

UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Dto. de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinarias

Área de Cirugía



DESARROLLO DE UN MODELO OSTEOPORÓTICO OVINO. UTILIZACIÓN DE PRP, BMP-2 Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES ALOGÉNICAS EN LA REGENERACIÓN DE DEFECTOS ÓSEOS Y OSTEOINTEGRACIÓN DE IMPLANTES DE TITANIO

DEVELOPMENT OF AN OSTEOPOROTIC SHEEP MODEL. BONE REGENERATION AND TITANIUM IMPLANTS OSSEOINTEGRATION USING PRP, BMP-2 AND ALLOGENEIC MESENCHYMAL STEM CELLS

Memoria para optar al Grado de Doctor con Mención Internacional presentada por

Fidel San Román Llorens

dirigida por el Prof.Dr.D. José Manuel Gonzalo Orden

León, 22 de Noviembre 2013

A mis padres y hermano

A toda mi familia en especial a mis abuelos

A mi abuelo Fidel que me transmitió desde

pequeño el amor por la naturaleza y la veterinaria

A María

AGRADECIMIENTOS

- A los Profesores D. José Manuel Gonzalo Cordero y Dña Maria Asunción Orden Recio que desde el principio me acogieron profesional y personalmente como uno más de su familia y a los que nunca podré agradecerse los suficientemente.
- A mi Director el Profesor José Manuel Gonzalo Orden por su apoyo, dedicación y enseñanzas sin los cuales habría sido imposible la realización de este trabajo.
- A María Santos Galdiano, su ayuda profesional y personal han sido siempre fundamentales en los momentos más difíciles.
- Al Profesor de la Facultad de Ciencias del Deporte Jose Antonio Fernandez de Paz pieza clave en esta investigación.
- Al Profesor Fernando Muñoz Guzón del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de Lugo, a María y a todo su equipo por su inestimable ayuda en la preparación, estudio y valoración estadística de las muestras.
- Al Profesor Antonio Rodriguez Bertos del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid por su magnífico trabajo en la valoración de los hallazgos histológicos .
- Al Profesor Arsenio Fernández López del Departamento Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de León y a su magnífico equipo representado por Irene, María, Noelia, Berta, Diego y Marta, imprescindibles en la preparación, manejo, y estudio del plasma rico en plaquetas (PRP), proteína morfogenética (BMP-2) y las células madre utilizadas.
- Al Profesor Juan Carlos Fernandez Dominguez de Tejerina , por su apoyo y animo y prestados.

- A los compañeros de mi Departamento, en especial a los de Cirugía, Profesores, Jose Rodriguez Altonaga, Alicia Ester Serantes, Jesús Maria Sanchez Fernandez, Marta Regueiro Purriños, y a todos los becarios Nelson, Manu, Jose, Anabel, Noelia, Sara, Paco, Paola, Beatriz y Susana, por su paciencia y apoyo en todo momento durante el desarrollo de esta investigación.
- Al personal técnico de mi Departamento muy especialmente a Victor, Carlos, Santi, José Luis, Andrés, Santiago, Guadalupe y David que siempre me han apoyado incondicionalmente, día y noche, por el cuidado y manejo profesional de los animales del estudio, así como por su ayuda prestada.
- A Dña. Mercedes Roldán Chesa, Directora General de la empresa SOADCO por su confianza y aportación de los implantes dentales Klockner utilizados en este estudio.
- A las secretarias del Departamentos y Rectorado, Rosi y Piedad que siempre han estado pendientes de que todo llegara a buen término.
- En general a todos los Profesores de Cirugía de las Universidades Españolas de Murcia, Barcelona, Zaragoza y Lugo , y de la Facultad de Veterinaria de Universidad de Munich que me aportaron con sus enseñanzas los conocimientos quirúrgicos esenciales para realizar esta Tesis.

ÍNDICE

I. RESUMEN/ SUMMARY.....	6
II. ABREVIATURAS.....	9
III. INTRODUCCIÓN.....	13
1. OSTEOPOROSIS.....	14
1.1 Definición.....	14
1.2 Clasificación.....	15
1.3 Epidemiología.....	18
1.4 Fisiopatología de la enfermedad.....	20
1.4.1 Anatomía e histología ósea: composición y organización del hueso.....	20
1.4.2 Fisiología ósea.....	24
1.4.3 Proceso de remodelación ósea.....	25
1.4.4 Osteoporosis inducida por glucocorticoides (OIC).....	30
1.4.5 Osteoporosis postmenopáusica.....	32
1.5 Diagnóstico.....	33
1.5.1 Densitometría ósea.....	34
1.5.2 Resonancia Magnética (RM).....	37
1.5.3 Micro-CT, QCT y HR-pQCT.....	39
1.5.4 Histomorfometría ósea.....	41
1.5.5 Marcadores bioquímicos.....	41
1.6 Tratamiento de la osteoporosis.....	42
1.6.1 Tratamiento médico de la osteoporosis.....	43
1.6.2 Tratamiento de las fracturas osteoporóticas.....	47
1.7 Situación actual del problema.....	51
2. MODELOS OSTEOPORÓTICOS.....	53
3. REGENERACIÓN ÓSEA.....	57
3.1 Injertos óseos.....	57
3.1.1 Autoinjerto o injerto autólogo.....	57

3.1.2 Homoinjerto o aloinjerto.....	58
3.1.3 Isoinjerto o injerto singénico.....	61
3.1.4 Heteroinjerto o Xenoinjerto.....	61
3.2 Biomateriales.....	63
3.2.1 Biocompatibilidad.....	63
3.2.2 Bioestabilidad, bioactividad y seguridad biológica.....	65
3.2.3 Biomateriales y tejido óseo.....	66
3.2.4 Clasificación de los biomateriales.....	66
3.2.5 Matriz ósea desmineralizada (DBM).....	67
3.2.6 Colágeno.....	68
3.2.7 Titanio.....	68
3.3 Factores de crecimiento.....	70
4. INGENIERÍA TISULAR.....	73
4.1 Células.....	75
4.1.1 Biología de las células madre mesenquimales (MSCs).....	76
4.1.2 Obtención de las MSCs.....	77
4.1.3 Aislamiento de las MSCs.....	79
4.1.4 Diferenciación de las MSCs.....	80
4.1.5 MSCs procedentes del tejido adiposo.....	81
4.2 Matrices celulares e injertos combinados.....	84
5. IMPLANTES DE TITANIO.....	85
5.1 Tipos de implantes dentales.....	87
5.2 Tratamientos de superficie.....	90
5.2.1 Tratamientos mecánicos.....	91
5.2.2 Métodos químicos.....	92
5.2.3 Métodos electroquímicos.....	93
5.2.4 Métodos fotolitográficos.....	93

5.3 Recubrimientos del implante.....	94
5.4 Esterilización de los implantes.....	95
5.5 Cirugía implantológica.....	96
5.6 Osteointegración de implantes.....	96
5.7 Técnicas de análisis de la osteointegración.....	99
 IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	 103
 V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	 106
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	107
2. MATERIAL Y EQUIPAMIENTO.....	109
3. MÉTODOS.....	112
3.1 Ovariectomía.....	112
3.2 Alimentación.....	113
3.3 Corticoterapia.....	120
3.4 Protocolos anestésicos.....	120
3.5 Técnica densitométrica.....	122
3.6 Obtención, aislamiento, cultivo y diferenciación celular.....	124
3.6.1 Protocolo de obtención de la grasa.....	124
3.6.2 Procesado de la grasa para la obtención de las ADMCs.....	125
3.6.3 Cultivo primario y expansión de las ADMCs.....	127
3.6.4 Inducción osteogénica de las ADMCs.....	128
3.6.5 Obtención del PRP y resuspensión de las células.....	129
3.7 Creación de defectos y colocación de implantes.....	130
3.7.1 Método de creación de defectos óseos femorales.....	132
3.7.2 Método de colocación de los implantes.....	134
3.8 Procesado de las muestras y estudios histomorfométricos.....	135

3.8.1 Preparación.....	135
4. MANEJO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	143
5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	143
VI. RESULTADOS.....	144
1. DENSITOMETRÍA ÓSEA.....	145
2. HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA.....	147
2.1 Regeneración de defectos óseos.....	147
2.2 Osteointegración de implantes.....	148
2.3 Medidas a nivel del radio, cuello femoral y vértebra lumbar.....	151
2.4 Hallazgos histológicos.....	152
2.4.1 Hueso cortical y trabecular normal y osteoporótico.....	152
2.4.2 Defectos femorales.....	155
2.4.3Implantes.....	161
VII. DISCUSIÓN.....	167
VIII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	177
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	182

I. RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

El presente trabajo de tesis doctoral describe con detalle la elaboración de un modelo animal osteoporótico en la especie ovina y la aplicación en el mismo de PRP (plasma rico en plaquetas), BMP-2 (proteína morfogenética ósea 2) y ADSCs (células mesénquimales procedentes del tejido adiposo) alogénicas en la regeneración de defectos óseos y la osteointegración de implantes de titanio. En este estudio experimental se emplearon un total de 18 individuos que se dividieron en tres grupos de 6 animales (grupo 1= control, grupo 2= osteoporosis, grupo 3= osteoporosis, defectos e implantes).

En la primera parte del estudio, y con el fin de inducir la osteoporosis, los individuos del grupo 2 fueron sometidos a ovariectomía bilateral, recibieron corticoterapia y fueron alimentados a base de una dieta pobre en Ca y Vitamina D. Para la validación del modelo se recurrió a la utilización de densitometría e histomorfometría ósea. Los valores obtenidos en este grupo se compararon con los del grupo 1 que no fue sometido a ovariectomía ni a corticoterapia y recibió una alimentación convencional. En cuanto a la densitometría ósea se desarrolló un sistema de posicionamiento específico que permitió garantizar la fiabilidad y repetibilidad de las mediciones a nivel de las vértebras lumbares y cuellos femorales. Los estudios histomorfométricos se efectuaron sobre piezas óseas obtenidas postmortem, concretamente vértebras lumbares y cuellos femorales, que fueron previamente incluidas en bloques de metacrilato.

En la segunda parte del estudio, se crearon defectos óseos a nivel de los cóndilos femorales y se colocaron implantes de titanio a nivel de la epífisis proximales de la tibia en animales en los que previamente se había inducido la condición osteoporótica. En este tercer grupo de individuos (n=6) se valoró la efectividad de la utilización de BMP-2, PRP y ADSCs alogénicas a nivel de los defectos e implantes mediante mediciones histomorfométricas realizadas sobre las muestras óseas obtenidas postmortem 2 meses después de la cirugía.

Respecto a los resultados obtenidos, el estudio estadístico de los valores densitométricos e histomorfométricos de los animales de los grupos 2 y 3 mostró diferencias significativas con respecto a los del grupo 1 y reveló pérdidas de densidad mineral ósea (DMO) suficientes como para considerar a estos individuos osteoporóticos. En cuanto a la regeneración de defectos óseos, los valores medios de regeneración ósea fueron inferiores en los defectos en los que se emplearon ADSCs presentando diferencias estadísticamente significativas. Así mismo, respecto a la osteointegración de implantes de titanio, los porcentajes de osteointegración fueron

también inferiores en los implantes en los que se emplearon ADSCs presentando diferencias estadísticamente significativas respecto a los implantes en los que no se empleó nada y respecto a aquellos en los que se empleó PRP y BMP-2. En estos últimos los valores medios de osteointegración fueron superiores pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a los obtenidos en los implantes que no llevaban nada.

SUMMARY

This doctoral thesis describes the development of an osteoporotic sheep model and the application of PRP (platelet-rich plasma), BMP2 (bone morphogenetic protein2) and allogeneic ADSCs (adipose tissue-derived stem cells) to promote bone healing in bone cavitory defects and the osseointegration of titanium implants in this experimental model. Eighteen animals were used in this experimental procedure that were divided into three groups with six animals per group (group 1 = control, group 2 = osteoporosis, group 3 = osteoporosis, defects and implants).

In the first part of this study, the individuals of group 2 underwent bilateral ovariectomy, received glucocorticoid treatment and were fed with a low calcium and vitamin D diet. In order to validate the osteoporotic condition of these animals, bone densitometry scans and bone histomorphometric analyses were performed. Individuals of group 1 remained untreated and were fed with a conventional diet, and their bone densitometric and histomorphometric values were used as reference values for non-osteoporotic animals. A specific positioning system was developed to guarantee the reproducibility and fiability of the BMD (bone mineral density) measurements. Histomorphometric analyses were performed in lumbar vertebrae and femoral neck bone samples obtained post mortem, that were embedded in methyl methacrylate.

In the second part of this study, femoral condylar cavitory defects were created and titanium implants were placed in a third group of osteoporotic sheep that had previously followed the same osteoporotic induction protocol. The application of PRP, BMP2 and ADSCs to promote bone healing in bone cavitory defects and the osseointegration of titanium implants was assessed in this group through histomorphometric analyses of bone samples obtained postmortem.

BMD and bone histomorphotric values showed significative statistical differences between individuals of groups 2 and 3 and individuals of group 1, and the BMD loss of groups 2 a 3 was big enough to consider them as ostoporotic. Regarding the results of bone cavitory defects healing, the bone regeneration mean values were lower in the defects treated with ADSCs, although these differences failed to achieve statistical significance. Regarding the results of titanium implants osseointegration (BIC), mean values were also lower in the implants treated with ADSCs compared with the PRP + BMP2 treated implants and non-treated implants, showing significative statistical differences. The BIC mean values were higher in the the PRP + BMP2 treated implants compared with the non-treated.

II. ABREVIATURAS

- **1,25 (OH)3D:** 1,25 dihidroxi-vitamina D3
- **ADSCs:** Células madre derivadas del tejido adiposo
- **AEMPS:** Asociación española de medicamentos y productos sanitarios
- **AINES:** Antiinflamatorios no esteroideos
- **ALCAM:** Molécula de adhesión celular leucocito-activada
- **ASCs:** Células madre adultas
- **BA:** Área de hueso
- **BAI:** Área de hueso interroscalo
- **BAP:** Área de hueso perimplantaria
- **BIC:** contacto hueso implante
- **BICc:** contacto hueso implante a nivel de la región cortical
- **BMP:** Proteína morfogenética ósea
- **BRU:** Unidades de remodelación ósea
- **C-FMS:** Receptor del factor1 estimulante de colonias
- **CFU-U:** Unidades formadoras de colonias fibroblásticas
- **DBM:** Matriz ósea desmineralizada
- **DC-STAMP:** Proteína transmembrana específica de las células dendríticas
- **DE:** Desviación estándar
- **DMO:** Densidad mineral ósea
- **DO:** Densitometría ósea
- **DXA:** Absorciometría con rayos X de Energía dual
- **EFG:** Factor de crecimiento epitelial
- **FDA:** Agencia de drogas y alimentos de Estados Unidos
- **FGF:** Factor de crecimiento fibroblástico
- **FSH:** Hormona folículo estimulante
- **GH:** Hormona del crecimiento
- **GM-CSF:** Factor estimulante de colonias granulocítico macrofágico
- **HA:** Hidroxiapatita
- **HLA-DR:** Antígeno leucocitario humano-DR

- **HR-pQCT:** Tomografía computarizada periférica de alta resolución
- **HTLV-I:** Virus linfotrófico de célula T humano I
- **HTLV-II:** Virus linfotrófico de célula T humano II
- **ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular
- **IGFs:** Factores de crecimiento insulínico
- **KeV:** Kiloelectronvoltio
- **LPA:** Lipoaspiración
- **LRP5:** Proteína asociada al receptor de lipoproteína de baja densidad 5
- **M-CSF:** Factor estimulante de colonias de macrófagos
- **MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad
- **Micro-CT:** Microtomografía computerizada
- **MO:** Médula ósea
- **MSCs:** Células madre mesenquimales
- **OB:** Osteoblastos
- **OC:** Osteoclastos
- **OHT:** Ovariohisterectomía
- **OIC:** Osteoporosis inducida por glucocorticoides
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **OP-1:** Proteína osteogénica-1
- **OVX:** Ovariectomía
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas
- **PRP:** Plasma rico en plaquetas
- **QCT:** Tomografía computarizada cuantitativa
- **Quantitative US:** Ultrasonografía cuantitativa
- **RANK:** Receptor activador del factor nuclear kappa β
- **RANKL:** Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa β
- **RM:** Resonancia magnética
- **RPMI:** Medio Roswell Park Memorial Institute
- **RUNX2:** Factor de transcripción 2 relacionado con Runt

-
- **Rx:** Rayos X
 - **SCF:** Factor de células madre
 - **TA:** Área total
 - **TE:** Tiempo eco
 - **TGFβ:** Factor de crecimiento transformante β
 - **TNF:** Factor de necrosis tumoral
 - **TR:** Tiempo de repetición
 - **VCAM-1:** Proteína de adhesión de células vasculares-1
 - **VEGF-C:** Factor de crecimiento del endotelio vascular
 - **VHB:** Virus de la hepatitis B
 - **VHC:** Virus de la hepatitis C
 - **VIH-1:** Virus de la inmunodeficiencia humana-1
 - **VIH-2:** Virus de la inmunodeficiencia humana-2

III. INTRODUCCIÓN

1. OSTEOPOROSIS

1.1 Definición

La osteoporosis es la enfermedad ósea metabólica más frecuente. Ésta se define como una enfermedad sistémica del organismo caracterizada por una disminución de la masa ósea y un deterioro de la estructura microscópica del tejido óseo, que conlleva un incremento de la fragilidad de los huesos y el consecuente aumento de la susceptibilidad para sufrir fracturas óseas^{1,2}.

