | 69 |
| | Comparación grupos “CONTROL”-“MATRIZ”: | 69 |
| | Comparación grupos “CONTROL”-“MATRIZ + MO”: | 69 |
| 3 | ESTUDIOS DE CUANTIFICACIÓN:..... | 71 |
| 3.1 | Porcentaje de regeneración ósea:..... | 71 |
| 3.1.1 | Estudio descriptivo e inferencial: | 71 |
| 3.1.2 | Análisis de regresión: | 72 |
| 3.1.3 | Comparación entre los tres grupos de estudio en tiempos de seguimiento iguales:..... | 73 |
| 3.1.4 | Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes en cada uno de los grupos:..... | 76 |
| 3.1.5 | Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes y los diferentes grupos:..... | 81 |
| 3.1.6 | Resumen de los resultados de evolución temporal del porcentaje de regeneración ósea:..... | 82 |
| 3.2 | Densidad en el defecto:..... | 84 |
| 3.2.1 | Estudio descriptivo e inferencial: | 84 |
| 3.2.2 | Análisis de regresión: | 85 |
| 3.2.3 | Comparación entre los tres grupos de estudio en tiempos de seguimiento iguales:..... | 87 |
| 3.2.4 | Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes en cada uno de los grupos:..... | 90 |
| 3.2.5 | Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes y los diferentes grupos:..... | 94 |
| 3.2.6 | Resumen de los resultados de evolución temporal de la densidad ósea en el defecto:..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| 4 ESTUDIO HISTOLÓGICO MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA:..... | 98 |
| 4.1 Grupo “control”: | 98 |
| 4.2 Grupos experimentales (“matriz” y “matriz + MO”):..... | 99 |
| 4.2.1 Hueso regenerado:..... | 99 |
| 4.2.2 Unión entre hueso regenerado y “matriz”: | 103 |
| DISCUSIÓN | 107 |
| 1 DISCUSIÓN GENERAL: | 108 |
| 2 DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO CON TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR LA IMAGEN: | 116 |
| 3 DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO CON TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN:..... | 117 |
| 4 DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO: | 123 |
| 5 LÍMITACIONES DEL ESTUDIO: | 125 |
| 6 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:..... | 126 |
| CONCLUSIONES | 127 |
| BIBLIOGRAFÍA | 129 |

INTRODUCCIÓN

1 EL TEJIDO ÓSEO:

El hueso constituye un órgano y como tal se compone de varios tejidos (vasos sanguíneos, linfáticos, nervios, tejido adiposo, conjuntivo y óseo).

Posee tres funciones principales: actúa como soporte mecánico y del aparato locomotor (Rodan GA, 1992; Sommerfeldt DW et al., 2001), proporciona protección a los órganos internos y hogar a las células de la médula ósea (Rodan GA, 1992; Sommerfeldt DW et al., 2001) y presenta actividad metabólica como regulador de la homeostasis del calcio.

El tejido óseo es un componente del hueso que tiene sus propias células y matriz ósea, además posee un componente inorgánico cristalino.

1.1 Tipos de tejido óseo:

Desde el punto de vista MICROSCÓPICO existen dos tipos de tejido óseo:

Hueso fibrilar:

También llamado hueso primitivo o “woven bone”. Está presente en el embrión y en el recién nacido, en el callo de fractura, en la zona metafisaria del hueso en crecimiento y en algunos procesos tumorales. En su matriz las fibras de colágeno no se orientan uniformemente y sus diámetros son variables. Posee gran número de células también organizadas anárquicamente. Es la respuesta del organismo a la necesidad de formar hueso rápidamente. Se comporta mecánicamente como isotrópico, es decir, responde del mismo modo independientemente de la dirección de la fuerza aplicada (Einhorn TA et al., 2009).

Hueso laminar:

Denominado también hueso maduro es producto de la remodelación existente. Presenta una organización paralela y definida de las fibras de colágeno, células más dispersas y de tamaño constante. Es anisotrópico, opone mayor resistencia cuando la dirección de la fuerza es paralela al eje longitudinal de sus fibras (Einhorn TA et al., 2009).

Desde el punto de vista MACROSCÓPICO existen otros dos tipos:

Hueso esponjoso:

Es aquel constituido por trabéculas óseas interconectadas. Representa el 20% de la masa ósea y se encuentra en la metáfisis y epífisis de huesos largos así como en los huesos cortos, planos e irregulares (Clarke B, 2008; Einhorn TA et al., 2009).

Hueso compacto o cortical:

Está compuesto por tejido macizo. Representa el 80% de la masa ósea y forma el envoltorio de los huesos cortos, planos e irregulares. Se encuentra también en la diáfisis de los huesos largos. Este hueso cortical se organiza en el llamado sistema haversiano cuya unidad básica es la osteona (Clarke B, 2008; Einhorn TA et al., 2009).

1.2 Componentes del tejido óseo:

La matriz orgánica:

Fue Virchow en 1853 el primero en describir la matriz orgánica o sustancia osteoide, que supone un 22-25% de la matriz ósea. Está constituida principalmente por proteínas, de las cuales la más abundante es el colágeno (90%).

Colágeno:

En un 90% se trata de colágeno tipo I, existiendo pequeñas proporciones de fibras de colágeno III y V, probablemente procedentes de los vasos sanguíneos que vascularizan el hueso (Gehron R et al., 1993). En el colágeno se hallan los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo este último un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno.

La disposición de las fibras colágenas es la que determina que el tejido óseo sea maduro (o laminar) en el que las fibras se disponen de manera ordenada, en láminas paralelas y orientadas en una dirección preferente y permitiendo la mayor densidad de colágeno por unidad de volumen de tejido, o fibrilar

(también llamado primitivo) en el que la disposición de las fibras es desordenada con menor densidad mineral).

Proteínas no colágenas:

-Osteocalcina (Proteína Gla ósea/BPG): es la proteína no colágena más abundante en el tejido óseo (representa del 10 al 20% de las proteínas no colágenas del hueso). Es producida por los osteoblastos y atrae a los osteoclastos. Mientras la función "in vivo" de la osteocalcina es desconocida su afinidad por los constituyentes minerales del hueso le atribuyen un papel en la formación de éste. Se puede medir en sangre y sus niveles reflejan la actividad metabólica ósea ("turn over").

-Osteopontina (OPN): es una fosfoproteína ácida normalmente encontrada en tejidos mineralizados como los huesos y los dientes, y está implicada en la regulación de la mineralización mediante su acción inhibitoria del crecimiento de los cristales de apatita, así como promoviendo la función osteoclástica a través de la $\alpha\beta 3$ integrina (Giachelli CM et al., 2005). Aunque la OPN no se encuentra en las arterias normales, se ha documentado la presencia abundante de la misma en los lugares de calcificación en placas ateroscleróticas humanas y en válvulas aórticas calcificadas, donde es sintetizada en niveles elevados por los macrófagos (Fitzpatrick LA et al., 1994; Giachelli CM et al., 1993; O'Brien KD et al., 1995). Estos hallazgos sugieren que la OPN puede ser un regulador importante del depósito mineral arterial bajo condiciones de agresión y enfermedad (Giachelli CM et al., 2005).

-Osteonectina: se trata de una proteína fosforilada de la matriz extracelular del hueso. Ha mostrado tener una alta afinidad por el colágeno, el calcio y la hidroxiapatita, sugiriendo que podría funcionar en el hueso uniendo la fase mineral con la matriz de colágeno (Termine JD et al., 1981). Se ha demostrado la expresión de osteonectina, junto con sialoproteína ósea y osteopontina en lesiones de arteriopatía urémica calcificante (calcifilaxis) (Ahmed S et al., 2001).

-Osteoprotegerina (OPG): se trata de un miembro de la superfamilia de los receptores de factor de necrosis tumoral (Watson KE et al., 1994). Supone un

nexo de unión más entre los metabolismos óseo y vascular. En el esqueleto, la OPG es un inhibidor indirecto de la osteoclastogénesis. Funciona como un receptor soluble que se une e inhibe al ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL). La activación del RANKL es esencial para la maduración de los progenitores osteoclasticos (Canfield AE et al., 1996). La OPG es expresada en cultivo de células musculares lisas de arterias coronarias (Tintut Y et al., 1998). Tanto OPG como RANKL se encuentran en arterias normales (Rosenfeld ME et al., 2000). En modelos de rata el tratamiento con OPG previene la calcificación vascular inducida por warfarina (Wada T et al., 1999). Ratones transgénicos con carencia de osteoclastos funcionales, producen un hueso inadecuadamente trabecularizado (osteopetrótico) (Watson KE et al., 1994). En contraste, ratones con carencia de OPG producen osteoporosis con múltiples fracturas. Curiosamente, estos ratones, también tienen calcificación vascular en algunas arterias (Jono S et al., 1997). Recientemente se ha mostrado asociación entre los niveles de OPG y la enfermedad coronaria arterial en humanos. En pacientes con angina estable, los niveles de OPG se han asociado con un estrechamiento significativo arterial coronario (Mohler ER et al., 1999).

-Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): la cascada de las BMPs es crítica para la correcta formación del hueso. Las BMPs son miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes β (TGF- β), controlan los aspectos fundamentales del modelado de las extremidades y están implicados en la diferenciación y proliferación de los condrocitos y osteoblastos (Urist MR, 1965). La BMP-2 es crítica para el desarrollo cardiovascular, tal como se ha evidenciado por el fallo vascular temprano en ratones deficientes en BMP-2 (Zhang H et al., 1996). En adultos, sin embargo, la expresión aumenta en las lesiones ateroscleróticas (Dhore CR et al., 2003) donde podría contribuir a la calcificación vascular. Se ha visto que las BMP-2 y BMP-4 son también expresadas en regiones calcificadas de arterias ateroscleróticas (Willette RN et al., 1999). Por esta razón se ha sugerido que las señales de las BMPs son un componente importante del mecanismo de la calcificación arterial.

-Factor alfa-1 de unión al núcleo (Cbfa 1): también llamado factor de transcripción 2 relacionado con el enanismo, factor 2 estimulante de osteoclastos y factor de la leucemia mieloblástica aguda 3. Es uno de los factores de transcripción que regulan la diferenciación osteoblástica y la formación ósea (Ducy P et al., 1997). Parece tener una doble función, por una parte es esencial para el desarrollo osteoblástico a partir de células precursoras mesenquimales y por otra estimula la diferenciación condrocítica hipertrófica y terminal. El Cbfa1 es expresado de forma temprana en el desarrollo de células que tienen el potencial de diferenciarse tanto en osteoblastos como en condrocitos y precede la aparición del hueso. Las señales de las BMPs y Cbfa1 interactúan por vías complejas que no son totalmente comprendidas (Wang W et al., 2003). El Cbfa-1 se sintetiza en regiones sin proteína Gla de matriz, se asocia con áreas calcificadas y puede ser considerado un marcador para las células osteoprogenitoras en la pared vascular (Engelse MA et al., 2001).

-Proteína Gla de la matriz (MGP): es una proteína expresada de forma predominante por las células musculares lisas vasculares y por los condrocitos. Se trata de una proteína inhibidora de la mineralización de la matriz extracelular en el hueso y en el diente. Se expresa por los condrocitos y por las células musculares lisas vasculares, pero no por los osteoblastos. Los ratones transgénicos con deficiencia de MGP mueren al mes o tres meses de edad debido a la calcificación de las fibras elásticas y a la rotura de las arterias de gran calibre como la aorta (El Maadawy S et al., 2003). Se ha demostrado que tiene una regulación local y que para cumplir su función necesita la presencia de los residuos de ácido glutámico Gla (Murshed M et al., 2004). Recientemente se ha evidenciado que la MGP inhibe la diferenciación de célula mesenquimal hacia la estirpe osteogénica secuestrando el potente factor de diferenciación osteogénica y condrogénica BMP-2, previniendo por tanto su interacción con los receptores (Hirschi K et al., 2001). En las lesiones ateroscleróticas la MGP es expresada por las células endoteliales y por las células musculares lisas que forman cápsulas fibrosas, pero nunca está presente en los macrófagos (Engelse MA et al., 2001).

-Leptina: la hormona leptina es un regulador del remodelado óseo manteniendo constante la masa ósea. Actúa a través del sistema nervioso simpático sobre la

proliferación osteoblástica (Fu L et al., 2005). Los niveles elevados de leptina han sido correlacionados con enfermedad cardiovascular, obesidad, envejecimiento, infección y lipopolisacárido bacteriano y dietas ricas en grasas. Todas estas condiciones se han relacionado también con el aumento de la calcificación vascular (Parhami F et al., 2001). Existe una población de células de la capa media de la pared arterial a la que se le ha atribuido un papel en la calcificación arterial y a las que se ha denominado células vasculares calcificantes. Cuando se tratan con leptina experimentan un incremento significativo de cinco a diez veces la actividad fosfatasa alcalina, lo cual apoya la idea de un efecto de diferenciación pro-osteogénica de la leptina. Además se ha demostrado la presencia del receptor de la leptina en las células vasculares calcificantes (Parhami F et al., 2001).

-Msx2: es un factor de transcripción inducible por BMP-2 que controla la mineralización craneofacial (Satokata I et al., 2000). Aunque promueve el desarrollo temprano de los osteoblastos, el Msx2 inhibe la diferenciación terminal de los mismos (Shao JS et al., 2005). El Msx2 programa la diferenciación osteogénica de los miofibroblastos vasculares (Cheng SL et al., 2003).

-Sialoproteína ósea (BSP): parece desempeñar un papel en la formación ósea, siendo particularmente abundante en las interfases hueso-cartílago. La proteína es fabricada más selectivamente por los osteoblastos, pero puede ser detectada en los condrocitos hipertróficos (Shen Z et al., 1995). Por otra parte, se ha visto que la calcificación medial en pacientes con enfermedad renal terminal se localiza junto con la expresión de osteopontina, sialoproteína ósea, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I en la capa media.

-Otros: se han identificado otra serie de factores en la regulación de la calcificación vascular, incluyendo el factor de crecimiento transformante (TGF- β), la fetuina-A, el polipéptido relacionado con la hormona paratiroidea, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), el receptor tirosina kinasa Axl, los lípidos oxidados y las alteraciones en el metabolismo del calcio y el fosfato disrregulados (Abedin M et al., 2004; Collin-Osdoby P, 2004).

Cuando el componente orgánico está sin mineralizar se denomina osteoide y se caracteriza por un mayor contenido de proteínas no colágenas y agua que la matriz orgánica mineralizada.

La matriz inorgánica:

Supone un 70% del peso del hueso.

Composición:

El 95% es fosfato tricálcico dispuesto en cristales análogos a los de hidroxiapatita, otro pequeño porcentaje es de fosfato de osteocalcio (brushita). Con la edad disminuye la concentración de fosfato y aumenta su cristalinidad. Las moléculas de fosfato cálcico se localizan entre las moléculas de colágeno en estructura bifásica cuyas propiedades son superiores a la suma de las dos por separado. Este componente es el principal responsable de la resistencia a las fuerzas de compresión.

El proceso de mineralización:

La mineralización ósea no es un proceso totalmente comprendido, se piensa que es modulado por los osteocitos y ocurre a los 10-15 días después de la secreción de la matriz orgánica. Se han identificado varias proteínas que participan en el proceso de mineralización ósea (Kennedy et al., 2012; Pereira et al., 2009).

-DMP 1 (“dentin matrix acidic phosphoprotein 1”): esta proteína es crítica para la adecuada mineralización del hueso y la dentina, está presente en diversos tejidos óseos y dentarios. En los osteoblastos indiferenciados es una proteína nuclear que regula la expresión de genes específicos. Durante la maduración de éstos se vuelve fosforilada y se exporta a la matriz extracelular, donde orquesta la formación de matriz mineralizada. Las mutaciones en el gen de esta proteína provocan la hipofosfatemia autosómica recesiva, enfermedad que se manifiesta como raquitismo y osteomalacia (Kashima TG et al., 2013).

-PHEX (“phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked”): se piensa que esta proteína interviene en la mineralización ósea y de la dentina y en la

reabsorción renal de fosfatos. Las mutaciones en sus genes causan el raquitismo hiposfosfatémico ligado al cromosoma X (Durmaz E et al., 2013).

-MEPE (“matrix extracellular phosphoglycoprotein”): se trata de una fosfoproteína ligadora de calcio que pertenece a la familia de las glicoproteínas N ligandos. Miembros de esta familia son componentes de la matriz celular ósea y de la dentina y regulan la mineralización ósea. La deficiencia de una proteína similar en ratones causa un aumento en la masa ósea. Los ratones que carecen del gen que codifica esta proteína son resistentes a la pérdida de trabécula ósea asociada con la edad (Reijnders CM et al., 2013).

-PGF-23 (“fibroblast Growth factor 23”): esta proteína es secretada por los osteocitos, se libera a nivel sistémico y controla la homeostasis del fósforo con el objetivo de determinar la cantidad de fósforo que se deposita en la matriz osteoide. Además, se ha encontrado asociación entre los niveles de esta molécula y alteraciones cardiovasculares, calcificación vascular y mayor riesgo de enfermedades de este origen. En la actualidad, estas moléculas son dianas terapéuticas para el tratamiento de la osteoporosis fundamentalmente en pacientes con insuficiencia renal (Pereira et al., 2009; Shaffer et al., 2012).

El componente celular:

Línea osteoformadora:

La formación ósea es una secuencia de eventos que comienza con la estimulación de las células mesenquimales para diferenciarse en osteoblastos maduros y eventualmente, osteocitos. Las células troncales mesenquimales tienen capacidad de diferenciación a diferentes estirpes celulares: tejido óseo, cartilaginoso, adiposo y muscular (Luu H, 2011).

La diferenciación hacia cada uno de los tejidos dependerá del estímulo que reciba la célula troncal mesenquimal (Arthur A et al., 2009; Janicki P et al., 2011). Existen muchos factores de crecimiento, factores de transcripción y hormonas sexuales que intervienen en el proceso de diferenciación. Entre estos factores destaca por su aplicación clínica la proteína morfogenética ósea (BMP). Esta proteína es un factor osteoinductivo que promueve la diferenciación osteoblástica y la formación ósea. Aunque no todos los subtipos

de BMP son osteogénicos al menos 20 han sido identificados. Los más importantes por su aplicación clínica son la BMP- 2 y la BMP-7 (Friedlaender JE et al., 2001; Lane JM, 2005). También el factor de transcripción RUNX2 es determinante en la diferenciación de las células hacia la línea de precursores óseos (pro-osteoblastos, fundamentalmente) (Brinker MR et al., 2008).

Con los estímulos oportunos las células troncales mesenquimales se diferencian a progenitores osteoblásticos (pro-osteoblastos, osteoblastos y osteocitos) que se encuentran fundamentalmente en el endostio y en la capa celular (cambium) del periostio (situada debajo de la capa fibrosa del mismo). Las células endoteliales y pericitos vasculares parecen tener también capacidad de diferenciarse en osteoformadoras.

-Osteoblastos: se localizan en la superficie ósea. Se definen porque producen colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, osteocalcina y tienen receptores para PTH. También tienen receptores para la 1,25 vitamina D, glucocorticoides, prostaglandinas y estrógenos. Las funciones de los osteoblastos son sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea (para ello poseen muchas mitocondrias, abundante retículo endoplásmico y aparato de Golgi), regular la mineralización del tejido óseo (para ello controlan el flujo electrolítico entre el espacio extracelular y el hueso) e iniciar el proceso de reabsorción mediante la secreción de proteasas neutras.

-Osteocitos: son células que residen en el seno de la matriz ósea y constituyen el 90-95% del componente celular del tejido óseo. Los osteocitos son osteoblastos maduros que han quedado atrapados en la matriz mineralizada que han elaborado. Morfológicamente se caracterizan por presentar unas organelas intracelulares poco desarrolladas y unas prolongaciones citoplasmáticas de gran tamaño que se extienden radialmente en las osteonas hasta los canalículos, favoreciendo la comunicación con otros osteocitos y con los osteoblastos de superficie. Sus funciones son el mantenimiento de la homeostasis mineral (Ca y P extracelulares) y actuar como “sensores” de fracturas (si se rompen las uniones entre ellos comienza el proceso reparativo).

Línea destructora de hueso:

-Osteoclastos: de estirpe celular monocítico-macrofágica. El pro-osteoclasto es su escalón intermedio. Su abundancia de vesículas y mitocondrias le da su importante actividad enzimática. Es una célula multinucleada. Se localizan en los espacios de superficie ósea trabecular (lagunas de Howship) y en la cabeza de los conos perforantes corticales. Tienen un borde rugoso cuya superficie aumenta el área de intercambio (reabsorción) con el hueso. Contienen fosfatasa ácida tartato-resistente. Tienen como función reabsorber hueso. Se fijan a la superficie ósea mediante proteínas (integrinas) que “sellan” una zona donde desciende localmente el pH, se disuelve el componente mineral de la matriz y se liberan proteasas ácidas que degradan el componente colágeno. No tienen receptores para la PTH, 1,25 vitamina D, PG (prostaglandinas) ni TNF por lo que su activación se consigue con la activación previa de los osteoblastos. Cuando los osteoblastos se activan expresan en la membrana la proteína RANK-L (RANK ligando) que se une al RANK (receptor activador del factor nuclear kappa) del pro-osteoclasto y hace que éste se active. Tienen receptores para la calcitonina (inhibe su actividad) y son inhibidos por los bifosfonatos (inhiben la formación del borde rugoso). La Interleucina 1 es un potente estimulador de los mismos. Existe un receptor, osteoprotegerina (OPG, familia del TNF) que se une al RANK-L inhibiendo así la diferenciación y activación del osteoclasto.

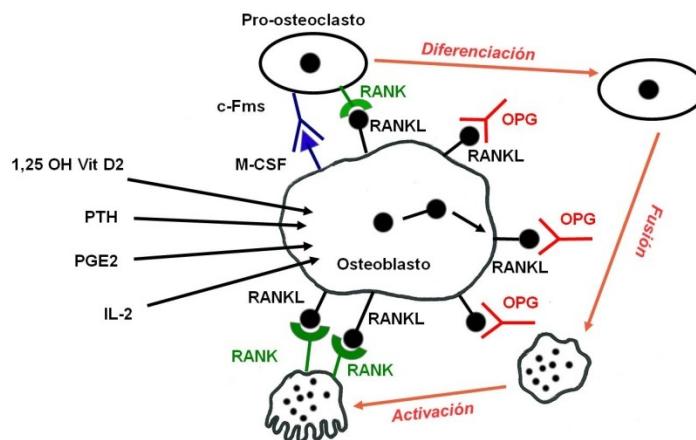


Figura 1: Esquema de la activación del osteoclasto.

-Mastocitos: se encuentran en una proporción baja. Sintetizan y secretan histamina y heparina, así como un amplio espectro de enzimas degradadoras de la matriz extracelular, factores de crecimiento, citoquinas y factores proangiogénicos (Gannon FH et al., 2001). Muchas de estas moléculas también influyen en el reclutamiento, la diferenciación y la actividad de los osteoclastos, fenómenos que apuntan a la participación de los mastocitos en el recambio óseo.

1.3 Osteogénesis:

Durante el proceso embrionario existen dos tipos de formación ósea que se reflejan en los dos tipos de consolidación de las fracturas que se producen durante la edad adulta.

-La osificación endocondral conlleva la diferenciación de las células troncales mesenquimales a un intermediario cartilaginoso hialino que posteriormente va desapareciendo permitiendo así la proliferación de yemas vasculares y la migración de promotores celulares óseos. Por este proceso se realiza la embriogénesis de los huesos largos, el crecimiento longitudinal del hueso y la consolidación de fracturas.

-En la osificación intramembranosa se produce un centro de osificación dentro de la matriz extracelular a partir de la diferenciación de las células madre mesenquimales en células osteoprogenitoras (osteoblastos) que irán produciendo directamente la matriz ósea y el crecimiento (Buch DW et al., 2012; Dimitriou R et al., 2005; Sommerfeldt DW et al., 2001). Por este proceso tiene lugar la embriogénesis de los huesos planos y es el proceso predominante en los sistemas de distracción y en la osteogénesis.

2 TRATAMIENTO DE LOS DEFECTOS

ÓSEOS:

La reparación de grandes defectos causados por traumatismos, cirugía tumoral, cirugía ortopédica, infecciones o malformaciones continúa siendo hoy en día un desafío para los cirujanos reconstructivos.

Para las pérdidas óseas pequeñas (menos de tres centímetros) se recomienda la utilización de injerto óseo autólogo libre. Pero cuando el defecto óseo es mayor el problema es más complejo y se han descrito varios procedimientos (osteodistracción, técnica de la membrana inducida, regeneración ósea guiada, utilización de sustitutos óseos, etc...).

El nuevo conocimiento sobre los procesos básicos celulares y moleculares que gobiernan la reparación tisular ha surgido de campos como la Biología Celular, la Biología Molecular y la Genética Molecular. Los avances puestos en marcha en estos campos, tales como los nuevos biomateriales o las investigaciones sobre células troncales han abierto nuevos caminos para acometer problemas aún no resueltos en Ortopedia.

2.1 Propiedades de los injertos y sustitutos óseos:

Osteogenicidad:

Es la capacidad de formación ósea sin indicación del origen celular. Cuando se forma hueso sobre el injerto o a su alrededor éste puede tener su origen en el propio injerto (células que sobreviven al tratamiento del injerto) o en células del huésped. Se ha demostrado que con un adecuado manejo pueden sobrevivir células de la superficie de los injertos corticales y esponjosos, siendo estas células clave para la formación de callo óseo entre las primeras cuatro a ocho semanas tras la implantación. Lógicamente el hueso esponjoso, gracias a su mayor superficie, tiene mayor potencial de formar hueso nuevo que el hueso cortical. Como ejemplos de tejidos con esta propiedad serían el injerto autólogo de médula ósea y el injerto autólogo procedente de cresta ilíaca.

Osteoinducción:

Es la capacidad del material implantado para promover la transformación fenotípica de células progenitoras en osteoblastos. La osteoinducción está mediada por factores provenientes del injerto y es escasa en los injertos mineralizados, cuya máxima capacidad osteoinductora proviene de las células vivas que portan. La matriz ósea contiene diversas proteínas morfogenéticas: factor transformante-beta, factores similares a la insulina I y II, factores de crecimiento fibroblástico ácido y básico, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, interleucinas, factores estimuladores de las colonias de granulocitos y de granulocitos-macrófagos... etc, los cuales inducen la diferenciación de las células mesenquimales en células formadoras de hueso (Allori AC et al., 2008).

Un buen estado del lecho sobre el que asienta el tejido osteoinductor es clave para su éxito ya que éste depende del reclutamiento de células del huésped. Por ejemplo, en un lecho excesivamente fibrosado o previamente irradiado la formación de hueso alrededor del injerto dependerá casi exclusivamente de la capacidad osteogénica del mismo y no de su capacidad osteoinductora.

Sin embargo la osteoinducción no es una propiedad exclusiva de la matriz ósea y sus proteínas, puesto que recientemente ha sido descrita para los aloinjertos óseos esterilizados y para diversos materiales como el titanio.

Osteoconducción:

Es la capacidad de una matriz de actuar como andamio para el crecimiento óseo desde los márgenes del defecto, aprovechando los canales de la matriz implantada. La osteoconducción puede ocurrir por una neoformación ósea activa por osteoinducción o puede suceder pasivamente sin la participación del propio injerto, como sucede en la mayoría de los aloinjertos corticales. La osteoconducción no es un proceso aleatorio y sigue un patrón especial ordenado y predecible determinado por la estructura del injerto, el aporte vascular desde los tejidos colindantes, el ambiente mecánico y la presencia de otros biomateriales (Abukawa H et al., 2006).

Las relaciones entre estas propiedades se esquematizan en la figura 2. En todos los casos es necesaria una cierta estabilidad mecánica y un aporte vascular adecuado.

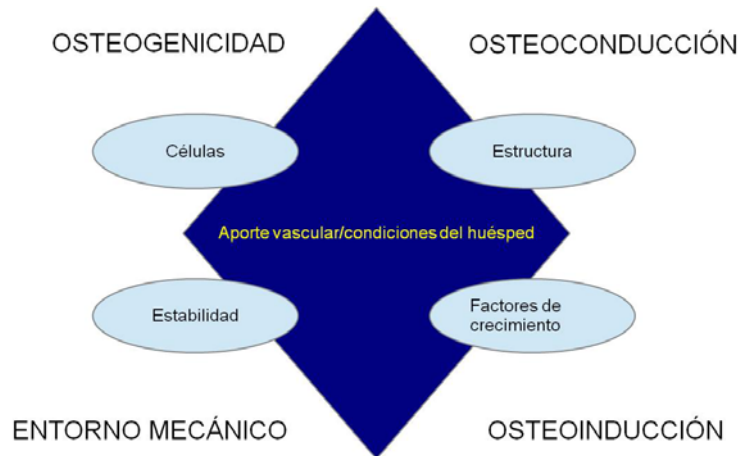


Figura 2: esquema de las propiedades necesarias para la consolidación ósea.

2.2 Clasificación de los injertos óseos:

Los diferentes injertos óseos se pueden clasificar según diferentes criterios:

Composición tisular:

Según su composición tisular los injertos óseos se agrupan en injertos corticales (utilizados para rellenar defectos segmentarios) y esponjosos (usados para rellenar defectos cavitarios).

Características anatómicas:

Según el origen del injerto (tibia, cabeza femoral...), según su talla o su forma.

Aporte sanguíneo:

Se dividen en injertos vascularizados (preservan vasos sanguíneos originales o suturados a arteria local), que son técnicamente más difíciles de realizar pero se incorporan mejor y los injertos no vascularizados o libres, aquellos que no tienen un aporte vascular.

Método de conservación:

A la hora de procesar y manipular los injertos éstos se pueden presentar en fresco (presentan mayor antigenicidad, tienen células viables y se incorporan mejor debido a que conservan propiedades osteogénicas), congelados (tienen menor antigenicidad pero aún conservan factores de crecimiento y su capacidad osteoinductora) o liofilizados (procesado mediante congelado en seco, el injerto es menos antigénico pero también tiene menor capacidad osteoconductora ya que no conserva los factores de crecimiento).

Manipulaciones adicionales:

A los injertos óseos se les pueden aplicar diversas técnicas y manipulaciones adicionales, tales como desmineralización, irradiación, etc...

Según la disparidad genética entre el donante y el receptor:

Los injertos se clasifican en autoinjerto u homoinjerto (el injerto se obtiene el mismo individuo al que es aplicado), isoinjerto (el injerto se obtiene de gemelos monozigóticos; es raro), aloinjerto (en esta ocasión el donante es de un miembro distinto de la misma especie) y xenoinjerto (el donante pertenece a otra especie).

Lugar de implantación:

En función del lugar de implantación del injerto éstos se dividen en ortotópicos (en caso de que el injerto se implante en la misma región anatómica que la del origen; por ejemplo si se utiliza una tibia de cadáver sustituyendo a una tibia) o heterotópico (si el injerto pasa a ocupar un lugar distinto del de su origen; por ejemplo, injerto de cresta ilíaca para rellenar un defecto en tibia).

2.3 Opciones de tratamiento de los defectos

óseos:

Cuando abordamos el tratamiento de defectos óseos grandes (acordado por la literatura defectos mayores de tres centímetros) nos encontramos con un problema aún no del todo resuelto para el que se han descrito varios procedimientos:

Autoinjerto:

El injerto autólogo de hueso esponjoso es el patrón oro. Es osteoinductor (tiene factores de crecimiento), osteoconductor (funciona como un almacén de hidroxapatita y colágeno) y es osteogénico (aporta células mesenquimales y osteoblastos). No desencadenan reacción irritativa, ni transmiten enfermedades. Como inconvenientes están la morbilidad asociada a su obtención en la zona donante y la escasa o al menos limitada cantidad disponible. La zona donante más empleada es la cresta ilíaca, que tiene la capacidad de facilitar injerto cortical o esponjoso abundante. Se han descrito complicaciones en hasta un 25-40% de pacientes, entre ellos la formación de hematomas, lesión nerviosa, trastornos estéticos y dolor crónico en la zona donante. Otras regiones donantes son las costillas, peroné, metáfisis tibial, metáfisis radial...

Los tipos de autoinjertos según la COMPOSICIÓN ÓSEA son:

-Injerto cortical: tiene menos células (5%) pero más soporte estructural. Se incorpora mediante un remodelado haversiano ("creeping substitution") que va debilitando el injerto seguido de depósito de hueso nuevo.

-Injerto esponjoso: da menos soporte estructural pero son mayores sus propiedades de osteogénesis y osteoinducción. Se revascularizan más rápidamente. Los osteoblastos van depositando hueso nuevo sobre trabéculas antiguas. Éstas posteriormente se remodelan.

Y según su VASCULARIZACIÓN:

-Autoinjerto no vascularizado: también llamado libre. Puede ser de esponjosa o de cortical. Al tratarse de un injerto sin vascularización se necrosa y tiende a reabsorberse (sobre todo en grandes defectos) (Marsh JL et al., 1994). Se integra de forma lenta.

-Autoinjerto vascularizado: pueden ser simples (hueso + vasos) o compuestos (igual + partes blandas). Se trasplanta un hueso con su vascularización. El hueso más comúnmente empleado es el trasplante de peroné vascularizado que ha probado ser una técnica efectiva ya que no tiene que existir sustitución celular progresiva sino que se integra consolidando en sus extremos como una fractura. Los problemas que presenta esta técnica es que requiere al menos dos equipos quirúrgicos trabajando simultáneamente, uno en el sitio donante y otro en el área receptora y de un cirujano con experiencia en cirugía vascular (para realizar las anastomosis microvasculares). Además la cirugía dura, como promedio de ocho a 12 horas en manos expertas.

Aspirado de médula ósea:

Varias investigaciones han confirmado la capacidad osteogénica de las células madre que residen en la médula ósea (Beresford JN, 1989; Burwell RG, 1964; Burwell RG, 1985). Incluso se ha demostrado una correlación positiva entre la capacidad osteogénica y la concentración celular de médula ósea (Conolly FJ et al., 1989). Esto ha conducido al uso de preparados de médula ósea expandida para el tratamiento de retardos de consolidación y pseudoartrosis (Conolly FJ et al., 1991; Healey JH et al., 1990). Como origen de los aspirados de la médula ósea se utilizan la cresta ilíaca, los cuerpos vertebrales o el sacro. Dichos aspirados se obtienen habitualmente mediante punción con trocar, aunque recientemente se han incorporado otros sistemas como el RIA ("reaming–irrigation–aspiration") que permite la obtención de grandes cantidades de aspirado de la médula ósea desde el canal medular femoral. El número de células que se obtienen de los aspirados dependen de variables como la edad del paciente.

Aloinjerto o injerto heterólogo:

Es aquel injerto obtenido de miembros distintos de una misma especie. Presenta como ventaja principal que la disponibilidad del mismo es ilimitada. Como inconvenientes podemos destacar varios: carece de células viables y por ello de capacidad osteogénica (a su vez menor potencial osteoinductor), se necesitan donantes para asegurar las reservas (bien donante vivo o cadáver y un banco de huesos), puede transmitir enfermedades (se estima una probabilidad de transmisión del VIH de uno por millón) e infecciones y debido a la discrepancia genética puede desencadenar respuesta inmune.

Los tipos de injerto heterólogo son esponjoso (presenta una incorporación similar al autoinjerto pero con mayor proceso inflamatorio; además la incorporación del mismo suele ser incompleta) y cortical (mantiene la capacidad osteoinductora presentando una sustitución más lenta e incompleta).

Transporte óseo:

Es una técnica basada en el principio de osteodistracción. Descrita por Ilizarov consiste en realizar una fractura en uno de los extremos óseos e ir llevando con la ayuda de un fijador con agujas transfixiantes este fragmento óseo hasta el extremo contrario, permitiendo la restauración de la longitud requerida (Alcántara-Martos T et al., 2010) así como la corrección de deformidades con un único equipo quirúrgico y unas dos horas de intervención. La principal complicación que presenta esta técnica es el riesgo de infección de los pines.