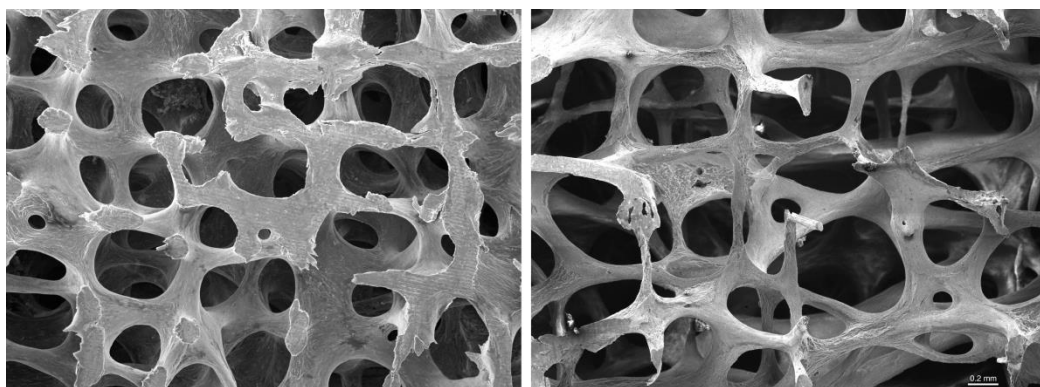


Figura 1. Diferencias microscópicas observadas en muestras de tejido óseo normal (izda) y osteoporótico (dcha).

No obstante, en la práctica clínica la definición operativa de osteoporosis que se utiliza es la de la OMS (Organización Mundial de la Salud, 1994), que se basa en la medición de la masa ósea mediante densitometría ósea (DO). De esta forma la OMS define la osteoporosis como una densidad mineral ósea (DMO) menor o igual a 2,5 desviaciones estándar por debajo de la DMO promedio de personas adultas jóvenes sanas, (“escala T” o “T score”). Así, en función de los valores densitométricos obtenidos la densidad mineral ósea de los individuos puede clasificarse como:

- a) **Normal:** Cuando la densidad mineral ósea es inferior a -1 desviaciones estándar en la escala T.
- b) **Osteopénica:** Cuando la densidad mineral ósea se encuentra entre -1 y -2.5 desviaciones estándar en la escala T.
- c) **Osteoporótica:** Si la densidad mineral ósea es inferior a -2.5 desviaciones estándar en la escala T.

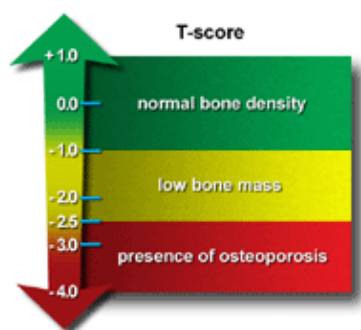


Figura 2. T-score: Valor de DMO comparado con el valor promedio para personas sanas de 20 años expresado en términos de desviación estándar (DE).

1.2 Clasificación

La osteoporosis puede ser clasificada como:

1) Osteoporosis primaria

La pérdida de masa ósea está ligada al proceso de envejecimiento (tipos I y II) o bien su origen es desconocido (osteoporosis idiopática). Suponen más del 95% de los casos de osteoporosis en mujeres y aproximadamente un 80% en los hombres³. A su vez se clasifica en:

1.1) Tipo I o postmenopausica

Está relacionada con el déficit de estrógenos que tiene lugar tras la menopausia. La pérdida de masa ósea es superior a nivel del hueso trabecular y el mayor porcentaje de las fracturas que conlleva se localizan a nivel de las vértebras lumbares y la región distal del radio (fractura de Colles)⁴. Afecta fundamentalmente a mujeres de entre 50 y 75 años.

1.2) Tipo II o senil

Asociada a cambios fisiológicos relacionados con el envejecimiento. La pérdida de masa ósea es superior a nivel del hueso cortical y las fracturas de cadera son las que tienen mayor representación⁴. Afecta a hombres y mujeres a partir de los 70 años.

1.3) Osteoporosis idiopática

Cuando su causa es desconocida.

2) Osteoporosis secundaria

Las causas de osteoporosis secundaria son múltiples (Tabla 1): enfermedades genéticas, endocrinas, gastrointestinales, hematológicas, reumatológicas, nutricionales, farmacológicas, etc⁵.

Tabla 1. Diferentes causas de osteoporosis secundaria ¹

1. Enfermedades endocrinológicas	A. Estados hipogonadales - Insensibilidad a los andrógenos - Trastornos de la conducta alimentaria - Amenorrea de los atletas - Hiperprolactinemia - Panhipopituitarismo - Menopausia precoz - Síndrome de Turner o de Klinefelter
1. Enfermedades endocrinológicas	B. Patologías endocrinas - Acromegalia - Insuficiencia suprarrenal - Enfermedad de Cushing - Diabetes mellitus tipo I - Hiperparatiroidismo primario y secundario. - Secreción tumoral de PTH - Hipertiroidismo - Déficits nutricionales (Calcio, Vitamina D , Magnesio, etc.)
2. Enfermedades gastrointestinales	- Enfermedad celiaca - Gastrectomía - Malabsorción - Enfermedad Inflamatoria Intestinal - Cirrosis biliar primaria - Enfermedad hepática grave - Insuficiencia pancreática exocrina.
3. Trastornos genéticos	- Hemocromatosis - Hipofosfatasia

	- Osteogénesis imperfecta - Síndrome de Ehlers –Danlos - Síndrome de Marfan - Síndrome de Menkes - Síndrome de Riley-Day - Porfirias - Enfermedades de depósito
4. Trastornos hematológicos	- Mieloma múltiple - Leucemias y linfomas - Mastocitosis sistémica - Anemia perniciosa
5. Enfermedades reumáticas	- Artritis reumatoide - Espondilitis anquilosante
6. Transplante de órganos	- Trasplante de médula - Trasplante de riñón, hígado, corazón o pulmón.
7. Drogas	- Anticoagulantes: heparina y cumarínicos - Anticomieles - Ciclosporina y Tacrolimus - Drogas Citotóxicas - Glucocorticoides y ACTH - Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas - Metotrexato

1.3 Epidemiología

La OMS considera la osteoporosis el segundo problema de salud en importancia, siendo el primero las enfermedades cardiovasculares. El aumento de la esperanza de vida ha traído consigo un aumento de su incidencia año tras año. Merced a este último hecho y a su carácter asintomático la osteoporosis ha sido denominada como la “epidemia silente del siglo XXI”.

Cuando hablamos de osteoporosis nos encontramos frente a un problema sanitario global cuya importancia va en aumento con el envejecimiento de la población. Se trata de un proceso prevenible y tratable, pero la falta de signos de alerta previos a la aparición de fracturas, conlleva que pocos pacientes sean diagnosticados en fases tempranas y tratados de forma efectiva⁶.

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más prevalente. Su distribución dentro de la población está fuertemente ligada al sexo. Se ha observado que las mujeres tienen una densidad ósea menor que los hombres y que después de la menopausia, la incidencia de fracturas es de dos a tres veces mayor que en los hombres. En España la prevalencia en mujeres es 2,5 veces superior a la que presentan los varones y se estima que a nivel mundial podría afectar a aproximadamente 200 millones de mujeres⁷.

En cuanto a la distribución mundial de la enfermedad debemos considerar que aquellos países con esperanzas de vida media superiores, presentarán una población más longeva y por lo tanto una mayor prevalencia. Esto contribuye a que la posibilidad de desarrollar osteoporosis en áreas de Norteamérica y Europa sea superior. No obstante, también se han descrito diferencias étnicas relacionadas con el desarrollo de la enfermedad y la consecuente aparición de fracturas. Por ejemplo, las mujeres de raza blanca caucásica tienen una mayor incidencia de fracturas que las hispanas y que las afroamericanas^{8,9}. Los individuos de raza afroamericana presentan DMO medias superiores por lo que presentan una menor predisposición al desarrollo de la enfermedad. Además, otros factores morfológicos propios de la constitución esquelética, como una menor longitud del cuello femoral que ha sido constatada en individuos de raza asiática, parecen dificultar la aparición de fracturas de cadera independientemente de los valores de DMO¹⁰. Sólo en el año 2000 se contabilizaron alrededor de 9.000.000 de fracturas osteoporóticas en todo el mundo, siendo Europa el continente que presentó un mayor número de casos (34,8%)¹¹.

A nivel nacional, se calcula que 2 millones de mujeres y 800.000 varones presentan osteoporosis, esto supone aproximadamente el 35% de las mujeres españolas mayores de 50 años, porcentaje que se eleva a un 52% en las mayores de 70 años. Una de cada 5 mujeres de más de 50 años tiene al menos una fractura vertebral debida a la osteoporosis, que se asocia a deterioro de la calidad de vida y a riesgo aumentado de otras fracturas¹². Además, existe una elevada mortalidad asociada a la presentación de fracturas de cadera y vertebrales¹³.

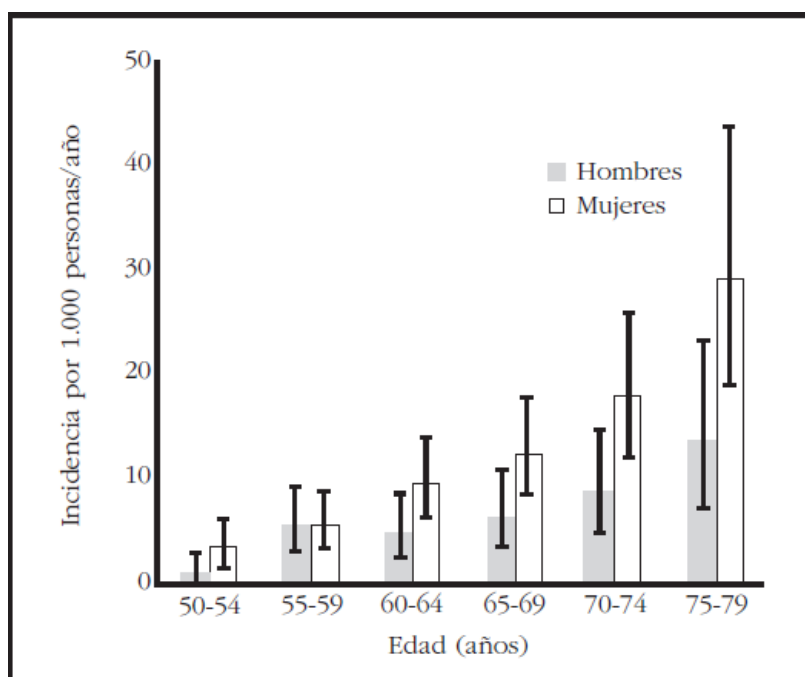


Figura 3. Incidencia de la fractura vertebral en función de la edad y el sexo¹

Respecto a la localización de las fracturas osteoporóticas, éstas van a encontrarse principalmente a nivel de la cadera, porción distal del radio (fractura de Colles) y vértebras lumbares. Según los resultados publicados por Johnell et al¹¹, de los 9.000.000 de fracturas que se estima se produjeron en el año 2000, 1.600.000 fueron fracturas de cadera, 1.700.000 afectaron a la región del antebrazo y 1.400.000 fueron fracturas vertebrales. Otras regiones corporales comúnmente asociadas con fracturas osteoporóticas son el húmero, la tibia, el peroné, las costillas, la clavícula, la escápula y el esternón¹⁴.

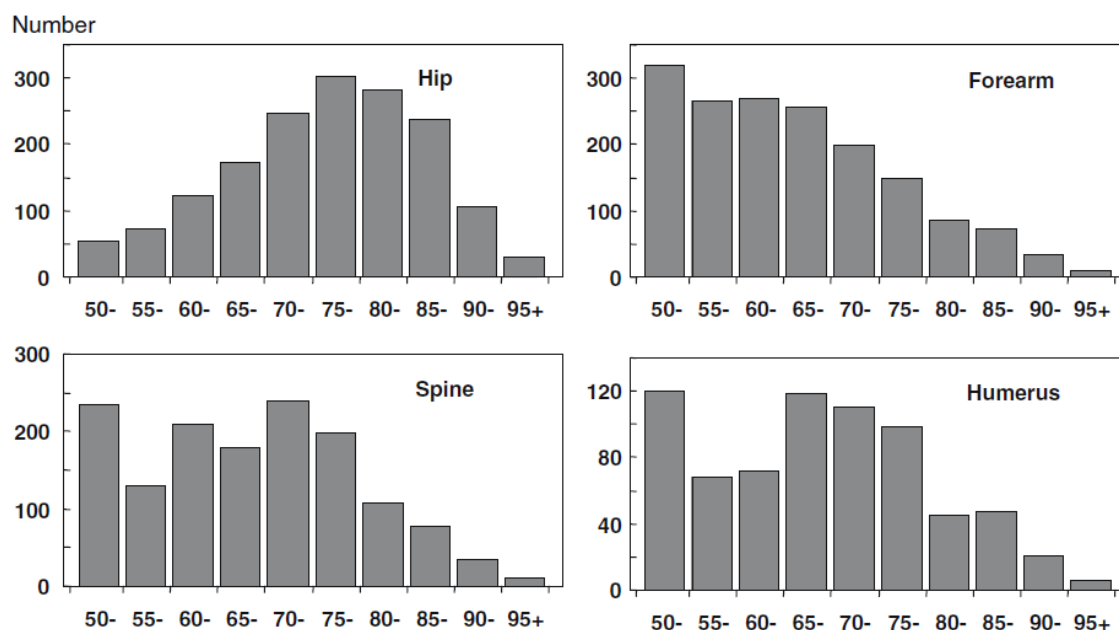


Figura 4. Número de miles casos de fracturas osteoporóticas en función de la edad y distintas localizaciones anatómicas contabilizadas a nivel mundial en el año 2000 ²

Desde un punto de vista epidemiológico, también es interesante valorar la mortalidad asociada a la aparición de fracturas osteoporóticas. Por causas poco conocidas, la mortalidad hospitalaria por fractura de cadera y fractura vertebral es el doble en varones que en las mujeres (10% frente a 4,7%) y la mortalidad al año de la fractura también es mayor en varones con respecto a mujeres (35-37% frente a 28%) ¹³. Las fracturas de Colles (porción distal del radio), sin embargo, no se han asociado a un incremento de la mortalidad ¹⁵.

1.4 Fisiopatología de la enfermedad

Para poder comprender los mecanismos responsables del desarrollo de la osteoporosis, es necesario un profundo conocimiento de la anatomía, histología y fisiología ósea en condiciones no patológicas.

1.4.1 Anatomía e histología ósea: composición y organización del hueso

El esqueleto humano se compone de 213 huesos, sin tener en cuenta los sesamoideos ¹⁶. En función de su morfología vamos a encontrar cuatro tipos de huesos:

- Huesos largos: clavículas, húmeros, cúbitos, radios, metacarpianos, fémures, tibias, peronés, metatarsianos y falanges.

- Huesos cortos: huesos carpales y tarsales, rótulas y sesamoideos.
- Huesos planos: huesos del cráneo, mandíbula, escápula, esternón y costillas.
- Huesos irregulares: vértebras, sacro, coxis y huesos hioideos.

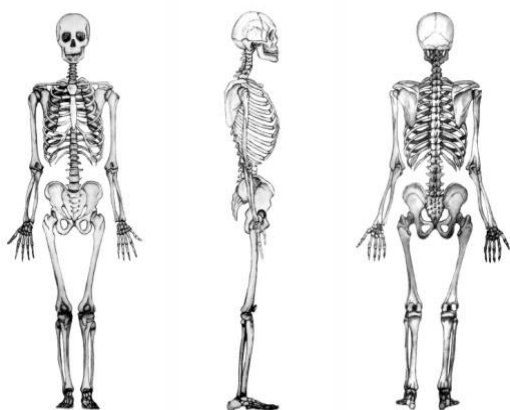


Figura 5. Morfología del esqueleto humano

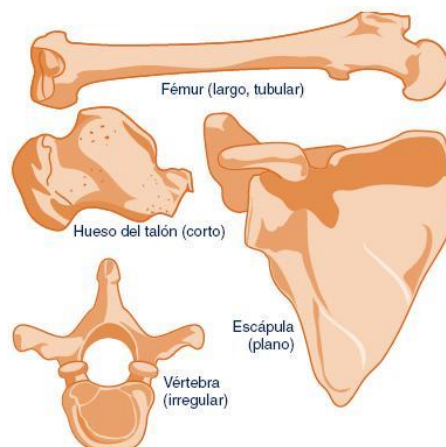
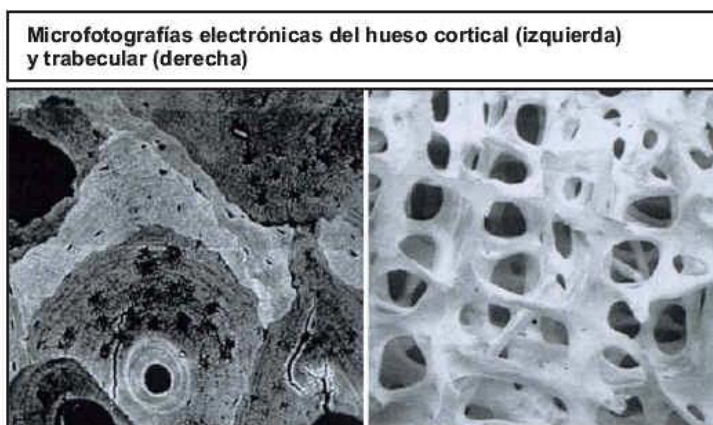
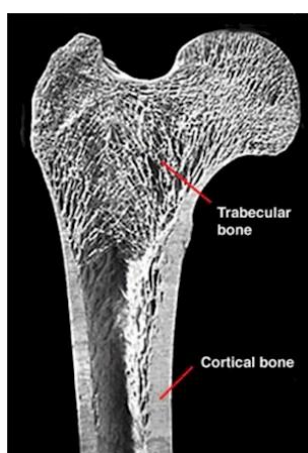


Figura 6. Ejemplos de diferentes tipos óseos

En el hueso del individuo adulto podemos encontrar dos tipos de tejido óseo claramente diferenciados: el hueso cortical y el hueso trabecular o esponjoso, cuya proporción y distribución variará en función del tipo óseo y de la localización dentro del hueso. Así, las vértebras presentan un ratio hueso cortical: esponjoso de un 25:75, la cabeza femoral un ratio 50:50 y la diáfisis radial 95:5¹⁷.



Figuras 7 y 8. Distribución de hueso cortical y trabecular/esponjoso (fig.7 izda). Microfotografías del tercio proximal del fémur (fig.8 dcha)³

El tejido óseo cortical constituye la superficie externa del hueso y encierra en su interior al hueso esponjoso, constituido por placas trabeculares y barras tisulares que se conectan

entre sí y con la cara interna de las corticales óseas. Dicho tejido carece de cavidades vasculares, ya que su matriz extracelular se ordena en laminillas óseas, que se pueden disponer de manera paralela (hueso cortical laminar) o de manera concéntrica alrededor de un canal (hueso compacto de tipo osteónico). A través de dichos canales discurren vasos sanguíneos y nervios, y junto con las laminillas óseas concéntricas y los osteocitos, dispuestos entre las laminillas, forman un conjunto denominado “osteona” o sistema de Havers. Los canales de Havers de osteonas cercanas están conectados mediante canales transversales denominados canales de Volkmann. Del orden de 4 a 20 laminillas óseas se disponen alrededor de un canal de Havers. Los osteocitos se encuentran en unos huecos localizados en las laminillas óseas denominados lagunas. De estas lagunas salen pequeños conductos denominados canalículos por donde los osteocitos emiten prolongaciones celulares. Los canalículos se abren a los canales de Havers por donde viajan los vasos sanguíneos, y desde donde los osteocitos obtienen los nutrientes¹⁸.

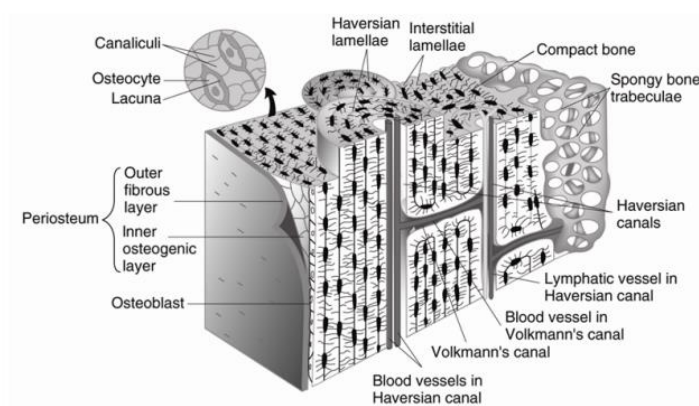


Figura 9. Esquema de una sección ósea corticoesponjosa de un hueso largo⁴

El hueso esponjoso o trabecular presenta grandes espacios denominados cavidades vasculares, ocupados por vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos. Estas cavidades están delimitadas por trabéculas óseas en las cuales las fibras de colágeno pueden estar dispuestas de manera entrecruzada (hueso trabecular no laminar) o bien ordenadas en laminillas óseas (hueso trabecular laminar). Generalmente, durante la formación de los huesos u osteogénesis se forma primero un hueso trabecular no laminar, denominado primario, que posteriormente será sustituido por un hueso secundario que es trabecular laminar. Este último se encuentra por lo general en el interior de los huesos, como el interior de la epífisis o en la cabeza de los huesos largos, siempre rodeado por hueso compacto¹⁸.

El hueso cortical supone un 80% de la masa ósea y el trabecular el 20% restante. El hueso cortical tiene una baja relación superficie/volumen y su principal función es la protección y el soporte. El hueso esponjoso está conformado por trabéculas dispuestas en panal y presenta una elevada relación superficie/volumen que es muy importante para un metabolismo óseo normal.

Además en el hueso se pueden diferenciar dos fases principales en su composición: la fase mineral o inorgánica, y la fase orgánica u osteoide. La fase orgánica está fundamentalmente compuesta por fibras de colágeno de tipo I y proteínas no colágenas como la osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas y la osteopontina. También podemos encontrar enzimas y factores de crecimiento. En el adulto las fibras de colágeno de tipo I se disponen preferencialmente en capas formando una estructura típicamente laminar¹⁹. La fase mineral u inorgánica está constituida por cristales de hidroxiapatita de calcio y fósforo. Dichos cristales se depositan sobre la matriz orgánica y constituyen aproximadamente el 65% del peso seco del hueso.

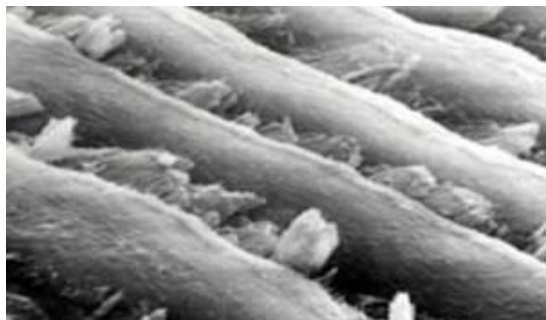


Figura 10. Fotografía de microscopía electrónica de barrido, en donde se ve la forma de los cristales de hidroxiapatita, uno al lado del otro, en forma ordenada. Entre medio deberían ir las proteínas que dirigen su crecimiento ordenado⁵

El último componente del hueso son las células óseas, dentro de las cuales podemos diferenciar tres tipos celulares fundamentales:

- 1) Osteoclastos (OC): son las únicas células del organismo que presentan capacidad de resorción ósea¹⁷. Proviene de estirpes celulares de la línea monocito-macrofágica ubicadas en la médula ósea²⁰.

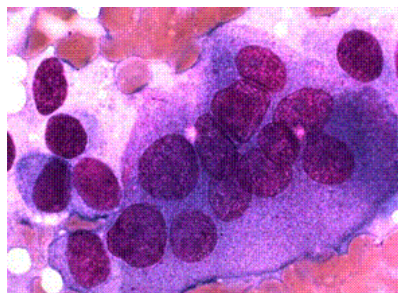


Figura 11. Imagen microscópica de un osteoclasto

- 2) Osteoblastos (OB): su función principal es la síntesis de la matriz ósea no mineralizada denominada osteoide. Proviene de la maduración de células mesenquimales existentes en la médula ósea.
- 3) Osteocitos: Su función es mantener las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho. Se originan a partir de osteoblastos quedan atrapados en la matriz ósea recién sintetizada durante el proceso de síntesis ósea.



Figura 12. Imagen microscópica de tejido óseo

1.4.2 Fisiología ósea

El tejido óseo constituye uno de los mayores sistemas del organismo y desempeña múltiples funciones: sirve de sustento y protección de tejidos blandos, constituye un anclaje muscular indispensable para la función locomotora, actúa como reservorio de iones y sirve de almacenamiento activo de la médula ósea, interaccionando con células precursoras de la hematopoyesis²¹.

Como órgano de soporte, el esqueleto, está expuesto a procesos de deterioro como los que sufren otras estructuras que tienen que resistir cargas mecánicas. Pero a diferencia de las

estructuras de soporte inertes (columnas, vigas, etc.), el hueso es un órgano vivo, con capacidad para renovarse, lo que le permite mantener sus condiciones de resistencia. Este proceso de renovación tiene lugar de forma continua, y recibe el nombre de “remodelación ósea”^{22,23}. La velocidad con que se lleva cabo se denomina “recambio” o “turnover óseo”²⁴.

1.4.3 Proceso de remodelación ósea

La renovación ósea se lleva a cabo mediante la destrucción por los osteoclastos de pequeñas unidades microscópicas de tejido, que están dispersas por el esqueleto y que se denominan unidades de remodelación ósea (BRU), que son posteriormente sustituidas por un tejido nuevo formado por los osteoblastos. Los precursores de los osteoclastos se transforman en osteoclastos maduros (fase de activación) y comienzan a resorber hueso (fase de resorción), labrando una cavidad tuneliforme en el hueso cortical (cono de apertura) o lacunar en el hueso trabecular (laguna de Howship) que tras un periodo de aparente inactividad (fase de inversión), será ocupada por matriz ósea neoformada por osteoblastos (fase de formación) que se mineralizará unos quince días después. A continuación, se describen cada una de las fases que componen el ciclo de remodelación ósea con más detalle.

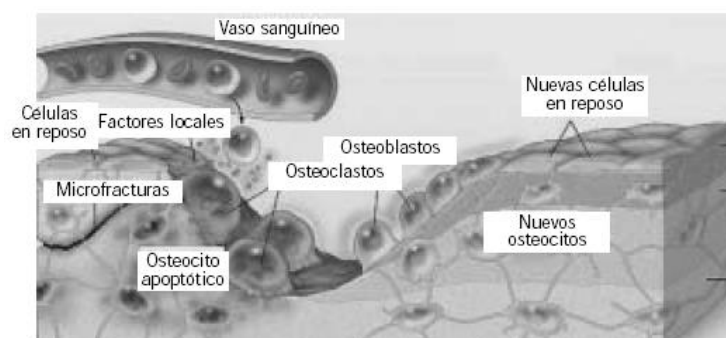


Figura 13. Unidad de remodelado óseo (BRU)⁶

Fase de activación: durante esta fase se va a producir una transformación de los precursores de osteoclastos a osteoclastos maduros y su activación, indispensable para su posterior adhesión a la zona de remodelación y para llevar a cabo el proceso de resorción ósea que tendrá lugar en la siguiente fase del ciclo de remodelación ósea. El osteoclasto es una célula multinucleada producto de la fusión de precursores mononucleares (preosteoclastos) mediante la participación de la proteína DC-STAMP (proteína transmembrana específica de las células dendríticas), entre otras. Tiene origen hematopoyético y deriva de una célula que es

precursora común del osteoclasto y el macrófago. En el desarrollo del osteoclasto y en su activación funcional es primordial un receptor de superficie denominado RANK (receptor activador del factor nuclear kappa B), sobre el cual actúa una molécula conocida como “ligando del RANK o RANKL” que está presente en la membrana de células de estirpe osteoblástica.²⁴ La interacción RANK-RANKL implica un contacto directo célula a célula, aunque el RANKL está ocasionalmente presente en forma soluble. Para activar el osteoclasto es necesaria también la presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), formado también por células de estirpe osteoblástica, pero que no está unido a la membrana celular sino que es un factor soluble. El osteoclasto posee un receptor específico (C-FMS, receptor del factor 1 estimulante de colonias) para el M-CSF. Las células de linaje osteoblástico producen, además, otras sustancias para las que también existen receptores en el osteoclasto consideradas “coestimuladoras respecto al sistema RANK-RANK-L”. Así mismo también actuarán sobre el osteoclasto sustancias originadas en otros tipos celulares que serán activadoras (Factor de necrosis tumoral-TNF, Factor de crecimiento del endotelio vascular-VEGF-C, Interleuquinas 1, 3, 6 y 11) e inhibidoras (calcitonina, Interleuquinas 4, 10 y 18)²⁵. La propia interacción del osteoclasto con la matriz ósea aumenta su supervivencia.

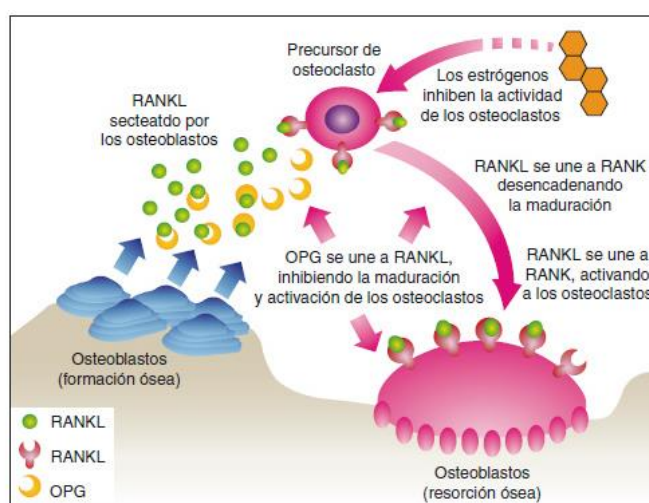


Figura 14. Control de la actividad de los osteoclastos mediante la interacción entre el receptor activador del ligando del factor nuclear-κB (RANK) y la osteoprotegerina (OPG)⁷

Fase de resorción: En esta fase los osteoclastos maduros se adhieren a la superficie de la zona de remodelación y desarrollan el proceso de resorción ósea.