Técnica de membrana inducida:

El concepto de membrana inducida es una estrategia utilizada para la regeneración ósea particularmente en grandes pérdidas óseas (<25 cms). Este método desarrollado por Masquelet implica la realización de dos etapas; en primer lugar se induce la formación de una “membrana biológica” como reacción o respuesta a un cuerpo extraño (espaciador de cemento), creando una cámara o espacio en el que en una segunda etapa se coloca injerto óseo autólogo (Masquelet AC et al., 2010; Pelissier P et al., 2004; Viateau V et al., 2006). Se ha demostrado que dicha membrana inducida posee propiedades

osteoinductivas, osteogénicas y angiogénicas y varios estudios han demostrado resultados satisfactorios (Giannoudis PV et al., 2011; Masquelet AC et al., 2010; Viateau V et al., 2006). La idea de crear estas membranas surgió en los años 60 y los primeros materiales que se probaron fueron el teflón y el poliuretano, pero no tenían las propiedades alcanzadas con los utilizados actualmente (polimetilmetacrilato, PMMC). Las primeras publicaciones con el uso de estas membranas surgieron en el campo de la Cirugía Odontológica y Maxilofacial.

Técnica quirúrgica:

-Consiste en la interposición de una pieza de PMMC en el defecto una vez que se ha desbridado y limpiado a fondo. Este cemento se puede mezclar con los antibióticos compatibles que normalmente se usan y se deja unas seis semanas.

-Al retirar el material aparece una membrana que no queda adherida al material exógeno por lo que éste se desprende con mucha facilidad. Histopatológicamente la membrana es de unos dos milímetros de grosor y está formada por matriz de colágeno tipo I, miofibroblastos y fibroblastos (Viateau V et al., 2010) que corren paralelas a la superficie de la misma. Su aspecto es similar al de una membrana epitelial. Posee una alta concentración de factores de crecimiento endotelial vascular (FCVE) (Pelissier P et al., 2004), un factor angiogénico que ha demostrado el incremento de la vascularización de los tejidos alrededor, así como una multitud de factores de crecimiento osteogénicos.

-Todas estas características son las responsables de que cuando se coloca tejido óseo se mantiene el volumen, disminuye la posibilidad de reabsorción del mismo, la formación de tejido óseo ectópico y la formación de tejidos blandos dentro del hueco, limitado por la membrana.

Complicaciones:

A pesar de los buenos resultados obtenidos con esta técnica, se han detectado varias complicaciones asociadas a ella:

-La primera, persistencia de la infección en el caso de pérdidas óseas subsecuentes a infecciones. La causa más frecuente es el inadecuado desbridamiento previo a la implantación del espaciador (Sancineto CF et al., 2008).

-Fractura por estrés retardada (Apart T et al., 2010) que parece ocurrir antes de que se forme una corticalización adecuada del hueso formado “de novo”. Esto puede tardar incluso años después de la cirugía. Faltan estudios que investiguen estos eventos pero parece que este fenómeno aparece con más frecuencia cuando el método utilizado para la estabilización del defecto fue el fijador externo, siendo las posibilidades menores si lo que se utilizó fueron placas y tornillos o clavos intramedulares.

Regeneración tisular guiada (RTG):

El concepto de regeneración tisular guiada (RTG) consiste en la utilización de membranas bioabsorbibles o no reabsorbibles que actúan como barrera para prevenir la invasión de tejidos blandos en el defecto formando una “cámara” para “guiar” el proceso de reparación tisular. Este procedimiento desempeña un papel bien reconocido en la actualidad en cirugía nerviosa periférica (Dahlin L et al., 2001; Dahlin LB et al., 2001) y en cirugía del territorio cráneo – maxilo – facial, sobre todo en Odontología (Aguirre Zorzano et al., 1994; Aguirre Zorzano et al., 1999; Bunyaratavej et al., 2001; De Vicente JC et al., 2000; De Vicente JC et al., 2006; López-Arranz E, 1997; Santamaria J et al., 1998). A principios de la década de los 90 se empieza a utilizar el término “osteopromoción” para referirse a esta técnica de regeneración tisular en tejido óseo, fundamentalmente a partir de los estudios de Linde et al (Alberius et al., 1995; Dahlin C et al., 1991; Linde A et al., 1993; Linde A et al, 1995). En hueso largo, la cantidad de trabajos publicados es sustancialmente menor y los resultados son a menudo variables.

Regeneración ósea guiada en hueso largo:

A lo largo de la historia se han utilizado diferentes materiales o tejidos como membranas de regeneración ósea. Los principales tipos de membranas utilizados son los siguientes:

Membranas sintéticas:

-No bio-reabsorbibles: se han realizado estudios de regeneración ósea guiada empleando membranas de polietileno (Narang R et al., 1975), poliuretano (Farso NF et al., 1992) politetrafluoroetileno expandido (PTFE e) (Bluhm AE et al., 1995; Nyman R et al., 1995; Rodrigo JJ et al., 2001; Zellin G et al., 1997) así como silicona (Lu S et al., 1996; Zhang H et al., 1998 (a); Zhang H et al., 1998 (b); Zhang Y et al., 1999; Zhang Z et al., 1996) y etil-celulosa (Mosheiff R et al., 2003; Nasser NF et al., 2005).

-Bioabsorbibles: destaca el uso de homo y copolímeros del ácido poliláctico. (Gerber A et al., 2002; Giardino R et al., 1999; Giardino R et al., 2000; Giardiono R et al., 2002; Gogolewski S et al., 2000; Gugala Z et al., 1999; Gugala Z et al., 2002; Ip WY, 2002; Meninig RP, 2002; Pineda LM et al., 1996). Recientemente se ha descrito el uso de quitosan como membrana de regeneración ósea guiada (Nasser NJ et al., 2005).

Membranas biológicas:

Son pocos los estudios documentados en la literatura sobre el empleo de membranas biológicas en regeneración ósea guiada de hueso largo. Se ha ensayado el uso de submucosa de intestino delgado sin obtener buenos resultados (Moore DC et al., 2004). También se han usado membranas de aterocolágeno bovino sin que se consiguiese regeneración ósea total (Teixeira JO et al., 1998).

Nuestro grupo investigador comenzó a investigar una membrana biológica (arteria aorta) susceptible de experimentar calcificación en su pared, demostrando que los aloinjertos aórticos criopreservados eran válidos para guiar el proceso de regeneración ósea (MA Suárez-Suárez et al., 2005; Suárez-Suárez MA, 2003).

Aunque en la actualidad varias membranas “barrera” se están utilizando en la práctica clínica, se están desarrollando nuevos tipos en un esfuerzo para superar las limitaciones actuales de las utilizadas. Estos nuevos materiales incluyen las membranas de alginatos, nuevos copolímeros degradables, membranas híbridas o nanomembranas así como membranas amnióticas (Berner A et al., 2012; Chaturvedi R et al., 2008; Ereno C et al., 2010; He H et

al., 2007; Humber CC et al., 2010; Jiangi H et al., 2002; Kim JH et al., 2011; Kothiwale SV et al., 2009; Shabani I et al., 2011; Teng SH et al., 2008; Tokuda S et al., 2009; Ueyama Y et al., 2002; Ueyama Y et al., 2006; Wu CA et al., 2009; Zang J et al., 2010 (a) y(b)).

Las investigaciones puestas en marcha están evaluando estas membranas con el objetivo de establecer una “membrana ideal” para la regeneración ósea con características óptimas en términos de biocompatibilidad, efecto espaciador, integración tisular y manejabilidad para obtener la máxima eficacia y seguridad clínica.

Sustitutos óseos:

Son materiales naturales o sintéticos que semejan algunas de las características del hueso especialmente trabecular y son capaces de sustituirlo pero no ofrecen garantías para soportar la carga. Los sustitutos óseos son fundamentalmente materiales osteoconductores, aunque a algunos de ellos, como las matrices óseas desmineralizadas también se les haya reconocido propiedades, no siempre demostradas, osteoinductoras.

Matrices óseas desmineralizadas (MOD):

La matriz ósea es aloinjerto tratado mediante extracción con ácido para eliminar componentes minerales, dejando la estructura colágena y las proteínas no colágenas incluyendo los factores de crecimiento. Estos sustitutos mantienen una estructura similar a la trabécula ósea, pero sin capacidad de soportar cargas. Puede utilizarse combinados con otros sustitutos, de hecho se ha demostrado su eficacia como expansor de autoinjerto. Necesitan de un transportador con rápida reabsorción (glicerol, gelatina, ácido hialurónico), porque si este transportador tarda en reabsorberse se retrasa su acción.

Son osteoinductores (inducen actividad osteocondrogénica de células pluripotenciales o de fibroblastos) pero no ofrecen sostén estructural. Diversos estudios han demostrado una variabilidad significativa interproducto e interlote en función del hueso donante y las técnicas de preparación.

Cerámicas:

Son compuestos inorgánicos formados por elementos metálicos y no metálicos unidos por uniones covalentes o iónicas.

Compuestos minerales basados en el fosfato de calcio:

Pertenecen a este grupo el fosfato tricálcico (TCP) y la hidroxiapatita (HA). Algunos se pueden preparar como cerámicas. Forman osteoide al ponerse en contacto con el hueso. Este osteoide se mineraliza y se reabsorbe, sustituyéndose por hueso. Su degradación es muy lenta y pueden servir de transportadores de otros sustitutos óseos o de factores de crecimiento, antibióticos o BMPs. Son resistentes a la compresión pero frágiles a la tensión.

Se pueden preparar de varias maneras: en forma de gránulos o bloques pequeños, como recubrimiento de implantes o como cementos de fosfato cálcico (se mezclan con cemento, fraguan "in situ" y no dependen del calor, ya que es un variedad de baja temperatura).

Sustitutos óseos coralinos:

A base de carbonato cálcico. Se absorben muy lentamente. Son buenos transportadores tanto para factores de crecimiento como para terapia celular.

Polímeros:

Las características de los polímeros son: degradación por hidrólisis, producción de una inflamación local y como ventajas aportan que son abundantes, tienen una baja antigenicidad y no transmiten enfermedades.

Se pueden clasificar en:

-No reabsorbibles: polietileno de alto peso molecular y polimetilmetacrilato (cemento óseo).

-Reabsorbibles o biodegradables:

-Colágeno tipo I: buen transportador, estimula la deposición de mineral óseo, la fijación de factores de crecimiento y la angiogénesis, ofreciendo un entorno favorable para la regeneración ósea. Puede unirse a proteínas no

colágenas que actúan en la mineralización. Como desventajas presenta que no ofrece sostén estructural y que posee potencial antigénico. Considerado como potencial transportador para BMPs, matriz ósea desmineralizada u otros materiales de injerto, así como transportador de antibióticos como la gentamicina.

-Hidrogeles: polímeros porosos y permeables con alto contenido en agua y particulares propiedades mecánicas (en estudios en fase experimental).

3 INGENIERÍA TISULAR:

La reconstrucción de defectos óseos con injertos autólogos se ha establecido como el patrón oro debido a sus propiedades osteogénicas (Hausamen and Neukam, 1992; Neukam FW et al., 1994). No obstante, tal y como hemos visto, este procedimiento presenta varias limitaciones, posibles complicaciones y morbilidades asociadas.

En la búsqueda de alternativas se han desarrollado diversos biomateriales con propiedades osteoconductoras que sirven como sustitutos temporales permitiendo la progresiva formación de hueso local. Debido a la ausencia de propiedades osteogénicas en estos sustitutos óseos existe una creciente necesidad de una alternativa a los autoinjertos.

La Ingeniería Tisular ósea ha investigado ampliamente sobre cuatro factores básicos requeridos para el éxito de cualquier procedimiento de reparación ósea:

- La presencia de **señales morfogénicas** (factores de crecimiento o de diferenciación).
- Células** capaces de diferenciarse en osteoblastos.
- Un biomaterial que actúe como **soporte**.
- La presencia de un **lecho en el huésped** viable y bien vascularizado.

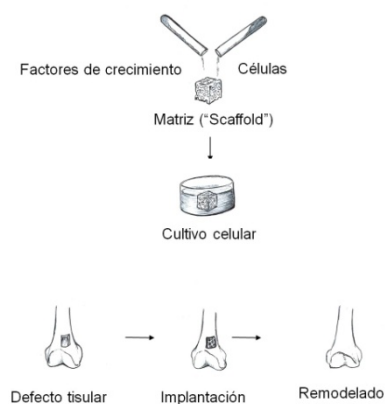


Figura 3: Elementos básicos en Ingeniería Tisular.

A partir de estos elementos la Ingeniería Tisular aborda el desafío de los defectos óseos desde tres perspectivas no excluyentes (Handschel J et al., 2006):

-Implante directo de células osteoformadoras aisladas o previamente cultivadas. Células individuales o agregados celulares insertados en la zona a reparar con o sin matrices (“scaffolds” en la literatura anglosajona).

-Implante de matrices tridimensionales con células osteoformadoras cultivadas: las células autólogas o heterólogas son cultivadas en soportes que se trasplantan al lecho cuando han alcanzado la fase osteoprodutora.

-Regeneración ósea “in situ”: la formación de hueso nuevo es inducida por matrices específicas o estímulos externos que influyen sobre las células del huésped para alcanzar la osteoformación.

A continuación se analizarán los requerimientos básicos de la Ingeniería Tisular ósea.

3.1 Células osteoformadoras:

En las distintas técnicas de Ingeniería Tisular se han utilizado tanto células autólogas como heterólogas, con diferentes grados de diferenciación. Se ha trabajado con éxito tanto con células diferenciadas, con células totipotentes de origen embrionario y con células multipotentes (células troncales mesenquimales). En los últimos años se ha añadido al arsenal terapéutico la reprogramación celular (Nakagawa M et al., 2008). Con esta técnica y siguiendo diferentes métodos células adultas diferenciadas son genéticamente modificadas para obtener células pluripotentes (“iPS cells”).

Células troncales:

Las células troncales son células indiferenciadas con una alta capacidad de proliferación, capacidad de autorrenovación, de diferenciarse hacia múltiples líneas celulares y por lo tanto la regeneración de tejidos (Blau HM et al., 2001). No obstante las células troncales tienen diferentes grados de diferenciación potencial. Las células troncales más primitivas derivan del oocito fecundado (el

cigoto) y más concretamente de los descendientes de sus primeras divisiones (dos divisiones) (Alison MR et al., 2002; Preston SL et al., 2003). Estas células son totipotentes porque son capaces de formar el embrión y el trofoblasto que formará la parte embrionaria de la placenta. Unos días después estas células comienzan a especializarse, formando una bola hueca de células, el blastocisto, con un racimo de células en un polo llamado embrioblasto (IMC, "Inner Cell Mass"). De este grupo de células deriva el embrión (Alison MR et al., 2002; Preston SL et al., 2003). Las células IMC, también conocidas como células troncales embrionarias son consideradas también pluripotentes (Alison MR et al., 2002; Preston SL et al., 2003). Pueden diferenciarse en casi todas las células de las tres líneas celulares, excepto la placenta.

Finalmente podemos encontrar las células troncales multipotentes, también conocidas como células troncales adultas, en la mayoría de los tejidos diferenciados (Alison MR et al., 2002; Preston SL et al., 2003; Presnell SC et al., 2002). Teóricamente y contrariamente a las células troncales embrionarias serían capaces de producir un rango limitado de progenie diferenciado, según el origen embrionario del tejido donde se encuentren (Alison MR et al., 2002; Preston SL et al., 2003). No obstante, estas células troncales adultas podrían tener un alto grado de plasticidad en la diferenciación (es decir, podrían diferenciarse en otras líneas celulares que no estuviesen relacionadas con el origen embrionario del tejido donde se encuentran).

Los mecanismos biológicos responsables del importante potencial de desarrollo de las células troncales no son aún del todo comprendidos. En los últimos años se ha enfatizado mucho en el entorno en el que es situada la célula troncal, su "nicho". Un nicho es un subconjunto de células tisulares y matriz extracelular, que favorece la existencia de células troncales en su estado indiferenciado. Se cree que la interacción con otros tipos celulares y con los componentes de la matriz extracelular influye en la supervivencia y el desarrollo de las líneas celulares (Preston SL et al., 2003; Spradling A et al., 2001).

Células troncales totipotentes o embrionarias:

Son las células derivadas del blastocisto y con la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tejido del organismo excepto la placenta. Estas células fueron

aisladas y cultivadas por primera vez hace más de 20 años. Para alcanzar la diferenciación hacia osteoblastos deben ser cultivadas en un medio con dexametasona, glicerolfosfato y ácido ascórbico.

Comparten con las células troncales mesenquimales la capacidad ilimitada de replicación, que además no decrece con el tiempo. Como inconvenientes que presentan están el riesgo de cancerización que tienen y los problemas éticos y morales que pueden derivarse de su obtención a partir de embriones (Cancedda R et al., 2003).

Una variante de estas células son las células troncales somáticas pluripotentes obtenidas a partir del cordón umbilical y que pueden diferenciarse hacia osteoblastos, adipocitos, condroblastos, células hematopoyéticas y neurales. Como ventajas presentan mejor accesibilidad para su obtención (sin problemas éticos) y parecen no presentar riesgo de cancerización (Handschel J et al., 2006).

Células troncales mesenquimales, células multipotentes o células troncales adultas:

Son células capaces de generar nuevo cartílago, hueso, tendón, músculo, nervio y tejido adiposo por lo que recientemente han acaparado la atención de la Ingeniería Tisular. Recientes estudios han proporcionado evidencia clara de que estas células troncales mesenquimales multipotentes adultas (MSC) existen en más órganos de lo que previamente se esperaba. Dichas células se han aislado de una variedad de tejidos adultos incluyendo médula ósea (BMDPCs) (Pittenger MF et al., 1999), músculo esquelético (Qu-Petersen Z et al., 2002), grasa (ADPCs) (Zuk PA et al., 2002) y pericondrio y periostio (PDPCs) (Yoo and Johnstone, 1998) y su potencial osteogénico ha sido investigado en numerosos estudios sobre regeneración ósea (Barry FP et al., 2004; Cowan CM et al., 2004; Halvorsen YD et al., 2001; Hamada K et al., 2008; Hattori H et al., 2004; Hayashi O et al., 2008; Mao JJ et al., 2006; Meinel L et al., 2004; Shanti RM et al., 2007).

Estas células no están únicamente presentes en tejidos con alto recambio celular, como la médula ósea, sino que se encuentran también en tejidos con

un recambio celular más bajo, como la grasa o el periostio (Barry FP et al., 2004).

Actualmente existen protocolos estandarizados y bien establecidos que permiten de forma fácil el cultivo de estas células así como la diferenciación desde células troncales específicas de tejidos a células osteoprogenitoras (Hattori H et al., 2004; Pittenger MF et al., 1999; Tenenbaum HC et al., 1985; Zuk PA et al., 2001). Dicha diferenciación está mediada por numerosas hormonas y citoquinas y no todas las células de cualquier procedencia tienen la capacidad de diferenciarse a todos los tejidos citados. En cuanto a la formación de hueso por esta línea celular las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) desempeñan un papel esencial en la diferenciación hacia osteoblastos. Cuando se alcanza la caracterización fenotípica de osteoblasto maduro las células pueden sintetizar matriz ósea capaz de mineralizarse. Además los osteoblastos maduros deben expresar fosfatasa alcalina, sintetizar colágeno (predominantemente tipo I) y osteocalcina.

Células diferenciadas:

La base de la regeneración ósea está en la existencia de osteoblastos activos, así que el uso de osteoblastos maduros autólogos representa una acertada estrategia para la Ingeniería Tisular del hueso. Estas células autólogas carecen de cualquier riesgo de rechazo, no son objeto de ningún debate ético y su obtención no genera una excesiva morbilidad.

Son el tipo celular más utilizado en el momento actual para el cultivo de hueso. Su principal desventaja deriva del escaso número de células en expansión en comparación con las células madre. El fenotipo de osteoblasto maduro expresa fosfatasa alcalina y sintetiza proteínas colágenas y no colágenas de la matriz ósea, incluyendo osteocalcina (Meyer U et al., 2006).

Células modificadas genéticamente:

Se han estudiado células genéticamente alteradas en un intento de evaluar aspectos teóricos de la Ingeniería Tisular, como son las líneas celulares del osteosarcoma, líneas celulares inmortales y clones celulares no transformados.

Al margen de su potencial carcinogénico y su imprevisibilidad, estas células pueden tener un ilimitado potencial de replicación y diferenciación por lo que podría ser una interesante arma futura para la Ingeniería ósea.

En este sentido el concepto de reprogramación celular desarrollado casi simultáneamente por dos equipos de investigación en USA y Japón para la obtención de células iPS constituyen una esperanza para la Ingeniería tisular (Aoi T et al., 2008; Nakagawa M et al., 2008).

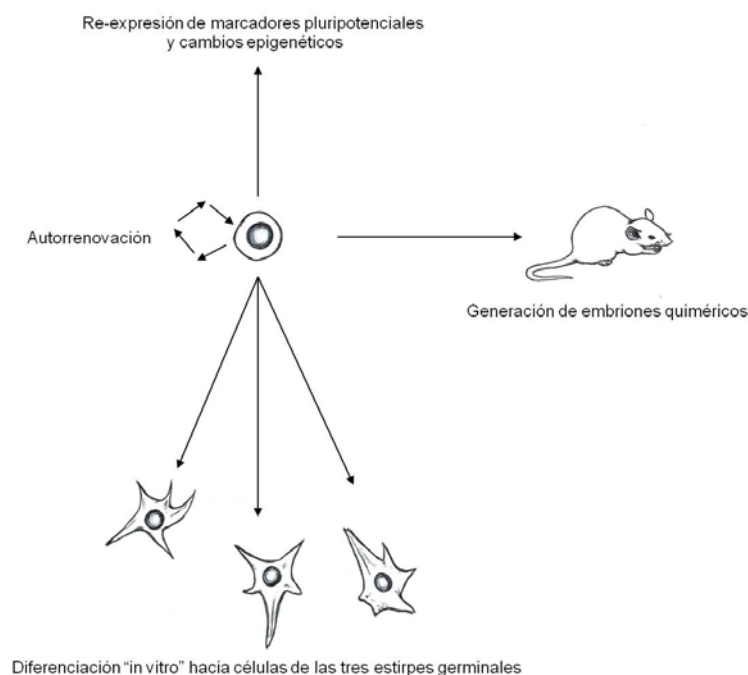


Figura 4: Método de obtención de iPS según la escuela japonesa.

3.2 Matrices celulares o “scaffolds”:

A pesar de toda la tecnología desarrollada para obtener células con capacidad osteogénica con las células aisladas no se pueden fabricar tejidos ya que en éstos las células se encuentran distribuidas en una estructura tridimensional. Esta estructura tridimensional la proporciona la matriz extracelular de los tejidos, que no es solamente una estructura de sostén de las células sino que presenta motivos de adhesión para que las células queden convenientemente fijadas. La matriz extracelular es producida y destruida de forma coordinada por

las propias células que componen el órgano o tejido. Por este motivo en la mayoría de modelos de Ingeniería tisular es necesario proporcionar a las células previamente cultivadas una estructura o soporte (“scaffolds” en la literatura inglesa) para que una vez introducidas en ella y colocadas en un entorno tridimensional las células comiencen a comportarse de la manera más fisiológica posible (Godbey WT et al., 2002).

Desgraciadamente no existe tecnología suficiente para producir matrices extracelulares semejantes a las de los tejidos adultos, siendo la búsqueda de estas estructuras tridimensionales, soportes, andamiajes o “scaffolds” uno de los campos de investigación más importantes actualmente en el ámbito de la Ingeniería tisular (Griffith L, 2002).

Propiedades de las matrices:

Las diferentes matrices deben poseer unas cualidades macroscópicas, microscópicas y físicas que posibiliten el desarrollo de sus funciones:

-Biocompatibilidad: no deben generar respuesta inmune y ni ser tóxicos para las células.

-Porosidad: esta propiedad les permite actuar como un molde en tres dimensiones para el crecimiento óseo tanto “in vivo” como “in vitro”. La porosidad y la alta conexión entre los poros posibilitan la acumulación y correcta distribución de los osteoblastos y mejora su neovascularización.

-Tamaño del poro: si el tamaño del poro es excesivamente pequeño puede producirse una oclusión de los mismos por grupos celulares. El tamaño del poro ideal se estima entre los 150-900 μm .

- Superficie: el material de la matriz debe promover la adhesión y la actividad celular y de forma ideal promover la osteogénesis a nivel genético de forma que una estructura compuesta de una matriz y hueso obtenido a través de procedimientos de Ingeniería ósea puedan ser desarrollados “in vitro” para luego ser implantados.

-Osteoinducción: esta propiedad resulta útil sobre todo para reparar defectos óseos amplios.

-Propiedades mecánicas y biodegradabilidad: las matrices deben tener propiedades mecánicas afines a las de hueso huésped. Su consistencia debe ser la adecuada para soportar las presiones tanto “in vitro” como “in vivo”. La matriz debe tener un contacto directo con el tejido circundante sin la formación de tejido cicatricial creando una interfaz estable. La velocidad de reabsorción de la matriz debe ser lo más afín a la de regeneración de tejido nuevo y los productos de su degradación deben ser fácilmente excretables por el cuerpo y no tóxicos de manera que el hueso vuelva a su estado original y función lo antes posible.

Tipos de matrices:

Cerámicas:

Han sido ampliamente utilizadas en Ingeniería ósea y pueden ser de origen natural (hidroxiapatita coralina o de origen animal) o sintéticas (hidroxiapatita sintética o fosfato tricálcico). Poseen una reconocida capacidad osteoconductora y han demostrado buenos resultados de forma aislada o con cultivos celulares, pero presentan varios inconvenientes fruto de su inestabilidad mecánica y la falta de predictibilidad en su absorción, escasa para la mayoría de las cerámicas. Por otra parte pueden incrementar las concentraciones de Ca y P extracelular de forma importante hasta el grado de producir muerte celular (Meyer U et al., 2005; Salgado AJ et al., 2004).

Polímeros reabsorbibles:

Está considerado el “scaffold” ideal y pueden dividirse en naturales o sintéticos.

-Naturales: de origen vegetal o animal entre ellos se encuentran el colágeno, fibrinógeno, chitosan, ácido hialurónico y polihidroxibutirato. Sus principales ventajas son: escaso potencial inmunogénico, propiedades bioactivas, versatilidad química y capacidad de interacción con el huésped.

-Sintéticos: usados de forma habitual, entre ellos se encuentran los poli-hidroxi-ácidos, policaprolactone, polipropileno, policarbonatos, polifosfazoles y polianhíricos.

Los “scaffolds” de fibrina o hidrogeles son matrices de origen natural que han sido ampliamente utilizados en Ingeniería Tisular con buenos resultados. Su potencialidad radica en su alto contenido en agua, su alta biocompatibilidad, transporte eficiente de nutrientes y favorecer la migración celular a través de los mismos con facilidad (Ahmed TA et al., 2008).

La fibrina es un biopolímero del fibrinógeno monómero. Tanto la fibrina como el fibrinógeno tienen un papel esencial en la coagulación, interacciones entre la matriz celular y las propias células, inflamación y reparación tisular. Las formas más usadas de fibrina como matriz en Ingeniería Tisular es en forma de hidrogeles, pegamentos (“fibrin glue”) y micropartículas de fibrina (“fibrin microbeads”).

Los hidrogeles de fibrina derivan de fibrinógeno y trombina purificados, y han sido empleados en la última década para Ingeniería Tisular de tejido adiposo, piel, cartílago, músculo y hueso. En concreto en el campo de la regeneración ósea han sido empleados en numerosos estudios pero en todos ellos la matriz presentaba una desventaja fundamental: su escasa consistencia y resistencia mecánica. Para subsanar este inconveniente algunos trabajos combinaron el hidrogel con sustancias que le aportaran mayor resistencia como la hidroxiapatita o el fosfato tricálcico (Gurevich O et al., 2002; Nakamura K et al., 1998; Weinand C et al., 2007).

Otra fuente de obtención de matrices son las proteínas globulares del plasma (fundamentalmente la albúmina) unida covalentemente con un grupo aldehído y posteriormente liofilizado (Meana A et al., 2008). Este método genera una estructura más rígida y consistente que los convencionales hidrogeles. Estas matrices derivadas del plasma tienen como ventaja su fácil y barata elaboración y la posibilidad de obtenerlas de forma autóloga a partir de pequeñas muestras de sangre del paciente, con una mayor consistencia y resistencia que los desarrollados hasta la fecha.

3.3 Factores de crecimiento:

Son proteínas secretadas por células que actúan sobre otras células diana con una acción concreta induciendo la división celular o promoviendo la síntesis de

matriz. Su vida media es corta, por lo que su utilización actual es escasa todavía. Se unen a unos receptores diana y desencadenan una señal intracelular, ejerciendo un efecto osteoinductor.

Existen numerosos factores de crecimiento:

Factores de crecimiento transformantes (TGF):

-TGF- β : superfamilia de factores reguladores del metabolismo funcional óseo. Estimulan células mesenquimales. Los osteoblastos son las células con mayor número de receptores para estos factores. Las BMPs forman parte de este grupo.

-TNF-alfa: factor necrosante tumoral alfa que inhibe la actividad osteoblástica y estimula la osteoclasia y la reabsorción ósea.

Factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGF):

Entre ellos se encuentra el IGF II que tiene como función promover la proliferación y diferenciación de precursores osteoblásticos.

Factores de crecimiento fibroblástico (FGF):

En este grupo se encuentra el FGF-b (factor de crecimiento fibroblástico básico). Estimula la proliferación de osteoblastos pero inhibe su diferenciación. Tiene efecto sobre la reabsorción, estimulando la proliferación de los precursores osteoclasticos y la producción de prostaglandinas.

Factores de crecimiento plaquetarios (PDGF):

Están compuestos por dímeros (subunidad A y B), presentando tres formatos AA, AB y BB. Las plaquetas poseen PDGF, VEGF, TGF-beta y BSP (sialoproteína ósea). Estos factores estimulan el crecimiento óseo pero no inducen la formación ósea "in vivo" a diferencia de las BMPs.

Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs):

Son proteínas pleiotrópicas con múltiples y diferentes acciones biológicas. Pertenecen a la superfamilia TGF-beta. Regulan la hematopoyesis, la síntesis

de matriz extracelular, el mantenimiento celular y la apoptosis. Son los únicos factores de crecimiento morfógenos, ya que no sólo estimulan la multiplicación de las células conectivas, sino que también son capaces de transformarlas en células osteoprogenitoras pero exigen la presencia de células osteoprogenitoras sobre las que actuar.

Se consideran osteoinductoras las BMP-2, BMP-4, BMP-6 y BMP-7. Hay descritas más de 20. Son también proteínas morfogénicas de cartílago (primer paso para la diferenciación ósea). Su acción está mediada por un complejo de receptores con actividad intrínseca serotonina/treonina quinasa presentes en los osteoblastos. Poseen antagonistas específicos (noggina y cordina, “noggin” y “chordin” en inglés) y otros llamados “gremlin” que se unen a sus mismos receptores.

Los tipos usados actualmente autorizados por la Agencia Europea del Medicamento son:

-BMP-7 (OP-1): sintetizada como proteína osteogénica recombinante. Es útil en pseudoartrosis atróficas de huesos largos, de escafoides, fracturas abiertas de tibia y en artrodesis lumbar posterolateral. Está autorizada en Europa para el tratamiento de las pseudoartrosis de tibia en pacientes esqueléticamente maduros en los que ya se ha intentado autoinjerto.

-BMP-2: se trata de una proteína osteoinductiva. Está autorizada en Europa para artrodesis lumbar intersomática y pseudoartrosis de tibia. Parece aumentar la tasa de artrodesis en comparación con autoinjerto solo. El efecto también es notable en pacientes fumadores. En los estudios realizados parece que el coste es similar al uso de autoinjerto de cresta ilíaca si se tienen en cuenta las complicaciones de ésta, el tiempo quirúrgico y el número de reintervenciones. En fracturas abiertas de tibia reduciría el número de procedimientos de aporte de injerto, reintervenciones y de infecciones.

Se está investigando sobre la BMP-4 y la BMP-14 (Growth Differentiation Factor 5 o GDF-5). También se está investigando acerca de la modificación del equilibrio entre las BMPs y sus inhibidores, suprimiendo los inhibidores de las BMPs (cordina, noggina) para potenciar la osteoinducción.

Hay preocupación acerca de la posible oncogenicidad de las BMPs y algunos estudios han demostrado mayor número de casos diagnosticados de cáncer tras la aplicación de BMP recombinante humana en la artrodesis lumbar. Tanto la FDA como la EMEA contraindican la aplicación de rh-BMP-2 (BMP-2 recombinante) en pacientes con diagnóstico previo de cáncer y se desaconseja aplicar rh-BMP-7 (BMP-7 recombinante) cerca de cánceres o infecciones activas (Carragee EJ et al., 2011).

El tratamiento de grandes defectos óseos sigue representando hoy en día un gran desafío en la Cirugía Ortopédica y en la Cirugía Cráneo-Maxilofacial. Tras los buenos resultados obtenidos con regeneración ósea guiada el hueso del territorio craneo-maxilofacial nos hemos planteado la utilización de esta técnica en los defectos diafisarios de hueso largo.

Nuestro grupo investigador ha logrado demostrar que es posible utilizar aloinjertos arteriales criopreservados como membranas de regeneración ósea guiada en defectos de hueso largo en un modelo experimental en radio de conejo, con hallazgos que sugieren una posible contribución de la pared arterial en la regeneración de hueso en el defecto (Suárez-Suárez et al., 2003 y 2005). Los resultados obtenidos utilizando arteria criopreservada descongelada como membrana de regeneración ósea guiada fueron superiores a los obtenidos con membranas sintéticas (Álvarez Rico, 2009; Ferrero Manzanal, 2008).

Otra forma de abordar la necesidad clínica de hueso autólogo es su obtención mediante técnicas de cultivo "in vitro". Este desafío no sólo incluye la posibilidad técnica de lograr el cultivo de osteoblastos funcionantes sino que implica la elaboración de un soporte tridimensional proteico para su diferenciación.

Dados los prometedores resultados con la utilización de una novedosa matriz proteica tridimensional de origen autólogo tanto en estudios "in vitro" como en la regeneración ósea en territorio cráneo-maxilofacial publicados por Gallego et al (Gallego, 2009) nos planteamos su utilización en defectos de hueso largo.

Dicha matriz podría constituir el elemento de implementación regenerativa ideal para los modelos de regeneración ósea guiada ampliamente estudiados y valorados en la literatura.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN:

-¿Se podría favorecer la regeneración de hueso largo mediante una matriz proteica tridimensional obtenida mediante Ingeniería Tisular a partir de proteínas plasmáticas autólogas?.

-¿Ayudaría a dicha regeneración ósea la adición de células pluripotenciales autólogas?.

2 HIPÓTESIS:

“El empleo de una matriz proteica porosa de origen plasmático autólogo favorece la regeneración ósea en defectos de hueso largo, con resultados superiores si a la estructura de la matriz se añaden células pluripotenciales autólogas procedentes de la médula ósea”.

3 OBJETIVO:

Evaluar la regeneración ósea obtenida en defectos de hueso largo usando una matriz de proteínas globulares plasmáticas autólogas, con y sin la adición de células procedentes de médula ósea, comparándolas entre sí y con respecto a un grupo control.

MATERIAL Y MÉTODO

1 CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES:

Los procedimientos del presente trabajo se realizaron de acuerdo con la legislación vigente:

-La Directiva 86/609/CEE del 24 de noviembre de 1986 del Consejo de Comunidades Europeas (publicado el 18 de diciembre de 1986 en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas) relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, así como a las líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales de experimentación desarrolladas en el anexo II al artículo 5 de dicha Directiva 86/609/CEE.