Para poder destruir el hueso, este adopta una morfología especial²⁵. La parte de la membrana que se pone en contacto con el hueso adopta una forma rugosa o “borde en cepillo”, dicho borde está constituido por microvellosidades a las que se vierten hidrogeniones,

que eliminarán el componente mineral, y enzimas que eliminan el colágeno como la catepsina. Este proceso se lleva a cabo mediante una bomba de protones $H^+K^+ATPasa$ ²⁶. En la periferia de la zona rugosa se forma un anillo cuya superficie tiene la propiedad de unirse íntimamente al hueso, quedando en el interior de dicho anillo un espacio sellado del que los hidrogeniones y las enzimas no pueden escapar.

Tanto en la formación del anillo de actina como en el de la superficie rugosa juega un papel fundamental el citoesqueleto de la célula, ya que su configuración marca el camino de las vesículas citoplasmáticas hacia las microvellosidades, en las que liberarán su contenido que será vertido al espacio sellado donde ejercerán su efecto osteodestructivo.

Fase de inversión: en esta fase, la superficie ósea queda libre de células exceptuando unos pocos fagocitos mononucleares que cubren y limpian la cavidad resortiva y forman un recubrimiento sólido (glucoproteína) que constituye una línea de cementación sobre la que se depositará el hueso nuevo.

Fase de formación: en esta fase los osteoblastos sintetizarán matriz ósea que rellenará el espacio creado durante la fase de resorción. Una vez desempeñada su función, aproximadamente la mitad de los osteoblastos formadores de hueso mueren por apoptosis. La otra mitad o bien se transforman en osteoblastos de superficie que cubren el hueso recién formado (células de recubrimiento), o bien a medida que forman hueso, quedan atrapados en el interior de la matriz ósea y se transforman en osteocitos.

Los precursores de los osteoblastos derivan de células del mesénquima estromal y se convierten en osteoblastos maduros bajo la influencia de diversos factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. Los principales factores implicados en su maduración son el RUNX2 (factor de transcripción 2 relacionado con Runt), OSTERIX, ATF4 (Factor de transcripción activador 4) y el AP1 (factor de transcripción heterodimérico compuesto de proteínas de las familias FOX y JUN). Otras sustancias que estimulan la formación del hueso por el osteoblasto son las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) el TGFB (Factor de crecimiento transformante beta), IGFs (Factores de crecimiento insulínicos), FGF (Factor de crecimiento fibroblástico), PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas), la endotelina, PTHrp, etc. ^{27,28}.

El osteoblasto además de la función osteoformadora tiene una función reguladora de la destrucción ósea. Éste o sus precursores poseen capacidad para producir sustancias que estimulan al osteoclasto. El osteoclasto produce una sustancia llamada osteoprotegerina (OPG) que presenta afinidad por el propio RANKL, de forma que se une a él impidiendo que

este acceda al RANK y por tanto evitando la estimulación del osteoclasto. Es decir, el comportamiento del osteoclasto varía en relación RANKL/OPG. Numerosos factores que actúan sobre el osteoclasto (Parathormona-PTH y 1,25 dihidroxivitaminaD3 - 1,25 (OH)3D) lo hacen al menos en parte indirecta a través del osteoblasto modificando esta relación RANKL/OPG.

La vía Wnt/beta-catenina establece un nexo entre las funciones osteoformadora y osteoclastogénica de los osteoblastos ya que la betacatenina está implicada en la regulación del equilibrio RANKL/OPG desviándolo a favor de la segunda. En resumen la activación de la vía en la fase temprana de la vida de las células de estirpe osteoblástica induce formación, mientras que en las fases tardías reduce la osteoclastogénesis. Se ha sugerido que el ligando del LRP5 (proteína asociada al receptor de lipoproteína de baja densidad 5) decide cuál de las dos funciones debe predominar. Las mutaciones de la proteína LRP5 pueden conducir a osteoporosis o a una masa ósea alta. Los diversos factores de la vía Wnt/beta-catenina regulan la formación de los osteoblastos, inhiben su apoptosis y aumentan su tiempo de vida.

Bajo condiciones fisiológicas normales en el proceso de remodelación ósea la formación de hueso concuerda estrechamente con la resorción ósea, existiendo un equilibrio entre ambas (el volumen de masa ósea que se elimina se reemplaza con la misma cantidad de hueso). La ruptura de dicho equilibrio por diferentes causas conduce a situaciones patológicas como, por ejemplo, la osteoporosis.

Tabla 2. Factores de desarrollo y diferenciación de las células ósea ²

Factores de crecimiento
1. Proteínas morfogenéticas (BMP). Son capaces de iniciar la osteoblastogénesis. Están implicadas en el desarrollo del esqueleto durante la vida embrionaria. BMP 2 y 4 inician el linaje osteoblástico en la médula ósea adulta desde los precursores mesenquimáticos. Estimulan la transcripción de genes para la transcripción osteoblástica específica. 2. Factor de crecimiento transformador beta (FTCB). 3. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP). 4. Factor de crecimiento similar a la insulina (FCIL). 5. Factores de crecimiento fibroblástico (FCF). Todos pueden estimular la diferenciación osteoblástica, influyendo en la diferenciación y replicación de progenitores osteoblásticos diferenciados.

Citoquinas
1. Estimulan el desarrollo de osteoclastos: • Interleuquina 1, 3, 6, 11. • Factor inhibitorio de leucemia. • Oncostatín M. • Factor de necrosis tumoral. • Factor netrótico ciliar. • Factor estimulador de colonia granulocítico macrofágico (GM-CSF). 2. Inhiben el desarrollo de osteoclastos: • Interleuquina 4, 10, 18. • Interferon gamma.
Hormonas sistémicas
1. PTH, 1,25 (OH)3D: potentes estimuladores de la formación osteoclástica. 2. Calcitonina: inhibe el desarrollo y actividad del OC y promueve su apoptosis. 3. Estrógenos, andrógenos, glucocorticoides y tiroxina: potentes reguladores que influyen en el desarrollo de OC y OB a través de la regulación de la producción y /o acción de varias citoquinas.
Moléculas de adhesión
Para el desarrollo de OC y OB son necesarias señales autocrinas, paracrinas, endocrinas e interacciones célula-célula y célula-matriz, que son llevadas a cabo por proteínas expresadas sobre la superficie de estas células y son responsables del contacto entre precursores osteoclásticos con células estromales/osteoblásticas, denominadas moléculas de adhesión. Están incluidas, integrinas, selectinas, caderinas y proteínas de transmembrana. - Están comprometidas en la migración de progenitores OC y OB desde la médula ósea (MO) a sitios de remodelación. - Iniciación y cese de reabsorción ósea osteoclástica. - Control de desarrollo y apoptosis del OC y OB.

Tabla 3. Factores sistémicos y locales que intervienen en la formación y resorción óseas²

INCREMENTAN	
Sistémicos	
Formación	Reabsorción
Fluoruros	Parathormona (PTH)
Parathormona	Péptido relacionado a PTH

Prostaglandinas	Calcitriol
Citoquinas	Tiroxina
Locales	
BMP	Interleuquina 1,6,11,17
FCTB	FCF
FCIL	Prostaglandinas
FCF	RANKL
FCDP	TNF alfa y beta
Prostaglandinas	FC alfa
	M-CSF
	GM-CSF
	SCF (Factor de células madre)
DISMINUYEN	
Sistémicos	
Formación	Reabsorción
Corticosteroides	Calcitonina
	Estrógenos
	Testosterona
Locales	
	FC beta
	Interferón gamma
	Interleuquinas 4,10,13,18
	Osteoprotegerina

1.4.4 Osteoporosis inducida por glucocorticoides (OIC)

Los efectos adversos producidos por los glucocorticoides (GC) sobre el esqueleto no fueron descritos hasta que en 1932, Cushing observó la descalcificación que acompañaba a la hiperplasia suprarrenal producida por un adenoma hipofisario productor de hormona adrenocorticotropa³⁰; sin embargo hasta que los glucocorticoides no empezaron a ser utilizados con carácter terapéutico por vía exógena, hace más de 50 años , el efecto nocivo de estos fármacos, que se puso inicialmente de manifiesto por la aparición de fracturas vertebrales, no había supuesto suficiente motivo de preocupación³¹.

De los múltiples efectos adversos que pueden presentar los GC, las fracturas osteoporóticas son el más devastador, pudiendo afectar a entre un 30 % y 50% de los pacientes ^{32,33,34}. Si consideramos que sólo en Estados Unidos más de 30 millones de personas reciben medicamentos bajo prescripción médica cuyo componente principal son los

glucocorticoides³⁰, podemos hacernos una idea de la magnitud e impacto socioeconómico de este problema.

Fisiopatología de la OIC: La OIC es multifactorial y se produce por la acción de los glucocorticoides a diferentes niveles dentro de los cuales vamos a destacar:

Acción sobre células del metabolismo óseo: los GC inhiben la producción, maduración y actividad de los osteoblastos, a la vez que incrementan la apoptosis de osteoblastos maduros y osteocitos^{35,36}. La disminución en el número viable de osteocitos ha sido demostrada en biopsias óseas de la cresta iliaca procedentes de pacientes tratados con glucocorticoides³⁷, esta disminución podría afectar a la función que éstos desempeñan en la regulación de la calidad ósea y a su capacidad para detectar y reparar daños microscópicos en el tejido óseo.

La inhibición de la formación ósea se debe en parte a una disminución en la actividad y producción de factores de crecimiento, hormonas sexuales y citoquinas. Los GC ejercen diversas acciones sobre el eje GH-IGF-1 (GH, Hormona de crecimiento) como la disminución del IGF-1, medidor de la función osteoblástica, y de proteínas de unión al IGF-1 que tienen efectos estimuladores sobre la formación ósea^{35,36}. Así mismo al disminuir la expresión de proteínas como la BMP2 y la RUNX-2 que son imprescindibles para la diferenciación de células precursoras de osteoblastos, inhiben la proliferación y diferenciación de los mismos^{38,39}.

Por otro lado los GC inhiben la expresión del gen colágeno tipo I y estimulan la expresión por osteoblastos y condrocitos de colagenasa 3³⁵, que degrada el colágeno tipo I y tipo II (principales constituyentes de la matriz ósea y cartilaginosa), interfiriendo de esta forma en la síntesis de matriz ósea. Los GC también parecen aumentar la vida media de los osteoclastos contribuyendo así a un incremento en la resorción ósea⁴⁰. Además, los GC inhiben la síntesis de OPG, además de incrementar la expresión de RANKL³⁵, estimulando la osteoclastogénesis.

Acción sobre hormonas y metabolismo mineral: los GC son capaces de alterar el metabolismo del calcio. En función de la dosis, pueden ocasionar una disminución de la absorción intestinal del calcio y un aumento de su excreción renal. Dicho incremento se debe por un lado a una mayor movilización del calcio procedente del hueso pero también a una acción directa de los GC a nivel renal⁴¹.

Aunque existen pocas evidencias de que la administración de GC produzca un verdadero hiperparatiroidismo secundario, la hormona paratiroidea puede ser estimulada directa o

indirectamente principalmente por desequilibrios en el metabolismo cálcico^{39,42}. Los GC pueden además incrementar la sensibilidad renal y de los osteoblastos a la acción de la PTH produciendo un incremento del remodelado óseo y la consiguiente pérdida de hueso⁴³. Así mismo, los GC disminuyen la producción de hormonas sexuales, incluidos los estrógenos (implicados en el desarrollo de osteoporosis postmenopáusica) y de la testosterona, que afecta a las células óseas.

Acción sobre el tejido muscular: los GC producen también efectos deletéreos sobre las células musculares dando lugar a miopatías originando debilidad muscular e incrementando el riesgo de caídas y por tanto de fracturas.

1.4.5 Osteoporosis postmenopáusica

La pérdida de masa ósea está ligada inevitablemente al proceso de envejecimiento en ambos sexos. Ésta pérdida se acelera en los años posteriores a la menopausia en mujeres, independientemente de sus antecedentes raciales o étnicos y en ambos sexos bajo la administración de algunas drogas como los corticoides y en determinadas situaciones patológicas como el hipertiroidismo. La menopausia se define como el cese de la menstruación, que es precedida por un periodo de uno o dos años en el cual se produce una disminución gradual de la producción de estrógenos ováricos. La menopausia tiene lugar en la mayoría de las mujeres aproximadamente a la edad de 51 años⁴⁴. Con el cese de la función ovárica se observa una pérdida rápida de hueso, de un 2 a un 4% por año en los 3-5 años siguientes a la menopausia, pérdida anual muy superior al 1% de la que es responsable el envejecimiento^{45,46}. A lo largo de su vida una mujer puede llegar a perder hasta un 30 % de su hueso original que forma los ejes de los huesos de las extremidades y representa aproximadamente 4/5 partes del esqueleto. A nivel del hueso trabecular la pérdida puede llegar a ser del 50%⁴⁷. Sin embargo, es de vital importancia considerar que la probabilidad de que un individuo pueda desarrollar osteoporosis dependerá, en un alto grado, de la masa ósea máxima que haya alcanzado durante su juventud.

Fisiopatología de la osteoporosis postmenopáusica: el déficit estrogénico que se produce en la mujer durante la menopausia acarrea un aumento del reclutamiento, actividad y vida de los osteoclastos que da lugar a un aumento en el número y actividad de las BRU. También se ha descrito un incremento de la apoptosis de los osteoblastos, este hecho unido a un incremento en las BRU trae consigo un balance negativo en estas unidades de remodelado dando lugar no sólo a trabéculas más finas, sino en ocasiones a lagunas de resorción más

profundas y a una pérdida de la conectividad del hueso que fundamentalmente afecta al hueso trabecular⁴⁸.

La acción directa de los estrógenos sobre osteoblastos y osteoclastos se efectúa a través de receptores para los estrógenos que estas células expresan. No obstante, el mayor efecto de los estrógenos es la inhibición de la resorción ósea⁴⁹. Los estrógenos inhiben la proliferación y diferenciación de precursores osteoclásticos y promueven la apoptosis de osteoclastos maduros, reduciendo así su supervivencia. Se ha demostrado que los estrógenos utilizan múltiples vías para alterar la secreción de RANKL y que además tienen efectos sobre la osteoclastogénesis a través de células T, en las cuales los estrógenos han demostrado regular la producción de la citoquina TNFalfa y modular la producción de Óxido Nítrico (NO)^{50,51}. Además, los estrógenos también aumentan la secreción de OPG. Por lo tanto, su deficiencia, origina una disminución en la expresión de la misma, mientras que la terapia estrogénica previene dicha disminución. Es muy probable que la OPG tenga un papel preponderante en la acción antiresortiva de los estrógenos⁴⁹. Los estrógenos también son capaces de regular el remodelado óseo a través de mecanismos indirectos mediados por cambios en el Calcitriol o la PTH^{49,52}.

Por último, al disminuir durante la menopausia los niveles de estrógenos, se produce un incremento de los niveles de la hormona folículo-estimulante (FSH). Se ha descrito que la FSH recombinante estimula la formación de osteoclastos procedentes de médula ósea humana en presencia de RANKL. Parece ser que la FSH incrementa la cascada de fosforilación de las quinasas RANKL-sensitivas⁵³. Además la FSH también estimula la producción de TNFalfa por parte de células precursoras de macrófagos presentes en la médula ósea⁵⁴.

1.5 Diagnóstico de la osteoporosis

Generalmente la osteoporosis no es detectada hasta que aparecen signos clínicos evidentes como son una disminución de la estatura o la aparición de fracturas patológicas. Puesto que la osteoporosis cursa de manera asintomática hasta que se observan las complicaciones óseas, es de vital importancia llegar a un diagnóstico precoz, inducido por la historia clínica, factores genéticos, nutricionales y ambientales, determinación de marcadores bioquímicos y cuantificación de la densidad mineral ósea mediante densitometría.

El diagnóstico por imagen tiene una importancia crítica a la hora de identificar a los individuos que presentan un mayor riesgo de fractura y que requieren tratamiento médico preventivo para reducirlo, así como para monitorizar la respuesta al tratamiento. La absorpciometría dual por Rayos X (DXA) es actualmente la técnica de elección para medir la densidad mineral ósea de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar técnicas de diagnóstico por imagen avanzadas que permitan valorar la calidad y fragilidad del hueso, dentro de las cuales podemos destacar la Tomografía computarizada de alta resolución periférica (HR-pQ CT), tomografía computarizada cuantitativa (QCT), la Resonancia Magnética (RM) y la Ultrasonografía Cuantitativa (Quantitative US)⁵⁵.

Dentro de la pruebas de laboratorio, destaca la determinación de marcadores bioquímicos de remodelado óseo que supone una propuesta novedosa en la evaluación clínica de los pacientes con osteoporosis. El uso de estos biomarcadores podría permitir la identificación de pacientes con mayor riesgo de fractura y monitorizar la respuesta terapéutica. Al tratarse de mediciones no invasivas y relativamente económicas debería extenderse su empleo ya que posibilitaría una medición seriada y en intervalos cortos de las variaciones en el recambio óseo⁵⁶.

1.5.1 Densitometría ósea

La densitometría fue introducida en la práctica clínica de manera rutinaria en 1987. Es una técnica bien estandarizada, sencilla de realizar, presenta una elevada precisión (error de precisión máximo aceptable entre un 2 y un 2,5 %), somete a los pacientes a bajas dosis de radiación (1-50 microSv para una exploración a nivel vertebral) y es actualmente el mejor método establecido para cuantificar la densidad mineral ósea en vivo⁵⁵. Dicho valor se emplea para establecer el diagnóstico de osteoporosis, estimar el riesgo de fractura e identificar a los pacientes aptos para el inicio y la evaluación del tratamiento⁵⁷.

En la actualidad existen dos tipos de equipos densitométricos: de densitometría central y de densitometría periférica. En los equipos de DXA central, que se utilizan principalmente para evaluar la densidad ósea en la cadera y columna, el paciente se coloca en decúbito supino sobre una mesa acolchada, mientras que en la DXA periférica el paciente introduce el dedo, la mano, el antebrazo o el pie en un pequeño dispositivo que obtiene una lectura de densidad mineral ósea en pocos minutos. En un principio parece lógico pensar que si la mayor parte de

las fracturas se producen en columna vertebral y fémur, la determinación de la densidad mineral ósea debe realizarse a este nivel. El principal inconveniente de los equipos de DXA centrales es su elevado coste económico y la escasa disponibilidad de aparatos. No obstante, numerosos estudios prospectivos han puesto de manifiesto que la DXA a nivel periférico es un buen indicador para determinar el riesgo de fracturas así como para evaluar la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento⁵⁸. Por tanto la DXA periférica aunque con una conocida menor especificidad que la DXA central, parece un buen método para realizar un cribado selectivo de la población con factores de riesgo de la osteoporosis, sobre todo en lugares geográficos alejados de los hospitales de referencia y de equipos de DXA centrales.⁵⁹



Figura 15. Equipo de DXA periférica y posicionamiento del paciente.



Figura 16. Equipo de DXA central y posicionamiento del paciente.

Los equipos de densitometría central constan de una unidad de exploración y una consola de control. La unidad de exploración está compuesta por diferentes elementos, la mayoría incluidos en una mesa sobre la que se coloca el paciente en decúbito supino. En la parte inferior de dicha mesa de exploración encontramos una fuente emisora de Rx debidamente

blindada y colimada, que se integra sobre un sistema de desplazamiento mecánico que permite moverse tanto longitudinal como transversalmente. La fuente radiactiva utiliza dos haces de Rx (70 y 140 KeV). Uno es absorbido por tejidos blandos y el otro por el hueso. La radiación no absorbida por el paciente llega a un detector que se encuentra en el interior de un brazo mecánico que se desplaza sincrónicamente con la fuente emisora durante la exploración, de esta manera el paciente queda entre la fuente y el detector. La masa ósea es proporcional a la atenuación de la radiación por lo que al detector llegarán los haces de fotones que no han sido absorbidos ni dispersados, y mediante el sistema de detección se detallará la cantidad de radiación absorbida de cada uno de los haces al atravesar al paciente. Con esa información y mediante un programa informático se digitaliza y se calcula la densidad mineral ósea del hueso explorado.

La consola de control está formada por un monitor de visualización de imágenes, un teclado de control del ordenador, una impresora y un sistema de conservación de imágenes⁶⁰.

El resultado obtenido es comparado con el valor promedio de individuos adultos jóvenes sanos (escala T-Score) en función de la medida en que la densidad mineral ósea del paciente se aleja de la normalidad, dicha densidad podrá ser clasificada como:

- a) Normal: el valor de densidad mineral ósea es superior de -1 desviaciones estándar (DE) de la referencia media para adultos jóvenes.
- b) Osteopénica: el valor de densidad mineral ósea es de -1 a -2,5 DE de la referencia media para adultos jóvenes.
- c) Osteoporosis: el valor de densidad mineral ósea menor de -2,5 DE de la referencia media para adultos jóvenes.

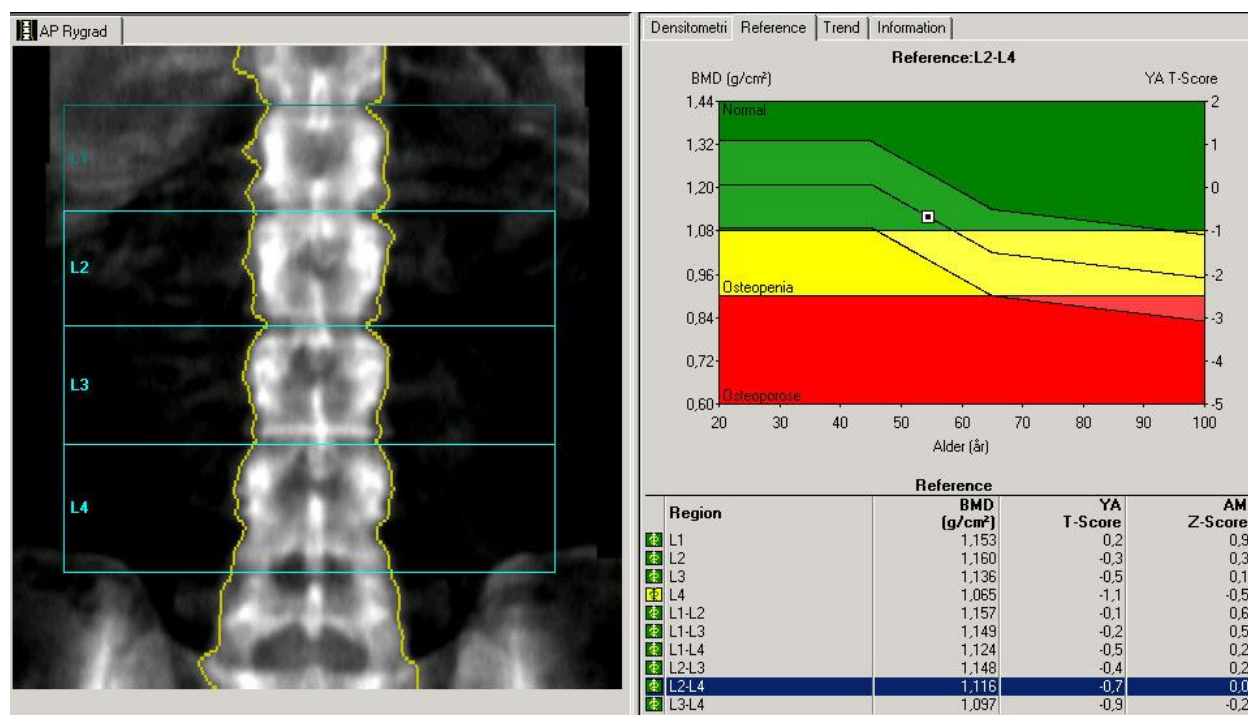


Figura 17. Resultados de una exploración por DXA central a nivel de L1-L4. En la imagen que aparece en la consola de control se pueden observar las regiones de interés o ROI (izda), la situación del individuo dentro de la escala T-Score (arriba dcha) y los valores densitométricos obtenidos (abajo derecha).

1.5.2 Resonancia Magnética (RM)

Con la aparición de equipos de RM de alto campo y las mejoras en el software empleado para el procesamiento de la imagen, la capacidad de esta técnica diagnóstica para valorar y cuantificar la estructura trabecular se ha incrementado sustancialmente durante los últimos años. Estudios de calibración y validación han demostrado que existe correlación entre el estudio de la estructura trabecular observada por RM, por micro-CT (Microtomografía computerizada), la histomorfometría ósea y la resistencia biomecánica derivada de estudios in vitro ^{61,62,63,64}. Además, la ausencia de radiación convierte a la resonancia magnética en una técnica diagnóstica muy atractiva tanto para estudios clínicos como científicos. Sin embargo, hasta la fecha la técnica ha sido principalmente establecida para la obtención de imágenes periféricas, a nivel de la región distal del radio, tibia y calcáneo⁵⁵. Aunque se han llevado a cabo estudios preliminares en la región proximal del fémur, el estudio de la arquitectura trabecular en este área sigue suponiendo un reto puesto que su visualización es todavía limitada debido a la falta de resolución espacial ^{62,63,64}. Los tiempos de exploración elevados y la ausencia de movimiento para evitar la aparición de artefactos constituyen también desventajas a tener en cuenta en estos estudios.

La resonancia magnética junto con otras técnicas de diagnóstico de imagen avanzadas proporciona por lo tanto información estructural, más allá de la densidad mineral ósea, y cada vez hay mayores evidencias que indican que la densidad mineral ósea sólo explica parcialmente la resistencia del hueso y el riesgo de fractura. Diferentes estudios clínicos llevados a cabo han demostrado que las mediciones estructurales obtenidas por resonancia magnética proporcionan información adicional a la DMO en la diferenciación de individuos con y sin riesgo de fractura por fragilidad ósea^{65,66,67,68}. El estudio de la osteoporosis inducida por glucocorticoides en modelos animales mediante estas técnicas puede tener especial relevancia para valorar el impacto en el hueso trabecular y cortical y sus características macro y microscópicas⁶⁹.

No menos interesante es el estudio de las propiedades bioquímicas de la médula ósea que podrían condicionar la resistencia del hueso trabecular y cortical. Los investigadores se cuestionan en la actualidad si la osteoporosis puede estar relacionada con una “obesidad ósea” puesto que se ha descrito un aumento del contenido graso medular en pacientes sometidos a terapias corticoideas y con diabetes mellitus que presentan riesgos de fractura aumentados⁷⁰. Mediante el estudio por RM podemos estimar la adiposidad y contenido en agua medular, siendo muy superior en este sentido a otras técnicas de diagnóstico por imagen de última generación.

La RM es, además, un método más específico que la radiografía convencional en la diferenciación de fracturas compresivas patológicas neoplásicas de fracturas compresivas osteoporóticas ya que puede detectar destrucción ósea con lesiones líticas y masas en el tejido blando adyacente. En resonancia magnética las fracturas compresivas agudas muestran una disminución de señal en las imágenes T1 y un aumento de señal (patrón de edema medular óseo) en las imágenes en T2 o STIR. En las imágenes T1 además suele haber sólo un reemplazo parcial de la médula ósea en fracturas osteoporóticas mientras que las fracturas neoplásicas generalmente muestran un reemplazo medular completo en el cuerpo vertebral⁷¹.

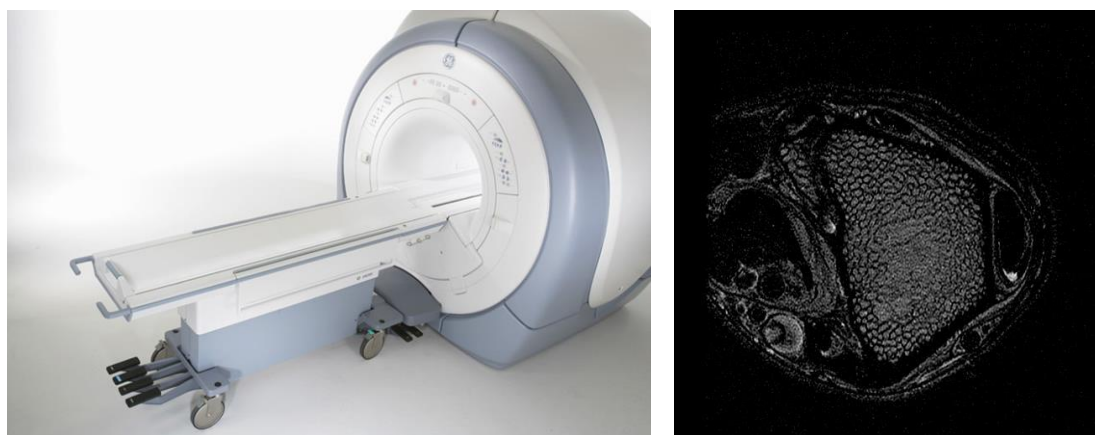


Figura 18. Equipo de resonancia magnética de alto campo (izda), imagen de la estructura trabecular de la epífisis distal del radio de una oveja obtenida mediante resonancia magnética de alto campo (dcha).

1.5.3 Micro-CT, QCT y HR-pQCT

Durante los últimos años se han realizado importantes avances en el campo de la valoración de la arquitectura ósea mediante la Tomografía Computerizada. Originalmente la tomografía computerizada cuantitativa se centró en la medición de densidades minerales óseas trabeculares en cortes transversos a nivel de vertebrae lumbares y del antebrazo. Una de las ventajas de la Tomografía Computerizada (QCT) cuantitativa frente a la DXA es el análisis por separado de la densidad mineral ósea de los compartimentos trabeculares y corticales. Mientras que el hueso trabecular a nivel vertebral es metabólicamente más activo y puede servir como un indicador precoz de éxito terapéutico, el hueso cortical a nivel de la cadera puede ser más importante para estimar el riesgo de fractura⁷². Aunque la tomografía computerizada cuantitativa presenta una elevada precisión para cuantificar la DMO a nivel de la columna vertebral, cadera y radio la resolución espacial de esta técnica es muy inferior a otras como la resonancia magnética de alto campo dificultando por tanto el estudio de la microarquitectura ósea. Además somete a los pacientes a dosis de radiación altas que oscilan entre los 100 y 1000 microSv en exploraciones efectuadas a nivel vertebral y de la cadera.

Otras técnicas basadas en la tomografía computerizada como el microCT, que presenta una resolución espacial entre 1 y 100 micras, proporcionan una aproximación muy exacta de la microarquitectura ósea. Sin embargo esta técnica sólo es aplicable para el estudio de muestras in vitro de biopsias óseas y estudios in vivo en especies de pequeño tamaño como ratones.

También podría reemplazar en el futuro a técnicas seriadas de tinción tediosas requeridas para el análisis histomorfométrico de cortes⁷³.

La técnica más novedosa basada en la Tomografía Computerizada para el estudio de la estructura trabecular y que puede presentar una aplicación clínica es la tomografía computerizada cuantitativa periférica de alta resolución (HR-pQCT). Ésta presenta una resolución espacial superior a la QCT pero inferior a la Micro-CT (dimensión nominal del voxel isotrópico de 82 micras). No obstante el acceso a esta tecnología es todavía muy limitado, estando su utilización restringida a estudios científicos. Otras de sus desventajas incluyen que sólo es aplicable a áreas esqueléticas periféricas, como el radio distal y la tibia, somete a los pacientes a radiaciones ionizantes y los artefactos por movimiento limitan en ocasiones el análisis morfológico de la arquitectura ósea⁵⁵.