-El Real Decreto 223/1988/BOE del 14 de marzo de 1988 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (publicado el 18 de marzo de 1988 en el Boletín Oficial del Estado), sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como a su posterior desarrollo en la Orden Ministerial del 13 de octubre de 1989 (publicada el 18 de octubre de 1989).

-Los miembros del grupo de investigación poseen la homologación para trabajar con animales en el ámbito de la experimentación en las categorías B (“personal que lleva a cabo los procedimientos”) y C (“personal responsable para dirigir o diseñar los procedimientos”) del Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre (BOE número 252 del 21/10/2005) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos: Resolución del 22 de enero del 2007 de la Consejería de Medio Rural y Pesca del Gobierno del Principado de Asturias.

2 DISEÑO DEL ESTUDIO:

Se utilizaron 15 conejos de la raza blanca de Nueva Zelanda machos, con un peso de $4,7 \pm 0,6$ Kg (no existieron diferencias significativas intergrupo: ANOVA $p > 0,05$) procedentes del mismo criadero de animales de experimentación (Granja San Bernardo S.L., Tulebras, Navarra) (Número de Registro Ganadero 233 NA 101).

Se estabularon en el Bioterio de la Universidad de Oviedo, en jaulas individuales de tamaño normalizado en condiciones ambientales estándar con deambulaci3n libre, alimento y agua “ad libitum”, dieta convencional y bajo supervisi3n y cuidado veterinario.

El manejo de los animales, sus cuidados generales, alojamiento, los ensayos realizados y las t3cnicas empleadas se realizaron en todo momento bajo estricta supervisi3n de los veterinarios del Bioterio de la Universidad de Oviedo.

2.1 Modelo:

Se crearon defectos segmentarios de 10 mm en el radio de ambas extremidades anteriores de 15 conejos. En el estudio se evalu3 la regeneraci3n3sea en defectos creados en radio de conejo en tres grupos diferentes:

-Grupo “matriz” (10 patas): En el defecto creado se coloc3 un soporte tridimensional de naturaleza proteica y origen aut3logo de 10 mm de longitud.

-Grupo “matriz + m3dula 3sea” (10 patas): En este grupo al soporte tridimensional se le realiz3 una siembra con c3lulas procedentes de m3dula 3sea aut3loga.

-Grupo “control” (10 patas): con la finalidad de minimizar el sufrimiento de los animales y para rentabilizar al m3ximo los experimentos con ellos (principios de las Tres Erres de Russel y Burch) se utilizaron los datos del grupo control obtenidos en estudios previos de nuestro grupo investigador (Su3rez-Su3rez et al., 2003 y 2005) (Ferrero Manzanal, 2008).

En los defectos correspondientes a este grupo no se coloc3 ning3n tipo de material. Por motivos de dise3o del estudio previo, se colocaron cuatro grapas

anticolapso de acero inoxidable que no mostraron capacidad de estimular la regeneración ósea (tan sólo se apreció un mínimo crecimiento óseo en los extremos del radio similar a los grupos control de otros estudios existentes en la literatura por lo que, en caso de favorecer la regeneración, la consideramos despreciable).

2.2 Programación y aleatorización:

Se intervinieron las dos patas anteriores de 10 conejos (20 defectos óseos) dejando entre ambas cirugías seis meses para la completa recuperación del animal.

Se utilizó un sistema de asignación completamente al azar para validar la estimación de la varianza del error experimental. Consiste en aplicar de forma aleatoria los tratamientos a las unidades experimentales. Así se diseñaron 10 modelos para determinar la asignación de cada conejo (unidad experimental) a cada tratamiento (grupo “matriz” frente a grupo “matriz + mo”). Se seleccionaron 10 números de tres dígitos y se asignó de forma ordenada un número a cada unidad experimental. Se prefieren números de tres dígitos porque es más difícil encontrar valores iguales. Se ordenaron de menor a mayor valor los nuevos números y se asignó a la primera parte de la tabla la opción “matriz” y la segunda mitad de la tabla la opción “matriz + MO”. Para determinar en cada conejo el orden de intervención de las patas (derecha o izquierda) se realizó un sistema idéntico de asignación aleatoria.

Se realizaron controles radiográficos de todas las extremidades en el postoperatorio inmediato y cada mes hasta el sexto.

No se registraron complicaciones durante el procedimiento quirúrgico en ningún caso. Todos los conejos intervenidos sobrevivieron y por tanto no fue necesario sustituir a ninguno.

3 OBTENCIÓN DE LA MATRIZ PROTEICA TRIDIMENSIONAL:

La base de la matriz utilizada son las proteínas globulares del plasma entrecruzadas con una sustancia tipo aldehído. En nuestro estudio se preparó a partir de muestras de sangre periférica de los animales utilizados como receptores de la matriz. Se extrajeron 10 ml de sangre periférica de cada espécimen y se enviaron al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias. Las muestras se mantuvieron durante 30 min a 37 °C para que se produjera la retracción del “clot” de fibrina. A continuación se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 min. El suero obtenido (5 ml) fue entonces cruzado con 0,5 ml de glutaraldehído al 25% de concentración (Merck, Alemania) y la mezcla resultante fue transferida a una jeringa de 5 ml con un fiador central que se utilizó como molde para dar forma tubular a la estructura (figura 5).



Figura 5: Representación gráfica del sistema empleado para obtener la forma tubular de la matriz.

Esta solución se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min hasta alcanzar la solidificación. A continuación se introdujo en el congelador manteniéndose a -70°C durante 12 horas aproximadamente. Una vez descongelado el producto se cortó la jeringa liberándose el cilindro y se sometió a liofilización durante 48 horas. Tras este proceso la matriz tiene una estructura porosa pero es extremadamente friable, por lo que se hidrató para lograr un producto viable como soporte. La hidratación se llevó a cabo de forma progresiva con etanol en concentraciones decrecientes (100-90-80%) manteniéndose durante una hora en cada una de ellas.

De esta manera se obtuvo una estructura tridimensional tubular porosa, elástica, flexible y no tóxica. Finalmente esta matriz se lavó con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) para eliminar restos de etanol y se mantuvo en este medio hasta su utilización en las cirugías.

4 OBTENCIÓN DE MATRIZ CON CÉLULAS PROCEDENTES DE MÉDULA ÓSEA:

En los casos pertenecientes al grupo “matriz + mo” se realizó una siembra con células procedentes de médula ósea autóloga. 24 horas antes de la intervención quirúrgica en la que se implantó la matriz se procedió a la punción de cresta ilíaca para la obtención de una muestra de médula ósea.

La intervención se realizó en condiciones de asepsia en el quirófano de cirugía experimental del Bioterio de la Universidad de Oviedo. Se preparó la zona de cresta de donde se obtuvo la muestra mediante lavado pre quirúrgico con agua y jabón y se rasuró la zona. El procedimiento se realizó bajo anestesia general. Para ello se premedicó al animal con Buprenorfina (0,05 mg/Kg vía subcutánea) 15 minutos antes de comenzar el procedimiento y con una mezcla de Domtor® (Medetomidina) a dosis de 0,18 mg-/Kg por vía intramuscular con Ketamina a dosis de 15 mg/Kg también por vía intramuscular como inductores de la anestesia. Una vez sedado el animal se aplicó una mascarilla con O₂ y después de unos minutos se añadió Isoflurano al 3-5%. Una vez dormido se intubó con tubo endotraqueal del 3,5 mediante técnica ciega (“a oído”). El mantenimiento de la anestesia general se realizó con Isoflurano al 1,5-2%. Con el animal en decúbito lateral se preparó el campo estéril sobre la cresta ilíaca a puncionar y se realizó una pequeña incisión con un bisturí del número 15 (Aesculap, Alemania). Con un trocar para biopsia de médula ósea MIELO-CAN (SteryLab s.f.l. Rho, Milan, Italia) se atravesó la tabla externa del hueso ilíaco y se extrajeron entre ocho y diez ml de médula ósea.

La muestra se envió al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias donde se realizó la siembra de las células en la matriz. Las células

mesenquimales se obtuvieron de las muestras después de realizar una centrifugación diferencial en Ficoll® (2, 4, Dinitrophenyl-AminoEthylCarboxyMethyl-FICOLL). Estas células mesenquimales se sembraron directamente en la matriz, en agitación toda la noche a 37°C. Se mantuvieron en estufa hasta su aplicación en las cirugías.

5 PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

5.1 Entorno:

La intervención quirúrgica se realizó en el quirófano experimental del Bioterio de la Universidad de Oviedo en condiciones de asepsia. En el antequirófano se preparó a los animales realizándose rasurado de la extremidad a intervenir y lavado con agua y Betadine® jabonoso.

5.2 Anestesia:

El procedimiento anestésico y el seguimiento postoperatorio fueron desarrollados por el equipo de veterinarios del Bioterio.

Como premedicación se utilizó Buprenorfina (0,05 mg/Kg) por vía subcutánea administrada 15 minutos antes del comienzo de la cirugía, además de Domtor® (Medetomidina) a dosis de 0,18mg/Kg con Ketamina a dosis de 15 mg/Kg por vía intramuscular. Para la inducción anestésica se utilizó una mascarilla con oxígeno inicialmente y tras unos minutos Isoflurano (Forane® líquido sol. Inhalatoria, Abbie Farmacéutica S-L.U.) al 3-5%. Una vez dormido el animal se intubó con un tubo endotraqueal de 3,5 mediante técnica ciega ("a oído"). El mantenimiento de la anestesia se llevó a cabo con Isoflurano (Forane®) al 1,5-2% y se utilizó como analgésico Metacan® (Meloxicam) a dosis de 0,3 cc por vía subcutánea. Se monitorizaron la capnografía, la pulsioximetría y la presión arterial no invasivas. Se mantuvo una perfusión intravenosa de solución isotónica de cloruro sódico al 0,9% (Braun Medical SA, Barcelona) a un ritmo de 40 ml/hora con control mediante microgotero (Dial-A-Flo®, Venisystems, Abbott, Ireland).

Se colocó al animal en decúbito supino sobre una manta térmica de agua caliente. La pata delantera contralateral se sujetó para garantizar un buen campo de trabajo.

5.3 Profilaxis antibiótica:

Se utilizó Kurgan® (Cefazolina) (50 mg/Kg) en dosis única por vía intravenosa 15 min antes de la intervención. En el postoperatorio se administraron 100 mg/Kg diarios por vía intramuscular durante 48 horas más.

5.4 Intervención:

Se desinfectó la pata delantera a intervenir con Povidona Yodada (Betadine®) y se aisló y preparó el campo con paños estériles desechables. Se practicó una incisión cutánea longitudinal y disección por planos a través de una vía anterolateral directa hasta exponer el radio y la parte superior del cúbito identificando la membrana interósea entre ambos.

A continuación se creó un defecto osteoperióstico de 10 mm a nivel del tercio medio del radio con una hoja de sierra conectada a un motor bajo irrigación continua con suero salino fisiológico para evitar la necrosis térmica de los extremos de la osteotomía (figuras 6 y 7). Se eliminó el periostio de la vecindad mediante raspado con bisturí (figura 7).

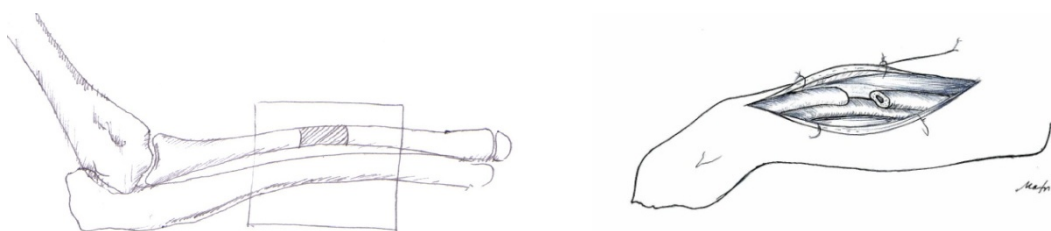


Figura 6: localización de la osteotomía realizada. Dibujo de la osteotomía de 10 mm realizada en el radio.

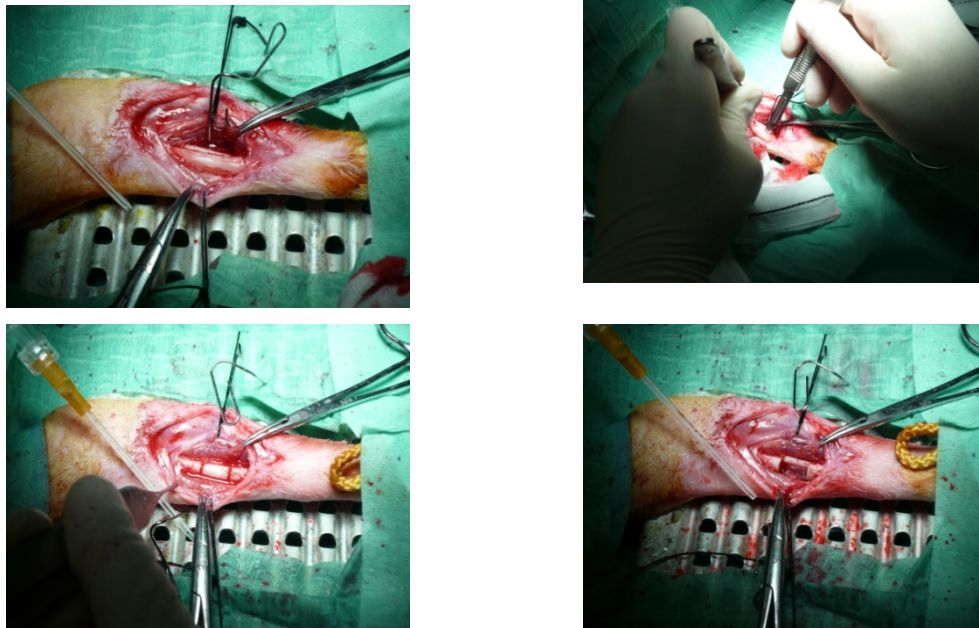


Figura 7: Fotos del procedimiento quirúrgico en las que se puede ver la vía quirúrgica, la osteotomía realizada y la desperiostización de los bordes.

Grupo control:

Se realizaron con una broca de 0,5 mm cuatro orificios en la cortical de cada extremo del defecto óseo. Tal y como se comentó previamente, se colocaron cuatro grapas de alambre de acero inoxidable de 0,4 mm de diámetro entre dichos orificios por motivos del diseño del estudio previo (figura 8). En este grupo se dejó el defecto vacío, sin ningún injerto para que nos sirviera como control.

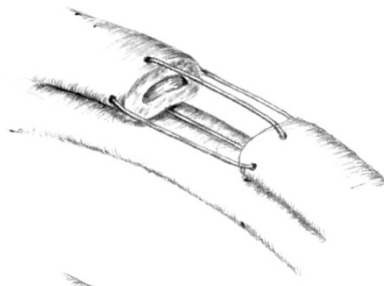


Figura 8: Representación gráfica del montaje realizado en el grupo control mediante 4 grapas metálicas.

Grupos “matriz” y “matriz + mo”:

En cada extremo de la osteotomía se practicaron dos orificios con una broca de 0,5 mm de diámetro (figuras 9A y 10A). Se cortaron y regularizaron los extremos de la matriz para hacerla coincidir con el tamaño del defecto (10 mm) y se pasaron dos hilos de sutura de Polipropileno (Prolene® 6/0, Ethicon, Johnson and Johnson SA) a través del túnel central de la matriz (figuras 9B y 10B). Se pasaron los cuatro extremos de los dos hilos por los orificios practicados en los extremos del defecto óseo y se colocó el cilindro de matriz encastrado en dicho defecto (Figuras 9C y 10C). Para asegurarlo en ese lugar se anudaron los hilos de sutura en los extremos de la osteotomía (figuras 9D y 10D).

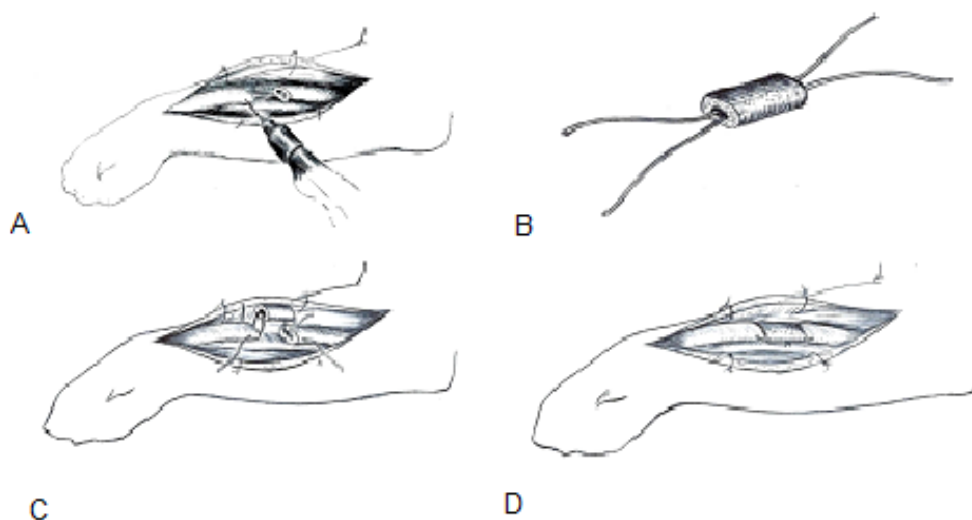


Figura 9 (A, B, C y D): Dibujos del procedimiento de colocación del fragmento de matriz en el defecto óseo practicado. Realización de los orificios en los extremos de la osteotomía (A), paso de los dos hilos de sutura por el túnel del cilindro de matriz (B) y a través de los orificios practicados (C) para su sutura y sujeción (D).

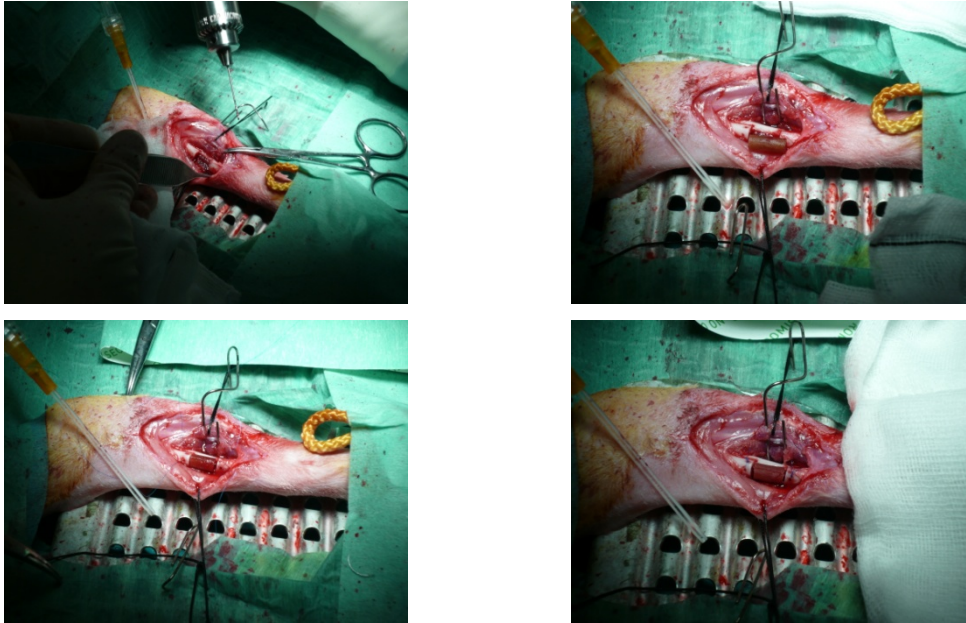


Figura 10 (A, B, C y D): De izquierda a derecha y de arriba abajo; fotos del procedimiento quirúrgico. Realización de los orificios en los extremos de las osteotomías (A) y sujeción de la matriz con hilos de sutura (B) a través de dichos orificios (C y D).

Tras el lavado abundante con suero fisiológico se procedió al cierre por planos con suturas reabsorbibles (Dexon® 3/0, B. Braun-Dexon, B. Braun Surgical SA) y no reabsorbibles para la piel (Seda® 0, B. Braun-Dexon, B. Braun Surgical SA), sin dejar ningún tipo de drenaje. La herida quirúrgica se cubrió con gasas que se sujetaron con algodón y venda elástica previo control radiográfico de la extremidad (figura 11).

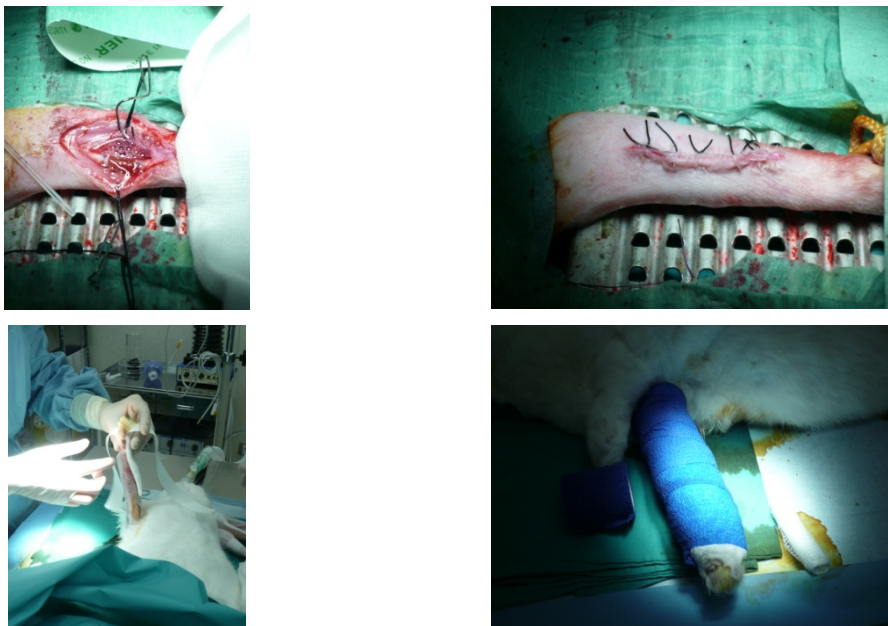


Figura 11 (A, B, C y D): De izquierda a derecha y de arriba abajo; fotos del procedimiento quirúrgico: Lavado profuso del campo quirúrgico (A), cierre de la herida (B) y en las fotos inferiores vendaje de la extremidad (C y D).

5.5 Postoperatorio:

No se utilizó ningún tipo de inmovilización externa rígida de la extremidad permitiendo al cúbito actuar como férula interna del radio. El animal se mantuvo al lado de una estufa eléctrica hasta la recuperación anestésica completa y una vez colocado en su jaula se le permitió la deambulación libre.

Como pauta analgésica postoperatoria se utilizó una combinación de Buprenorfina en las primeras 24 horas a dosis de 0,05 mg/Kg por vía subcutánea y Meloxicam a dosis de 0,2 mg/Kg durante 4 días.

La primera cura de la herida quirúrgica se realizó a los cuatro o cinco días con Povidona Yodada (Betadine®) y las suturas se retiraron a los 10 días de la intervención. Se prescindió del vendaje elástico a los 14-15 días postoperatorios.

5.6 Eutanasia de los animales:

Fue realizada por el equipo de veterinarios del Bioterio. Tras sedar al animal con Medetomidina Clorhidrato (Domtor®) a dosis de 0,18 mg/Kg y Diazepam (Valium®) a dosis de hasta 0,2 mg/Kg por vía intravenosa se utilizó una sobredosis de Pentobarbital sódico (Tiopental®) (dosis mayores de 100 mg/Kg) también por vía intravenosa.

6 ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR LA IMAGEN. ESTUDIO RADIOGRÁFICO:

6.1 Material:

-Unidad de radiología retro alveolar Trophy® modelo 708 con temporizador CCX-Digital® con tubo radiogénico de rejilla, foco 0,7 CEI, potencia de 8 mA y una penetración de 70 KVp y un tiempo de exposición de 0,30 segundos.

-Película radiográfica Kodak Ultra-Speed Occlusal DF-50® de 51x76 mm (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

-Fijador radiográfico dental Kodak® (Kodak Industrie, Chalon, France).

6.2 Metodología:

Las radiografías se realizaron con los animales en decúbito supino y la extremidad en supinación. Todas ellas con la misma distancia entre el foco y la película radiográfica (10 cms) e idénticas condiciones de amperaje, voltaje y tiempo de exposición. Los controles se hicieron en el preoperatorio (para comprobar el cierre fisario), en el postoperatorio inmediato y cada mes. En cada ocasión se obtuvieron dos radiografías para seleccionar la de mejor calidad.

El revelado se realizó en una cámara oscura a 20-22°C de temperatura ambiente con la siguiente secuencia temporal: cinco minutos en líquido revelador, 30 segundos de lavado con agua pura, cinco minutos en el líquido fijador, cinco minutos con agua pura y secado con aire caliente.

7 ESTUDIO DE CUANTIFICACIÓN SOBRE IMÁGENES RADIOGRÁFICAS:

7.1 Material:

-Sistema de captación de imágenes Escáner EPSON EXPRESION 1640 XL® (modelo G650C) (Epson Iberia SA) en el Centro Científico-Tecnológico de la Universidad de Oviedo.

-Sistema de procesamiento de imágenes: software basado en el programa "Image J" sobre el que el Servicio de Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo ha realizado una aplicación específica.

7.2 Metodología:

-Digitalización de imágenes: la imagen radiográfica se captó utilizando un escáner a un formato .TIFF sin comprimir, con una resolución de 800x600 pixeles con una escala de grises a ocho BIT/pixel, =256 niveles de gris. El valor cero representa el negro y el 255 el blanco.

-Tratamiento de imágenes digitalizadas: el programa está orientado a medir la regeneración ósea en los defectos óseos estudiados.

Como primer paso se realizó una calibración de la imagen inicial (la del postoperatorio inmediato) basada en las distancias de la zona del defecto.

A continuación se marcó el área de la zona de defecto, obteniéndose una “máscara” que sirvió como referencia de defecto óseo a medir.

Para obtener la regeneración ósea en cada imagen a lo largo del tiempo fue necesario en primer lugar hacer un registro de la imagen a estudiar en relación a la imagen que teníamos de referencia para poder superponer la imagen que estábamos midiendo y la del postoperatorio inmediato (“máscara”).

Con el fin de homogeneizar las densidades de las imágenes se realizó una recalibración marcando una zona de densidad mínima (por ejemplo, la zona sin hueso del defecto) y una zona de intensidad máxima (por ejemplo una zona de hueso cortical).

Sobre la zona de defecto de la imagen a medir se detectó en función del nivel de gris el área de hueso regenerado. Comparando esta área con la “máscara” el programa nos determinó el valor medio de gris de la zona de hueso regenerado (valores entre cero y 255), la medida en mm^2 de zona de hueso regenerado y el porcentaje de área ocupado por dicha regeneración.

7.3 Variables de cuantificación radiológica estudiadas:

7.3.1 Porcentaje de regeneración ósea:

Definido como el porcentaje de relleno del defecto por densidad calcio. Valora el porcentaje de hueso regenerado en el defecto según la ocupación del defecto óseo por densidad calcio, sin tener en cuenta el grado de densidad. Se determinó por el programa de análisis de imagen basado en “Image J” (optomorfometría radiológica) en los controles realizados a los tres grupos de estudio (“control”, “matriz” y “matriz + mo”) en los seis primeros meses de seguimiento.

Permite comparar mediciones de radiografías diferentes ya que, al tratarse de una proporción su valor no se ve influido por el grado de magnificación radiográfica. Es una variable cuantitativa continua.

7.3.2 Densidad en el defecto:

Valora el grado de densidad del tejido que rellena el defecto óseo. Se determinó también con el programa basado en “Imagen J” (optodensitometría radiológica) en las imágenes radiográficas de los tres grupos de estudio (“control”, “matriz” y “matriz + mo”) tomadas mensualmente durante seis meses.

Este programa permite comparar mediciones de distintas radiografías ya que determina la densidad de una zona de referencia control y evita la influencia del grado de penetración radiográfica o de la técnica de revelado. Es también una variable cuantitativa continua.

8 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS:

8.1 Material:

-Ordenador portátil INTEL[®] (R) Core (TM) i7-3612QM CPU @ 2.10 GHz. 4,00 Gb de RAM.

-Software: sistema operativo Microsoft Windows versión 2007. Programa estadístico SPSS[®] versión 19.0 (SPSS/ PC Inc, Illinois, USA).

8.2 Metodología:

8.2.1 Estudio estadístico del tipo de regeneración en el defecto:

Se aplicó un test no paramétrico (Chi cuadrado) para estimar las diferencias entre el tipo de regeneración ósea obtenido y el tipo de injerto empleado. Se utilizó el mismo test agrupando la variable regeneración en dos grupos (regeneración completa y regeneración incompleta, que engloba a la regeneración parcial y no regeneración).

8.2.2 Estudio descriptivo:

Para las variables estudiadas (porcentaje de regeneración y densidad ósea en el defecto) se calcularon los valores del tamaño muestral, la media, desviación estándar, error estándar de la media, límites superior e inferior del intervalo de confianza del 95% de la media y valores mínimos y máximos que podían tomar las variables.

8.2.3 Análisis de regresión:

Para todos los modelos de la variable “densidad en el defecto” y para el “porcentaje de regeneración ósea” en grupo “matriz + MO” se aplicó una regresión lineal simple sin hacer ninguna transformación de las variables.

En el caso del “porcentaje de regeneración ósea” en el grupo “matriz” se optó por una transformación logarítmica.

Se ejecutó un modelo de regresión lineal simple con el fin de explicar la evolución de las variables a lo largo de los meses. Se calculó el coeficiente de correlación que estima la relación o asociación lineal entre la variable y los meses y el coeficiente de determinación que indica el porcentaje de la variabilidad de la variable dependiente explicado por la regresión.

Se comprobó la bondad del modelo ajustado verificando las hipótesis de normalidad, independencia y homocedasticidad de los residuos o errores del modelo a través de gráficas de diagnóstico.

8.2.4 Análisis comparativo intergrupo:

Para comparar la medida de una misma variable en un mismo momento temporal en los grupos “control”, “matriz” y “matriz + MO” se realizaron previamente los test de Shapiro-Wilk para comprobar el supuesto de normalidad ($p > 0,05$) y la prueba de Levene ($p > 0,05$) para estudiar la homocedasticidad de las variables estudiadas.

Si no se cumplían los dos criterios se utilizaron pruebas no paramétricas para variables cuantitativas independientes (test de Kruskal-Wallis con su post hoc U-Mann Whitney).

Si se cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad se utilizó un test paramétrico (ANOVA de una vía) con su correspondiente test post-hoc.

8.2.5 Análisis comparativo de diferentes momentos temporales en un mismo grupo:

Se aplicó una prueba de significación global, el análisis de la varianza de medidas repetidas utilizando como factor intra-sujetos o factor de medidas repetidas el tiempo, para cada uno de los grupos (“control”, “matriz” y “matriz + MO”), con el fin de calcular diferencias entre los valores de cada variable en diferentes momentos temporales. La secuencia de pruebas estadísticas que se utilizó fue la siguiente:

-Prueba de esfericidad de Mauchly: en caso de vulneración de este supuesto se ajustaron los grados de libertad del numerador y del denominador del estadístico F univariado para corregir los grados de libertad en las pruebas de significación promediadas. En este ajuste, llamado “epsilon” el programa estadístico proporcionó tres estimaciones: Greenhouse-Geisser, Huynh-Feldt y Lower-Bound.

-Prueba de contrastes intrasujetos: la obtención de resultados significativos nos indicó que al menos una de las medias era diferente de las otras, pudiendo serlo más de dos o incluso todas ellas.

-Pruebas de contrastes pareados: con estas pruebas se valoró en la muestra la existencia de diferencias significativas entre el valor de una variable en un determinado momento temporal y el valor en el momento inmediatamente siguiente así como entre el momento final con todos los anteriores. Además permitió calcular el intervalo de confianza del 95% de las diferencias observadas.

8.2.6 Análisis comparativo entre los distintos grupos y los diferentes momentos temporales:

Se aplicó la misma metodología explicada en el punto anterior, realizando un análisis de varianza de medidas repetidas, salvo que en esta ocasión se incluyeron en el análisis dos factores, con medidas repetidas en uno de ellos. El factor intra-sujetos o de medidas repetidas considerado fue el tiempo y el factor inter-sujetos el grupo.

El grado de significación utilizado en todas las pruebas estadísticas fue del 95%.

9 ESTUDIO HISTOLÓGICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA:

El procesamiento de las muestras para estudio histológico de microscopía óptica se realizó en la Unidad de Metabolismo Óseo y Mineral del Hospital Universitario Central de Asturias y en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias.

Se siguió la siguiente metodología:

9.1 Obtención de las muestras óseas:

- Sacrificio del animal conforme a un protocolo específico del Bioterio.
- Desarticulación de las extremidades anteriores a nivel del codo y muñeca.
- Disección por planos hasta el cúbito y radio, conservando la envoltura de partes blandas que rodea el defecto óseo.
- En el grupo control se localizaron las grapas de alambre y se retiraron de la forma menos traumática posible.
- Cada una de las muestras obtenidas fue fragmentada en dos mitades de igual superficie.
- Las muestras destinadas a la inclusión en parafina (muestras descalcificadas) fueron transportadas en glutaraldehído al 25% al Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias.
- Las muestras destinadas a la inclusión en metacrilato (muestras no descalcificadas) fueron transportadas en etanol al 70% a la Unidad de Metabolismo Óseo y Mineral del Hospital Universitario Central de Asturias.

9.2 Procesamiento de muestras óseas descalcificadas:

- Fijación en solución acuosa tamponada de formaldehído al 10% a temperatura ambiente durante un mínimo de 24 horas.

-Descalcificación mediante quelantes químicos por inmersión en sal disódica 2-hidrato de ácido etilen-diamina-tetraacético (EDTA) al 10% en TBS tamponado. El tejido se mantuvo a temperatura ambiente en la parte superior del bote mediante un sistema de corchos unidos al tejido que actuaban a modo de boyas permitiendo su flotación, con agitación diaria durante dos meses, cambiándose el líquido cada 15 días. La comprobación del grado de descalcificación se realizó mediante punciones con bisturí.

-Inmersión en solución acuosa de carbonato de litio a saturación durante 16 horas.

-Deshidratación progresiva en alcoholes de gradación ascendente y eliminación de alcohol absoluto final con xilol.

-Inclusión en parafina.

-Corte de los bloques con ultramicrotomo para obtener secciones longitudinales de 5 micras de espesor siguiendo el eje de la diáfisis del radio.

9.3 Procesamiento de muestras óseas no descalcificadas:

La técnica de inclusión de muestras óseas en una resina plástica basada en glicol metacrilato permite estudiar muestras sin descalcificar preservando sus relaciones histológicas. Esto hace posible valorar la calidad de la mineralización ósea y la relación entre los diferentes componentes del tejido óseo.

-Inmersión en etanol al 70% durante 24 horas.

-Deshidratación y deslipidación: se realizó pasando las piezas por diferentes gradaciones de etanol y acetona:

Etanol-acetona al 50% durante 12 horas.

Acetona durante 12 horas.

Etanol-acetona al 50% durante 12 horas.

Etanol absoluto durante 24 horas.

-Infiltración: este proceso se realizó con una resina plástica hidrosoluble basada en Glicol metacrilato, JB-4 Plus ®, que penetra e impregna con facilidad al tejido óseo. Para ello se mezclaron 100 ml de 2-hidroxietilmetacrilato-polietilenglicol con 1 gramo de peróxido de benzoilo en polvo al 70% y fueron agitados manualmente hasta la disolución completa. Esta mezcla se conservó refrigerada a 4°C en un frasco de vidrio de paredes oscuras herméticamente cerrado durante 6 semanas. A continuación, se colocaron las muestras óseas en tubos de vidrio con la mezcla descrita para su infiltración durante 12 horas.