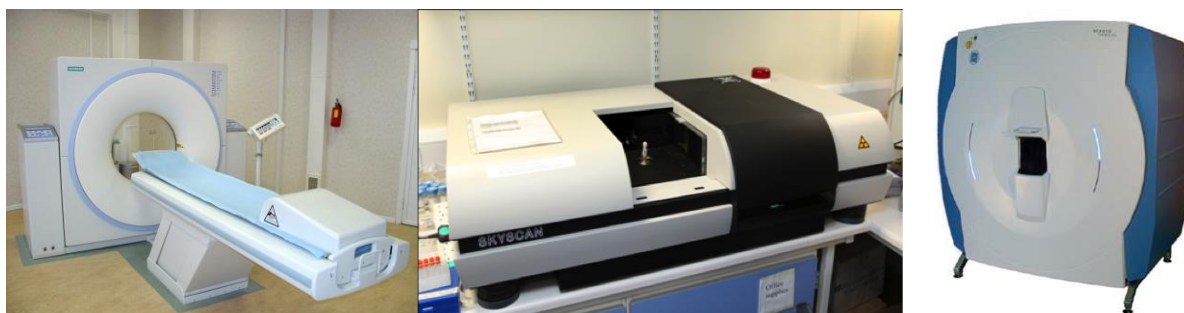


Figura 19. Equipo de CT (izda), micro CT (centro) y HR pQCT (dcha)

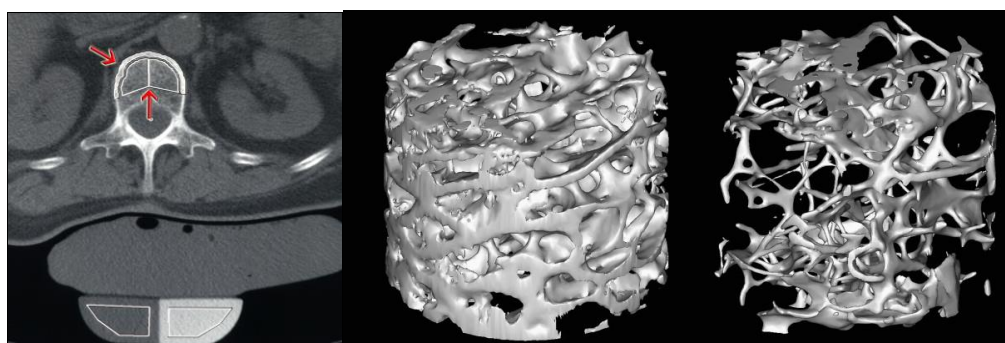


Figura 20. Imágenes obtenidas por micro CT de Biopsias óseas (izda), cuantificación de DMO en la región trabecular del cuerpo vertebral de una VL por QCT (dcha)⁸

1.5.4 Histomorfometría ósea

La histomorfometría ósea de biopsias óseas permite un diagnóstico precoz y aporta información relevante sobre la fisiología ósea y determinadas alteraciones metabólicas, pero debemos considerar que son técnicas invasivas que debilitan el hueso y tienen indicaciones limitadas. A mediados de los ochenta se recomendaba disponer de una biopsia ósea de todos los pacientes con osteoporosis para un mejor entendimiento de los mecanismos que producen la pérdida de masa ósea⁷⁴. Sin embargo, en la actualidad su utilidad clínica fundamental se centra en aquellos casos de osteoporosis en los que no se vislumbre una patogenia clara, permitiendo el diagnóstico diferencial con otros procesos que pueden producir alteraciones óseas como osteomalacia, hiperparatiroidismo, discrasias sanguíneas, mieloma y ocasionalmente metástasis.

En investigación resulta de gran utilidad. En ensayos clínicos es conveniente disponer de una biopsia basal para comparar con otras biopsias, bien durante el tratamiento o al final del mismo. Su empleo es obligado en algunos ensayos de fármacos en los que se sospecha que pueden suprimir el remodelado óseo o producir un tejido óseo anormal. Así mismo, en el comienzo del desarrollo de nuevos tratamientos para la osteoporosis debe de emplearse la biopsia ósea en al menos un subgrupo de pacientes hasta que la seguridad y eficacia del mismo se hayan asegurado⁷⁵. Las biopsias óseas también pueden ser sometidas a test biomecánicos que aportan información sobre la resistencia estructural de las mismas.

1.5.5 Marcadores bioquímicos

La matriz ósea orgánica está compuesta en un 90 % por colágeno tipo I. Durante el proceso de degradación se produce una liberación extracelular de carboxipeptidos y aminoprotocolágenos que son liberados al torrente sanguíneo⁷⁶. Los marcadores bioquímicos de remodelación ósea miden estos productos generados durante el proceso de formación o degradación de matriz ósea y pueden ser determinados en sangre y orina. Su análisis, repetido a intervalos cortos, permite una valoración seriada del turnover óseo. Los marcadores óseos de actividad osteoblástica se conocen como marcadores de formación y aquellos derivados de la actividad osteoclástica son conocidos como marcadores de resorción⁷⁷.

Actualmente la principal aplicación de los marcadores bioquímicos de remodelación ósea en la osteoporosis es la valoración de la respuesta terapéutica. También han demostrado ser útiles en la predicción de riesgo de fractura, de la pérdida de masa ósea y su correlación con la DMO. Con respecto a la predicción de la masa ósea, aunque estos biomarcadores evalúan el equilibrio entre la formación y resorción ósea y suelen estar inversamente relacionados con la DMO, estas correlaciones no son lo suficientemente fuertes como para considerarlos predictores de masa ósea. Por lo tanto no deberían ser utilizados para el diagnóstico de la osteoporosis⁷⁸.

Tabla 4. Marcadores de Formación ósea³.

Marcadores de formación	Marcadores de resorción
Suero Fosfatasa alcalina total (FA) Fosfatasa alcalina ósea (FAO) Osteocalcina (OC) C-terminal propéptido del procolágeno tipo I (PICP) N-terminal propéptido del procolágeno tipo I (PINP)	Suero Fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) C-terminal telopéptido del colágeno tipo I (ICTP) B-CrossLaps (β -CTX) N-terminal telopéptido del colágeno tipo I (NTX) Orina Excreción urinaria de calcio Hidroxiprolina Piridinolina (Pir) Desoxipiridinolina (Dpir) ICTP α -CrossLaps (α -CTX) NTX

1.6.Tratamiento de la osteoporosis

Cuando nos enfrentamos a pacientes con osteoporosis se debe efectuar una evaluación integral y los médicos deben intentar eliminar de primera intención los factores de riesgo que presentan los pacientes. Posteriormente se deben investigar los factores que propician las caídas que originan fracturas que pueden limitar las actividades del paciente (benzodiacepinas, ingesta de alcohol, gafas bifocales y progresivas) así como las posibles barreras arquitectónicas de su hogar o externas. Si el paciente además de osteoporosis ya presenta fracturas patológicas, será necesario proporcionar un tratamiento analgésico adecuado, así como efectuar la resolución adecuada de la fractura, lo que evitará a la larga secuelas por inmovilización que pudieran generar una mayor pérdida ósea y otras complicaciones⁵⁷.

1.6.1 Tratamiento médico de la osteoporosis

Dentro del manejo del paciente osteoporótico y con el fin de prevenir fracturas patológicas, se recurre principalmente a la administración de agentes farmacológicos, dietas específicas y suplementación con vitamina D y calcio, ejercicio y fisioterapia.

Los Bifosfonatos juegan un papel principal en el manejo de la osteoporosis⁸⁰. Bifosfonatos genéricos como el Alendronato y el Risendronato son fármacos de primera elección debido a su bajo precio, efectividad y tolerabilidad en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, el uso de bifosfonatos se puede asociar a efectos adversos entre los que destacamos alteraciones del tracto gastrointestinal superior, fracturas atípicas de fémur y osteonecrosis aséptica mandibular⁸¹.

Calcio y Vitamina D: la vitamina D juega un papel principal en la absorción del calcio y tiene efectos directos sobre el hueso. La deficiencia de vitamina D y calcio conduce a hiperparatiroidismo secundario, osteoporosis y osteomalacia⁸². Por lo tanto los niveles de vitamina D y de calcio son básicos en la prevención y tratamiento de la osteoporosis⁸¹. Se recomienda consumir entre 400 y 800 UI de vitamina D al día. Su función es mantener al calcio sérico dentro de valores normales, incrementar su absorción intestinal y aumentar la movilización de las células troncales para diferenciarse a osteoblastos⁵⁷.

Bifosfonatos: Los primeros ensayos clínicos con bifosfonatos se llevaron a cabo en los años 70. Estos fármacos presentan una estructura similar a la hidroxiapatita y se incorporan en el hueso. Los bifosfonatos son tóxicos para los osteoclastos interfiriendo con la adenosina trifosfato (ATP) en el metabolismo energético o con el sistema HMG-coA reductasa (hidroximetil-glutaril CoA-reductasa). Por lo tanto su acción primaria es la de agente antiresortivo. En la actualidad existen más de 10 tipos diferentes de bifosfonatos disponibles en el mercado para su administración oral o intravenosa,⁸¹ dentro de ellos el Alendronato, el Risedronato, el ácido Zoledrónico y el Ibandronato son los más utilizados.

El alendronato ha demostrado prevenir la pérdida ósea e incrementar la densidad mineral ósea en la cadera y en la columna entre un 5 y un 10% en pacientes osteoporóticos. La dosis utilizada es de 5mg/día vía oral o 35 mg semanales en mujeres recientemente menopáusicas y de 10 a 70 mg a pacientes posmenopáusicas. La duración del tratamiento no está clara y se ha observado que los beneficios esqueléticos pueden preservarse al menos de 1 a 2 años después

de su suspensión, tras la cual tiene lugar una reducción gradual de la DMO. Estudios realizados con este fármaco a dosis continuadas de 5 mg al día durante un periodo de 10 años han llegado a obtener un incremento de la DMO de un 13 % en la columna lumbar, de un 10,3% en el trocánter y de un 6,7% en la parte proximal del fémur^{83 84}.

El consumo continuo del Risedronato ha demostrado incrementar la densidad mineral ósea de la columna vertebral con una dosis diaria de 5mg día vida oral o semanal de 35 mg, permitiendo una reducción del riesgo de fractura vertebral de un 41 a un 49 %.⁵⁷ De todos los bifosfonatos posibles el Risedronato parece tener comparativamente una afinidad menor por el mineral óseo^{85,86}. Lo que podría facilitar su acceso a las células sensibles a estímulos mecánicos de la red osteocítica lacunar⁸⁷. Sin embargo, todavía no se ha demostrado que reduzca el riesgo de fracturas no vertebrales⁸⁸.

El ácido Zoledrónico es un bifosfonato nitrogenado de elevada potencia que también es comúnmente utilizado en pacientes con cáncer. Recientemente, también ha sido aprobado como fármaco para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica con una pauta de administración de una única inyección intravenosa anual de 5mg.⁸⁹. Así como otros bifosfonatos orales e intravenosos está asociado con la posibilidad de desarrollar osteonecrosis mandibular. Este tipo de osteonecrosis se limita a la región cráneo facial y su fisiopatología es desconocida^{90, 91}.

El ibandronato está indicado en el tratamiento de osteoporosis de mujeres posmenopáusicas con elevado riesgo de fractura. Ha demostrado reducciones entre un 50 y un 62% del riesgo relativo de incidencia de fracturas vertebrales tras tres años de consumo continuado, si bien no ha demostrado reducir el riesgo de fracturas de cadera. Su pauta de administración es un 1 comprimido mensual de 150mg.



Figura 21. Diferentes tipos de bifosfonatos empleados en el tratamiento de la osteoporosis.

Calcitonina: Es una hormona endógena secretada por las células C parafoliculares de la glándula tiroides; tras la exposición a calcitonina in vitro, los osteoclastos comienzan a alisar su borde en cepillo y se retiran de la zona de resorción ósea. En presencia continua de calcitonina se observa una pérdida de su acción inhibitoria, esto podría deberse a la producción de anticuerpos o a una regulación a la baja de los receptores de calcitonina. Las vías de administración son la subcutánea, intramuscular e inhalada, recomendando esta última a dosis de 200 UI al día y alternando las fosas nasales⁵⁷. Sus posibles efectos adversos incluyen náuseas, proceso inflamatorio regional, rinitis y cuadros de epistaxis.⁹² En julio de 2012 La Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) informó de la existencia de los nuevos ensayos clínicos que apuntaban un ligero incremento de riesgo de tumores asociados a tratamientos prolongados con calcitonina. En 2013 la AEMPS ha suspendido la comercialización de medicamentos de administración intranasal con calcitonina y restringe el uso de los inyectables a tratamientos cortos.

Denosumab: Es un anticuerpo monoclonal humano que inhibe al RANKL, el cual es importante en la diferenciación y activación de los osteoclastos. De esta forma inhibe la resorción ósea de manera similar a los bifosfonatos pero a través de un mecanismo diferente. En junio de 2010 fue aprobado su uso para el tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas con elevado riesgo de fractura y en aquellas que no han respondido satisfactoriamente a otras terapias. Hasta 2012 no fue aprobada su utilización en hombres con elevado riesgo de fractura. Su administración es por vía subcutánea a una única dosis de 60 mg cada seis meses⁹³. Cuando se ha comparado la efectividad del denosumab y el alendronato en el tratamiento de mujeres postmenopáusicas, con el denosumab el incremento de DMO era igual o superior a nivel de la cadera y de la columna vertebral⁹⁴. Sin embargo, aunque su efectividad clínica se mantuvo hasta 6 meses después de la administración de denosumab, el cese del tratamiento se asoció con una reducción más rápida de DMO en comparación a la terapia con bifosfonatos. Esto podría deberse a que el denosumab no se incorpora a la matriz ósea⁹⁵.

Estrógenos: La terapia sustitutiva hormonal se ha relacionado con el incremento de la masa ósea. Los regímenes que incluyen terapia con estrógenos son más efectivos en la protección contra la osteoporosis que aquellos en los que se utiliza exclusivamente calcio; los estrógenos conjugados han mostrado que incrementan la densidad mineral ósea casi un 6% en la columna y un 2,8% en la cadera tres años después de su administración.

Desafortunadamente la terapia con estrógenos tiene riesgos significativos, ya que se ha vinculado a un incremento en la incidencia de cáncer uterino y de mama, así como a un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (infarto agudo de miocardio y enfermedad vascular cerebral)⁵⁷. Su utilización se relega a cortas temporadas y con dosis bajas a pacientes perimenopáusicas que presentan síntomas significativos⁸³.

Agentes anabólicos:

Hormona paratiroidea: Desempeña un papel esencial en la homeostasis del calcio manteniendo los niveles de calcio sérico dentro de los valores de referencia controlando de manera indirecta (a través de los osteoblastos) la resorción ósea por parte de los osteoclastos⁹⁶. Administrada a dosis de 20 μ /día por vía subcutánea se han observado incrementos de DMO de los cuerpos vertebrales de entre un 8% y un 9% y del fémur de un 3%. También se ha observado una reducción de hasta un 65% en la incidencia de fracturas vertebrales y de un 54% en las no vertebrales⁹⁷. Su asociación con el Alendronato mejora significativamente los resultados. Uno de los efectos adversos observados tras su administración es la hipercalcemia que aparece hasta en un 3% de los pacientes y que puede ser corregida para ajustar la dosis del complemento de calcio y vitamina D⁵⁷. Su uso está contraindicado en niños y adultos que cursan con hipercalcemia, enfermedad de Paget, metástasis ósea o con antecedentes de haber recibido radioterapia en alguna región ósea, ya que se ha relacionado dicha situación con el osteosarcoma⁹⁷. El tiempo recomendado de duración del tratamiento es variable siendo de 18 meses en Europa y de dos años en Estados Unidos.

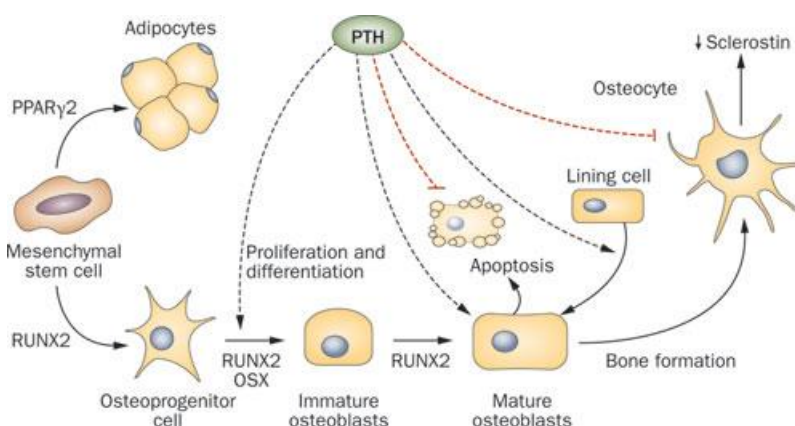


Figura 22. La PTH induce la expresión de RUNX2 en los osteoblastos, induce la diferenciación de precursores osteoblásticos, prolonga la supervivencia osteoblástica y reduce la producción de esclerostina.⁹

Raloxifeno: actúa como modulador selectivo de los receptores estrogénicos. Presenta un efecto benéfico en el perfil lipídico y disminuye la incidencia de cáncer de mama con receptores positivos a estrógenos. Debido a esto la Agencia de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) aprobó en 2007 su utilización en mujeres postmenopáusicas que presentan un elevado riesgo de cáncer de mama⁹⁸. La dosis recomendada es de 60 mg/día por vía oral, y los alimentos no alteran su absorción por lo que se puede administrar con éstos. Según algunos ensayos clínicos presenta una efectividad equiparable a la del Alendronato en cuanto a la reducción del riesgo de fractura⁹⁹. Ocasionalmente se ha asociado con episodios tromboembólicos, por lo que su uso está contraindicado en mujeres con antecedentes o riesgo elevado de enfermedad tromboembólica⁵⁷.

Ranelato de estroncio: Los iones divalentes del estroncio tienen la capacidad de sustituir al calcio dentro del hueso sin afectar negativamente a la mineralización¹⁰⁰. El efecto protector del ranelato de estroncio proviene de un desacoplamiento entre la formación ósea y la resorción, incrementando el número de osteoblastos funcionales y disminuyendo simultáneamente el de osteoclastos¹⁰¹. Diversos estudios demuestran que el tratamiento con ranelato de estroncio, a una dosis de 2 g/día por vía oral durante un periodo de tres años disminuye hasta un 40% el riesgo de fracturas vertebrales en mujeres postmenopáusicas, aunque es incierta la relación de su consumo con la disminución de fracturas de cadera.¹⁰² A pesar de los escasos efectos adversos derivados de su administración se ha relacionado con un ligero aumento de la trombosis venosa en las extremidades inferiores⁵⁷.

1.6.2 Tratamiento de las fracturas osteoporóticas

La principal complicación asociada a la osteoporosis es la aparición de fracturas osteoporóticas que acarreen enormes problemas sociales, económicos y sanitarios. Aunque la osteoporosis suele ser un proceso difuso del esqueleto, generalmente aquellos huesos que presentan un alto contenido de hueso trabecular sufren con mayor frecuencia fracturas. El manejo quirúrgico de estas fracturas supone un reto dentro de la cirugía ortopédica y a menudo conduce a fallos en los sistemas de fijación y osteosíntesis, disminuciones en la capacidad funcional de los pacientes y elevadas tasas de mortalidad postoperatoria. Las fracturas que se producen con mayor frecuencia en huesos osteoporóticos se localizan fundamentalmente en cuatro zonas:^{103, 104}

- Columna vertebral (acuñamientos vertebrales)
- Cadera (fractura de cuello femoral)
- Región distal del antebrazo (fractura de Colles y de Smith)
- Hombro (fractura de cuello de húmero)

De entre todas las fracturas osteoporóticas, en este apartado nos vamos a centrar en las fracturas vertebrales y de cadera, puesto que son las que conllevan un mayor impacto socioeconómico y tienen una mayor mortalidad asociada^{13, 15}.

Fractura vertebral: Son las más frecuentes en pacientes osteoporóticos y podemos clasificarlas en función de su morfología en tres tipos: cuña, biconcava y aplastamiento global. Cuando son sintomáticas causan dolor, pérdida de funcionalidad y tienen un elevado impacto en la salud pública. Su diagnóstico implica la elaboración de una historia clínica centrada en la naturaleza del dolor que presenta el paciente así como diferentes estudios de diagnóstico por imagen. El manejo de estas fracturas es multimodal y comienza con una terapia conservadora que consiste en tratamiento analgésico, tratamiento médico para la osteoporosis, fisioterapia y utilización de corsés. Los pacientes que son refractarios al tratamiento conservador pueden ser candidatos a procedimientos quirúrgicos de aumentación vertebral como la vertebroplastia y la cifoplastia¹⁰⁵.



Figura 23. Diferentes tipos de fractura vertebral osteoporótica (izda): a) vértebra no fracturada, b) fractura en cuña, c) fractura biconcava, d) fractura por aplastamiento. Imágenes de fracturas vertebrales obtenidas mediante resonancia magnética (centro) y radiología (dcha).¹⁰

Tratamiento médico:

- Control del dolor: el control del dolor en estos pacientes se realizará mediante analgesia multimodal que puede incluir la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), relajantes musculares, narcóticos, agentes para el control del dolor neuropático (antidepresivos tricíclicos), analgésicos locales en parche, bloqueo de nervios intercostales y unidades de estimulación nerviosa transcutánea (TENS) ¹⁰⁶.
- Tratamiento farmacológico específico de la osteoporosis (bifosfonatos, moduladores selectivos de receptores estrogénicos, PTH recombinante, etc.).

Tratamiento quirúrgico: Sus principales indicaciones son el mantenimiento del dolor tras el tratamiento conservador, déficits neurológicos y muchas veces la paraplejia a consecuencia de la retropulsión de fragmentos del cuerpo vertebral hacia el interior del conducto raquídeo. Las dos técnicas más frecuentemente utilizadas son la vertebroplastia y la cifoplastia, ¹⁰⁶ técnicas mínimamente invasivas y guiadas por fluoroscopia.

- Vertebroplastia: consiste en la introducción de 4 a 8 centímetros cúbicos de polimetilmetacrilato, habitualmente transapendicular en la vértebra fracturada.
- Cifoplastia: consiste en la introducción de un balón hinchable transapendicular hasta la fractura para expandirla y posteriormente introducir polimetilmetacrilato.

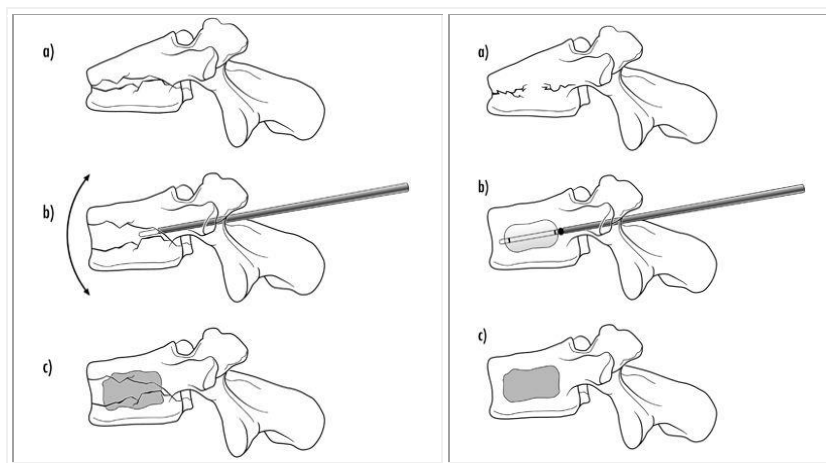


Figura 24. Recuperación de la altura vertebral durante la vertebroplastia (izda). **a:** Un cuerpo vertebral fracturado con una hendidura intravertebral móvil. **b:** La posición en extensión abre la hendidura, permitiendo cierto grado de restauración de la altura del cuerpo vertebral. **c:** La inyección de metilmetacrilato estabiliza la fractura en esta posición. Recuperación de la altura de la vértebra en la cifoplastia (dcha). **a:** Una vértebra fracturada con pérdida de altura. **b:** Un globo hinchable desplaza las trabéculas vertebrales y eleva la placa terminal superior, permitiendo alguna restauración de la altura del cuerpo vertebral. **c:** Tras la retirada del globo se inyecta metilmetacrilato en el espacio vacío.¹¹

Fractura de cadera: el número y variedad de fracturas de cadera aumenta rápidamente en el mundo. En líneas generales, podemos dividirlos en fracturas de cuello femoral (intracapsular) y pertrocanterías (intertrocanterías y subtrocanterías). En pacientes osteoporóticos, estas fracturas son consecuencia de traumatismos de baja energía. Los pacientes no presentan signos de inestabilidad hemodinámica y no requieren una estabilización urgente ¹⁰⁷. Estas fracturas implican graves consecuencias para los pacientes y sus familiares e incluyen una mortalidad anual del 30% y un sustancial aumento de la dependencia y una disminución importante de la calidad de vida ¹⁰⁸.

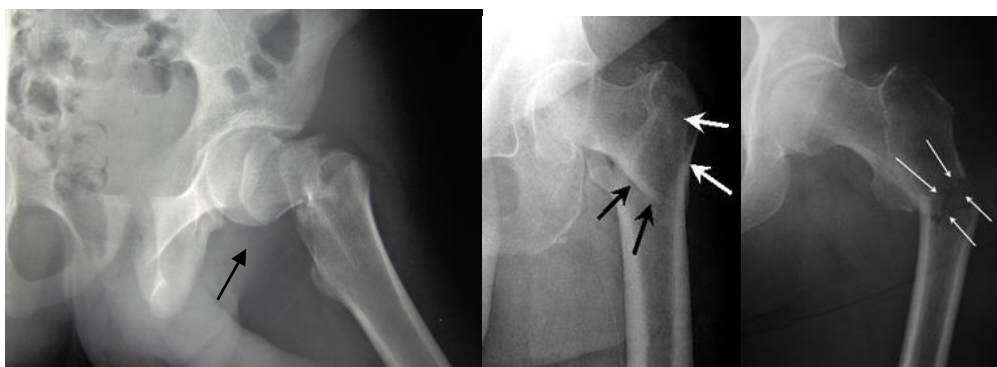


Figura 25. Diferentes tipos de fractura de cadera osteopóroticas: fractura de cuello femoral (izda), fractura intertrocantería (centro), fractura subtrocantería (dcha) ¹²

Tratamiento médico: control del dolor mediante analgesia multimodal de forma similar a la descrita para fracturas vertebrales y tratamiento farmacológico específico de la osteoporosis (bifosfonatos, moduladores selectivos de receptores estrogénicos, PTH recombinante, etc.).

Tratamiento quirúrgico: aunque las fracturas mínimamente desplazadas pueden ser tratadas de manera conservadora, esta vía suele originar limitaciones funcionales. El manejo de las fracturas está basado en factores individuales de los pacientes, tales como el estado ambulatorio antes de la lesión, la edad, la función cognoscitiva y las comorbilidades; y en los factores de la fractura, el tipo y el grado de desplazamiento. Las opciones de tratamiento incluyen manejo no quirúrgico, fijación percutánea (externa), reducción cerrada y fijación interna, reducción abierta y fijación interna y artroplastia parcial o total de la cadera. Sin embargo, la definición sobre cuál es la mejor forma de tratamiento de estas fracturas en pacientes de edad avanzada y con osteoporosis, parece estar más asociada a la utilización de reemplazo articular ¹⁰⁹.

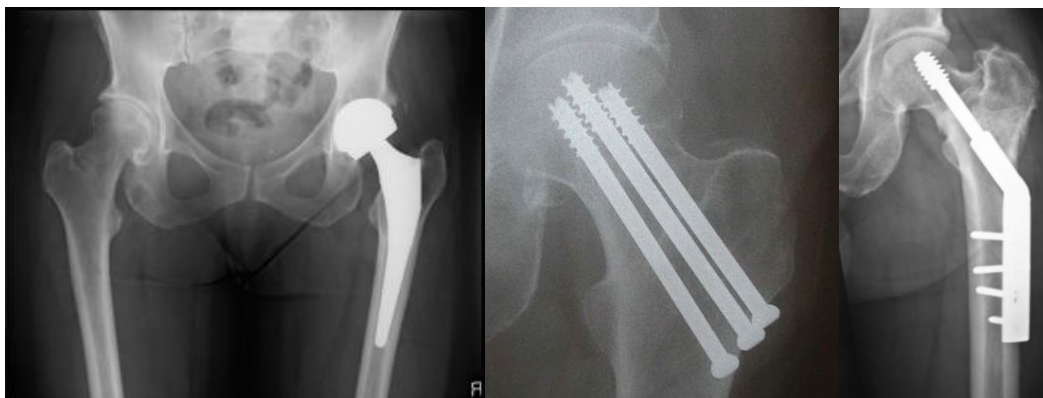


Figura 26. Prótesis de cadera (izda). Estabilización mediante tornillos (centro) y placa de osteosíntesis DHS (dcha).¹³

1.7 Situación actual del problema

El envejecimiento del aparato locomotor y las patologías que de éste derivan, constituyen un problema en rápida progresión asociado al envejecimiento demográfico. La prevención de fracturas en pacientes osteoporóticos y la recuperación funcional de los mismos suponen un reto no resuelto a tenor de la progresiva incidencia del problema. La realización de procedimientos quirúrgicos sobre huesos debilitados, dada la mala calidad del hueso que recibe el implante, conduce a un resultado peor que si dicha intervención se realizara sobre un hueso joven y fuerte. El riesgo de fractura aumenta exponencialmente y su recuperación es lenta, difícil y a menudo conduce a una discapacidad e incluso a la muerte. Alrededor de la cuarta parte de los pacientes que sufren una fractura de fémur fallecerán en el primer año posterior a la aparición de la misma. De los que sobreviven, aproximadamente la mitad quedarán total o parcialmente dependientes. El dolor crónico, la limitación funcional, la dependencia, las alteraciones psicológicas y el aislamiento social convergen en un grave deterioro de la calidad de vida.

Así mismo, los aspectos económicos que rodean este problema socio-sanitario tienen una importancia primordial, por lo que toda acción encaminada a la reducción de los costes debe ser seriamente considerada. Cabe mencionar que una intervención quirúrgica para la implantación de una prótesis de cadera tiene un coste para las autoridades sanitarias de alrededor de 20.000€¹¹⁰. En estados Unidos se estima que los costes médicos directos derivados del tratamiento de fracturas osteoporóticas podrían alcanzar los 20.300 millones de dólares anuales¹¹¹. En el marco de la Unión Europea los costes rondan los 15.000 millones de

euros anuales, y por supuesto, el incremento en la esperanza de vida hace pensar en dificultades aún más serias para el futuro. Dicho coste, lejos de disminuir, ha experimentado un crecimiento continuo durante todo el siglo XX y primera década del siglo XXI. De hecho, el número total de fracturas osteoporóticas a nivel mundial en el año 1950 fue de 1,47 millones y la proyección para el año 2050 es de alrededor de 5,3 millones¹¹⁰.

Tabla 5. Costes hospitalarios directos de fracturas de cadera. Datos en millones de euros anuales⁴

País	2000*	1996
Austria	156,00	146,32
Bélgica	160,00	113,83
Dinamarca	47,97	47,97
Finlandia	150,00	22,68
Francia	600,00	560,86
Alemania	1.462,24	1.401,97
Grecia	44,55	47,81
Irlanda	8,29	3,97
Italia	555,86	204,91
Luxemburgo	no disponibles	no disponibles
Holanda	180,37	180,37
Portugal	51,32	27,45
España	220,00	216,05
Suecia	300,00	101,03
Reino Unido	847,28	530,21
Total	4.800,00	3.600,00

Datos en millones de euros. / *Última cantidad disponible entre 1996 y 2000
Fuente: Comisión Europea.