-Inclusión: una vez completada la infiltración se procedió a realizar la inclusión de las muestras óseas. Para ello se preparó la resina basada en glicol metacrilato mezclando 15 ml. de la solución catalizada refrigerada previamente descrita con 1 ml. de solución derivada de pirimidenetrione. Se vertió la mezcla preparada en moldes de polietileno de 13x19x5 mm., donde se colocaron las muestras óseas debidamente identificadas. Sobre las muestras que se encontraban en proceso de inclusión se instalaron bloques plásticos de contención cubriendo herméticamente los moldes para obtener condiciones anaeróbicas. La polimerización de la resina basada en glicol metacrilato se completó en aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo las muestras fueron retiradas de los moldes.

-Cortes de las piezas: Los cortes histológicos de las piezas se realizaron con ultramicrotomo de cuchilla de diamante para obtener secciones longitudinales de 5 micras de espesor.

9.4 Tinciones óseas:

Hematoxilina-eosina:

En primer lugar se realizó la desparafinización de las muestras con baños consecutivos de xilol de un segundo de duración cada uno. Para teñir las muestras se realizaron los siguientes pasos:

-Aplicación de Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.

- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.
- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (20 minutos).
- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95% para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

Tinción Von Kossa:

Muestra el hueso y las sales minerales como depósitos negros. El núcleo y el citoplasma adquieren una tonalidad de rosa a rojo.

Tras la desparafinización de las muestras se realizaron los siguientes pasos:

- Aplicación de nitrato de plata al 3% durante cinco minutos.
- Dos lavados de cinco minutos con agua destilada.
- Formol-carbonato de sodio durante cinco minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.
- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1%.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Ácido fosfotungstico-Orange G durante siete minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1%.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Deshidratación y montaje.

La observación de las preparaciones se realizó con un foto microscopio Nikon Labophot ® en el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias.

RESULTADOS

1 ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR LA IMAGEN:

Estudio radiográfico:

En las radiografías obtenidas se valoró el tipo de regeneración ósea desarrollado. Se observaron tres patrones de osificación diferentes:

No regeneración:

En el postoperatorio inmediato se observó una interrupción de la continuidad ósea del radio (el defecto óseo) con densidad “agua” en su interior. En los dos primeros meses se apreció un pequeño aumento de densidad a nivel de los extremos del defecto. A los tres y cuatro meses se pudo distinguir una densidad “calcio” en la membrana interósea y un pequeño capuchón radiodenso a nivel de las osteotomías de cada uno de los extremos, con la parte central manteniendo una densidad “agua”. Se mantuvo esta misma situación a los cinco y seis meses y en ningún caso se restableció la continuidad radiológica entre los extremos del defecto.

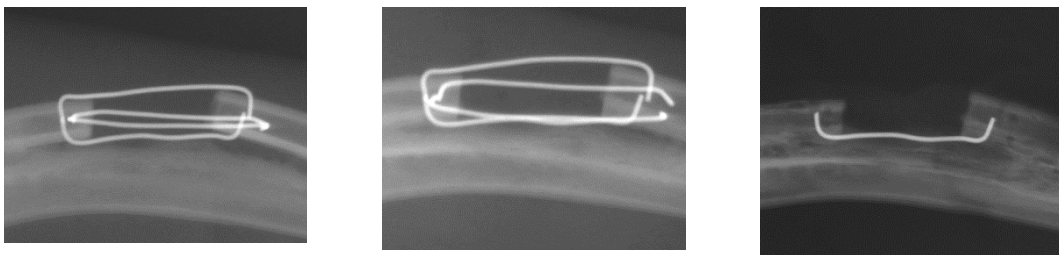


Figura 12: Evolución radiográfica de un patrón de no regeneración. Controles a los 0, 3 y 6 meses de izquierda a derecha.

Regeneración parcial:

En las imágenes del postoperatorio inmediato se observó en la región del defecto óseo densidad “agua”. En las etapas iniciales (uno y dos meses) se observaron dos áreas de densidad calcio a modo de mamelones que prolongaban los extremos de las osteotomías con una cantidad variable de densidad calcio en la zona central. Este frente de osificación se detuvo en un

momento dado de la evolución temporal, sin llegar a puentear el defecto óseo y sin restablecerse la continuidad cortico-medular del radio.



Figura 13: Evolución radiográfica de un patrón de regeneración ósea parcial. Controles a los 0, 3 y 6 meses de izquierda a derecha.

Regeneración ósea completa:

La evolución inicial fue superponible a la del grupo de regeneración ósea parcial pero en torno a los tres y cuatro meses las densidades a nivel de la membrana interósea y en el defecto fueron mayores, alcanzando una densidad cercana a la del calcio. En los últimos meses de la evolución se restableció claramente la continuidad radiográfica del radio, con densidad “calcio” a nivel del defecto y con dos líneas periféricas radiodensas que, aunque delgadas, rodeaban a una zona menos radiodensa asemejando el patrón córtico-medular del hueso normal. Se observó además una sinostosis radiográfica entre el cúbito y el radio a nivel de la membrana interósea.

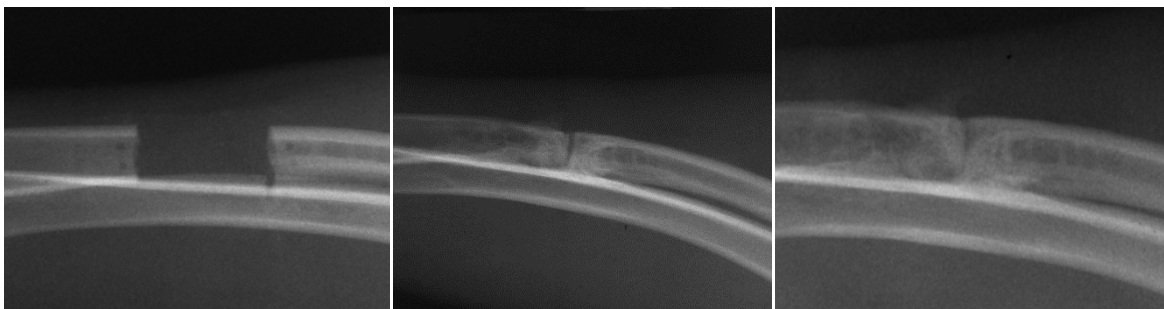


Figura 14: Evolución radiográfica de un patrón de regeneración ósea completa. Controles a los 0, 3 y 6 meses de izquierda a derecha.

La distribución de estos patrones de regeneración ósea en los tres grupos de estudio fue la siguiente:

| | N | No regeneración | Regeneración parcial | Regeneración completa |
|-----------|----|-----------------|----------------------|-----------------------|
| CONTROL | 10 | 4 | 6 | 0 |
| MATRIZ | 10 | 1 | 8 | 1 |
| MATRIZ+MO | 10 | 1 | 4 | 5 |

Tabla 1: Distribución entre los tres grupos de estudio de los patrones radiográficos observados.

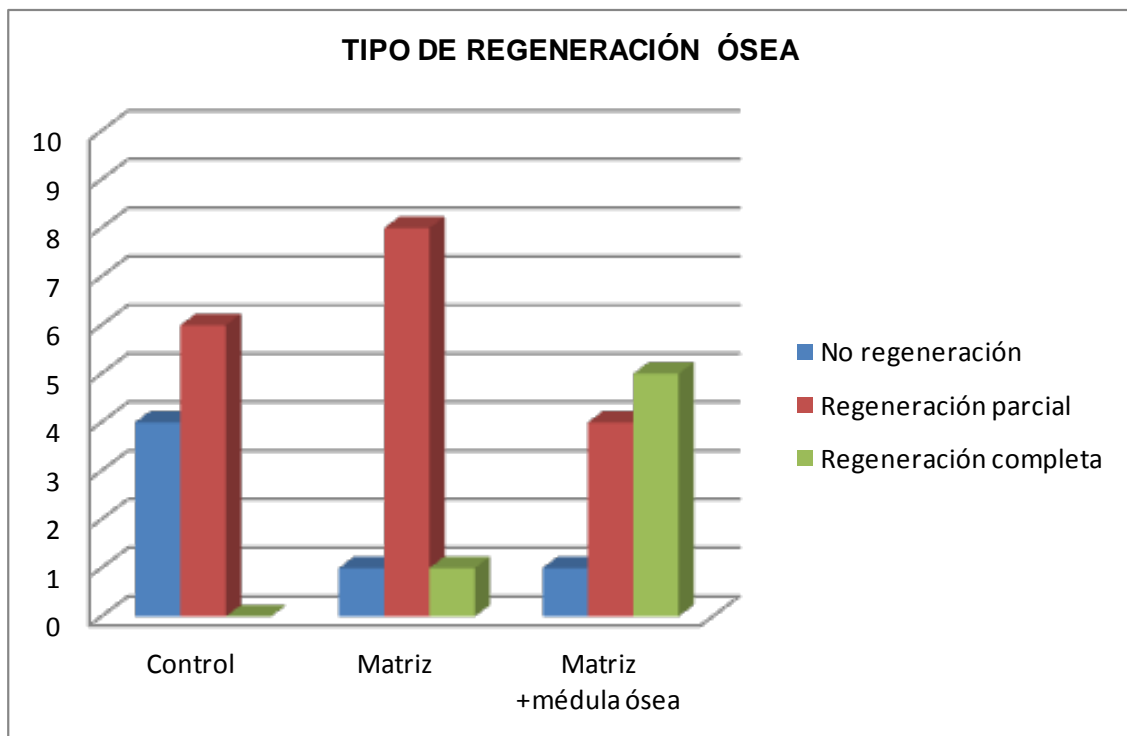


Figura 15: Representación mediante diagrama de barras de los tres patrones radiográficos de regeneración ósea observados y su distribución en cada uno de los tres grupos de estudio.

2 ESTUDIO ESTADÍSTICO DEL TIPO DE REGENERACIÓN EN EL DEFECTO:

En la tabla 2 se muestran el número de casos (y el porcentaje que suponen) de cada patrón de regeneración ósea observado en los tres grupos de estudio.

| | N | No regeneración | Regeneración parcial | Regeneración completa |
|-----------|----|-----------------|----------------------|-----------------------|
| CONTROL | 10 | 4(40%) | 6(60%) | 0(0%) |
| MATRIZ | 10 | 1(10%) | 8(80%) | 1(10%) |
| MATRIZ+MO | 10 | 1(10%) | 4(40%) | 5(50%) |

Tabla 2: Resultados de la variable tipo de regeneración en el defecto óseo en cada uno de los tres grupos estudiados.

2.1 Comparación entre “tipo de regeneración” y “tipo de relleno del defecto”:

Se realizó la prueba de χ^2 para determinar la asociación de las variables cualitativas “tipo de regeneración” y “tipo de relleno empleado en el defecto”. Se obtuvo un p valor de 0,023. Al igual que en todos los contrastes de hipótesis que se aplicaron a lo largo de todo el texto consideramos diferencias estadísticamente significativas aquellas que arrojaban p valores inferiores a 0,05. En este caso la significación estadística nos indica que las variables “tipo de regeneración ósea” y “tipo de relleno empleado en el defecto” son dependientes.

| | Valor | gl | Sig. asintótica (bilateral) |
|--------------------------|-----------|----|-----------------------------|
| Chi-cuadrado de Pearson | 11,333(a) | 4 | 0,023 |
| Razón de verosimilitudes | 11,908 | 4 | 0,018 |
| N de casos válidos | 30 | | |

Tabla 3: Prueba de χ^2 para las variables “tipo de regeneración” y “tipo de injerto utilizado en el defecto”. 6 casillas (66,7%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 2,00.

Puesto que más del 20% de las casillas tenían una frecuencia esperada menor que 5 se optó por agrupar las categorías de la variable “tipo de regeneración” recodificándola en completa (para los valores de regeneración ósea total) e incompleta (suma de los casos de regeneración parcial y no regeneración). A

continuación se presenta la comparación entre los diferentes grupos según esta nueva variable.

2.2 Análisis de las diferencias entre el tipo de regeneración y el relleno empleado en el defecto:

Comparación grupos “MATRIZ” – “MATRIZ + MO”:

Puesto que más del 20% de las casillas tenían una frecuencia esperada menor de 5 se realizó el test exacto de Fisher para evaluar la asociación de las variables sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p=0,141$).

| | TIPO DE REGENERACIÓN AGRUPADO | | Total |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|-------|
| | REGENERACIÓN INCOMPLETA | REGENERACIÓN COMPLETA | |
| MATRIZ | 9 | 1 | 10 |
| MATRIZ + MO | 5 | 5 | 10 |
| Total | 14 | 6 | 20 |

Tabla 4: Tabla de contingencia para los grupos “matriz” y “matriz + mo” en función del tipo de regeneración.

Comparación grupos “CONTROL”-“MATRIZ”:

Al igual que en la comparación previa, se elaboró una tabla de contingencia con la variable tipo de regeneración agrupada en dos categorías. El resultado del análisis tampoco fue estadísticamente significativo (Fisher; $p=1,000$).

| | TIPO DE REGENERACIÓN AGRUPADO | | Total |
|---------|-------------------------------|-----------------------|-------|
| | REGENERACIÓN INCOMPLETA | REGENERACIÓN COMPLETA | |
| CONTROL | 10 | 0 | 10 |
| MATRIZ | 9 | 1 | 10 |
| Total | 19 | 1 | 20 |

Tabla 5: Tabla de contingencia para las variables “control” y “matriz” en función del tipo de regeneración.

Comparación grupos “CONTROL”-“MATRIZ + MO”:

En este caso el análisis fue estadísticamente significativo ($p=0,033$).

| | TIPO DE REGENERACIÓN AGRUPADO | | Total |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|-------|
| | REGENERACIÓN INCOMPLETA | REGENERACIÓN COMPLETA | |
| CONTROL | 10 | 0 | 10 |
| MATRIZ + MO | 5 | 5 | 10 |
| Total | 15 | 5 | 20 |

Tabla 6: Tabla de contingencia para las variables "control" y "matriz + mo" en función del tipo de regeneración ósea.

En resumen se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de regeneración ósea obtenido y el tipo de relleno utilizado en el defecto óseo. Desglosando esas diferencias por grupos no se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos "control" y "matriz" ni al comparar "matriz" y "matriz + MO". En cambio sí se obtuvo significación estadística al comparar los grupos "control" y "matriz + MO".

3 ESTUDIOS DE CUANTIFICACIÓN:

3.1 Porcentaje de regeneración ósea:

3.1.1 Estudio descriptivo e inferencial:

En la tabla 7 se muestran los resultados de la estadística descriptiva para la variable porcentaje de regeneración, así como el cálculo de los intervalos de confianza de la media.

| | Meses | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---------|-------|----|-------|-------------------|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| | | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| CONTROL | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 10 | 2,21 | 3,10 | 0,98 | -0,01 | 4,42 | 0 | 8,54 |
| | 2 | 10 | 8,22 | 7,94 | 2,51 | 2,54 | 13,90 | 0 | 17,45 |
| | 3 | 10 | 13,31 | 12,67 | 4,01 | 4,25 | 22,37 | 0 | 28,28 |
| | 4 | 10 | 18,36 | 17,44 | 5,52 | 5,89 | 30,84 | 0 | 39,55 |
| | 5 | 10 | 19,10 | 18,43 | 5,83 | 5,91 | 32,28 | 0 | 43,67 |
| | 6 | 10 | 21,59 | 20,75 | 6,56 | 6,75 | 36,44 | 0 | 47,97 |
| MATRIZ | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 10 | 22,18 | 27,12 | 8,58 | 2,77 | 41,58 | 4,28 | 82,96 |
| | 2 | 10 | 29,21 | 27,51 | 8,70 | 9,53 | 48,89 | 5,08 | 86,74 |
| | 3 | 10 | 35,38 | 27,82 | 8,80 | 15,48 | 55,28 | 5,32 | 90,55 |
| | 4 | 10 | 41,06 | 26,44 | 8,36 | 22,14 | 59,97 | 6,64 | 91 |
| | 5 | 10 | 47,46 | 25,66 | 8,11 | 29,10 | 65,81 | 10,44 | 92,34 |
| | 6 | 10 | 52,95 | 26,99 | 8,53 | 33,64 | 72,26 | 14,87 | 99,39 |
| M+ MO | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | 10 | 47,52 | 32,82 | 10,38 | 24,04 | 71 | 0 | 96,89 |
| | 2 | 10 | 64,29 | 24,76 | 7,83 | 46,58 | 82,01 | 15,28 | 99,89 |
| | 3 | 10 | 67,92 | 25,09 | 7,93 | 49,98 | 85,87 | 17,91 | 100 |
| | 4 | 10 | 71,81 | 23,37 | 7,39 | 55,09 | 88,53 | 24,53 | 100 |
| | 5 | 10 | 74,25 | 23,84 | 7,54 | 57,20 | 91,31 | 22,41 | 100 |
| | 6 | 10 | 78,54 | 22,42 | 7,09 | 62,50 | 94,58 | 29,52 | 100 |

Tabla 7: Estadística descriptiva e inferencial del porcentaje de hueso regenerado en los grupos "control", "matriz" y "matriz+ MO".

A continuación se representa la evolución del porcentaje de regeneración en el tiempo mediante diagramas de cajas.

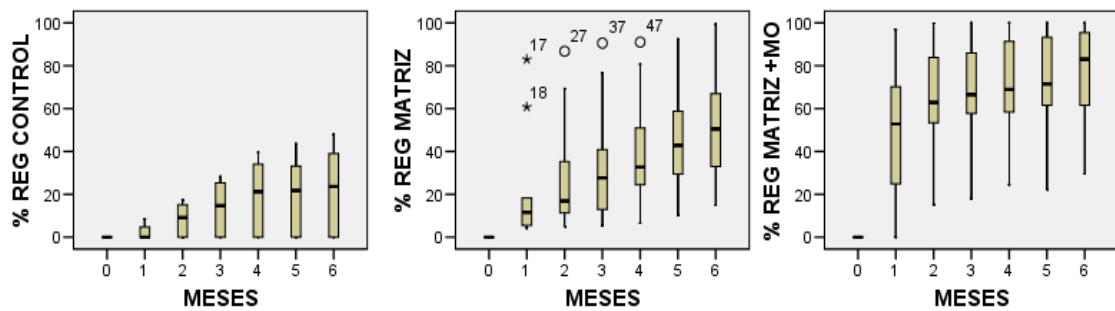


Figura 16: Representación gráfica mediante diagramas de cajas del porcentaje de hueso regenerado en los grupos "control", "matriz" y "matriz + MO".

3.1.2 Análisis de regresión:

Se construyeron modelos de regresión con el fin de calcular el porcentaje de regeneración en cada momento temporal. En el grupo control se observó que el porcentaje de regeneración fue nulo en el 51,43% de los casos, por lo que el efecto del tiempo parece no afectar al valor del porcentaje de regeneración ósea cuando el defecto se deja sin rellenar.

Sin embargo, en los grupos en los que se utilizó matriz y matriz con MO se obtuvieron modelos de regresión lineales simples cuyas fórmulas son:

$$\text{Log (\% reg matriz)} = 2,45 + 0,25 \text{ meses.}$$

$$\% \text{ reg matriz + MO} = 25,98 + 10,59 \text{ meses.}$$

Dichos modelos logran explicar un 21,9% y un 38,2% respectivamente del porcentaje de regeneración ósea en función del tiempo. Estos porcentajes no pueden considerarse elevados, lo que evidencia la existencia de otros factores, además del tiempo, que determinan e influyen en el valor del porcentaje de regeneración.

Una vez construido el modelo de regresión, tiene sentido plantearse cómo de correcto es el ajuste a los datos, es decir, si los valores predichos por el modelo reflejan de forma adecuada a los valores observados. A las diferencias entre los valores observados y los valores predichos o pronosticados por el modelo

se denominan errores o residuos, y es sobre éstos sobre los que se deben comprobar las hipótesis de normalidad, homocedasticidad e independencia para que el modelo sea adecuado. Tales hipótesis se comprobaron a través de los gráficos de diagnóstico siguientes.

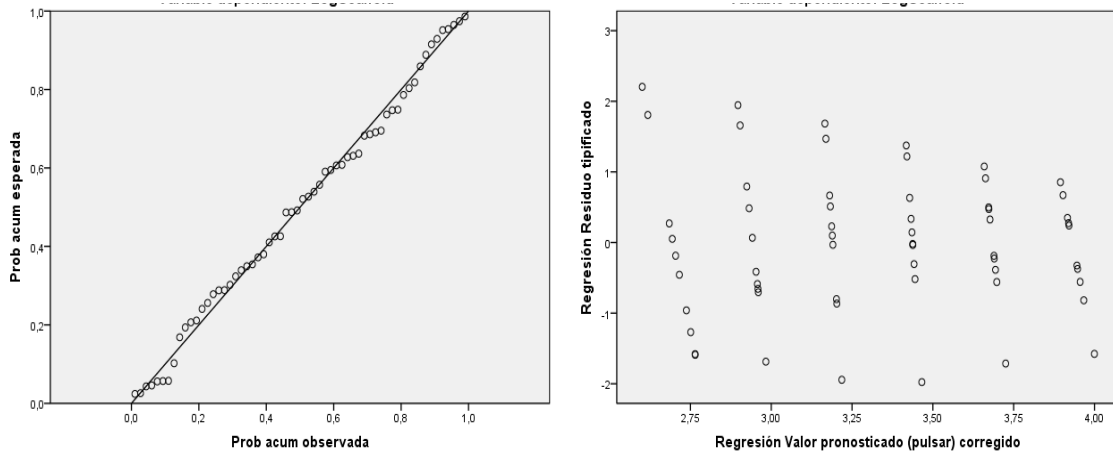


Figura 17: Gráficos de probabilidad normal y de valores pronosticados frente a residuos tipificados para la variable logaritmo de porcentaje de regeneración en el grupo “matriz”.

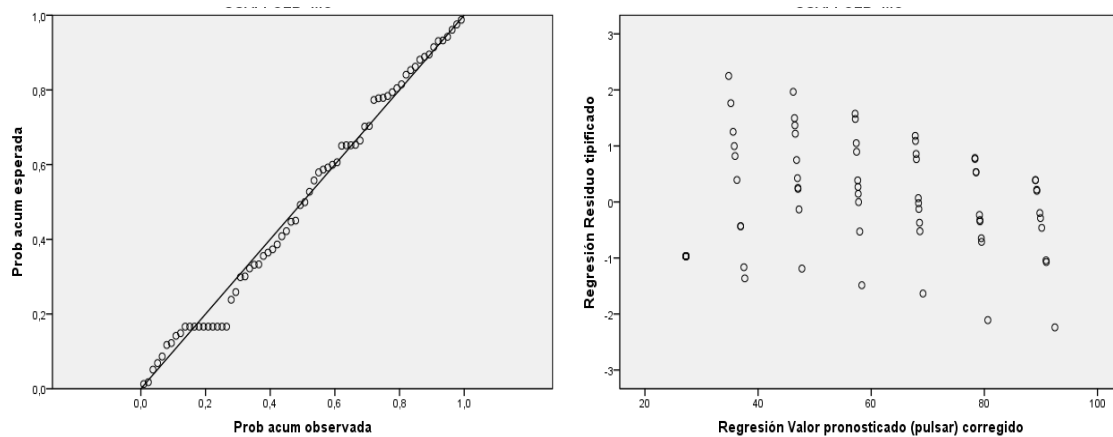


Figura 18: Gráficos de probabilidad normal y de valores pronosticados frente a residuos tipificados para la variable porcentaje de regeneración en el grupo “matriz + MO”.

3.1.3 Comparación entre los tres grupos de estudio en tiempos de seguimiento iguales:

Antes de comparar los tres grupos de estudio en cada una de las determinaciones temporales se realizaron pruebas para ver si cumplían los criterios de normalidad y de homocedasticidad. Para comprobar el primer

criterio se utilizó el test de Shapiro-Wilk por tratarse de un tamaño muestral “N” menor de 50.

| GRUPO | MESES | Shapiro-Wilk | | |
|-------------|-------|--------------|----|-------|
| | | Estadístico | gl | Sig. |
| CONTROL | 1 M | 0,75 | 10 | <0,05 |
| | 2 M | 0,77 | 10 | 0,01 |
| | 3 M | 0,79 | 10 | 0,01 |
| | 4 M | 0,78 | 10 | 0,01 |
| | 5 M | 0,80 | 10 | 0,01 |
| | 6 M | 0,80 | 10 | 0,02 |
| MATRIZ | 1 M | 0,69 | 10 | <0,05 |
| | 2 M | 0,79 | 10 | 0,01 |
| | 3 M | 0,87 | 10 | 0,09 |
| | 4 M | 0,90 | 10 | 0,21 |
| | 5 M | 0,95 | 10 | 0,70 |
| | 6 M | 0,96 | 10 | 0,75 |
| MATRIZ + MO | 1 M | 0,96 | 10 | 0,74 |
| | 2 M | 0,97 | 10 | 0,84 |
| | 3 M | 0,95 | 10 | 0,70 |
| | 4 M | 0,93 | 10 | 0,45 |
| | 5 M | 0,89 | 10 | 0,16 |
| | 6 M | 0,87 | 10 | 0,11 |

Tabla 8: Test de Shapiro-Wilk correspondiente al porcentaje de regeneración en el defecto para los grupos “control”, “matriz” y “matriz + MO”. (b) % REGENERACIÓN ÓSEA A LOS 0 MESES es una constante y se ha desestimado

Se realizó el test de Levene para determinar si se verificaba el supuesto de homogeneidad de las varianzas. Se comprobó que para nuestros datos se cumplía en los meses 2, 3, 4, 5 y 6.

| | Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|-----------|-----------------------|-----|-----|-------|
| % REG 0 M | . | 2 | . | . |
| % REG 1 M | 8,37 | 2 | 27 | <0,05 |
| % REG 2 M | 3,37 | 2 | 27 | 0,05 |
| % REG 3 M | 1,19 | 2 | 27 | 0,32 |
| % REG 4 M | 0,23 | 2 | 27 | 0,80 |
| % REG 5 M | 0,29 | 2 | 27 | 0,75 |
| % REG 6 M | 0,61 | 2 | 27 | 0,55 |

Tabla 9: Test de Levene aplicado a la variable porcentaje de regeneración para los grupos “control”, “matriz” y “matriz + MO” en las diferentes determinaciones temporales (Prueba de homogeneidad de varianzas).

Se cumplieron los criterios de normalidad y de homogeneidad de varianzas para la variable porcentaje de regeneración en las determinaciones de los meses 3, 4, 5 y 6 en el grupo “matriz” y en las determinaciones de los meses 2, 3, 4, 5 y 6 del grupo “matriz + MO”.

Como no se cumplieron dichos criterios de forma simultánea en los tres grupos de estudio en ninguna determinación temporal se aplicó un test no paramétrico (Kruskal–Wallis) para determinar la existencia de diferencias entre los tres grupos de estudio.

Estadísticos de contraste(a,b)

| | % REG 1 M | % REG 2 M | % REG 3 M | % REG 4 M | % REG 5 M | % REG 6 M |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Chi-cuadrado | 15,094 | 15,459 | 14,556 | 13,752 | 14,745 | 13,646 |
| gl | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sig. Asintót. | 0,001 | 0 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |

Tabla 10: Test de Kruskal-Wallis aplicado a los grupos "control", "matriz" y "matriz + MO" para la variable porcentaje de regeneración ósea en las diferentes determinaciones temporales.
Prueba de Kruskal-Wallis (b) Variable de agrupación: TIPO DE INJERTO.

Según los resultados obtenidos mediante el test de Kruskal–Wallis existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio en cada una de las determinaciones temporales estudiadas, excepto para la determinación a los 0 meses. Se realizó un test post-hoc (U de Mann-Whitney) para identificar entre qué pares de grupos había tales diferencias. En la tabla siguiente se muestra la significación estadística obtenida:

| | | Significación |
|-----------|---|-------------------------|
| % REG 1 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,024 <0,05 0,782 |
| % REG 2 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,295 <0,05 0,071 |
| % REG 3 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,201 <0,05 0,142 |
| % REG 4 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,401 0,001 0,086 |
| % REG 5 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,18 <0,05 0,151 |
| % REG 6 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,126 0,001 0,295 |

Tabla 11: Test post-hoc U de Mann-Whitney de comparaciones múltiples.

Se obtuvieron diferencias entre el grupo “control” y “matriz + MO” en todas las determinaciones temporales así como entre los grupos “control” y “matriz” en la primera determinación. El resto de comparaciones no resultaron estadísticamente significativas.

3.1.4 Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes en cada uno de los grupos:

Para comparar medias de una misma variable tomadas en diferentes momentos temporales en un mismo grupo se efectuó una prueba de significación global (análisis de la varianza de medidas repetidas).

Grupo “control”:

Inicialmente se efectuó la prueba de Mauchly para estimar el supuesto de “esfericidad” de varianzas. En este caso mostró que no se cumplía ($W=128,64$). Al comprobar la vulneración de este supuesto se ajustaron los grados de libertad del numerador y del denominador del estadístico F univariado mediante el estadístico epsilon. La prueba de efectos intrasujetos mostró diferencias estadísticamente significativas, lo que podría indicar que al menos una de las medias fuese diferente de las otras, o incluso más de dos o todas ellas (Greenhouse-Geisser con una significación de 0,008).

Posteriormente se realizaron pruebas de contrastes pareados ajustando el riesgo alfa al número de comparaciones mediante el método de Bonferroni y comparando el valor medio del porcentaje de relleno del defecto por hueso regenerado en cada intervalo temporal con el del intervalo inmediatamente siguiente. Se obtuvo así el grado de significación de cada comparación y el intervalo de confianza del 95% del valor de la diferencia observada.

Comparaciones por pares (b)
Medida: MEASURE_1

| (I) factor1 | (J) factor1 | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|-------------|-------------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1m | 0m | 2,21 | 0,98 | 1,00 | -1,89 | 6,30 |
| 2m | 0m | 8,22 | 2,51 | 0,20 | -2,27 | 18,71 |
| | 1m | 6,01 | 1,90 | 0,24 | -1,93 | 13,96 |
| 3m | 0m | 13,31 | 4,01 | 0,19 | -3,43 | 30,05 |
| | 1m | 11,10 | 3,36 | 0,19 | -2,92 | 25,12 |
| | 2m | 5,09 | 1,57 | 0,21 | -1,48 | 11,66 |
| 4m | 0m | 18,36 | 5,52 | 0,19 | -4,69 | 41,41 |
| | 1m | 16,16 | 4,87 | 0,19 | -4,18 | 36,50 |
| | 2m | 10,14 | 3,09 | 0,20 | -2,76 | 23,05 |
| | 3m | 5,05 | 1,84 | 0,47 | -2,62 | 12,73 |
| 5m | 0m | 19,10 | 5,83 | 0,20 | -5,26 | 43,45 |
| | 1m | 16,89 | 5,22 | 0,22 | -4,92 | 38,70 |
| | 2m | 10,88 | 3,44 | 0,24 | -3,51 | 25,26 |
| | 3m | 5,79 | 2,28 | 0,67 | -3,74 | 15,31 |
| | 4m | 0,73 | 0,56 | 1,00 | -1,60 | 3,07 |
| 6m | 0m | 21,59 | 6,56 | 0,20 | -5,83 | 49,01 |
| | 1m | 19,39 | 5,87 | 0,19 | -5,14 | 43,91 |
| | 2m | 13,37 | 4,19 | 0,23 | -4,13 | 30,88 |
| | 3m | 8,28 | 2,95 | 0,43 | -4,05 | 20,62 |
| | 4m | 3,23 | 1,26 | 0,64 | -2,03 | 8,49 |
| | 5m | 2,50 | 1,07 | 0,93 | -1,97 | 6,97 |

Tabla 12: Prueba de contrastes pareados del porcentaje de regeneración en el grupo "control".
Basadas en las medias marginales estimadas.
(a) Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni. (b) TIPO DE INJERTO = CONTROL

Como se observa en la tabla 12 no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de regeneración en cada mes y el inmediatamente posterior (ni siquiera entre el postoperatorio inmediato y el mes 6) por lo que se puede afirmar que los incrementos mensuales en el porcentaje de hueso regenerado en el grupo control si tienen lugar no son estadísticamente significativos.

Grupo "matriz":

Se comprobó la vulneración del supuesto de "esfericidad" de varianzas mediante la prueba de Mauchly ($W = 80,93$). Se ajustaron entonces los grados de libertad del numerador y del denominador del estadístico F univariado mediante el estadístico epsilon. A continuación se efectuó una prueba de

efectos intrasujetos. Al obtener resultados estadísticamente significativos se puede afirmar que al menos una de las medias es diferente de las otras, pudiendo serlo más de dos o incluso todas ellas (Greenhouse-Geisser con una significación menor de 0,05).

Al igual que en grupo control se realizaron pruebas de contrastes pareados para obtener el grado de significación de cada comparación y el intervalo de confianza del 95% del valor de la diferencia observada.

Comparaciones por pares(b)
Medida: MEASURE_1

| (I) factor1 | (J) factor1 | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|-------------|-------------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1m | 0m | 22,18 | 8,58 | 0,62 | -13,66 | 58,01 |
| 2m | 0m | 29,21 | 8,70 | 0,18 | -7,14 | 65,57 |
| | 1m | 7,04 | 1,95 | 0,12 | -1,12 | 15,20 |
| 3m | 0m | 35,38 | 8,80 | 0,06 | -1,38 | 72,14 |
| | 1m | 13,21 | 2,68 | 0,02 | 2,01 | 24,41 |
| | 2m | 6,17 | 1,38 | 0,03 | 0,42 | 11,92 |
| 4m | 0m | 41,06 | 8,36 | 0,02 | 6,12 | 76 |
| | 1m | 18,88 | 3,06 | <0,05 | 6,08 | 31,69 |
| | 2m | 11,84 | 1,95 | <0,05 | 3,70 | 19,99 |
| | 3m | 5,67 | 2,06 | 0,47 | -2,94 | 14,29 |
| 5m | 0m | 47,46 | 8,11 | 0,01 | 13,55 | 81,36 |
| | 1m | 25,28 | 4,36 | 0,01 | 7,05 | 43,51 |
| | 2m | 18,24 | 3,41 | 0,01 | 4,01 | 32,47 |
| | 3m | 12,07 | 3,69 | 0,20 | -3,33 | 27,47 |
| | 4m | 6,40 | 1,95 | 0,20 | -1,74 | 14,54 |
| 6m | 0m | 52,95 | 8,54 | <0,05 | 17,29 | 88,61 |
| | 1m | 30,77 | 4,88 | <0,05 | 10,37 | 51,18 |
| | 2m | 23,74 | 4,27 | 0,01 | 5,88 | 41,59 |
| | 3m | 17,57 | 4,64 | 0,09 | -1,82 | 36,95 |
| | 4m | 11,89 | 2,82 | 0,05 | 0,12 | 23,67 |
| | 5m | 5,49 | 1,25 | 0,04 | 0,28 | 10,71 |

Tabla 13: Prueba de contrastes pareados del porcentaje de regeneración en el grupo "matriz".
Basadas en las medias marginales estimadas. *La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.
(a)Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

Como se observa en la tabla 13 las diferencias estadísticamente significativas del porcentaje de regeneración con respecto al postoperatorio inmediato comenzaron a manifestarse a los cuatro meses. En lo que respecta a comparaciones entre determinaciones temporales consecutivas se observaron

diferencias entre los meses 3 y 2 y los meses 6 y 5 (aumentos del 0,42% y del 0,28% respectivamente como mínimo haciendo una interpretación conservadora del intervalo de confianza). El aumento del porcentaje se mantuvo de manera más o menos continua, observándose diferencias estadísticamente significativas hasta en el último intervalo temporal (entre los meses 5 y 6).

Grupo “matriz + MO”:

Puesto que no se cumplió el supuesto de esfericidad de la matriz de varianzas según el test de Mauchly ($W = 68,39$) se tuvo que realizar el ajuste epsilon. La prueba de efectos intrasujetos realizada rechazó la hipótesis nula por lo que se concluyó que al menos una de las medidas era diferente del resto (Greenhouse-Geisser con una significación menor de 0,05).

Al igual que en los grupos anteriores se realizaron pruebas de contrastes pareados ajustando el riesgo alfa mediante el método de Bonferroni.

Comparaciones por pares (b)
Medida: MEASURE_1

| (I) factor1 | (J) factor1 | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|-------------|-------------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1m | 0m | 47,52 | 10,38 | 0,03 | 4,14 | 90,89 |
| 2m | 0m | 64,29 | 7,83 | 0,00 | 31,57 | 97,02 |
| | 1m | 16,78 | 5,20 | 0,22 | -4,94 | 38,49 |
| 3m | 0m | 67,92 | 7,93 | 0,00 | 34,77 | 101,07 |
| | 1m | 20,41 | 5,36 | 0,09 | -2,00 | 42,81 |
| | 2m | 3,63 | 1,24 | 0,36 | -1,56 | 8,81 |
| 4m | 0m | 71,81 | 7,39 | 0,00 | 40,93 | 102,69 |
| | 1m | 24,29 | 5,64 | 0,04 | 0,74 | 47,84 |
| | 2m | 7,51 | 1,25 | 0,00 | 2,28 | 12,75 |
| | 3m | 3,89 | 1,30 | 0,32 | -1,53 | 9,30 |
| 5m | 0m | 74,25 | 7,54 | 0,00 | 42,75 | 105,76 |
| | 1m | 26,74 | 6,16 | 0,04 | 0,99 | 52,48 |
| | 2m | 9,96 | 1,91 | 0,01 | 1,99 | 17,92 |
| | 3m | 6,33 | 1,72 | 0,11 | -0,84 | 13,50 |
| | 4m | 2,45 | 0,99 | 0,76 | -1,70 | 6,59 |
| 6m | 0m | 78,54 | 7,09 | 0,00 | 48,92 | 108,17 |
| | 1m | 31,03 | 6,46 | 0,02 | 4,05 | 58,01 |
| | 2m | 14,25 | 2,65 | 0,01 | 3,19 | 25,31 |
| | 3m | 10,62 | 2,28 | 0,03 | 1,10 | 20,14 |
| | 4m | 6,74 | 1,85 | 0,11 | -0,98 | 14,45 |
| | 5m | 4,29 | 1,50 | 0,40 | -1,98 | 10,57 |

Tabla 14: Prueba de contrastes pareados del porcentaje de regeneración en el grupo "matriz + MO".
Basadas en las medias marginales estimadas. *La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.
(a)Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

Según la tabla 14 se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de regeneración entre el postoperatorio inmediato y el resto de las determinaciones temporales. No se observaron diferencias entre determinaciones temporales consecutivas. Hubo un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de regeneración ósea entre los meses 6 y 3, lo que indica que el porcentaje sigue aumentando significativamente a partir del mes 3. Sin embargo, a partir del mes 4 las diferencias no fueron significativas por lo que los incrementos en el relleno del defecto por hueso regenerado, si tienen lugar, no son apreciables.

3.1.5 Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes y los diferentes grupos:

Puesto que no se cumplió el supuesto de esfericidad de la matriz de varianzas según el test de Mauchly ($W=0,000$ $p \leq 0,05$) se tuvo que realizar el ajuste epsilon. Se concluyó que el factor tiempo tenía una influencia significativa (Greenhouse-Geisser $p \leq 0,05$), al igual que la interacción tiempo*grupo (Greenhouse-Geisser $p \leq 0,05$). Se valoró la prueba de efectos intersujetos, obteniéndose un efecto del grupo estadísticamente significativo ($F=14,82$; $p \leq 0,05$).

Por último, se presenta el resultado de comparar por pares los distintos grupos en cada momento temporal con la corrección de Bonferroni.

Comparaciones por pares

| tiempo | (I) grupo | (J) grupo | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|---------|--------------|-----------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1 mes | MO matriz | control | 45,31 | 11,02 | <0,05 | 17,18 | 73,45 |
| | | matriz | 25,34 | 11,02 | 0,09 | -2,79 | 53,48 |
| | | control | 19,97 | 11,02 | 0,24 | -8,17 | 48,10 |
| 2 meses | MO matriz | control | 56,07 | 9,77 | <0,05 | 31,13 | 81,02 |
| | | matriz | 35,08 | 9,77 | <0,05 | 10,13 | 60,03 |
| | | control | 20,99 | 9,77 | 0,12 | -3,96 | 45,94 |
| 3 meses | MO matriz | control | 54,61 | 10,21 | <0,05 | 28,55 | 80,67 |
| | | matriz | 32,54 | 10,21 | 0,01 | 6,48 | 58,60 |
| | | control | 22,07 | 10,21 | 0,12 | -3,99 | 48,14 |
| 4 meses | MO matriz | control | 53,44 | 10,16 | <0,05 | 27,50 | 79,39 |
| | | matriz | 30,75 | 10,16 | 0,02 | 4,81 | 56,69 |
| | | control | 22,69 | 10,16 | 0,10 | -3,25 | 48,64 |
| 5 meses | MO matriz | control | 55,16 | 10,22 | <0,05 | 29,07 | 81,24 |
| | | matriz | 26,8 | 10,22 | 0,04 | 0,71 | 52,88 |
| | | control | 28,36 | 10,22 | 0,03 | 2,28 | 54,44 |
| 6 meses | MO matriz | control | 56,95 | 10,53 | <0,05 | 30,09 | 83,82 |
| | | matriz | 25,60 | 10,53 | 0,07 | -1,27 | 52,46 |
| | | control | 31,36 | 10,53 | 0,02 | 4,49 | 58,22 |

Tabla 15: Comparación por pares en cada momento temporal. Corrección de Bonferroni
Medida: MEASURE_1 Basadas en las medias marginales estimadas. *La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05. (a)Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

En el primer mes solamente se observaron diferencias entre los grupos “control” y “matriz + MO”. Esta diferencia se mantuvo a lo largo del tiempo de seguimiento. En el segundo mes, además de la mencionada se observó diferencia entre los grupos “matriz” y “matriz + MO”. En los meses 3 y 4 se mantuvieron las mismas diferencias con valores de significación distintos. En el quinto mes se observaron diferencias en las tres comparaciones. Finalmente, en el sexto mes no se observaron diferencias en la comparación entre “matriz” y “matriz + MO”, si bien con un p valor no muy alejado del umbral preestablecido ($p=0,07$).

3.1.6 Resumen de los resultados de evolución temporal del porcentaje de regeneración ósea:

A continuación se muestran las curvas de evolución temporal del porcentaje de regeneración ósea en el defecto en cada uno de los grupos.

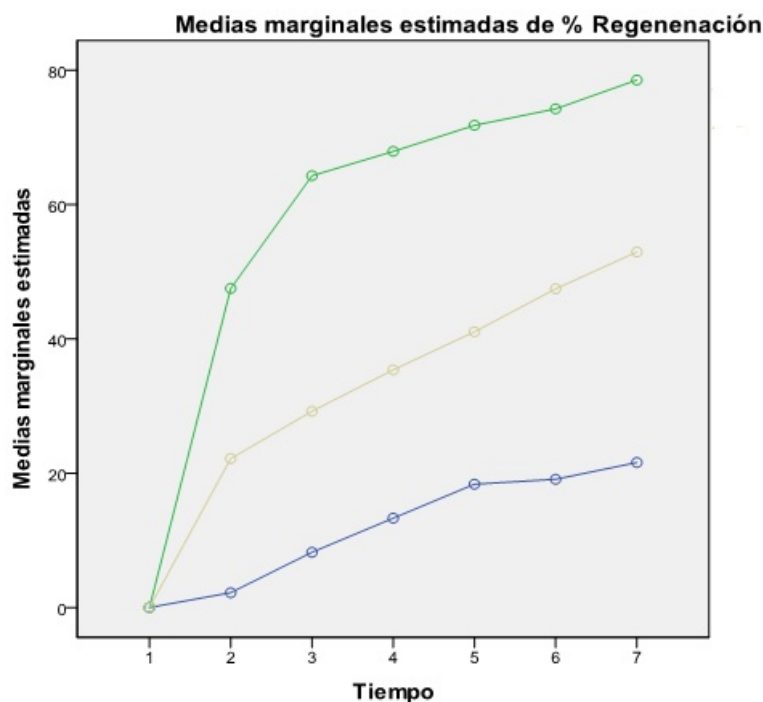


Figura 19: Evolución del porcentaje de regeneración en el defecto en el grupo “control” (azul), el grupo “matriz” (rojo) y “matriz + MO” (verde).

Por tanto el análisis de la evolución temporal del porcentaje de hueso regenerado en cada uno de los grupos puso de manifiesto que los incrementos en el porcentaje de regeneración observados en los grupos “matriz + MO” y “matriz” fueron estadísticamente significativos hasta el cuarto mes en el primer grupo y a partir del cuarto mes en el segundo.

Mientras que los valores observados en la variable porcentaje de regeneración ósea en el grupo “matriz + MO” fueron superiores de forma estadísticamente significativa a los del grupo “control” en todas las determinaciones temporales en el grupo “matriz” estas diferencias respecto al grupo “control” solamente se pusieron de manifiesto con seguimientos mayores (5 y 6 meses).

Es más, los incrementos en el porcentaje de regeneración ósea objetivado en el grupo “matriz + MO” fueron superiores a los observados en el grupo “matriz” en todas las determinaciones temporales, con diferencias estadísticamente significativas en prácticamente en todo el seguimiento (excepto en el primer y sexto mes).

3.2 Densidad en el defecto:

3.2.1 Estudio descriptivo e inferencial:

A continuación se muestran los resultados de la estadística descriptiva para la variable densidad ósea en el defecto, así como el cálculo de los intervalos de confianza de la media.

| | Meses | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|---------|-------|----|--------|-------------------|--------------|---|-----------------|--------|--------|
| | | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| CONTROL | 0 | 10 | 58,32 | 3,22 | 1,02 | 56,01 | 60,62 | 51,32 | 63,15 |
| | 1 | 10 | 65,60 | 8,90 | 2,81 | 59,24 | 71,97 | 53,71 | 82,36 |
| | 2 | 10 | 69,29 | 12,73 | 4,03 | 60,18 | 78,40 | 50,48 | 90,11 |
| | 3 | 10 | 74,94 | 19,10 | 6,04 | 61,27 | 88,60 | 49,34 | 103,99 |
| | 4 | 10 | 76,47 | 18,38 | 5,81 | 63,32 | 89,62 | 51,34 | 101,16 |
| | 5 | 10 | 78,35 | 17,38 | 5,49 | 65,92 | 90,78 | 54,84 | 101,66 |
| | 6 | 10 | 81,91 | 19,52 | 6,17 | 67,95 | 95,87 | 50,15 | 113,81 |
| MATRIZ | 0 | 10 | 58,90 | 1,62 | 0,51 | 57,74 | 60,05 | 56,31 | 61,46 |
| | 1 | 10 | 84,02 | 7,77 | 2,46 | 78,46 | 89,57 | 70,20 | 93 |
| | 2 | 10 | 91,17 | 6,78 | 2,14 | 86,32 | 96,02 | 75,12 | 101,76 |
| | 3 | 10 | 97,07 | 10,86 | 3,43 | 89,30 | 104,83 | 75,52 | 112,20 |
| | 4 | 10 | 99,79 | 11,85 | 3,75 | 91,32 | 108,27 | 77,56 | 120,07 |
| | 5 | 10 | 103,82 | 12,67 | 4,01 | 94,76 | 112,88 | 81,37 | 127,36 |
| | 6 | 10 | 108,59 | 13 | 4,11 | 99,30 | 117,89 | 83,46 | 130,47 |
| M+ MO | 0 | 10 | 58,67 | 4,18 | 1,32 | 55,68 | 61,66 | 52,09 | 66,98 |
| | 1 | 10 | 101,50 | 8,84 | 2,80 | 95,18 | 107,82 | 87,12 | 113,56 |
| | 2 | 10 | 115,55 | 17,79 | 5,63 | 102,82 | 128,28 | 88,69 | 141,30 |
| | 3 | 10 | 119,92 | 18,21 | 5,76 | 106,89 | 132,95 | 96,80 | 143,30 |
| | 4 | 10 | 122,32 | 17,66 | 5,58 | 109,69 | 134,95 | 103,53 | 145,26 |
| | 5 | 10 | 124,47 | 18,33 | 5,80 | 111,36 | 137,59 | 104,20 | 148,66 |
| | 6 | 10 | 126,96 | 18,33 | 5,79 | 113,85 | 140,07 | 107,96 | 150,89 |

Tabla 16: Estadística descriptiva e inferencial del valor de la densidad de hueso regenerado en los grupos "control", "matriz" y "matriz + MO".

En la siguiente figura se representa la evolución de la densidad en el tiempo mediante diagramas de cajas.

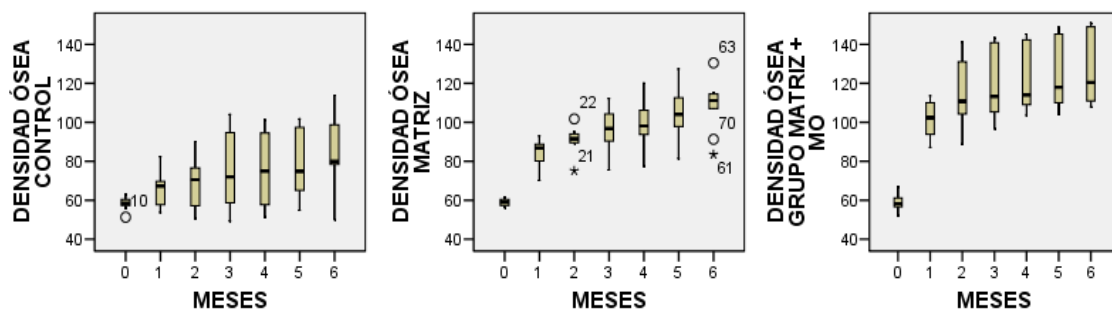


Figura 20: Representación gráfica mediante diagramas de la densidad de hueso regenerado en los grupos “control”, “matriz” y “matriz + MO”.

3.2.2 Análisis de regresión:

Se ejecutó un modelo de regresión lineal simple con el fin de calcular la evolución del valor de la variable densidad ósea a lo largo de los meses. Se obtuvieron las siguientes fórmulas o modelos de regresión lineal simples.

Densidad en el defecto (grupo “control”) = $61,04 + 3,69 \text{ meses}$.

Densidad en el defecto (grupo “matriz”) = $70,77 + 7,05 \text{ meses}$.

Densidad en el defecto (grupo “matriz + MO”) = $82,32 + 9,19 \text{ meses}$.

El porcentaje de la variabilidad de la densidad explicado por la regresión es de 19,2 % para el grupo “control”, de 60,2 % para el grupo “matriz” y de 46,2 % para el grupo “matriz + MO”.

Una vez construido el modelo de regresión, tiene sentido plantearse cómo de correcto es el ajuste a los datos, es decir, si los valores predichos por el modelo reflejan de forma adecuada a los valores observados. A las diferencias entre los valores observados y los valores predichos o pronosticados por el modelo se denominan errores o residuos, y es sobre éstos sobre los que se deben comprobar las hipótesis de normalidad, homocedasticidad e independencia para que el modelo sea adecuado. Tales hipótesis se comprobaron a través de los gráficos de diagnóstico siguientes.

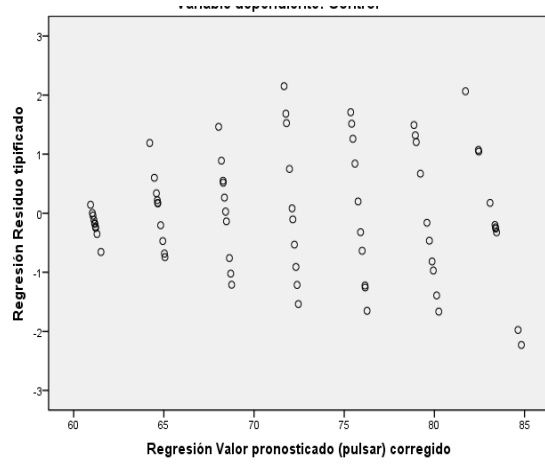
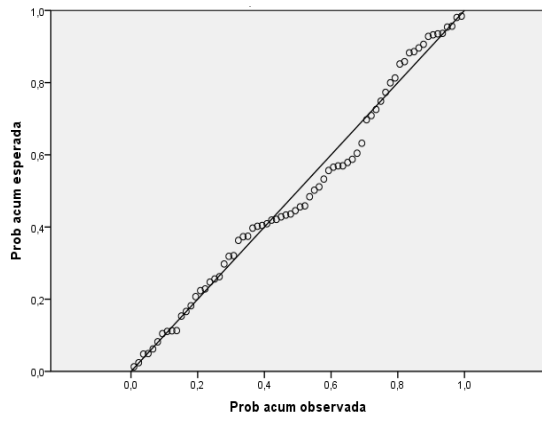


Figura 21: Gráficos de probabilidad normal y de valores pronosticados frente a residuos tipificados para la variable densidad ósea en el defecto en el grupo "control".

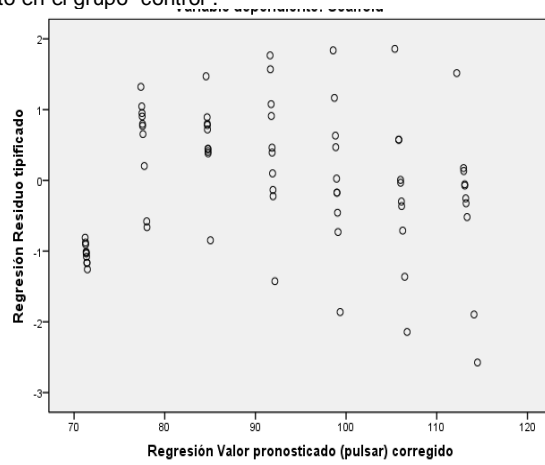
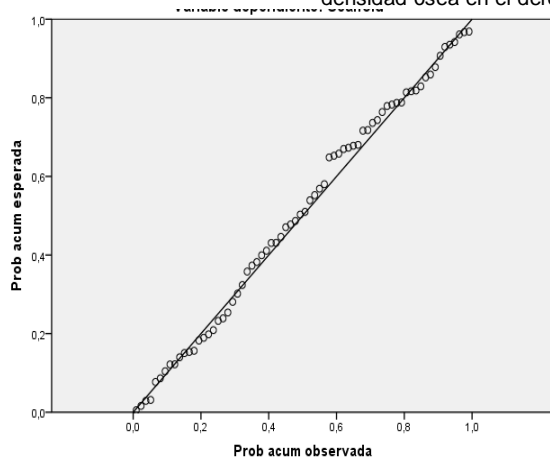


Figura 22: Gráficos de probabilidad normal y de valores pronosticados frente a residuos tipificados para la variable densidad ósea en el grupo "matriz".

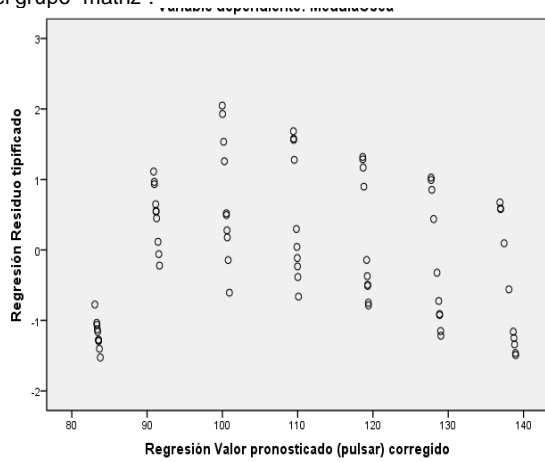
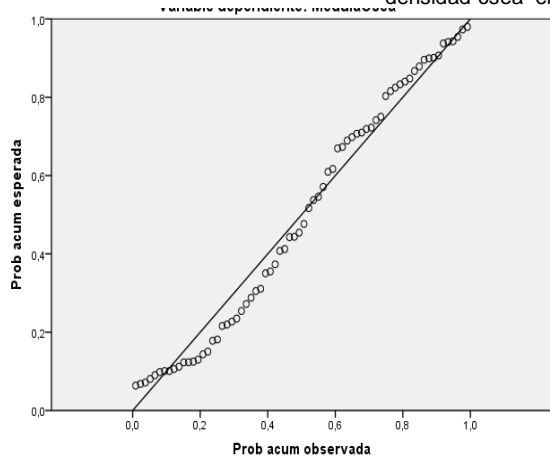


Figura 23: Gráficos de probabilidad normal y de valores pronosticados frente a residuos tipificados para la variable densidad ósea en el defecto en el grupo "matriz + MO".

3.2.3 Comparación entre los tres grupos de estudio en tiempos de seguimiento iguales:

Se aplicó el test de Shapiro-Wilk para comprobar en qué momentos temporales los valores de la variable seguían criterios de normalidad. Se observó dicho criterio ($p > 0,05$) en todas las determinaciones excepto en las de los meses 4 y 6 del grupo “matriz + MO”.

| GRUPO | MESES | Shapiro-Wilk | | |
|-------------|-------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. |
| CONTROL | 0 M | 0,95 | 10 | 0,64 |
| | 1 M | 0,95 | 10 | 0,69 |
| | 2 M | 0,97 | 10 | 0,85 |
| | 3 M | 0,94 | 10 | 0,59 |
| | 4 M | 0,92 | 10 | 0,38 |
| | 5 M | 0,92 | 10 | 0,32 |
| | 6 M | 0,93 | 10 | 0,48 |
| MATRIZ | 0 M | 0,97 | 10 | 0,91 |
| | 1 M | 0,85 | 10 | 0,05 |
| | 2 M | 0,85 | 10 | 0,06 |
| | 3 M | 0,97 | 10 | 0,84 |
| | 4 M | 0,98 | 10 | 0,98 |
| | 5 M | 0,98 | 10 | 0,93 |
| | 6 M | 0,89 | 10 | 0,19 |
| MATRIZ + MO | 0 M | 0,97 | 10 | 0,90 |
| | 1 M | 0,95 | 10 | 0,65 |
| | 2 M | 0,94 | 10 | 0,60 |
| | 3 M | 0,86 | 10 | 0,08 |
| | 4 M | 0,82 | 10 | 0,02 |
| | 5 M | 0,85 | 10 | 0,06 |
| | 6 M | 0,83 | 10 | 0,03 |

Tabla 17: Test de Shapiro-Wilk para la variable densidad ósea en el defecto correspondiente a los grupos “control”, “matriz” y “matriz + MO”.

(b) % REGENERACIÓN ÓSEA A LOS 0 MESES es una constante y se ha desestimado

A continuación se evaluó la homocedasticidad mediante el test de Levene. Dicha propiedad solamente se observó en las determinaciones de los meses 0, 1, 4, 5 y 6.

| | Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
|----------|-----------------------|-----|-----|------|
| DENS 0 M | 2,43 | 2 | 27 | 0,11 |
| DENS 1 M | 0,09 | 2 | 27 | 0,92 |
| DENS 2 M | 5,88 | 2 | 27 | 0,01 |
| DENS 3 M | 3,66 | 2 | 27 | 0,04 |
| DENS 4 M | 3,40 | 2 | 27 | 0,05 |
| DENS 5 M | 2,52 | 2 | 27 | 0,10 |
| DENS 6 M | 1,44 | 2 | 27 | 0,25 |

Tabla 18: Test de Levene aplicado a la variable densidad ósea en el defecto para los grupos "control", "matriz" y "matriz + MO" en las diferentes determinaciones temporales (Prueba de homogeneidad de variancias).

En las determinaciones en las que se cumplieron los criterios de normalidad y homocedasticidad se utilizaron test paramétricos (ANOVA de una vía) para determinar la existencia de diferencias de densidad en el defecto óseo en cada determinación temporal.

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|----------|--------------|-------------------|----|------------------|-------|-------|
| DENS 0 M | Inter-grupos | 1,71 | 2 | 0,86 | 0,08 | 0,919 |
| | Intra-grupos | 274,42 | 27 | 10,16 | | |
| | Total | 276,13 | 29 | | | |
| DENS 1 M | Inter-grupos | 6444,12 | 2 | 3222,06 | 44,42 | <0.05 |
| | Intra-grupos | 1958,39 | 27 | 72,53 | | |
| | Total | 8402,51 | 29 | | | |
| DENS 5 M | Inter-grupos | 10673,78 | 2 | 5336,89 | 20,06 | <0,05 |
| | Intra-grupos | 7184,77 | 27 | 266,10 | | |
| | Total | 17858,56 | 29 | | | |

Tabla 19: Prueba de ANOVA de un factor aplicado a los grupos "control", "matriz" y "matriz + MO" para la variable densidad ósea en el defecto.

En las determinaciones en las que se observaron diferencias se calculó el valor de las mismas con la prueba post-hoc de Bonferroni puesto que se cumplía el supuesto de homocedasticidad en todos los casos. De esta forma se pudo hacer una estimación conservadora del intervalo de confianza de las diferencias intergrupales en los casos en que aparecían.

Comparaciones múltiple

| Variable dependiente | (I) TIPO DE INJERTO | (J) TIPO DE INJERTO | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|--------------|-------|-------------------------------|---------|
| | | | | | | Lím sup | Lím inf |
| DENS 0 M Bonferroni | MATRIZ | CONTROL | 0,58 | 1,43 | 1 | -3,06 | 4,22 |
| | | MATRIZ + MO | 0,23 | 1,43 | 1 | -3,41 | 3,87 |
| | MATRIZ + MO | CONTROL | 0,35 | 1,43 | 1 | -3,29 | 3,99 |
| DENS 1 M Bonferroni | MATRIZ | CONTROL | 18,41 | 3,81 | <0,05 | 8,69 | 28,14 |
| | MATRIZ + MO | CONTROL | 35,90 | 3,81 | <0,05 | 26,17 | 45,62 |
| | | MATRIZ | 17,48 | 3,81 | <0,05 | 7,76 | 27,20 |
| DENS 5 M Bonferroni | MATRIZ | CONTROL | 25,47 | 7,30 | 0,01 | 6,85 | 44,09 |
| | MATRIZ + MO | CONTROL | 46,12 | 7,30 | <0,05 | 27,50 | 64,74 |
| | | MATRIZ | 20,65 | 7,30 | 0,03 | 2,03 | 39,27 |

Tabla 20: Test de comparaciones múltiples de la variable densidad en el defecto.

*La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las comparaciones múltiples realizadas con las determinaciones temporales de los meses 1 y 5. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para dichas comparaciones cuando se utilizaron las determinaciones tomadas en el postoperatorio inmediato.

Para las determinaciones temporales en las que no se cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad se utilizó una prueba no paramétrica (test de Kruskal-Wallis) para determinar la existencia de diferencias en la densidad ósea en el defecto.

Estadísticos de contraste(a,b)

| | DENS 2 M | DENS 3 M | DENS 4 M | DENS 6 M |
|---------------|----------|----------|----------|----------|
| Chi-cuadrado | 20,911 | 17,159 | 18,428 | 15,68 |
| gl | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Sig. asintót. | <0,05 | <0,05 | <0,05 | <0,05 |

Tabla 21: Test de Kruskal-Wallis aplicado a los grupos "control", "matriz" y "matriz + MO" para la variable densidad ósea en el defecto.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en todas las determinaciones temporales evaluadas. Se realizó un test post-hoc (U de Mann-Whitney) para identificar entre qué pares de grupos existían.

| | | Significación |
|----------|---|-------------------------|
| DENS 2 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,055 <0,05 0,081 |
| DENS 3 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,151 <0,05 0,087 |
| DENS 4 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,105 <0,05 0,087 |
| DENS 6 M | CONTROL - MATRIZ CONTROL - MATRIZ+MO MATRIZ - MATRIZ+MO | 0,038 <0,05 0,465 |

Tabla 22: Test post-hoc U de Mann-Whitney de comparaciones múltiples

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo “control” y “matriz + MO” en todas las determinaciones temporales, entre los grupos “control” y “matriz” en el mes 6, mientras que las comparaciones entre los grupos “matriz” y “matriz + MO” no fueron estadísticamente significativas en ninguna determinación temporal de las evaluadas.

3.2.4 Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes en cada uno de los grupos:

Grupo “control”:

Al igual que para la variable anterior, la prueba de Mauchly indicó que no se cumplía la hipótesis de esfericidad de la matriz de las varianzas ($\chi^2= 54,78$, $p \leq 0,05$) por lo que fue necesario realizar el ajuste epsilon. En las pruebas de efectos intrasujetos se observaron diferencias estadísticamente significativas para la prueba Greenhouse-Geisser ($p=0,003$) lo que podría indicar que al menos una de las medias era diferente de las otras, pudiendo serlo dos o más medias.

Comparaciones por pares (b)
Medida: MEASURE_1

| (I) factor1 | (J) factor1 | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|-------------|-------------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1m | 0m | 7,29 | 2,91 | 0,70 | -4,85 | 19,43 |
| 2m | 0m | 10,97 | 4,11 | 0,54 | -6,20 | 28,15 |
| | 1m | 3,69 | 1,65 | 1 | -3,21 | 10,58 |
| 3m | 0m | 16,62 | 6,02 | 0,47 | -8,55 | 41,79 |
| | 1m | 9,33 | 3,81 | 0,78 | -6,60 | 25,27 |
| | 2m | 5,65 | 2,52 | 1 | -4,89 | 16,18 |
| 4m | 0m | 18,15 | 5,88 | 0,27 | -6,42 | 42,72 |
| | 1m | 10,86 | 3,94 | 0,46 | -5,58 | 27,31 |
| | 2m | 7,18 | 2,65 | 0,51 | -3,90 | 18,25 |
| | 3m | 1,53 | 1,44 | 1 | -4,47 | 7,53 |
| 5m | 0m | 20,04 | 5,46 | 0,11 | -2,76 | 42,84 |
| | 1m | 12,75 | 3,39 | 0,09 | -1,41 | 26,91 |
| | 2m | 9,06 | 2,07 | 0,04 | 0,40 | 17,73 |
| | 3m | 3,42 | 1,10 | 0,26 | -1,16 | 8 |
| | 4m | 1,89 | 1,30 | 1 | -3,53 | 7,30 |
| 6m | 0m | 23,60 | 6,10 | 0,08 | -1,91 | 49,10 |
| | 1m | 16,31 | 3,78 | 0,04 | 0,51 | 32,11 |
| | 2m | 12,62 | 2,75 | 0,03 | 1,13 | 24,12 |
| | 3m | 6,97 | 2,19 | 0,23 | -2,16 | 16,11 |
| | 4m | 5,44 | 2,76 | 1 | -6,10 | 16,99 |
| | 5m | 3,56 | 2,29 | 1 | -6,02 | 13,14 |

Tabla 23: Prueba de contrastes pareados de la densidad en el defecto en el grupo "control".
Basadas en las medias marginales estimadas. *La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.
(a)Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni. (b)TIPO DE INJERTO CODIFICADO = CONTROL

Como puede comprobarse en la tabla 23 la prueba de contrastes pareados con ajuste mediante el de Bonferroni no mostró diferencias estadísticamente significativas entre la densidad de cada mes y la del inmediatamente siguiente.

En cambio sí se observaron diferencias significativas al comparar la densidad en el mes 6 con la de los meses 1 y 2 y al comparar la densidad entre el mes 5 y el 2. Sin embargo, éstas se deben interpretar con cierta cautela debido a que no se observaron diferencias significativas entre el mes 6 y el postoperatorio inmediato.

Grupo "matriz":

La prueba de esfericidad de Mauchly mostró de nuevo la vulneración de la hipótesis de esfericidad de la matriz de varianzas ($\chi^2= 40,324$; $p=0,008$) por lo

que se consideró la estimación de epsilon Greenhouse-Geisser que mostró resultados estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$); de esta forma se puede afirmar que al menos una de las medias es diferente de las otras pudiendo serlo de más de dos o incluso de todas ellas.

Comparaciones por pares (b)
Medida: MEASURE_1

| (I) factor1 | (J) factor1 | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|-------------|-------------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1m | 0m | 25,12 | 2,75 | <0,05 | 13,65 | 36,60 |
| 2m | 0m | 32,28 | 2,33 | <0,05 | 22,52 | 42,03 |
| | 1m | 7,15 | 2,74 | 0,59 | -4,29 | 18,60 |
| 3m | 0m | 38,17 | 3,68 | <0,05 | 22,80 | 53,54 |
| | 1m | 13,05 | 3,09 | 0,05 | 0,12 | 25,97 |
| | 2m | 5,90 | 2,37 | 0,73 | -4,01 | 15,80 |
| 4m | 0m | 40,9 | 3,97 | <0,05 | 24,33 | 57,47 |
| | 1m | 15,78 | 3 | 0,01 | 3,26 | 28,30 |
| | 2m | 8,62 | 3,03 | 0,41 | -4,05 | 21,30 |
| | 3m | 2,73 | 1,65 | 1 | -4,15 | 9,61 |
| 5m | 0m | 44,93 | 4,23 | <0,05 | 27,27 | 62,58 |
| | 1m | 19,8 | 3,55 | 0,01 | 4,96 | 34,65 |
| | 2m | 12,65 | 3,25 | 0,08 | -0,93 | 26,23 |
| | 3m | 6,75 | 2,35 | 0,39 | -3,08 | 16,58 |
| | 4m | 4,03 | 1,12 | 0,12 | -0,64 | 8,70 |
| 6m | 0m | 49,7 | 4,39 | <0,05 | 31,37 | 68,03 |
| | 1m | 24,58 | 3,48 | <0,05 | 10,05 | 39,10 |
| | 2m | 17,42 | 3,18 | 0,01 | 4,16 | 30,69 |
| | 3m | 11,53 | 2,54 | 0,03 | 0,92 | 22,14 |
| | 4m | 8,8 | 1,83 | 0,02 | 1,16 | 16,44 |
| | 5m | 4,77 | 1,37 | 0,14 | -0,94 | 10,49 |

Tabla 24: Prueba de contrastes pareados de la densidad en el defecto en el grupo "matriz".
Basadas en las medias marginales estimadas. *La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.
(a)Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

La prueba de contrastes pareados con ajuste del riesgo alfa al número de comparaciones mediante el método de Bonferroni no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los valores correspondientes a meses consecutivos (excepto entre el mes 1 y el postoperatorio inmediato).

Sin embargo sí se obtuvieron diferencias entre cada mes y el postoperatorio inmediato. También entre los meses 4 y 1; 5 y 1; 6 y 1, 2, 3, 4 y 5 meses. Estos resultados indican un progresivo aumento de la densidad ósea en el tiempo de forma lenta.

Grupo “matriz + MO”:

En este grupo en la prueba de esfericidad de Mauchly tampoco se cumplió la hipótesis de esfericidad de las varianzas ($\chi^2= 108,653$; $p\leq 0,05$) por lo que se consideró la estimación de epsilon Greenhouse-Geisser que mostró resultados estadísticamente significativos ($p\leq 0,05$); de esta forma se puede afirmar que al menos una de las medias es diferente de las otras pudiendo serlo de más de dos o incluso de todas ellas.

Comparaciones por pares (b)
Medida: MEASURE_1

| (I) factor1 | (J) factor1 | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|-------------|-------------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1m | 0m | 42,83 | 2,88 | <0,05 | 30,78 | 54,88 |
| 2m | 0m | 56,88 | 5,18 | <0,05 | 35,26 | 78,51 |
| | 1m | 14,05 | 3,79 | 0,10 | -1,80 | 29,91 |
| 3m | 0m | 61,25 | 5,36 | <0,05 | 38,83 | 83,67 |
| | 1m | 18,42 | 3,79 | 0,02 | 2,60 | 34,24 |
| | 2m | 4,37 | 1,17 | 0,10 | -0,51 | 9,25 |
| 4m | 0m | 63,65 | 5,12 | <0,05 | 42,25 | 85,06 |
| | 1m | 20,82 | 3,82 | 0,01 | 4,86 | 36,78 |
| | 2m | 6,77 | 1,42 | 0,02 | 0,82 | 12,72 |
| | 3m | 2,40 | 0,65 | 0,10 | -0,30 | 5,10 |
| 5m | 0m | 65,81 | 5,30 | <0,05 | 43,67 | 87,94 |
| | 1m | 22,98 | 4,07 | 0,01 | 5,99 | 39,96 |
| | 2m | 8,92 | 1,43 | <0,05 | 2,96 | 14,89 |
| | 3m | 4,56 | 0,74 | <0,05 | 1,45 | 7,66 |
| | 4m | 2,15 | 0,55 | 0,07 | -0,13 | 4,43 |
| 6m | 0m | 68,29 | 5,32 | <0,05 | 46,06 | 90,52 |
| | 1m | 25,46 | 4,11 | <0,05 | 8,27 | 42,65 |
| | 2m | 11,41 | 1,73 | <0,05 | 4,19 | 18,62 |
| | 3m | 7,04 | 0,94 | <0,05 | 3,12 | 10,96 |
| | 4m | 4,64 | 0,79 | 0,01 | 1,33 | 7,94 |
| | 5m | 2,48 | 0,42 | 0,01 | 0,74 | 4,23 |

Tabla 25: Prueba de contrastes pareados de la densidad en el defecto en el grupo “matriz + MO”.
Basadas en las medias marginales estimadas. *La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

(a)Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

La prueba de contrastes pareados con ajuste del riesgo alfa al número de comparaciones mediante el método de Bonferroni mostró diferencias estadísticamente significativas entre el valor de la densidad en todas las determinaciones temporales y el del postoperatorio inmediato. Se fueron obteniendo diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo,

pero hubo que esperar hasta los 6 meses para que se evidenciasen entre determinaciones consecutivas.

3.2.5 Comparaciones entre tiempos de seguimiento diferentes y los diferentes grupos:

Puesto que no se cumplió el supuesto de esfericidad de la matriz de varianzas según el test de Mauchly ($W=0,004$; $p\leq 0,05$) se tuvo que realizar el ajuste epsilon. Se concluyó que el factor tiempo tenía una influencia significativa (Greenhouse-Geisser $p\leq 0,05$), al igual que la interacción tiempo*grupo (Greenhouse-Geisser $p\leq 0,05$). Se valoró la prueba de efectos intersujetos, obteniéndose un efecto del grupo estadísticamente significativo ($F=24,40$; $p\leq 0,05$). Por último, se presenta el resultado de comparar por pares los distintos grupos en cada momento temporal utilizándose de nuevo la corrección de Bonferroni.

Comparaciones por pares
Medida: MEASURE_1

| tiempo | (I) grupo | (J) grupo | Diferencia entre medias (I-J) | Error típ. | Sig(a) | Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia(a) | |
|---------|--------------|-----------|-------------------------------|------------|--------|--|-----------------|
| | | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 0 meses | mo matriz | control | 0,35 | 1,43 | 1 | -3,29 | 3,99 |
| | | control | 0,58 | 1,43 | 1 | -3,06 | 4,22 |
| | | mo | 0,23 | 1,43 | 1 | -3,41 | 3,87 |
| 1 mes | mo matriz | control | 35,9 | 3,81 | <0,05 | 26,17 | 45,62 |
| | | matriz | 17,48 | 3,81 | <0,05 | 7,76 | 27,20 |
| | | control | 18,42 | 3,81 | <0,05 | 8,69 | 28,14 |
| 2 meses | mo matriz | control | 46,26 | 5,92 | <0,05 | 31,17 | 61,36 |
| | | matriz | 24,38 | 5,92 | <0,05 | 9,29 | 39,48 |
| | | control | 21,88 | 5,92 | <0,05 | 6,78 | 36,98 |
| 3 meses | mo matriz | control | 44,98 | 7,37 | <0,05 | 26,17 | 63,79 |
| | | matriz | 22,85 | 7,37 | 0,01 | 4,04 | 41,66 |
| | | control | 22,13 | 7,37 | 0,02 | 3,32 | 40,94 |
| 4 meses | mo matriz | control | 45,85 | 7,26 | <0,05 | 27,33 | 64,38 |
| | | matriz | 22,53 | 7,26 | 0,01 | 4 | 41,05 |
| | | control | 23,33 | 7,26 | 0,01 | 4,80 | 41,85 |
| 5 meses | mo matriz | control | 46,12 | 7,30 | <0,05 | 27,50 | 64,74 |
| | | matriz | 20,65 | 7,30 | 0,03 | 2,03 | 39,27 |
| | | control | 25,47 | 7,30 | 0,01 | 6,85 | 44,09 |
| 6 meses | mo matriz | control | 45,05 | 7,68 | <0,05 | 25,43 | 64,66 |
| | | matriz | 18,36 | 7,68 | 0,07 | -1,25 | 37,98 |
| | | control | 26,68 | 7,68 | 0,01 | 7,07 | 46,30 |

Tabla 26: Comparación por pares en cada momento temporal. Corrección de Bonferroni.
Basadas en las medias marginales estimadas. *La diferencia de las medias es significativa al nivel ,05.

Para la determinación en el postoperatorio inmediato no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las comparaciones.

En cambio, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las comparaciones múltiples entre la densidad ósea en el defecto de todas las determinaciones temporales excepto para la comparación de la determinación a los seis meses entre el grupo “matriz” y “matriz + MO”, si bien con un valor bastante cercano al umbral establecido (0,07).

3.2.6 Resumen de los resultados de evolución temporal de la densidad ósea en el defecto:

A continuación se muestran las curvas de evolución temporal de la densidad ósea en el defecto en cada uno de los grupos.

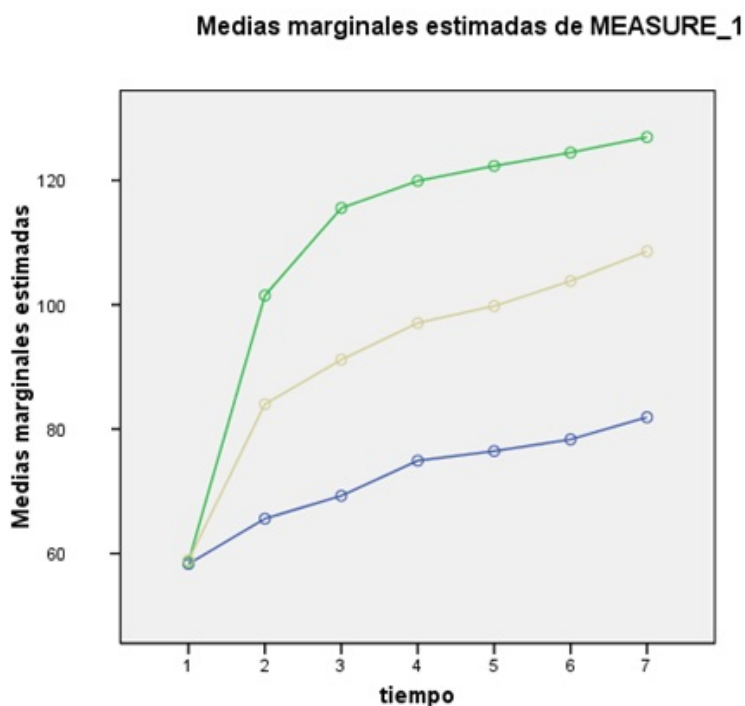


Figura 24: Evolución del valor de la densidad ósea en el defecto en el grupo "control" (azul), el grupo "matriz" (rojo) y "matriz + MO" (verde).

Por tanto, el análisis de la evolución temporal de la variable densidad ósea medida en el defecto puso de manifiesto que los valores observados fueron superiores en los grupos "matriz" y "matriz + MO" con respecto al grupo "control" en todas las determinaciones temporales excepto para las observadas, como cabe esperar en el postoperatorio inmediato. Estas diferencias, además, fueron estadísticamente significativas.

Se observó un aumento progresivo y estadísticamente significativo de la densidad ósea en los grupos "matriz" y "matriz + MO" a lo largo del tiempo.

Es más, los incrementos en los valores de la densidad ósea en el defecto observados fueron superiores y con diferencias estadísticamente significativas en el grupo “matriz + MO” respecto al grupo “matriz”, estancándose dicha significación a los seis meses.

Por tanto el efecto que tiene el tiempo sobre la densidad ósea en el defecto es distinto según el grupo estudiado.

4 ESTUDIO HISTOLÓGICO MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA ÓPTICA:

4.1 Grupo “control”:

En este grupo se observó la ausencia de unión ósea entre los extremos de la osteotomía (figura 25) Tan sólo se apreció una pequeña cantidad de hueso cortical obliterando la cavidad medular en los extremos del defecto, así como una sinostosis radiocubital madura a expensas de la osificación de la membrana interósea. La zona central del defecto se encontraba ocupada por tejido fibroso y músculo que penetraban desde el tejido circundante (figura 26).

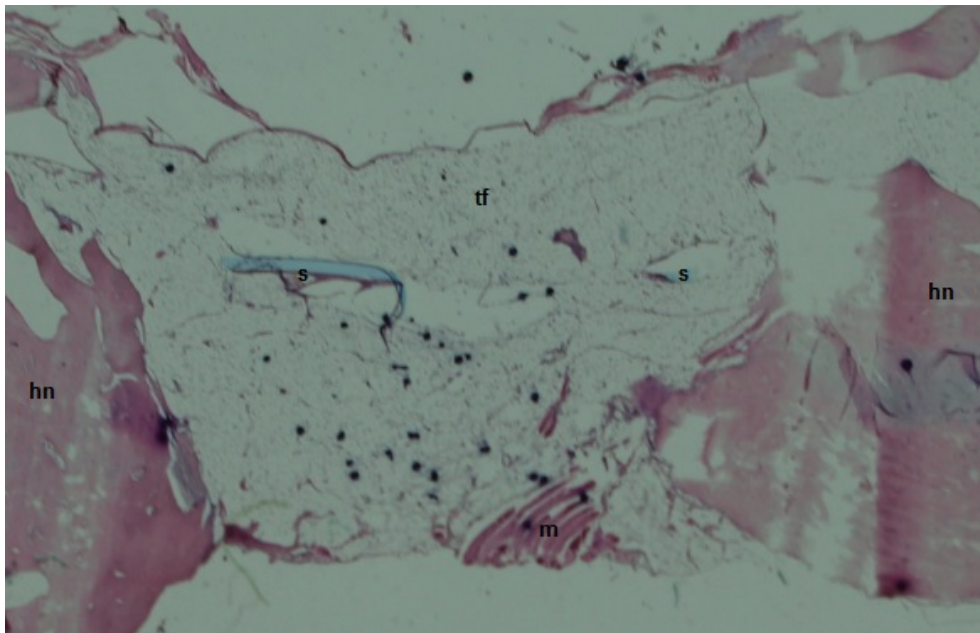


Figura 25: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina de foto con aumento x10. Se aprecian los extremos de las osteotomías con tejido fibroso interpuesto y ausencia de unión ósea entre los mismos (hn=hueso normal, tf=tejido fibroso, m=músculo, s=sutura de sujeción de la matriz en los extremos de la osteotomía).

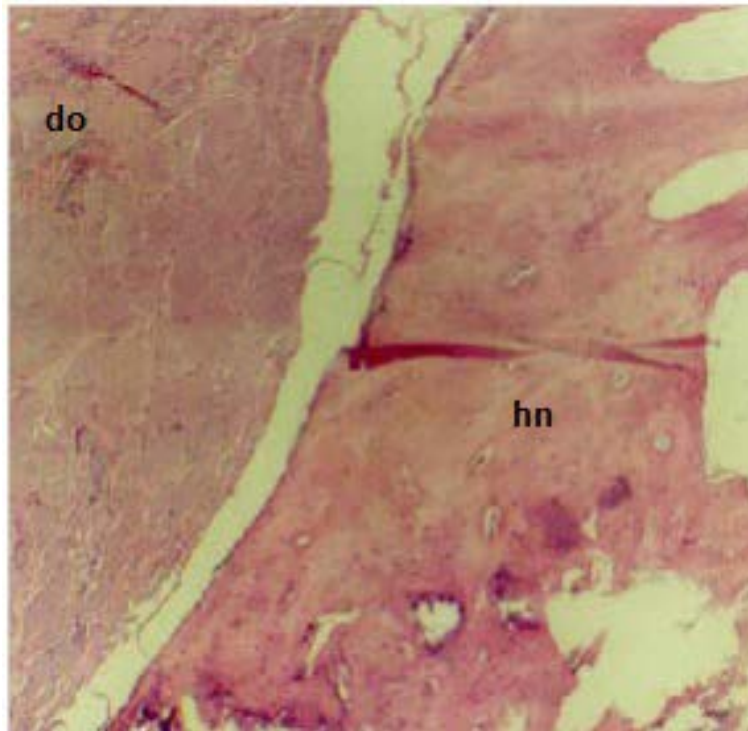


Figura 26: Imagen histológica con tinción hematoxilina-eosina a nivel del extremo de un defecto control (do= defecto óseo, hn=hueso normal de los extremos del defecto óseo).

4.2 Grupos experimentales (“matriz” y “matriz + MO”):

4.2.1 Hueso regenerado:

Regeneración ósea parcial:

Se observó un crecimiento desde los extremos del defecto óseo (marcados en nuestro trabajo por las suturas de polipropileno azul utilizadas para sujetar la matriz) con una morfología en punta de flecha con la base hacia el extremo óseo cortado. En la zona del defecto se objetivó la presencia de restos de matriz en distintas fases de reabsorción junto con tejido poco diferenciado, ricamente vascularizado de características mesenquimales (figura 27).

En este patrón de regeneración ósea parcial el proceso de calcificación dejó de progresar hacia el centro del defecto óseo sin que se estableciera la continuidad entre los extremos del defecto óseo. El osteoide constituía un tejido

desorganizado en un buen número de zonas, formándose hueso plexiforme en vez de lamelar, generando fibrosis (figura 28).

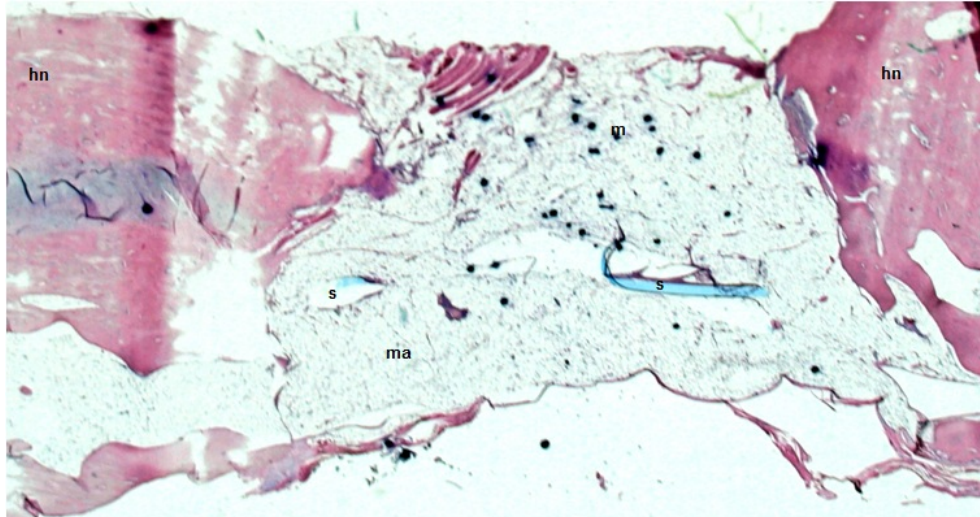


Figura 27: Imagen histológica de regeneración ósea parcial. Tinción hematoxilina-eosina y aumento x10. (Hn=hueso normal o nativo, ma=matriz, s=sutura, m=tejido mesenquimal)

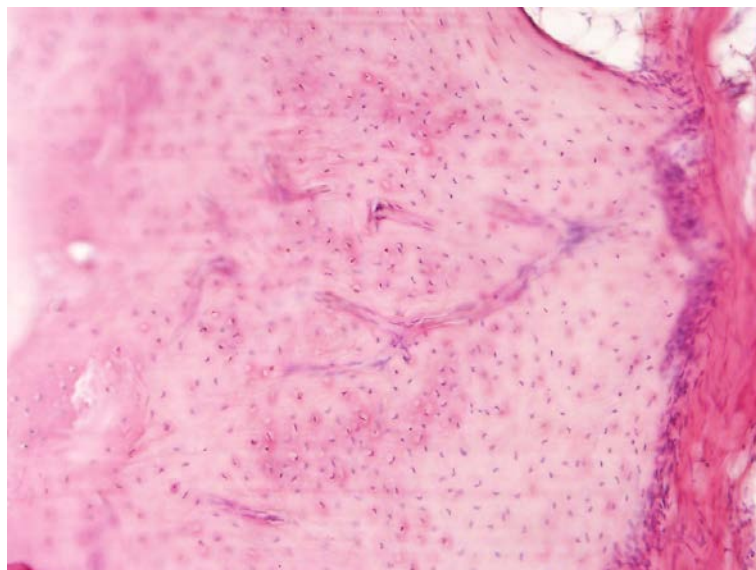


Figura 28: Imagen histológica con tinción hematoxilina-eosina y con una aumento 100x en la que se objetiva hueso plexiforme inmaduro observado en los frentes de mineralización.

Regeneración ósea completa:

En las patas que experimentaron regeneración ósea total el defecto óseo se encontró prácticamente ocupado en su totalidad por hueso trabecular inmaduro

con áreas de tejido medular variables (figura 29). Se observaron grupos de células de núcleo grande intensamente basófilo rodeadas de matriz inmadura, signo de actividad osteoblástica (figura 30).

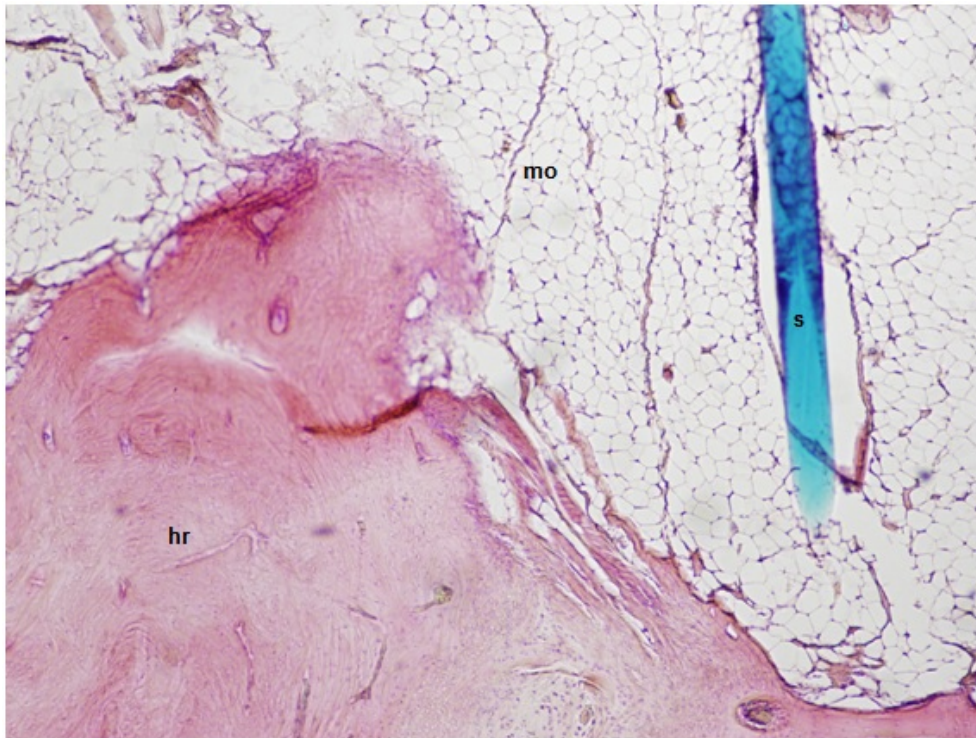


Figura 29: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina y con un aumento 100x en la que se observa el extremo de la osteotomía (hr=hueso regenerado, s=sutura, mo=médula ósea).

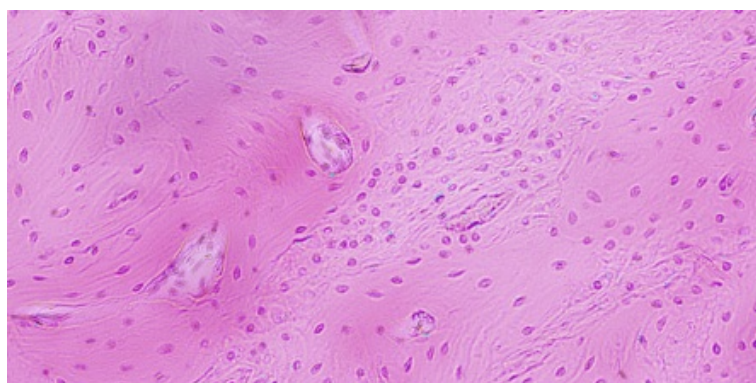


Figura 30: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina y con un aumento 100x en la que se puede observar tejido óseo inmaduro con actividad fundamentalmente osteoblástica.

Incluso se llegó a observar un patrón cortico medular muy parecido al del hueso normal, con restablecimiento de la continuidad entre la cortical y la

medular de los extremos del defecto (figura 31). El hueso medular presentó características normales con presencia de adipocitos así como células hematopoyéticas (figuras 32 y 33).

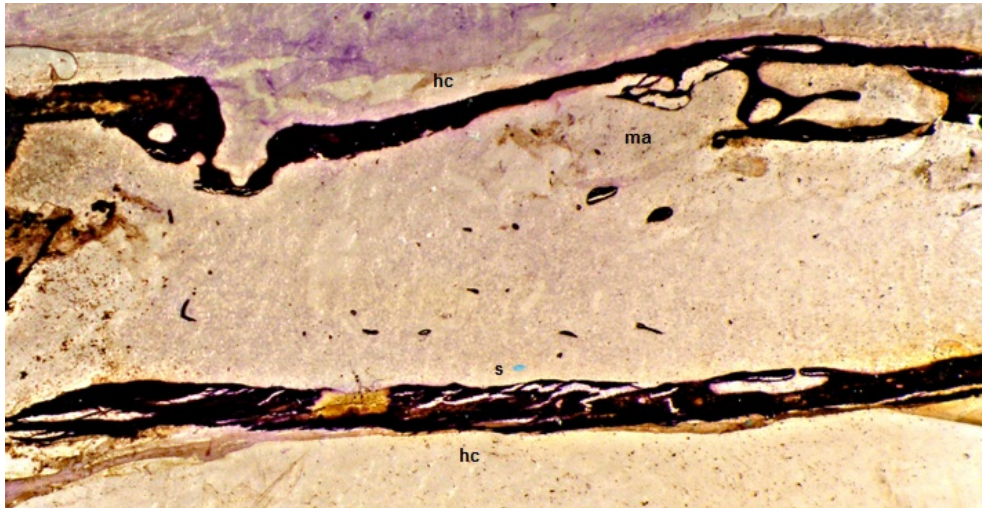


Figura 31: Imagen histológica con tinción de Von Kossa y con un aumento de 10x en la que se aprecia un patrón de regeneración ósea completa con la restitución de un patrón cortico medular normal (ma=matriz, hc= hueso cortical regenerado, s=sutura)

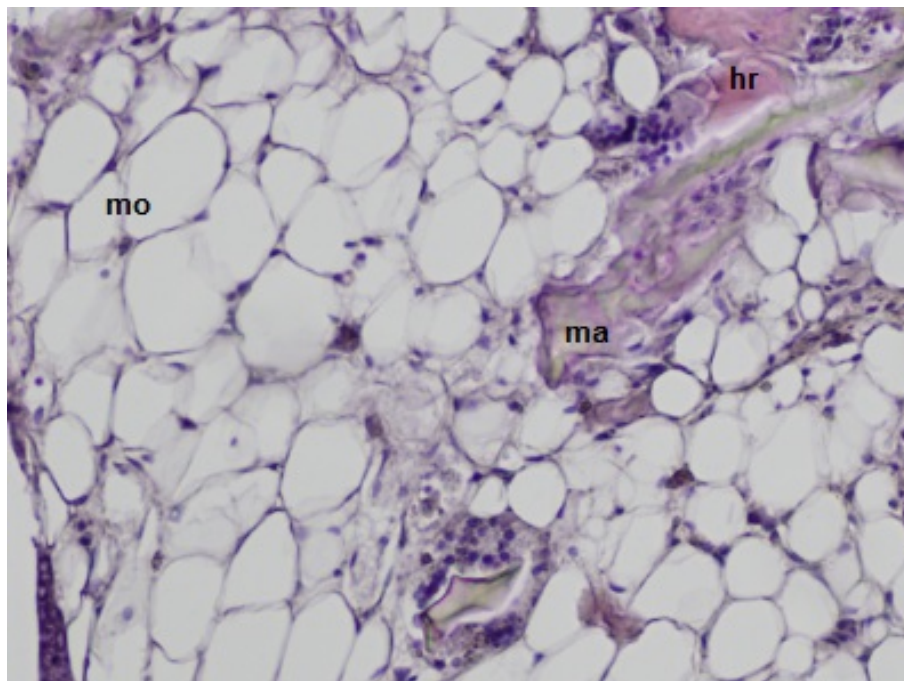


Figura 32: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina y con un aumento 200x en la que se observa una estructura ósea medular normal (hr=hueso regenerado, ma=restos de matriz, mo=médula ósea).



Figura 33: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina y con un aumento 200x en la que se observa el corte de un vaso sanguíneo con células hemáticas en el espesor de tejido regenerado (hr=hueso regenerado, ch=células hematopoyéticas, e=endotelio).

4.2.2 Unión entre hueso regenerado y “matriz”:

En los cortes histológicos no se encontró ninguna capa de tejido interpuesta entre la matriz y el tejido óseo circundante. Se apreció en cambio una unión directa entre la matriz, en forma de trazas remanentes teñidas de rosa pálido y el hueso regenerado (figura 34 y 35).

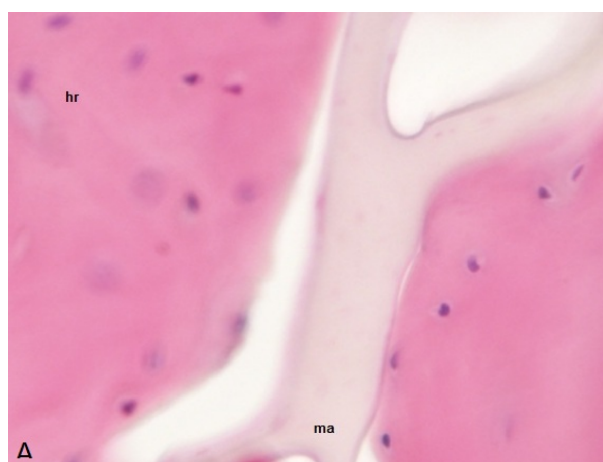


Figura 34: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina y con aumento 400x. Se observa contacto directo entre los restos de la matriz y el tejido óseo regenerado (hr=hueso regenerado, ma=restos de matriz, mo=médula ósea).

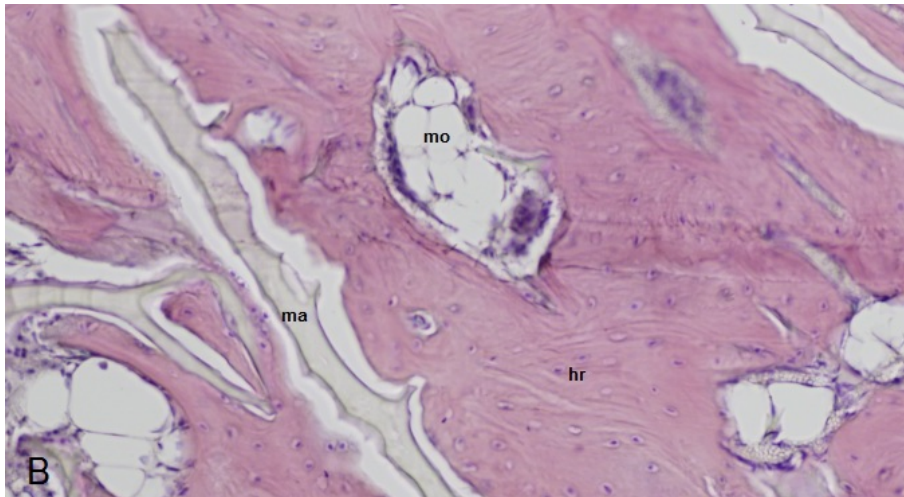


Figura 35: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina y con aumento 100x. Se observa el contacto directo entre los restos de matriz y el tejido óseo regenerado (hr=hueso regenerado, ma=restos de matriz, mo=médula ósea).

Alrededor de la matriz se observaron imágenes compatibles con el proceso de reabsorción de la misma ya que se encontraron estructuras o agrupaciones celulares compatibles con células gigantes multinucleadas (figuras 36, 37, 38 y 39).

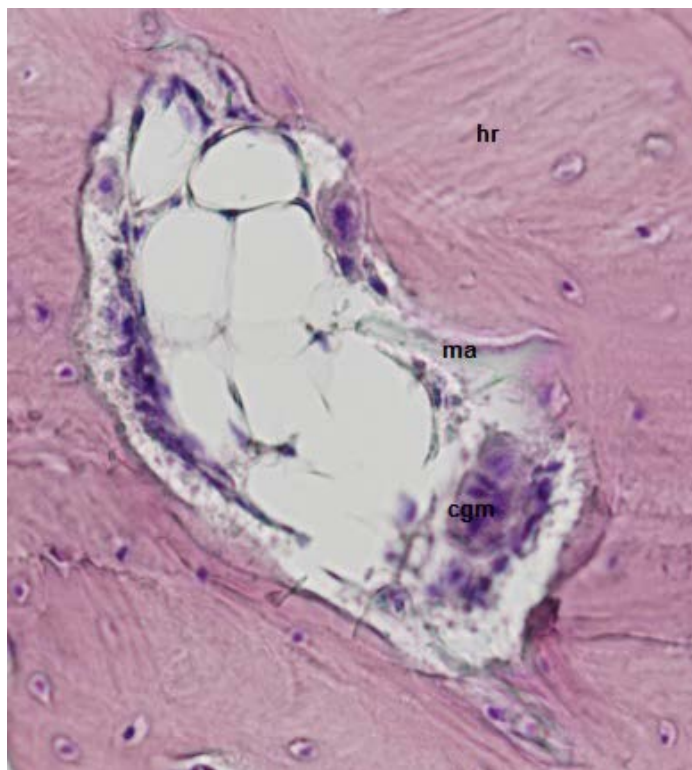


Figura 36: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina de una célula gigante multinucleada a un aumento de 200x (hr=hueso regenerado, ma=matriz, cgm=célula gigante multinucleada).

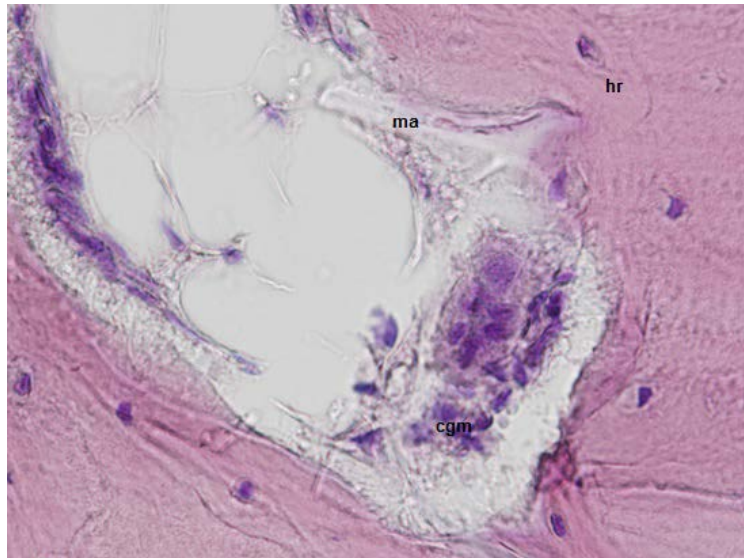


Figura 37: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina de una célula gigante multinucleada a un aumento de 400x (hr=hueso regenerado, ma=matriz, cgm=célula gigante multinucleada).

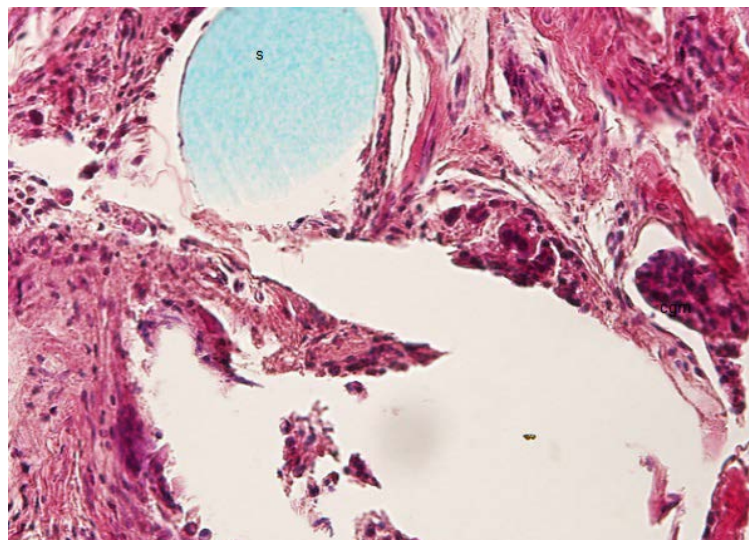


Figura 38: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina a un aumento de 200x donde se observan células gigantes multinucleadas (s=sutura, cgm=célula gigante multinucleada, mo=médula ósea, ma=matriz).

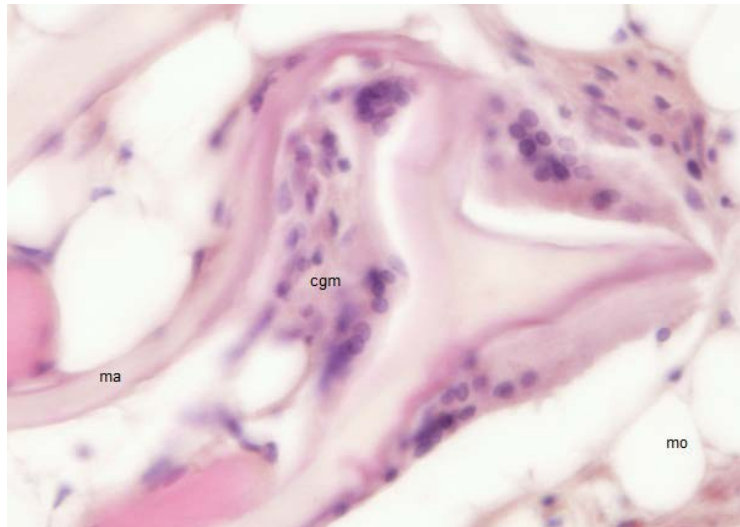


Figura 39: Imagen histológica con tinción de hematoxilina-eosina a un aumento de 400x donde se observan células gigantes multinucleadas (s=sutura, cgm=célula gigante multinucleada, mo=médula ósea, ma=matriz).

Sin embargo, como hemos comentado anteriormente no se encontró una interfaz definida entre la matriz y el hueso regenerado ni otras formas de reacción inflamatoria celular que pusieran de manifiesto respuestas a cuerpo extraño a la misma.

DISCUSIÓN

1 DISCUSIÓN GENERAL:

La reparación de defectos óseos supone aún hoy en día un reto para los cirujanos reconstructivos. Los progresos alcanzados en la cirugía han ampliado las posibilidades en el tratamiento tanto de los reemplazos articulares como de los tumores óseos y traumatismos, a menudo con la necesidad de abordar defectos óseos de gran tamaño.

El **injerto óseo autólogo** está considerado el patrón oro en el tratamiento de los defectos esqueléticos (Hausamen and Neukam,1992; Neukam et al., 1994) pero la cantidad necesaria para tratar los defectos suele estar limitada por la constitución del paciente y la morbilidad que estos procedimientos causan y el procedimiento de obtención precisa una cirugía adicional con riesgo de infección, daño local y muy frecuentemente dolor crónico o perdurable durante tiempo para el paciente (Ahlmann et al., 2002; Nkenke et al., 2004). No obstante, existen diferentes opciones para abordar dichas situaciones (**aloinjerto óseo, osteogénesis por distracción, técnica de Masquelet, sustitutos óseos, factores de crecimiento, células autólogas**) pero ninguna está exenta de inconvenientes (Gamradt SC et al., 2003; Lambiris E et al., 2004; Masquelet AC et al., 2000; Paley D et al., 2000). Por tanto, nos parece relevante el estudio de alternativas para el tratamiento de dichos defectos. Existen técnicas de uso preferentemente experimental como la regeneración ósea guiada, la Ingeniería Tisular o la terapia génica (Gamradt SC et al., 2003; Schmelzeisen et al., 2011) que están ofreciendo resultados prometedores.

La **Ingeniería Tisular** es un intento de recrear la biología de un tejido. En el caso de la cirugía ortopédica y traumatología dicho tejido trataría de remedar las características del autoinjerto óseo. Esto se podría conseguir aportando una matriz osteoconductora, proteínas osteoinductoras y células osteogénicas. Las estrategias de Ingeniería Tisular en ortopedia podrían combinar el empleo de polímeros, sustitutos óseos, proteínas recombinantes, células troncales mesenquimales y/o estrategias de transferencia génica para crear un equivalente de injerto óptimo para la regeneración ósea (Gamradt SC et al., 2003).

Las **matrices** (“scaffolds” en la literatura anglosajona) desempeñan un papel esencial apoyando la formación ósea. Además de presentar una estructura tridimensional que imite la arquitectura ósea deben cumplir unas características concretas que las hagan adecuadas como componentes esenciales en las estrategias de Ingeniería Tisular, que son la biocompatibilidad, la porosidad, un tamaño concreto del poro, poseer ciertas propiedades de superficie, osteoinductividad y ciertas propiedades mecánicas).

Se han desarrollado varias matrices, entre las que se incluyen materiales aloplásticos (polimetilmetacrilato, polietileno poroso), la hidroxiapatita, el fosfato tricálcico y los hidrogeles (derivados u obtenidos a partir del plasma). Independientemente de su utilidad o sus ventajas, como cuerpos extraños, los materiales aloplásticos tienen desventajas inherentes además de tasas más elevadas de infección y de extrusión (Salgado AJ et al., 2004). Por el contrario, los hidrogeles son un tipo de biomateriales que tienen una gran potencialidad como andamiajes o matrices y se han utilizado en muchas aplicaciones de Ingeniería Tisular. Su principal ventaja es la producción a partir de la propia sangre del paciente, lo que habilita su uso como una matriz autóloga sin los riesgos de infección o de rechazo. La principal desventaja para la reconstrucción y reparación de defectos óseos es su baja resistencia mecánica (Ahmed TA et al., 2008).

El Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias ha desarrollado un procedimiento de obtención de estructuras tridimensionales para Ingeniería Tisular a partir de albúmina plasmática (Jorcano JL et al., 2002). Los resultados de los estudios “in vitro” e “in vivo” en territorio maxilofacial fueron publicados por Gallego et al (Gallego G et al., 2006; Gallego L et al., 2007; Gallego L et al., 2008; Gallego Lopez L, 2009; Gallego L et al, 2010). Este grupo investigador evaluó el comportamiento “in vitro” de cultivos de osteoblastos obtenidos a partir de hueso mandibular humano en dicha matriz proteica. Estudiaron la evolución (comportamiento histológico, histoquímico e inmunohistoquímico) de dichos cultivos celulares en el dorso de ratones atímicos (nu/nu) tras 75 y 150 días de injerto y finalmente analizaron la capacidad de reparación ósea de esta estrategia de Ingeniería Tisular en defectos críticos mandibulares realizados en

ratas inmunoincompetentes (rnu/rnu) sacrificadas a los 35, 56 y 77 días del injerto.

Esta matriz proteica desarrollada, probada y patentada en los trabajos mencionados tiene un tamaño de poro que oscila entre los 150-300 μm , que según se pudo constatar con los análisis realizados con microscopía electrónica de barrido permitió el crecimiento osteoblástico y la producción de matriz mineralizada, tanto “in vitro” como “in vivo”. Cabría suponer que este tamaño de poro estaría en el límite apropiado para permitir la neovascularización pero los estudios histológicos desarrollados sobre los injertos procedentes del dorso de los ratones así como los procedentes de los defectos mandibulares de las ratas ponen en evidencia la presencia de vasos en las zonas injertadas.

La consistencia esponjosa pero firme de la matriz desarrollada permitió su utilización en injertos subcutáneos e incluso en defectos óseos. Ésta resulta una ventaja indiscutible de esta matriz sobre el resto de hidrogeles, además de su barata y fácil elaboración y la posibilidad de desarrollarlo de forma totalmente autóloga en el futuro.

Los resultados de este grupo investigador tras mantener los osteoblastos en el soporte tridimensional durante cuatro semanas evidenciaron una correcta penetración de las células en el mismo, observando la presencia de células con intensa basofilia de caracterización osteoblástica en capas superficiales y profundas. La tinción de fosfatasa alcalina resultó intensamente positiva a las cuatro semanas coexistentes con abundantes depósitos nodulares mineralizados en la tinción de von Kossa. Así estos resultados sugieren la presencia de células en diferentes estadios de diferenciación capaces de expresar marcadores de fenotipo osteoblástico y de matriz ósea ya mineralizada.

El injerto de los cultivos celulares sobre soportes tridimensionales en el dorso de los ratones mostró histoquímica e inmunohistoquímicamente en los estudios referenciados una neoformación ósea, cuyo grado de mineralización dependía del tiempo de aplicación del injerto si bien era independiente del tipo de suero empleado (humano versus bovino) en el desarrollo del cultivo.

Finalmente, los defectos críticos mandibulares de las ratas mostraron histoquímica e inmunohistoquímicamente una progresiva formación ósea. A los 77 días del injerto la mineralización del defecto era casi total, las imágenes de TC mostraron un cierre del defecto crítico injertado con persistencia del defecto control. El análisis densitométrico de las tomografías reveló un significativo aumento de la densidad ósea de los defectos críticos tratados dependiente de la variable tiempo, que a las 11 semanas alcanzaba valores similares al hueso.

Dados los prometedores resultados obtenidos con la utilización de esta novedosa matriz en territorio Maxilofacial nos planteamos valorar su capacidad de regeneración de **defectos de hueso largo**. El hueso del territorio cráneo maxilofacial (osificación membranosa), tal y como vimos en la Introducción, tiene una distribución, una formación y una fisiología que lo diferencia del hueso largo (osificación condral). Por otro lado están sometidos por lo general a cargas y fuerzas muy distintas que podrían influir en los procesos de reparación ósea. La mayoría de “scaffolds” en forma de hidrogeles o “pastas acuosas” están diseñados para rellenar defectos no sometidos a cargas por medio de inyección (Brandt J et al., 2010). Por lo tanto la mayoría de estudios animales utilizan modelos experimentales no sometidos a cargas, cuestión que se debe tener en cuenta a la hora de interpretar, valorar y comparar los resultados de diferentes estudios con distintos modelos. La influencia de la carga sobre los implantes en los procesos de osteointegración ha despertado controversia en la literatura y depende de muchos factores como el diseño del implante, la estructura y la porosidad de la superficie o el rango de movimiento. (Cameron HU et al., 1973; Ducheyne P et al., 1977; Huja SS et al., 1999; Klokkevold PR et al., 2001; Ohmae M et al., 2001; Pilliar RM et al., 1991; Pilliar RM et al., 1995; Serra G et al., 2008; Slaets E et al., 2009; Soballe K et al., 1992 (a); Soballe K et al., 1992 (b); Szmukler –Moncler S et al., 1998; Wehrbein H et al., 1993).

En nuestro diseño se creó a partir de la matriz proteica una estructura tubular para asemejar la estructura del hueso largo y evitar el efecto sellado de los elementos progenitores desde los extremos óseos (Nyman R et al., 2001).

Como **modelo animal** en el que llevar a cabo el estudio se eligió el conejo. Es uno de los animales más frecuentemente utilizados en investigación médica, siendo utilizado en aproximadamente el 35% de los estudios de investigación musculoesquelética (Neyt JG et al., 1998). Es debido a su fácil manejo y tamaño y a que alcanza la madurez esquelética a los seis meses aproximadamente. Los defectos óseos se crearon en el radio, que es un hueso tubular, tiene un buen tamaño para realizar procedimientos quirúrgicos y ha sido bien estudiado (Den Boer FC et al., 1999).

Estos animales presentan una sinostosis de las articulaciones radio cubital proximal y distal, así como una calcificación parcial de la membrana interósea, lo que permite crear defectos segmentarios sin que sea necesaria una estabilización adicional con sistemas de fijación interna o externa (que podrían interferir con el proceso de regeneración ósea) (Den Boer FC et al., 1999).

El uso de animales de mayor tamaño es más exigente por lo que la elección de este tipo de modelos está justificada y es necesaria antes de llevar a cabo ensayos clínicos para imitar lo máximo posible el entorno biológico, fisiológico y clínico del medio quirúrgico.

Schmitz et al (Schmitz JP et al., 1986) definieron el “tamaño crítico del defecto” como la pérdida ósea más pequeña en un hueso y en una especie animal en particular que no curará espontáneamente durante la vida del animal. Dicho tamaño va a depender de la localización del defecto en el esqueleto, de la estructura del hueso, de la carga que soporte, la especie, el sexo y la edad del animal.

En el ser humano la literatura ha señalado que defectos de más de 2,5 cms siempre requieren injerto óseo. Los injertos óseos no vascularizados fallan frecuentemente en defectos de más de seis o siete centímetros ya que estos injertos largos no son capaces de revascularizarse antes de que los osteoblastos se necrosen (Ip WY et al., 2002). El defecto diafisario de 10 mm en el radio de conejo supone un 13% de la longitud del mismo y está considerado un defecto de tamaño crítico (Giardino R et al., 2006). De hecho, aunque en conejos se observa una rápida curación ósea varios autores han experimentado el fallo en la unión ósea cuando defectos de este tamaño se

han dejado sin tratar. El hecho de que en ninguno de los defectos control de nuestro trabajo se produjera regeneración ósea significativa confirma lo apropiado del modelo elegido.

En el presente estudio se valoró la capacidad regenerativa en defectos en radio de conejo de una novedosa matriz proteica obtenida a partir de albúmina plasmática diseñada y patentada por el Banco de Tejidos de Asturias. En un grupo se planteó el estudio de la matriz de forma aislada y otro brazo del estudio se añadieron células obtenidas a partir **de médula ósea** como técnica de implementación regenerativa del defecto óseo creado.

Las **células troncales mesenquimales multipotentes adultas** son consideradas como una fuente excelente de células para la Ingeniería Tisular debido a su capacidad de autorreplicación y de diferenciación osteogénica (Srouji S et al., 2005; Srouji S et al., 2008). La combinación de células troncales mesenquimales adultas con la matriz apropiada parece ser la estrategia más prometedora para promover la neoformación ósea guiada (Doi K et al., 2007; Kim S et al., 2008).

Varias investigaciones han confirmado la capacidad de las células troncales que se encuentran en la médula ósea autóloga (Beresford NJ et al., 1989; Burwell RG et al., 1964; Burwell RG et al., 1985; Goujon E, 1989). De hecho Conolly et al (Conolly JF et al., 1989) demostraron una correlación positiva entre la capacidad osteogénica y la concentración celular que posea la médula ósea. Esto condujo a la utilización de preparados de médula ósea aumentada o expandida en el tratamiento de no uniones (Conolly JF et al., 1991; Healey JH et al., 1990). Hernigou et al (Hernigou PH et al., 2005 a) estudiaron el número y la concentración de células progenitoras en 60 pacientes con pseudoartrosis no infectadas. La médula ósea fue obtenida de la cresta ilíaca, concentrada e inyectada. Cuatro meses después del tratamiento se obtuvo unión en 53 pacientes y se recogió una correlación positiva entre el volumen de mineralización del callo y el número y la concentración de unidades formadoras de colonias existentes en los cultivos. Los siete pacientes que no consolidaron

tenían un número y una concentración celular significativamente menor de unidades formadoras de colonias.

Además de su utilización en el tratamiento de las fracturas, las células troncales mesenquimales procedentes de médula ósea han sido investigadas ampliamente para el tratamiento de la osteonecrosis del cuello femoral (Gangji V et al., 2001; Gangji V et al., 2004; Hernigou P et al., 2002; Hernigou P et al., 2005 (b); Mont MA et al., 1995).

Las células troncales mesenquimales multipotentes adultas no se encuentran únicamente en la médula ósea. Recientes estudios han demostrado que se encuentran en un gran número de órganos y tejidos. Se han aislado además de en médula ósea (BMDPCs) (Pittenger MF et al., 1999) en músculo esquelético (Qu-Petersen Z et al., 2002), grasa (ADPCs) (Zuk PA et al., 2002), pericondrio y periostio (PDPCs) (Yoo and Johnstone, 1998) y su potencial osteogénico ha sido investigado en numerosos estudios sobre regeneración ósea (Barry FP et al., 2004; Cowan CM et al., 2004; Halvorsen YD et al., 2001; Hamada K et al., 2008; Hattori H et al., 2004; Hayashi O et al., 2008; Mao JJ et al., 2006; Meinel L et al., 2004; Shanti RM et al., 2007).

Es razonable pensar que podrían existir diferencias en los resultados de reparación ósea dependiendo del origen de dichas células troncales adultas a la hora de diseñar estrategias de Ingeniería Tisular. Para investigar cuál sería la mejor fuente potencial se han diseñado tanto estudios con cultivos “ex vivo” (Hayashi O et al., 2008) como “in vivo” (Hayashi O et al., 2008; Stockmann P et al., 2012). El primer grupo investigador comparó la capacidad “in vitro” y en implantes “in vivo” de diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimales adultas procedentes de periostio, grasa y médula ósea tras dos semanas en cultivo y tras el implante de las mismas sobre matrices de hidroxiapatita. Los estudios “in vitro” demostraron diferencias estadísticamente significativas entre la diferenciación osteogénica de las células procedentes de periostio y de médula ósea frente al resto de células mesenquimales troncales adultas. En los estudios “in vivo” detectaron crecimiento óseo mediante micro-TC en los compuestos con médula ósea y periostio y un mayor volumen óseo mediante el análisis con TC en los compuestos con médula ósea respecto a los

compuestos con células adiposas con diferencias estadísticamente significativas. Concluyeron que las células troncales mesenquimales adultas procedentes de médula ósea y periostio podrían ser las candidatas ideales para su utilización en regeneración tisular ósea. Por su parte Stockmann et al (Stockmann P et al., 2012) diseñaron un trabajo para comparar el potencial osteogénico de células troncales mesenquimales adultas de varios orígenes: médula ósea, tejido adiposo y periostio. Analizaron cuantitativamente la consolidación de un defecto monocortical en la calota de cerdos. Tras el trasplante de un cultivo “ex vivo” de células troncales mesenquimales adultas observaron que independientemente del origen de estas células la velocidad y el patrón de consolidación eran casi comparables, sin obtener diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados habría que considerarlos con cierta cautela al valorar el estudio consolidación en territorio craneal, con unas diferencias fisiológicas frente al hueso largo.

En nuestro estudio hemos utilizado como fuente celular la médula ósea por su mayor accesibilidad y porque la técnica de aspiración con trocar nos resultó la más reproducible.

A continuación se pasará a analizar los resultados obtenidos para cada objetivo y método de estudio empleado.

2 DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO CON TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO POR LA IMAGEN:

En el estudio radiográfico se obtuvo regeneración ósea completa en el defecto en uno de los 10 casos del grupo “matriz” y en cinco de los 10 casos del grupo “matriz + MO”, resultados comparables como veremos a los mejores diseños experimentales con otros tipos de modelos de Ingeniería Tisular.

Como única referencia en la literatura de la utilización de esta novedosa matriz desarrollada a partir de albúmina plasmática están los trabajos publicados por Gallego et al. (Gallego López, 2009; Gallego L et al., 2010). En ellos se comunican buenos resultados tanto “in vitro” como “in vivo” en la reparación de defectos críticos mandibulares. La evaluación radiográfica se realizó a partir de imágenes de Tomografía Computarizada de modo que no podemos comparar nuestros resultados radiográficos con los de este grupo investigador.

En nuestro estudio solamente se recogió un caso de regeneración ósea completa en el grupo “matriz” pero hay que tener en cuenta que es la primera vez que se evalúa el comportamiento y el potencial de regeneración ósea de esta matriz de forma aislada en hueso largo. Creemos que estos resultados podrían superarse mediante técnicas de implementación regenerativa (factores de crecimiento, adición de células cambios físicos para mejorar la resistencia de la matriz y su capacidad osteoinductora...).

En los casos en los que se obtuvo regeneración ósea parcial el tejido neoformado se presentaba a modo de capuchones más o menos calcificados en los extremos de las osteotomías. Este hallazgo concuerda con un modelo

de regeneración ósea desde los extremos tal y como ha sido propuesto en la literatura (Meinig RP et al., 2002; Mosheiff R et al., 2003).

3 DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO CON TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN:

Existen diversas publicaciones en la literatura (De Vicente JC et al., 2000; Ferrero-Manzanal F, 2008; García AM 1996; Suárez-Suárez MA et al., 2003 y 2005; Zellin G et al., 1997) sobre el uso de técnicas **de cuantificación morfo-densitométrica** en regeneración ósea guiada sobre imágenes radiográficas y/o tomografía computerizada.

En nuestro estudio obtuvimos regeneración ósea total radiográfica, esto es, densidad ósea rellenando el espacio entre los extremos del defecto óseo en un 10% de los casos para el grupo “matriz” frente a un 50% del grupo “matriz + MO”. Los resultados de regeneración (tanto parcial como total) fueron mejores en el grupo “matriz” en comparación con el grupo “control”, aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas. Teniendo en cuenta que solamente se incluyeron 10 patas en cada grupo de estudio cabe la posibilidad de que tales diferencias estadísticas existan y que se puedan poner de manifiesto ampliando la muestra. En el grupo “matriz + MO” las diferencias obtenidas frente al grupo “control” sí fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados positivos apuntan que esta nueva matriz “a priori” es adecuada como armazón para ser utilizada en las estrategias de Ingeniería Tisular. Parece cumplir los criterios básicos de las matrices o “scaffolds” ya que aporta solidez y una estructura donde las células del huésped pueden desarrollarse, crear nueva matriz y tejido óseo neoformado. A diferencia de los diseños basados en la Regeneración Ósea Guiada en los que la estructura utilizada (membranas absorbibles o no, naturales o sintéticas) se utilizan para

crear un espacio protegido de la invasión de tejido fibroso, esta matriz se utilizó como almacén para el crecimiento óseo, sin aportar el efecto barrera de las técnicas de Regeneración Ósea Guiada. A pesar de no crear un espacio cerrado creemos que en ese espacio ocupado por la matriz sí podrían tener lugar procesos de neovascularización ósea, migración de células osteogénicas y formación de tejido osteoide previos a la regeneración ósea.

En nuestro estudio la regeneración ósea se vio favorecida por la adición de células procedentes de médula ósea. Tal y como hemos desarrollado en el apartado 1 las células troncales mesenquimales adultas procedentes de **médula ósea** tienen capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, condrocitos, adipocitos, mioblastos, células endoteliales y células neuronales, representando así una fuente ideal celular para los abordajes de la Ingeniería Tisular. Esta pluripotencialidad desempeña un papel importante en la formación de hueso nuevo y en la vascularización (Robey PG et al., 2006). Se utilizan ya en procedimientos clínicos en Cirugía Oral y Maxilofacial (Schmelzeisen et al., 2010) para reparar defectos óseos y mejorar la regeneración ósea.

Existen múltiples trabajos en la literatura que apoyan la utilización de **células troncales mesenquimales adultas** como técnica de **implementación regenerativa**; el aporte de células con potencial osteogénico es uno de los pilares básicos de los procedimientos de Ingeniería Tisular (Abukawa H et al., 2003; Baksh D et al., 1998; Bruder SP et al., 1998; Dong J et al., 2001; Dong J et al., 2002; Holy CE et al., 2003; Ishang-Riley SL et al., 1997; Mendes SC et al., 2002; Mendes SC et al., 2003; Petite H et al., 2000; Quarto R et al., 2001; Yoshikawa T et al., 2000). Las células multipotentes procedentes de periostio también se han utilizado para el diseño de estrategias en Ingeniería Tisular para obtener regeneración ósea (Perka C et al., 2000; Schantz JT et al., 2002 (a); Schantz JT et al., 2002 (b); Vacanti CA et al., 2001).

En los últimos años en la búsqueda de un modelo ideal de Ingeniería Tisular para la reparación de defectos óseos se han diseñado un número inabarcable de diseños y de estudios que combinan **matrices** (biodegradables o no, naturales o artificiales), junto con **células con capacidad osteogénica** (mesenquimales adultas procedentes de médula ósea, periostio, grasa o

incluso osteocitos adultos) y una gran variedad de técnicas para implementar la regeneración (factores de crecimiento, factores angiogénicos, técnicas para mejorar la vascularización, adición de vectores virales para la expresión de ciertas proteínas...). Hemos revisado la literatura referida a este tipo de estudios. A continuación expondremos en primer lugar los resultados obtenidos en modelos experimentales similares al utilizado en nuestro trabajo (defectos diafisarios en conejo de la raza blanca de Nueva Zelanda), continuaremos con modelos experimentales distintos al nuestro y en último lugar aquellos referidos a técnicas de implementación regenerativa de amplio uso en la actualidad.

Utilizando un modelo experimental similar al nuestro Zhao et al (Zhao M et al., 2011) crearon defectos críticos de 1,5 cms en radio de conejo y estudiaron un modelo de Ingeniería Tisular creado a partir de un "scaffold" de hueso esponjoso xenogénico al que le añadieron células cultivadas de médula ósea y al que aplicaron un haz vascular en un subgrupo. Si bien encontraron mejores tasas de regeneración ósea en el grupo con células de médula ósea, como también observamos en nuestro estudio, este grupo investigador apunta que los mejores datos de regeneración (con diferencias estadísticamente significativas) las encuentran en el modelo en el que se aplicó de forma adicional un haz vascular mediante microcirugía.

En una publicación más reciente Holy CE et al (Holy CE et al., 2003) obtuvieron resultados similares a los nuestros en defectos femorales de 1,2 cms de conejo aplicando matrices biodegradables de PLGA a los que añadieron células cultivadas de médula ósea. Objetivaron la formación de mayor cantidad de hueso nuevo de forma significativa en el grupo en el que se aplicó la matriz con células a las dos semanas, y en seguimientos mayores observaron una mayor radio opacidad en el grupo de "scaffold" con células respecto al grupo al que se le aplicó únicamente el "scaffold".

Mejores resultados son los publicados por Perka C et al (Perka C et al., 2000); en este trabajo crearon defectos críticos cubitales de conejo a los que aplicaron un "scaffold" de PLGA con células multipotentes aisladas de periostio; tras 28 días de cultivo recogieron datos de regeneración completa, de integración a los

márgenes de tejido circundante e incluso de crecimiento óseo a través del “scaffold”.

Un abordaje algo diferente fue el utilizado por Lyons et al (Lyons FG et al., 2014). En un modelo de radio de conejo aplicaron una matriz muy similar a la nuestra (de colágeno y glucosaminoglicano) pero a la que añadieron partículas de hidroxiapatita con y sin el aporte de dosis bajas de rh-BMP-2. Las ocho patas correspondientes al grupo de matriz de colágeno y las ocho con matriz y rh-BMP presentaron consolidación prácticamente completa, pero las mejores tasas de consolidación (consolidación bicortical), comparables al grupo control (injerto óseo autólogo) correspondían al grupo con hidroxiapatita, mejores incluso que las del grupo con rh-BMP-2 sin los costes ni los problemas de seguridad que implica la utilización de factores de crecimiento.

Finalmente Brandt et al (Brandt J et al., 2010) utilizaron un modelo de hidroxiapatita nanocristalina (Ostim ®) en defectos femorales distales de conejos. En sus resultados de microscopía objetivaron buena compatibilidad de la matriz pero en ningún caso se objetivó reabsorción de la misma. En cambio la matriz evaluada en nuestro estudio mostró a lo largo de los meses tanto una biocompatibilidad como una reabsorción completas a medida que se iba creando hueso nuevo.

En cuanto a otros modelos experimentales Kadiyala et al (Kadiyala et al., 1997) publicaron resultados prometedores utilizando matrices de cerámica porosa a los que añadieron células troncales mesenquimales en defectos segmentarios de fémures de ratas en comparación con el control de matriz aislado, tal y como observamos nosotros al comparar esos dos grupos. Resultados parecidos fueron publicados por Bruder (Bruder SP et al., 1998) utilizando un modelo canino.

En un modelo diafisario de cabra Petite H et al (Petite H et al., 2000) encontraron diferencias en la regeneración ósea dependiendo de la aplicación a un “scaffold” de coral con células de médula ósea fresca (como las utilizadas en nuestro estudio) y células troncales mesenquimales. A diferencia de nuestros resultados no objetivaron crecimiento óseo en el grupo con médula ósea y sí parcialmente en algunos casos (tres de siete animales) del grupo de

células troncales mesenquimales. Esta discrepancia de resultados frente a nuestro estudio podría deberse a las diferencias filogenéticas de los modelos animales utilizado o a que la densidad celular utilizada al no estar estrictamente cuantificada (ni en número ni en tipos celulares) sea totalmente distinta.

Si atendemos a otro tipo de estrategias utilizadas para mejorar la regeneración ósea encontramos en la literatura infinidad de modelos.

Los **hidrogeles** se asocian comúnmente a **factores de crecimiento** tales como BMPs (Burdick JA et al., 2002 (a); Burdick JA et al., 2002 (b)). En estos estudios publican buenos resultados de diferenciación osteogénica en cultivos “in vitro” debido a la facilidad con la que los fármacos se dispersan en la matriz y al alto control logrado en la selección de las propiedades físicas y químicas de los polímeros (Gazit D et al., 1999). El único inconveniente es que no pueden ser utilizados en áreas sometidas a carga extrema. “Scaffolds” tridimensionales de distintas composiciones se han combinado con una gran variedad de factores de crecimiento, desde BMPs a PDGF para aplicaciones de Ingeniería Tisular ósea (Kokubo S et al., 2003; Murata M et al., 1999; Murphy WL et al., 2000; Park YJ et al., 2000; Saito N et al., 2001; Ueda H et al., 2002; Whang K et al., 1998). La matriz proteica que estudiamos en nuestro diseño a pesar de tener un origen proteico, debido a su original procesamiento, presenta una consistencia que la hace adecuada para su utilización en defectos óseos. Creemos que con técnicas de implementación regenerativa que mejoren las propiedades mecánicas y la resistencia de la misma podríamos en un futuro evaluar su potencial para la regeneración de defectos óseos sometidos a cargas.

La **terapia génica** es una técnica en la cual se transfieren ácidos nucleicos, normalmente ADN, a células somáticas con un efecto terapéutico, bien corrigiendo un defecto o expresando proteínas útiles en ciertos tratamientos (Gazit D et al., 1999; Lee JY et al., 2001; Partridge K et al., 2002). El abordaje común en el campo de la Ingeniería Tisular ósea es transfectar células con genes codificados para la proteína recombinante BMP-2 (Gazit D et al., 1999; Hu W-W et al., 2010; Lee JY et al., 2001; Partridge K et al., 2002). Según los

estudios comunicados por Lee et al. usando esta estrategia es posible conseguir un mayor grado de formación ósea en comparación con técnicas que no utilizan células transfectadas, arrojando resultados prometedores (Lee JY et al., 2001). Partridge et al. mostraron en sus estudios la reproductibilidad de esta técnica (Partridge K et al., 2002). Como técnica o abordaje alternativo a las terapias basadas en la transfección, debido a las dudas suscitadas respecto a la seguridad de la terapia génica al estar involucrados vectores virales (Jadlowiec JA et al., 2003) están aquellas que utilizan los plásmidos como vehículo del ADN que queremos expresar (Bonadio J et al., 1999; Luu YK et al., 2003; Shea LP et al., 1999).

En cuanto al **porcentaje de regeneración ósea**, al analizar de forma conjunta las diferencias observadas teniendo en cuenta los tres grupos de nuestro estudio y además el efecto del tiempo en la evolución de la variable, los test aplicados concluyeron que el efecto del factor tiempo sobre el porcentaje de regeneración es distinto según el grupo que estemos estudiando.

Así los valores a lo largo del tiempo recogidos en el grupo “matriz + MO” fueron superiores de forma estadísticamente significativa frente a los valores recogidos en el grupo “control” para todas las determinaciones. En el caso del grupo “matriz” hubo que esperar al quinto mes para que estas diferencias fueran significativas.

Los incrementos observados en el porcentaje de regeneración en el grupo “matriz + MO” fueron superiores a los recogidos en el grupo “matriz” con diferencias estadísticamente significativas excepto en el primer y sexto mes.

Este hallazgo apoyaría las teorías de aplicación de técnicas de implementación regenerativa (en este caso la adición de células procedentes de médula ósea) para mejorar, acelerar y afianzar los procesos de reparación ósea.

Atendiendo a la variable **densidad en el defecto** y también analizando conjuntamente el efecto del tiempo y el modelo aplicado observamos que los incrementos en los valores de la variable densidad en el defecto fueron superiores y con diferencias estadísticamente significativas en el grupo

“matriz+ MO” respecto al grupo “matriz” estancándose a los seis meses. El efecto que ejerce la variable tiempo sobre la densidad ósea en el defecto es diferente según sea el grupo que estemos valorando. Habría que plantear estudios a más largo plazo para valorar si con mayores evoluciones temporales se igualan verdaderamente en ambos grupos los parámetros de regeneración ósea.

Los resultados obtenidos parecen estar justificados por el proceso de regeneración ósea en hueso largo; tras una fase inicial de relleno del hematoma de fractura el defecto óseo se organizaría, sufriría invasión celular con un aumento inicial de densidad calcio que se seguiría de un proceso más lento de remodelación ósea y finalmente se consolidaría el patrón córtico-medular propio del hueso maduro (Meinig RP et al., 1996 y 1997). Este proceso de regeneración completa se observó con mayor frecuencia y claridad en el grupo “matriz + MO” apoyando las teorías de implementación regenerativa.

4 DISCUSIÓN DE LOS HALLAZGOS DEL ESTUDIO HISTOLÓGICO:

En los estudios de microscopía óptica se observó en los casos de regeneración parcial cómo el frente de calcificación avanzaba desde los extremos del defecto óseo con una morfología en punta de flecha con las bases orientadas hacia los extremos, lo que indicaría que el crecimiento celular se produce desde los extremos del defecto creado, tal y como se describe en la literatura (Theiss F et al., 2005).

La evaluación macroscópica de los defectos tras el sacrificio no reveló la existencia de encapsulación del implante por tejido conectivo ni hiperemia de los tejidos adyacentes. El grosor de la zona de transición entre el hueso adyacente y la matriz presentó variaciones en las diferentes patas e incluso en muestras de la misma localización. Estas diferencias probablemente tengan que ver con pequeñas variaciones en la geometría de cada defecto en

particular provocando pérdidas de ajuste que podrían causar micro-movimientos del implante en el defecto.

En nuestras muestras y en el estudio publicado por Gallego et al (Gallego L et al., 2010) ya se observó la lenta degradación de esta matriz, distinguiéndose restos de la misma en las últimas determinaciones temporales. Esto podría suponer una ventaja al servir la matriz como andamiaje o guía para el crecimiento tisular y vascularización.

La presencia de macrófagos y estructuras celulares compatibles con células gigantes multinucleadas que se observaron en nuestro estudio sugieren una biodegradación celular como consecuencia de fagocitosis, como generalmente se observa cuando se implantan biomateriales en hueso (Oberle A et al., 2005; Theiss F et al., 2005). Las reacciones a cuerpo extraño fueron moderadas y generalmente observadas en la periferia más que en el centro de la matriz. La presencia de macrófagos durante la degradación de biomateriales en el hueso tal y como observamos en nuestras muestras podría clasificarse como fisiológica (Oberle A et al., 2005; von Doernberg MC et al., 2006) y la presencia de restos de células gigantes multinucleadas puede resultar ambiguo en este contexto. Generalmente los biomateriales que no tienen un origen autólogo son los que más probablemente inducirán una moderada reacción a cuerpo extraño. Las células gigantes multinucleadas resultan de la fusión de macrófagos para digerir grandes cantidades de materiales extraños. Estudios de Nuss et al (Nuss et al, manuscrito en preparación) sugieren que la presencia de células gigantes multinucleadas en contacto directo con osteoblastos y sus células osteoprogenitoras podría ser clasificado como biocompatible si están ausentes indicios de un importante acúmulo de linfocitos, células plasmáticas o encapsulamiento del material con una cápsula fibrosa.

En nuestras muestras no observamos indicios de una inflamación masiva. Es por eso que planteamos un modelo de degradación de la matriz fisiológico y no inflamatorio. Las células gigantes se observaron en la proximidad de los osteoblastos y la degradación de la matriz se siguió del depósito de matriz ósea. El procesamiento de esta matriz por parte de las células gigantes parece

que podría incluso fomentar el depósito de hueso nuevo neoforado en contacto con la matriz.

Continúa siendo una incógnita si la coexistencia de células gigantes multinucleadas y de osteoblastos es una coincidencia basada en la degradación de la matriz que provoca la fusión de macrófagos dando lugar a células gigantes o esta coincidencia estuviera producida por la comunicación o interferencias entre las células gigantes y los osteoblastos. Harían falta más estudios específicos centrados en este aspecto para aclarar esta relación.

5 LÍMITACIONES DEL ESTUDIO:

El presente trabajo de Tesis Doctoral presenta las siguientes limitaciones:

1- Se han empleado animales filogenéticamente bastante alejados de la especie humana y con buena capacidad de regeneración ósea (aunque en ningún control se registró regeneración ósea completa), lo cual limita en cierta medida la reproducibilidad en humanos.

2- Se ha utilizado un “andamiaje anticlapso” de alambre en el grupo “control” entre los extremos del defecto que no se ha aplicado en los grupos “matriz” y “matriz + MO”. Esta modificación, aunque en ningún caso produjo la regeneración ósea completa pudo aportar cierta estabilidad mecánica que de alguna manera mejorase los resultados en este grupo, estrechando las diferencias observadas y dificultado la obtención de diferencia estadística.

3- En nuestro estudio no se incluyeron valoraciones mecánicas porque en la inspección macroscópica de las muestras tras los sacrificios se objetivó una adecuada continuidad en los defectos y se optó por priorizar las muestras para los estudios histológicos.

4- No se realizaron estudios de cuantificación celular en las muestras procedentes de aspirados de médula ósea sembradas en la matriz proteica ni

la tipificación de las mismas (proporción de células troncales mesenquimales adultas).

6 FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

1- La utilización de esta novedosa matriz en defectos segmentarios diafisarios de animales filogenéticamente más evolucionados que el conejo.

2- Depuración de técnicas de implementación regenerativa basadas en la adición de células troncales mesenquimales adultas: cuantificación celular, tipificación de las mismas e incluso expansión y cultivos celulares para aumentar la capacidad osteogénica del modelo de Ingeniería Tisular.

3- Mejora de las características mecánicas y la resistencia de la matriz sobre todo de cara a su utilización en defectos sometidos a cargas. Adición de cerámicas como la HA que aumentarían la consistencia y mejorarían la osteoinducción del modelo.

4- Diseñar estudios para comparar este modelo de Ingeniería Tisular con las estrategias de Ingeniería Tisular basadas en matrices bioabsorbibles implementados con factores de crecimiento.

CONCLUSIONES

1- El relleno con una matriz de proteínas globulares plasmáticas autólogas permite obtener regeneración ósea completa en defectos segmentarios de tamaño crítico en hueso largo del modelo experimental utilizado.

2- La regeneración ósea obtenida es mayor y más llamativa si a esa matriz proteica se le añaden células de médula ósea obtenidas de cresta iliaca, con diferencias estadísticamente significativas en las diferentes determinaciones temporales.

3- Los hallazgos histológicos sugieren una excelente biocompatibilidad de la matriz de proteínas globulares plasmáticas autólogas, con imágenes de osteointegración en ausencia de respuesta inmune de rechazo.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(7):1161-1170.

Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg* 2003 Jan;61(1):94-100.

Abukawa H, Papadaki M, Abulikemu M, Leaf J, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coating. *Dent Clin North Am* 2006; 5:205-16.

Aguirre Zorzano LA, Estefania CE, García UE, Gil Lozano JA, Santamaria ZJ. Increase in residual crest bone using guided tissue regeneration: a clinical case report. *Quintessence Int* 1994; 25(9):593-598.

Aguirre-Zorzano LA, Estefania-Cundin E, Gil-Lozano J, Martinez-Conde R, Nunez-Anton V, Santamaria-Zuazua J. Periodontal regeneration of intrabony defects using resorbable membranes: determinants of the healing response. An observational clinical study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1999; 19(4):363-371.

Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A(5): 716e720.

Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, Evan AP, Moe SM. Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis* 2001;37(6):1267-1276.

Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B* 2008;1.

Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg* 1992;50(8):829-834.

Alcántara-Martos T, Aznar-Zafra S, Gutiérrez-Romero M, Delgado Martínez AD. Transporte óseo en defecto óseo femoral. A propósito de un caso. *Trauma Fund Mapfre* 2010;21(1):28-32.

Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *Journal of Pathology* 2002;197(4):419-423.

Allori AC, Sillon AM, Warren SM. Biological Basis of Bone Formation, Remodeling and Repair-Part II: Extracellular Matrix. *Tissue Eng Part B Rev* 2008;14:275-83.

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008;321:699-702.

Apart T, Bigorre N, Cronier P, Duteille F, Bizot P, Massim P. Two-stage reconstructions of post-traumatic segmental tibia bone loss with nailing. *Orthop Traumatol Surg Res* 2010;96(5):549-553.

Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* 2009;218:237-245.

B

Baksh D, Davies JE, Kim S. Three-dimensional matrices of calcium polyphosphates support bone growth in vitro and in vivo. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 1998;9(12):743-748.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(4):568e584.

Benjamin CT, Bruce GF, Fowler TT, Jeremy R, Attila P. Induced membrane Technique for reconstruction to manage bone loss. *J Am Acad Orthop Surg* 2012;20:142-150.

Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res*. 1989 Mar ;(240):270-80.

Berner A, Boerckel JD, Saifzadeh S, Steck R, Ren J, Vaquette C, Zhang JQ, Nerlich M, Guldberg RE, Hutmacher DW, Woodruff MA. Biomimetic tubular nanofiber mesh and platelet rich plasma-mediated delivery of BMP-7 for large bone defect regeneration. *Cell Tissue Res* 2012;347:603-612.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function?. *Cell* 2001;105(7):829-841.

Bluhm AE, Laskin DM. The effect of polytetrafluoroethylene cylinders on osteogenesis in rat fibular defects: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53(2):163-166.

Bonadio J, Smiley E, Patil P, Goldstein S. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration. *Nat Med* 1999 Jul;5(7):753-9.

Brandt J, Henning S, Michler G, Hein W, Bernstein A, Schulz M. Nanocrystalline hydroxiapatite for bone repair: an animal study. *Journal of materials Science. Materials in Medicine* 2010;21:283-294.

Brinker MR, O'Connor DP. Basic sciences. En Miller MD, editor. *Reviews of Orthopedics*, 6th Ed. Elsevier, Philadelphia, 2008.P1-6.

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kakiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998 Jul;80(7):985-96.

Buck DW 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:1314-1320.

Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol* 2001; 72(2):215-229.

Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2002 Nov;23(22):4315-23 (a).

Burdick JA, Mason MN, Hinman AD, Thorne K, Anseth KS. Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization. *J Control Release*. 2002 Sep18;83(1):53-63(b).

Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone; an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow –containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br*. 1964 Feb;46:110-40.

Burwell RG. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clin Orthop Relat Res*. 1985 Nov;(200):125-41.

C

Cameron HU, Pilliar RM, MacNab I. The effect of movement on the bonding of porous metal to bone. *J Biomed Mater Res*.1973;7(4):301–11.

Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells* 2003;21:610-9.

Canfield AE, Sutton AB, Hoyland JA, Schor AM. Association of thrombospondin-1 with osteogenic differentiation of retinal pericytes in vitro. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 2):343-353.

Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 2011 Jun;11(6):471-91.

Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003; 278(46):45969-45977.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008 Nov;3 Suppl 3:S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206.

Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. Circ Res 2004; 95(11):1046-1057.

Conolly JF, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. J Bone Joint Surg Am.1989 Jun;71(5):684-91.

Conolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous bone marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. Clin Orthop Relat Res. 1991 May;(266):259-70.

Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Nat Biotechnol 2004;22(5):560e567.

Chaturvedi R, Gill AS, Sikri P. Evaluation of the regenerative potential of 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane vs biodegradable membrane alone in the treatment of human periodontal infrabony defects: a clinical and radiological study. Indian J Dent Res 2008;19:116-123.

D

Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. J Neurosurg 1991;74(3):487-491.

Dahlin L, Lundborg G. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. J Hand Surg [Br] 2001;26(4):393-394.

Dahlin LB, Lundborg G. Use of tubes in peripheral nerve repair. Neurosurg Clin N Am 2001;12(2):341-352.

De Vicente JC, Lopez-Arranz E, Lopez-Arranz JS. Tissue regeneration in bone defects adjacent to endosseous implants: an experimental pilot study. Int J Periodontics Restorative Dent 2000;20(1):41-49.

De Vicente JC, Recio O, Martin-Villa L, Junquera LM, Lopez-Arranz JS. Histomorphometric evaluation of guided bone regeneration around implants with SLA surface: an experimental study in beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35(11):1047-1053.

Den Boer FC, Patka P, Bakker FC, Wippermann BW, van Lingen A, Vink GQ, Boshuizen K, Haarman HJ. New segmental long bone defect model in sheep: quantitative analysis of healing with dual energy x-ray absorptiometry. *J Orthop Res*. 1999 Sep;17(5):654-60.

Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(12):1998-2003.

Dimitriou R, Rsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 2005;36:1392-1404.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Calori GM, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BCM Med* 2012 Jul 26;10:81. doi: 10.1186/1741-7015-10-81.

Doi K, Kubo T, Hayashi K, Imura K, Akagawa Y. Development of cell-hybrid artificial bone: Effect of osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells on bone formation with newly developed interconnected porous calcium hydroxyapatite. *Dent Mater J* 2007;26:162–169.

Dong J, Kojima H, Ueruma T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J. In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 2001 Nov;57(2):208-16.

Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 2002;23(23):4493-4502.

Ducheyne P, De Meester P, Aernoudt E. Influence of a functional dynamic loading on bone ingrowth into surface pores of orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1977;11:811–38.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89(5):747-754.

Durmaz E, Zou M, Al-Rijjal RA, Baitei EY, Hammami S, Bircan I, Akçurin S, Meyer B, Shi Y. Novel and de novo PHEX mutations in patients with hypophosphatemic rickets. *Bone* 2013;52(1):286-291.

E

Einhorn TA, O’Keefe RJ, Buckwalter JA. *Orthopaedic Basic Science*. 3^a Ed. Ed. American Academy Orthopaedic Surgeons, Rosemont, 2007.

El Maadawy S, Kaartinen MT, Schinke T, Murshed M, Karsenty G, McKee MD. Cartilage formation and calcification in arteries of mice lacking matrix Gla protein. *Connect Tissue Res* 2003;44 Suppl 1:272-278.

Engelse MA, Neele JM, Bronckers AL, Pannekoek H, de Vries CJ. Vascular calcification: expression patterns of the osteoblast-specific gene core binding factor alpha-1 and the protective factor matrix gla protein in human atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2001;52(2):281-289.

Ereno C, Guimarães SA, Pasetto S, Herculano RD, Silva CP, Graeff CF, Tavano O, Baffa O, Kinoshita A. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2010;95:932-939.

F

Farso NF, Karring T, Gogolewski S. Biodegradable guide for bone regeneration. Polyurethane membranes tested in rabbit radius defects. *Acta Orthop Scand* 1992;63(1):66-69.

Ferrero Manzanal F. Osteogénesis mediante técnicas de regeneración tisular guiada en defectos de hueso largo (tesis doctoral). Oviedo: Servicio de Publicaciones Universidad de Oviedo; 2008.

Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest* 1994; 94(4):1597-1604.

Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD et al. Osteogenic protein 1 (bone morphogenic protein-7) in the treatment of tibial non unions. *J Bone J Surg Am* 2001;83:S151-158.

Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 2005; 122(5):803-815.

G

Gallego L, Junquera LM, Meana A, García E. Development and Transplantation of a mineralized matrix formed by osteoblasts in vitro for bone regeneration. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 2006;34:S2.

Gallego L, Junquera LM, Meana A, Peña I, García E. Cultivo "in vitro" de hueso mandibular humano. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial* 2007;29:S36.

Gallego L, Junquera LM, Meana A, Peña I, Rosado P. Culture of human osteoblasts on two different scaffolds. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery* 2008;36:S271.

Gallego López L. Desarrollo mediante cultivo in vitro de osteoblastos mandibulares humanos sobre matriz proteica tridimensional. Análisis del comportamiento in vivo en animales inmunoincompetentes (tesis doctoral). Oviedo: Servicio de Publicaciones Universidad de Oviedo; 2009.

Gallego L, Junquera L, García E, García V, Alvarez-Viejo M, Costilla S, Fresno MF, Meana A. Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in

a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Eng Part A* 2010 Apr;16(4):1179-87.

Gamradt SC, Lieberman JR. Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;183-94.

Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 Jun;86(6):1153-60.

Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur JP. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone*. 2011 Nov;49(5):1005-9. Epub 2011 Jul 29.

Gannon FH, Glaser D, Caron R et al. Mast cell involvement in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Hum Pathol* 2001;32:842-848.

García AM. Valoración reparativa volumétrica y densitométrica en quistes maxilares tras la aplicación de técnicas de barrera [tesis doctoral]. Vizcaya: Universidad del País Vasco 1996.

Gazit D, Turgeman G, Kelley P, Wang E, Jalenak M, Zilberman Y, Moutsatsos I. Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. *J Gene Med* 1999 Mar-Apr;1(2):121-33.

Gehron Robey P, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM. Structure and molecular regeneration of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 1993; 8 Suppl 2: S483-7.

Gerber A, Gogolewski S. Reconstruction of large segmental defects in the sheep tibia using polylactide membranes. A clinical and radiographic report. *Injury* 2002; 33 Suppl 2:B43-B57.

Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993;92(4):1686-1696.

Giachelli CM, Speer MY, Li X, Rajachar RM, Yang H. Regulation of vascular calcification: roles of phosphate and osteopontin. *Circ Res* 2005;96(7):717-722.

Giannoudis PV, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions. *Injury* 2011;42:591-598.

Giardino R, Fini M, Nicoli AN, Giavaresi G, Rocca M. Polylactide bioabsorbable polymers for guided tissue regeneration. *J Trauma* 1999;47(2):303-308.

Giardino R, Nicoli AN, Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rocca M et al. A resorbable biomaterial shaped as a tubular chamber and containing stem cells: a pilot study on artificial bone regeneration. *Int J Artif Organs* 2000;23(5):331-337.

Giardino R, Aldini NN, Fini M, Giavaresi G, Torricelli P. Enhanced guided bone regeneration with a resorbable chamber containing demineralized bone matrix. *J Trauma* 2002;52(5):933-937.

Giardino R, Nicoli Aldini N, Fini M, Tanzi MC, Faré S, Draghi L, Carpi A, Nicolini A, Giavaresi G. Bioabsorbable scaffold for in situ bone regeneration. *Biomed Pharmacother* 2006 Sep;60(8):386-92.

Godbey WT, Atala A. Ann N.Y. In vitro systems for tissue engineering. *Acad Sci* 2002;961:10-26.

Gogolewski S, Pineda L, Busing CM. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV. Does the polymer chemical composition affect the healing process? *Biomaterials* 2000;21(24):2513-2520.

Goujon E. Recherches experimentales sur les proprietes physiologiques de la moelle des os. *J Anat Physiol* 1869;6:399-412.

Griffith L. Ann N.Y. Acad Sci 2002;961:83-95.

Gugala Z, Gogolewski S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *J Orthop Trauma* 1999;13(3):187-195.

Gugala Z, Gogolewski S. Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury* 2002;33 Suppl 2:B71-B76.

Gurevich O, Vexler A, Marx G, Prigozhina T, Levdansky L, Slavin S, Shimeliovich I, Gorodetsky R. Fibrin microbeads for isolating and growing bone marrow-derived progenitor cells capable of forming bone tissue. *Tissue Eng.* 2002;8:661-72.

H

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2001;7(6):729e741.

Hamada K, Hirose M, Yamashita T, Ohgushi H. Spatial distribution of mineralized bone matrix produced by marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2008;84(1):128e136.

Handsichel J, Wiesmann HP, Depprich R, Kübler NR, Meyer U. Cell-based bone reconstruction therapies-cell sources. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:890-8.

Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004;178(1): 2e12.

Hausamen JE, Neukam FW. Transplantation of bones. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992; Suppl 1:1163-1177.

Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 2008;82(3): 238e247.

He H, Huang J, Chen G, Dong Y. Application of a new bioresorbable film to guided bone regeneration in tibia defect model of the rabbits. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:256-262.

Healey JH, Zimerman PA, McDonnell JM, Lane JM. Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. *Clin Orthop Relat Res.* 1990 Jul;(256):280-5.

Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clin Orthop Relat Res.* 2002 Dec;(405):14-23.

Hernigou PH, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Jul;87(7):1430-7 (a).

Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H. The use of Percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. *J Bone Joint Surg Br.* 2005 Jul;87(7):896-902 (b).

Hirschi K, Goodell M. Common origins of blood and blood vessels in adults? *Differentiation* 2001;68(4-5):186-192.

Holy CE, Fialkov JA, Davies JE, Shoichet MS. Use of a biomimetic strategy to engineer bone. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Jun15;65(4):447-53.

Humber CC, Sándor GK, Davis JM, Peel SA, Brkovic BM, Kim YD, Holmes HI, Clokie CM. Bone healing with an in situ-formed bioresorbable polyethylene glycol hydrogel membrane in rabbit calvarial defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:372-384.

Hu WW, Ward BB, Wang Z, Krebsbach PH. Bone regeneration in defects compromised by radiotherapy. *J Dent Res* 2010 Jan;89(1):77-81.

Huja SS, Katona TR, Burr DB, Garetto LP, Roberts WE. Microdamage adjacent to endosseous implants. *Bone.* 1999;25: 217–22.

I

Ip WY. Polylactide membranes and sponges in the treatment of segmental defects in rabbit radii. *Injury* 2002; 33 Suppl 2:B66-B70.

Ip WY. Polylactide membranes and sponges in the treatment of segmental defects in rabbit radii. *Injury* 2002; 33 Suppl 2:B66-B70.

Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res* 1997 Jul;36(1):1-8.

J

Jadlowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2003 Jun;3(3):409-23.

Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury* 2011;42:S77-81.

Jianqi H, Hong H, Lieping S, Genghua G. Comparison of calcium alginate film with collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:1449-1454.

Jono S, Nishizawa Y, Shioi A, Morii H. Parathyroid hormone-related peptide as a local regulator of vascular calcification. Its inhibitory action on in vitro calcification by bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(6):1135-1142.

Jorcano JL, Larcher F, Meana A, Gomez S, Nechaevsky MDR. Artificial dermis and production method therefor. WO 2002072800A1. 2002 Sep 19.

K

Kashima TG, Dongre A, Oppermann U, Athanasou NA: Dentine matrix protein 1 (DMP-1) is a marker of bone-forming tumours. *VIRCHOWS ARCHIV* 2013;462(5):583-591.

Kennedy OD, Schaffler MB. The roles of osteocyt signaling in bone. *J Am Acad Orthop Surg*. 2012;20:670-671.

Kim JH, Kim MK, Park JH, Won JE, Kim TH, Kim HW. Performance of Novel Nanofibrous Biopolymer Membrane for Guided Bone Regeneration within Rat Mandibular Defect. *In Vivo* 2011;25:589-595.

Kim S, Kim SS, Lee SH, Eun Ahn S, Gwak SJ, Song JH. In vivo bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly (d,l-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials* 2008;29:1043–1053.

Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:350–7.

Kokubo S, Fujimoto R, Yokota S, Fukushima S, Nozaki K, Takahashi K, Miyata K. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model. *Biomaterials* 2003 Apr;24(9):1643-51.

Korbling M, Estrov Z, Champlin R. Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant* 2003; 32 Suppl 1:S23-S24.

Kothiwale SV, Anuroopa P, Gajiwala AL. A clinical and radiological evaluation of DFDBA with amniotic membrane versus bovine derived xenograft with amniotic membrane in human periodontal grade II furcation defects. *Cell Tissue Bank* 2009;10:317-326.

Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001;153(5):1133-1140.

L

Lambiris E, Papadopoulos A, Karabasi A, Karageorgos A. Secondary intramedullary nailing after distraction osteogenesis: 30 patients followed for 2-12 years. *Acta Orthop Scand*. 2004;75:481-6.

Lane JM. Bone morphogenic protein science and studies. *J Orthop Trauma* 2005;19:S17-S22.

Lee JY, Musgrave D, Pelinkovic D, Fukushima K, Cummins J, Usas A, Robbins P, Fu FH, Huard J. Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am* 2001 Jul;83-A(7):1032-9.

Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurström K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol* 1993;64(11Suppl):1116-1128.

Linde A, Hedner E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int* 1995;56(6):549-553.

López-Arranz E. Regeneración ósea periimplantaria mediante mecanismos de osteoinducción, osteoconducción y regeneración ósea guiada [tesis doctoral]. Oviedo: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo 1997.

Lu S, Zhang Z, Wang J. Guided bone regeneration in long bone. An experimental study. *Chin Med J (Engl)* 1996;109(7):551-554.

Luu HH. Bone metabolism and metabolic bone disease. En: Flynn J.M. editor. *Orthopaedic Knowledge Update 10*. Rosemont. AAOS 2011. pp 181-192.

Luu YK, Kim K, Hsiao BS, Chu B, Hadjiargyrou M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J Control Release* 2003 Apr 29;89(2):341-53.

Lyons FG, Gleeson JP, Partap S, Coghlan K, O'Brien FJ. Novel Microhydroxyapatite Particles in a Collagen Scaffold: A Bioactive Bone Void Filler? *Clin Orthop Relat Res* 2014;472:1318–1328.

M

Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 2006;85(11): 966e979.

Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2000;45:346-53.

Masquelet AC, Begue T. The concep of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am* 2010;41(1):27-37.

Marsh JL, Prokuski L, Biermann JS. Chronic infected tibial nonunions with bone loss. Conventional techniques versus bone transport. *Clin Orthop Relat Res* 1994;301:118-23.

MA Suárez-Suárez. A Murcia-Mazón. JC de Vicente-Rodríguez. P Menéndez-Rodríguez. MA del Brío-León. P Riera-Rovira. Utilización de la capacidad de calcificación y osificación de la pared arterial para conseguir regeneración ósea completa en defectos de hueso largo. *Revista de Ortopedia y Traumatología* 2005;49(6):450-462.

Meana A, García E, García V, Jorcano JL, del Río M, Larcher F, Duarte B, Holguin A. Method for preparing three-dimensional structures for Tissue engineering. WO 2008/119855.

Meinel L, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Snyder B, Li C, et al. Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2004;71(1):25e34.

Meinig RP, Rahn B, Perren SM, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes: treatment of diaphyseal bone defects in the

rabbit radius with poly(L-lactide) membrane. A pilot study. *J Orthop Trauma*. 1996;10(3):178-90.

Meinig RP, Buesing CM, Helm J, Gogolewski S. Regeneration of diaphyseal bone defects using resorbable poly(L/DL-lactide) and poly(D-lactide) membranes in the Yucatan pig model. *J Orthop Trauma*. 1997 Nov;11(8):551-8.

Meinig RP. Polylactide membranes in the treatment of segmental diaphyseal defects: animal model experiments in the rabbit radius, sheep tibia, Yucatan minipig radius, and goat tibia. *Injury* 2002; 33 Suppl 2:B58-B65.

Mendes SC, Sleijster M, Van der Muysenberg A, De Bruijn JD, Van Blitterswijk CA. A cultured living bone equivalent enhances bone formation when compared to a cell seeding approach. *J Mater Sci Mater Med* 2002 Jun;13(6):575-81.

Mendes SC, Bezemer J, Claase MB, Grijpma DW, Bellia G, Degli-Innocenti F, Reis RL, de Groot K, van Blitterswijk CA, de Bruijn JD. Evaluation of two biodegradable polymeric systems as substrates for bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9 Suppl 1:S91-101.

Meyer U, Büchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB. Basic reactions of osteoblast on structured material surfaces. *Eur Cell Mater* 2005;9:39-49.

Meyer U, Wiesmann HP, Berr K, Kübler NR, Handschel J. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006;21:899-906.

Mohler ER, III, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis* 1999;8(3):254-260.

Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am*. 1995 Mar;77(3):459-74.

Moore DC, Pedrozo HA, Crisco JJ, III, Ehrlich MG. Preformed grafts of porcine small intestine submucosa (SIS) for bridging segmental bone defects. *J Biomed Mater Res A* 2004;69(2):259-266.

Mosheiff R, Friedman A, Friedman M, Liebergall M. Quantification of guided regeneration of weight-bearing bones. *Orthopedics* 2003;26(8):789-794.

Murata M, Huang BZ, Shibata T, Imai S, Nagai N, Arisue M. Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999 Jun;28(3):232-7.

Murphy WL, Peters MC, Kohn DH, Mooney DJ. Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly (lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2000 Dec;21(24):2521-7.

Murshed M, Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol* 2004;165(5):625-630.

N

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008;26:101-6.

Nakamura K, Koshino T, Saito T. Osteogenic response of the rabbit femur to a hydroxyapatite thermal decomposition product-fibrin glue mixture. *Biomaterials* 1998;19:1901-7.

Nasser NJ, Friedman A, Friedman M, Moor E, Mosheiff R. Guided bone regeneration in the treatment of segmental diaphyseal defects: a comparison between resorbable and non-resorbable membranes. *Injury* 2005; 36(12):1460-1466.

Narang R, Wells H. Osteogenesis within polyethylene implants at fracture gaps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1975;39(2):203-209.

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem

cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101-6.

Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998;18:118-23.

Neukam FW, Hausamen JE, Schmelzeisen R, Scheller H. Functional and esthetic reconstruction of complex facial defects after tumor resection and trauma. *Forstschr Kiefer Gesichtschir* 1994;39:39135-39139.

Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, et al. Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(2):157e163.

Nyman R, Magnusson M, Sennerby L, Nyman S, Lundgren D. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 1995;66(2):169-173.

Nyman R, Sennerby L, Nyman S, Lundgren D. Influence of bone marrow on membrane-guided bone regeneration of segmental long-bone defects in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2001 Sep;35(3):239-46.

O

O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation* 1995; 92(8):2163-2168.

Oberle A, Theiss F, Bohner M, Muller J, Kastner SB, Frei C, et al. Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep. *Schweiz. Arch. Tierheilkd* 2005;147(11):482–490.

Ohmae M, Saito S, Morohashi T, Seki K, Qu H, Kanomi R, et al. A clinical and histological evaluation of titanium mini-implants as anchors for orthodontic intrusion in the beagle. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;5:489–97.

P

Paley D, Maar DC. Ilizarov bone transport treatment for tibial defects. *J Orthop Trauma*. 2000;14:76-85.

Parhami F, Tintut Y, Patel JK, Mody N, Hemmat A, Demer LL. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. *Z Kardiol* 2001;90 Suppl 3:27-30.

Park YJ, Lee YM, Park SN, Lee JY, Ku Y, Chung CP, Lee SJ. Enhanced guided bone regeneration by controlled tetracycline release from poly (L-lactide) barrier membranes. *J Biomed Mater Res* 2000 Sep 5;51(3):391-7.

Partridge K, Yang X, Clarke NM, Okubo Y, Bessho K, Sebald W, Howdle SM, Shakesheff KM, Oreffo RO. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Mar 22;292(1):144-52.

Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. *J Orthop Res* 2004;22:73-79.

Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano et al. Patterns of FGF-23, DMP1 and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone* 2009;45:1161-1168.

Perka C, Schultz O, Spitzer RS, Lindenhayn K, Burmester GR, Sittlinger M. Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials* 2000;21(11):1145-1153.

Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon MO. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnology* 2000;18(9):956-963.

Pineda LM, Busing M, Meinig RP, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly (L-lactide) membrane pore

size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mater Res* 1996;31(3):385-394.

Pilliar RM. In: Davies EJ, editor. *The bone–biomaterial interface*. Toronto: University of Toronto Press; 1991. p. 380–7.

Pilliar RM, Deporter D, Watson PA. In: Vincenzini P, editor. *Materials in clinical applications, advances in science and technology*. Proceedings of the 8th CIMTEC world ceramic congress. Faenza, Italy: Techna; 1995. p. 569–79.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143e147.

Presnell SC, Petersen B, Heidaran M. Stem cells in adult tissues. *Seminars in cell developmental Biology* 2002;13(5):369-376.

Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular Pathology* 2003;56(2):86-96.

Q

Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New England Journal of Medicine*, the 2001;344(5):385-386.

Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002;157(5): 851e864.

R

Robey PG, Bianco P. The use of adult stem cells in rebuilding the human face. *J Am Dent Assoc* 2006;137:961–972.

Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992;13 Suppl 1:S3-S6.

Reijnders CM, van Essen HW, van Rens BT, van Beek JH, Ylstra B, Blankenstein MA, Lips P, Bravenboer N. Increased expression of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in cortical bone of the rat tibia after mechanical loading: identification by oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2013;8(11):e79672- e79672.

Rodrigo JJ, Hazelwood SJ, Farver TB, Nyman JS. Total knee replacement with interlocking stems: a preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 2001;(392):139-146.

Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(12):2587-2592.

S

Saito N, Okada T, Horiuchi H, Murakami N, Takahashi J, Nawata M, Ota H, Nozaki K, Takaoka K. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat Biotechnol* 2001 Apr;19(4):332-5.

Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004;4:743-65.

Sancineto CF, Barla JD. Treatment of long bone osteomyelitis with a mechanically stable intramedullar antibiotics dispenser: Nineteen consecutive cases with minimum of 12 months follow up. *J Trauma* 2008;65(6):1416-1420.

Santamaria J, García AM, De Vicente JC, Landa S, Lopez-Arranz JS. Bone regeneration after radicular cyst removal with and without guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 27(2):118-120.

Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K et al. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000;24(4):391-395.

Schantz JT, Hutmacher DW, Ng KW, Khor HL, Lim MT, Teoh SH. Evaluation of a tissue-engineered membrane-cell construct for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002 Mar-Apr;17(2):161-74(a).

Schantz JT, Hutmacher DW, Chim H, Ng KW, Lim TC, Teoh SH. Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology. *Cell Transplant* 2002;11(2):125-38(b).

Schmelzeisen R, Gutwald R, Oshima T, Nagursky H, Vogeler M, Sauerbier S. Making bone II: maxillary sinus augmentation with mononuclear cells--case report with a new clinical method. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Sep;49(6):480-2.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Apr;(205):299-308.

Serra G, Morais LS, Elies CN, Meyers MA, Andrade L, Muller C, et al. Sequential bone healing of immediately loaded miniimplants. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008;134:44–52.

Shabani I, Haddadi-Asl V, Soleimani M, Seyedjafari E, Babaeijandaghi F, Ahmadbeigi N. Enhanced infiltration and biomineralization of stem cells on collagen-grafted three-dimensional nanofibers. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1209-1218.

Shaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2012;10:118-125.

Shanti RM, Li WJ, Nesti LJ, Wang X, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(8): 1640e1647.

Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest* 2005;115(5):1210-1220.

Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999 Jun;17(6):551-4.

Shen Z, Heinegard D, Sommarin Y. Distribution and expression of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein show marked changes during rat femoral head development. *Matrix Biol* 1995;14(9):773-781.

Slaets E, Naert I, Carmeliet G, Duyck. Early cortical bone healing around loaded titanium implants: a histological study in the rabbit. *J Clin Oral Implants Res*. 2009;2:126–34.

Soballe K, Brockstedt-Rasmussen H, Hansen ES, Bünger C. Hydroxyapatite coating modifies implant membrane formation. Controlled micromotion studied in dogs. *Acta Orthop* 1992;63:128–40(a)

Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Jorgensen PH, Bünger C. Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatitecoated implants during stable and unstable mechanical conditions. *J Orthop Res* 1992;10:285–99(b)

Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001;10:S86-S95.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001;414(6859):98-104.

Srouji S, Maurice S, Livne E. Microscopy analysis of bone marrow derived osteoprogenitor cells cultured on hydrogel 3D scaffold. *Microsc Res Tech* 2005;66:132–138.

Srouji S, Kizhner T, Suss-Tobi E, Livne E, Zussman E. 3D Nanofibrous electrospun multilayered construct is an alternative ECM mimicking scaffold. *J Mater Sci* 2008;19:1249–1255.

Stockmann P, Park J, von Wilmsky C, Nkenke E, Felszeghy E, Dehner JF, Schmitt C, Tudor C, Schlegel KA. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - a comparison of different tissue sources. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2012;40(4):310-320.

Suárez-Suárez MA. Regeneración ósea guiada mediante aloinjertos arteriales criopreservados en defectos de hueso largo [tesis doctoral]. Oviedo: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo 2003.

Suárez-Suárez MA, Murcia Mazón A, De Vicente Rodríguez JC, Menéndez Rodríguez P, Del Brío León MA, Riera Rovira P. Utilización de la capacidad de calcificación y osificación de la pared arterial para conseguir regeneración ósea completa en defectos de hueso largo. *Revista de Ortopedia y Traumatología.* 2005;49(6):450-462.

T

Teixeira JO, Urist MR. Bone morphogenetic protein induced repair of compartmentalized segmental diaphyseal defects. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998;117(1-2):27-34.

Tenenbaum HC, Heersche JN. Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology* 1985;117(5):2211e2217.

Teng SH, Lee EJ, Wang P, Shin DS, Kim HE: Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87:132-138.

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981;26(1 Pt 1):99-105.

Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Bohner M, et al. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2005;26 (21):4383–4394.

Tintut Y, Parhami F, Bostrom K, Jackson SM, Demer LL. Calcitonin stimulates osteoblast-like differentiation of calcifying vascular cells. Potential signaling pathway for vascular calcification. *J Biol Chem* 1998; 273(13):7547-7553.

Tokuda S, Obata A, Kasuga T. Preparation of poly (lactic acid)/siloxane/calcium carbonate composite membranes with antibacterial activity. *Acta Biomater* 2009;5:1163-1168.

Towler DA, Bidder M, Latifi T, Coleman T, Semenkovich CF. Diet-induced diabetes activates an osteogenic gene regulatory program in the aortas of low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 1998;273(46):30427-30434.

Tyson KL, Reynolds JL, McNair R, Zhang Q, Weissberg PL, Shanahan CM. Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):489-494.

U

Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toba T, Yoshitani M, Nakamura T, Tabata Y, Shimizu Y. Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor-beta1 to promote bone repair in skull defects in rabbits. *Biomaterials* 2002 Feb;23(4):1003-10.

Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Suzuki K, Ryoike K. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials* 2002;23:2027-2033.

Ueyama Y, Koyama T, Ishikawa K, Mano T, Ogawa Y, Nagatsuka H, Suzuki K. Comparison of ready-made and self-setting alginate membranes used as a barrier membrane for guided bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2006, 17:281-288.

Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-899.

V

Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med* 2001 May 17;344(20):1511-4.

Viateau V, Guillermin G, Calando Y, Logeart D, Oudina K, Sedel L, Hannouche D, Bousson V, Petite H. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: an ovine model. *Vet Surg* 2006;35:445-452.

Viateau V, Bensidhoum M, Guillermin G. Use of the induced membrane technique for bone tissues engineering purposes: Animal Studies. *Orthop Clin North Am* 2010;41(1):49-56.

Von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, Grunenfelder S, van Lenthe GH, Muller R, et al. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials* 2006 Oct;27 (30):5186–5198.

W

Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin. *Circ Res* 1999;84(2):166-178.

Wang W, Xu J, Kirsch T. Annexin-mediated Ca²⁺ influx regulates growth plate chondrocyte maturation and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278(6):3762-3769.

Watson KE, Bostrom K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J Clin Invest* 1994;93(5):2106-2113.

Weinand C, Gupta R, Huang AY, Weiberg E, Madisch I, Qudsi RA, Neville CM, Pomerantseva I, Vacante JP. Comparison of hydrogels in the in vivo formation of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and beta-tricalcium phosphate. *Tissue Eng* 2007;13:757-65.

Wehrbein H, Diedrich P. Endosseous titanium implants during and after orthodontic load-an experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1993;4(2):76–82.

Whang K, Tsai DC, Nam EK, Aitken M, Sprague SM, Patel PK, Healy KE. Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1998 Dec 15;42(4):491-9.

Willette RN, Gu JL, Lysko PG, Anderson KM, Minehart H, Yue T. BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 1999;36(2):120-125.

Wu CA, Pettit AR, Toulson S, Grøndahl L, Mackie EJ, Cassady AI. Responses in vivo to purified poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) implanted in a murine tibial defect model. *J Biomed Mater Res A* 2009;91:845-854.

Y

Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 1998;Suppl 355:73e81.

Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S, Ohta T. In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation* 2000 Jan 15;69(1):128-34.

Z

Zhang J, Huang C, Xu Q, Mo A, Li J, Zuo Y. Biological properties of a biomimetic membrane for guided tissue regeneration: a study in rat calvarial defects. *Clin Oral Implants Res* 2010, 21:392-397(a)

Zhang J, Xu Q, Huang C, Mo A, Li J, Zuo Y. Biological properties of an anti-bacterial membrane for guided bone regeneration: an experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:321-327(b)

Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 1996;122(10):2977-2986.

Zhang H, Lu S, Wang J. [Haversian remodeling in guided bone regeneration] [resumen]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1998;36(5):275-7, 59.(a)

Zhang H, Lu S, Wang J. [Influence of stripping periosteum on bone formation in guided tissue regeneration] [resumen]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1998;36(5):278-80, 60(b).

Zhang Y, Lu S, Wang J, Zhang B. [Expression of BMP-2, TGF-beta, bFGF in guided bone regeneration] [resumen]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1999;37(7):399-402.

Zhang Z, Lu S, Wang J. [An experiment study of the guided bone regeneration] [resumen]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 1996;34(10):599-601

Zhao M, Zhou J, Li X, Fang T, Dai W, Yin W, Dong J. Repair of bone defect with vascularized tissue engineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits. *Microsurgery* 2011;31(2):130-137.

Zellin G, Linde A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. An experimental study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1997;31(2):97-104.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211e228.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279e4295.