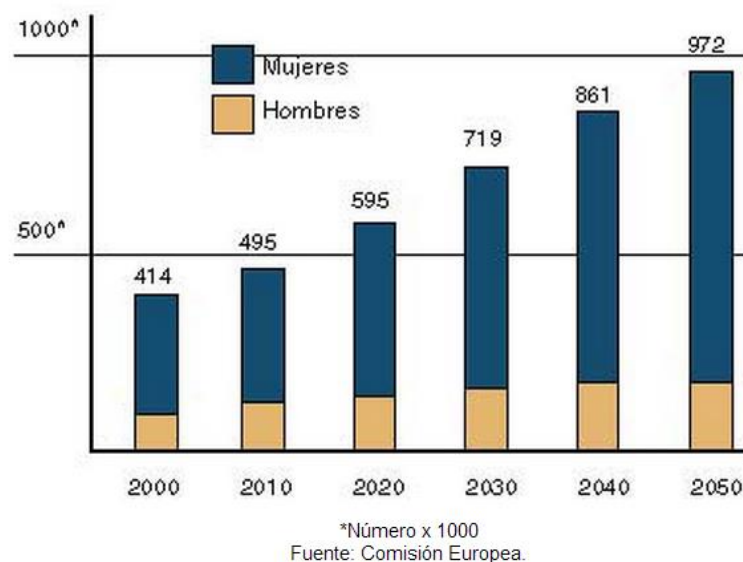
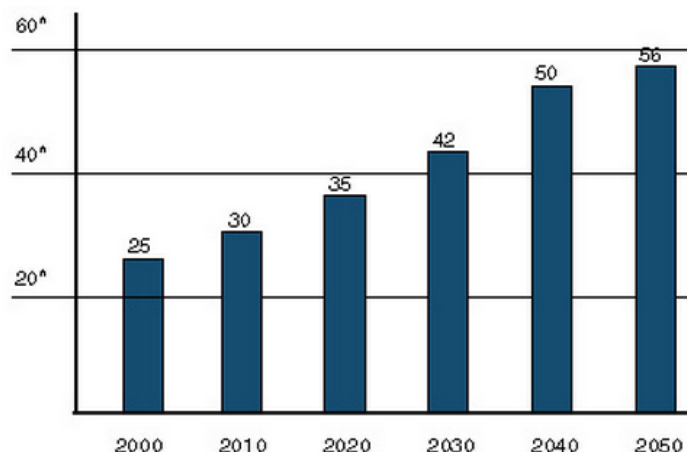


Figura 27. Previsión para 50 años sobre la incidencia de las fracturas de cadera en la UE¹⁴



*Camas de hospital necesarias por cada 1.000 habitantes
Fuente: Comisión Europea.

Figura 28. Camas de hospital necesarias por cada 1000 habitantes para tratar los casos de fractura de cadera y de columna en la UE. Datos anuales. datos en millones de euros.¹⁴

2 MODELOS OSTEOPORÓTICOS

Durante los últimos años se han utilizado una gran variedad de especies para el estudio de la osteoporosis, dentro de la cuales incluimos los primates, perros, gatos, roedores, conejos, cobayas, minipigs, cabras y ovejas. Todos ellos presentan ventajas y desventajas. Las ovejas son un modelo prometedor por varias razones: son dóciles, fáciles de manejar y de mantener, son relativamente baratas, fáciles de conseguir, ovulan espontáneamente y presentan huesos lo suficientemente grandes como para evaluar implantes ortopédicos humanos¹¹².

La mayoría de los estudios experimentales realizados en modelos animales han utilizado hembras. Esto se debe a que la osteoporosis postmenopáusica es la más frecuente dentro de esta enfermedad y presenta una mayor relevancia. No obstante, la osteoporosis inducida por glucocorticoides (GIO) y la osteoporosis senil también han sido ampliamente investigadas. La utilización de modelos animales para el estudio de la osteoporosis es fundamental tanto para profundizar en el conocimiento de los diferentes mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad como para mejorar en la prevención, diagnóstico y tratamiento de ésta.

Actualmente existe un creciente interés en el desarrollo de prótesis, sistemas de osteosíntesis, implantes dentales y terapias de regeneración ósea en condiciones osteoporóticas a nivel del esqueleto axial, apendicular, maxilar y mandibular. También tiene una gran importancia la investigación en procedimientos de aumentación vertebral con cerámicas bioactivas (vertebroplastias). La utilización de estos modelos permite testar nuevas

terapias farmacológicas, técnicas quirúrgicas e implantes en un elevado número de animales sometidos a un control que sería imposible llevar a cabo en ensayos clínicos humanos.

El modelo ideal debería permitirnos aproximarnos con mayor fiabilidad a la anatomía, biomecánica, biología celular y cambios patológicos observados en el esqueleto de la especie humana y al mismo tiempo ser reproducible, ético, económico y eficiente.

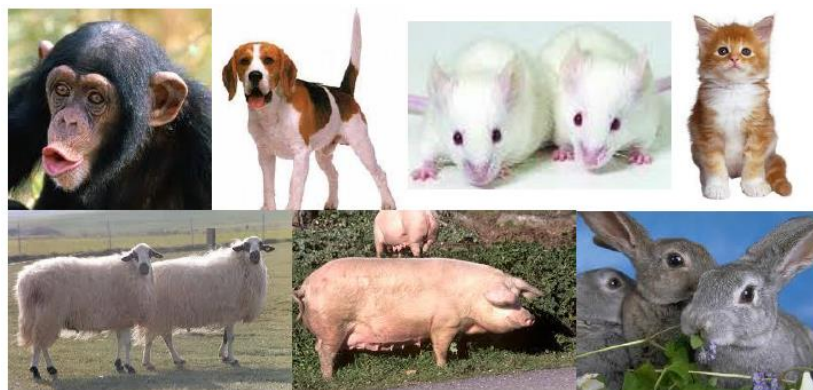


Figura 29.Diferentes modelos animales utilizados en el estudio de la osteoporosis.

Actualmente los **primates** son modelos animales ampliamente utilizados para evaluar la seguridad y eficacia de nuevos fármacos para prevenir la pérdida de masa ósea y osteoporosis asociada a la deficiencia de estrógenos. Ningún modelo animal reproduce exactamente a la especie humana, pero los primates presentan una mayor proximidad filogenética y mayores similitudes a nivel esquelético, hormonal y metabólico^{113,114}. Las secuelas a largo plazo tras la ovariectomía en individuos adultos, reproducen de manera bastante fiable la depleción estrogénica y pérdida de masa ósea postmenopáusica que tiene lugar en las mujeres. Sin embargo, la caracterización de este modelo animal ha revelado una limitación aparente respecto a la extensión de pérdida de masa ósea tras la ovariectomía, ya que dichas pérdidas no son lo suficientemente elevadas como para ser consideradas osteoporóticas. A pesar de esto, los primates son hasta la fecha, dentro de los modelos animales de gran tamaño, el modelo de osteopenia mejor caracterizado, siendo empleado para la aprobación de múltiples drogas y fármacos entre los que se incluyen anabolizantes, bifosfonatos y moduladores de receptores selectivos estrogénicos. Además los primates en ocasiones son la única alternativa posible para probar determinadas terapias, como por ejemplo los anticuerpos monoclonales, que en la actualidad están siendo investigados como un posible tratamiento de la osteoporosis¹¹⁵. Otra de las ventajas que presenta la investigación con primates en el campo de la osteoporosis es que sus similitudes anatómicas facilitan la realización de estudios densitométricos. Estudios poblacionales llevados a cabo en determinadas especies de primates

han revelado pérdidas de masa ósea ligadas a la edad y al sexo que pueden ser consideradas osteopénicas e incluso en algunos casos en individuos muy viejos, osteoporóticas ¹¹⁶. No obstante, hemos de considerar que la utilización de estos modelos animales presenta importantes limitaciones éticas, legales y económicas lo que dificulta en gran medida su uso.

Los **ratones, las ratas y los conejos** han sido muy utilizadas para estos estudios, principalmente por su facilidad de manejo y ventajas económicas, y porque se ha observado que mediante la esterilización de las hembras es relativamente sencillo y rápido obtener una disminución de DMO significativa. No obstante, cabe plantearnos si estas especies, tan distanciadas filogenéticamente de la especie humana y tan diferentes biomecánicamente, son válidas para simular adecuadamente muchos aspectos de esta patología en personas.

De estas tres especies la menos utilizada ha sido el **ratón**. Su reducido tamaño dificulta así mismo la realización de estudios experimentales en el campo de la implantología. No obstante si que ha sido ampliamente utilizado en estudios de regeneración de defectos óseos, sobre todo a nivel de la calota craneal^{117, 118}.

La **rata** ha sido sin duda la especie animal más utilizada para el estudio experimental de la osteoporosis. Se ha utilizado para estudiar la regeneración ósea en defectos de calota con y sin células madre autólogas y heterólogas ^{119,120}. También se han utilizado como modelos de osteoporosis y diabetes y para valorar el efecto de los estrógenos en la regeneración ósea perimplantaria^{121,122,123,124} y de la simvastatina en un modelo de osteoporosis en rata ^{125,126,127,128,129 y 130}.

El **conejo** se ha utilizado también profusamente como modelo animal de la osteoporosis tras ser sometido a la castración y con controles densitométricos. En él se han valorado el efecto de la PTH¹³¹, adiponectina¹³², zolendronato^{133,134,135} y BMP^{136,137}. En este modelo también se ha valorado la inhibición de la cicatrización ósea con corticoides sistémicos ¹³⁸. Por último se ha estudiado el efecto del injerto de grasa en defectos de calota ¹³⁹ y de las células mesenquimales de origen adiposo en la regeneración ósea ^{140,141,142}.

Las **especies porcina y ovina** han ido ganando importancia durante los últimos años. Los cerdos SMS (Sinclair Miniature Swine) esterilizados y alimentados con dietas bajas en calcio son modelos útiles para el estudio de la osteopenia y la perforación de la placa trabecular, y son modelos prometedores para el estudio de la influencia de los cambios microestructurales en la biomecánica ósea¹⁴³.

La principal desventaja de trabajar con la **especie porcina**, es que requiere el uso de líneas modificadas genéticamente y predisuestas para desarrollar esta enfermedad, o bien el uso de razas específicas que son poco accesibles y generalmente muy costosas. En la actualidad una de las más utilizadas es la Gottingen mini-pig, en la cual se puede obtener un elevado grado de osteoporosis inducida por glucocorticoides en hembras adultas primíparas¹⁴⁴.

En la **especie ovina** la administración de glucocorticoides durante periodos de 3 meses es suficiente para causar una disminución significativa de DMO¹⁴⁵. Esta pérdida es superior y más rápida cuando es sometida a un tratamiento combinado de corticoterapia, esterilización y alimentación a base de una dieta pobre en vitamina D y Ca. De esta forma podemos obtener disminuciones de la DMO > 30% en aproximadamente 12 semanas^{146,147,148}. Además la oveja es un modelo accesible, relativamente barato y con importantes similitudes biomecánicas y esqueléticas con la especie humana^{149,150}. También se puede conseguir una pérdida de DMO mediante ovariectomía sin corticoterapia ni dietas específicas, pero ésta es mucho menor, muchos autores defienden que más bien se trata de un modelo osteopénico, y requiere un periodo mucho más prolongado de tiempo para obtener disminuciones significativas (de 12 a 24 meses)^{148,151,152}.

En el **perro** se ha observado que la ovariectomía (OHT) y la ovariectomía (OVX) no se asocian a pérdidas de DMO significativas. La esterilización es un procedimiento habitual en la Medicina Veterinaria que se ha efectuado en millones de perras, muchas de ellas de edad avanzada, y no se ha observado un aumento del riesgo de fracturas. Por otro lado, individuos de la especie canina sí han sido empleados en la evaluación de los efectos derivados a nivel esquelético de fármacos comúnmente empleados en el manejo médico de la osteoporosis, como por ejemplo el raloxifeno¹⁵³.

En los **gatos** se puede inducir osteopenia en individuos en crecimiento, mediante la inmovilización y la alimentación con dietas bajas en calcio o ricas en fósforo. El hiperparatiroidismo nutricional secundario, que es frecuente en gatos jóvenes alimentados a base de carne y que no reciben un aporte adecuado de Ca, se ha asociado a un incremento del riesgo de fracturas¹⁵⁴. Estos hallazgos, así como la facilidad de manejo y alojamiento, sugieren que los gatos podrían ser útiles como modelo animal en el estudio de la osteoporosis.

Sin embargo, la utilización de las especies canina y felina, como modelos experimentales, cada vez es peor vista por la opinión pública, posiblemente por su consideración como animales de compañía.

3 REGENERACION ÓSEA

Denominamos sustitutivos óseos a todos los tejidos y materiales que pueden utilizarse para rellenar defectos óseos con el objetivo de obtener la regeneración y reparación del tejido óseo. Podemos reconocer dos tipos de sustitutivos, los injertos óseos y los biomateriales.

3.1 Injertos óseos

Denominamos injerto a aquella parte de un órgano o tejido que tras ser extirpado de una zona donante se coloca o inserta en otra zona receptora con el objetivo de dar soporte y /o corregir un defecto estructural.

Por lo tanto, injerto óseo se refiere al trasplante de hueso que se extrae de una región para utilizarlo en otra. En los injertos óseos, se agrega hueso donante al lugar donde se encuentre la deficiencia ósea o el defecto óseo.

Dentro de las funciones de los injertos óseos debemos definir los términos osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción.

La osteogénesis hace referencia a la formación de hueso sin indicación del origen celular. Cuando se forma hueso sobre el injerto o a su alrededor, éste puede tener origen en el propio injerto (células que sobreviven al tratamiento del injerto y que lógicamente sólo pueden suceder con los autoinjertos) o en células huésped.

La osteoinducción es el proceso por el que algunos factores o sustancias estimular un determinado número de células osteoprogenitoras para que se diferencien hacia células osteogénicas. Además del autoinjerto, materiales que poseen esta propiedad osteoinductiva son la matriz ósea desmineralizada y las proteínas morfogenéticas (BMP). Los aloinjertos son un material que mantiene sólo de forma residual esta capacidad.

La osteoconducción es el proceso tridimensional de crecimiento de brotes vasculares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras desde el lecho del receptor al interior del injerto. 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 injertos de esponjosa^{155,156}.

3.1.1 Autoinjerto o injerto autólogo

Denominamos autoinjerto al injerto que es extraído de una parte del esqueleto y se

implanta en otra localización del mismo individuo. Tiene excelentes propiedades osteogénicas osteoconductoras y osteoinductivas.

Como principales ventajas de este autoinjerto, habitualmente de esponjosa, destacamos que se revasculariza con mucha facilidad y se integran rápidamente en el huésped, es histocompatible y no inmunógeno, no transmite enfermedades y se suele adaptar bien en el sitio del injerto. Como inconvenientes a destacar estarían su volumen limitado, un tiempo largo de cirugía, hemorragia, dolor postoperatorio, a veces intenso, la lesión temporal de la estructura en la zona donante, además de las complicaciones habituales de la técnica quirúrgica. También limitan su utilización factores como la edad, no pudiendo obtenerse de niños ni de ancianos y los antecedentes del donante como pueden enfermedades malignas u otras enfermedades. Las complicaciones aparecen en un 8,5-20% de los pacientes.

La región ideal para obtener un autoinjerto es la cresta iliaca, en la zona anterior o en la posterior, pudiendo extraerse entre 12,87 ml y 30,31ml respectivamente. Otros lugares idóneos para extracción serían la tibia, el peroné, el olecranon, el radio distal o las costillas^{155,156,157}.

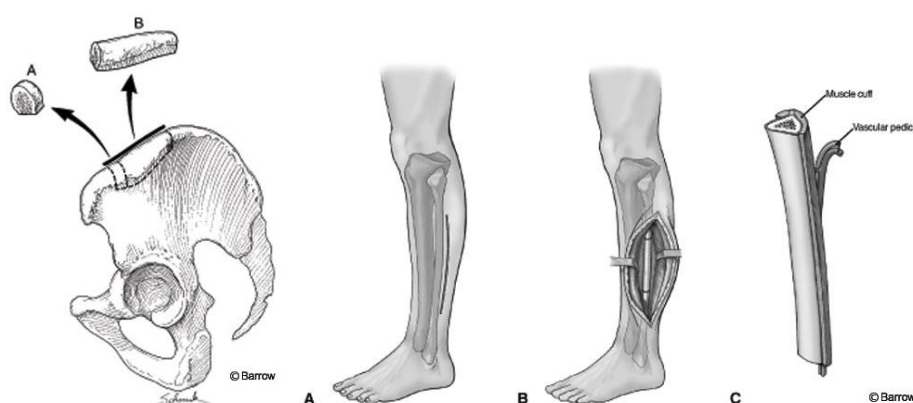


Figura 30. Diferentes localizaciones para la obtención de injertos óseos. Cresta iliaca (izda), peroné (dcha)¹⁵

3.1.2 Homoinjerto o aloinjerto

Los inconvenientes antes mencionados de los autoinjertos restringen su aplicación, siendo una de las alternativas disponibles la utilización de aloinjertos. En la actualidad suponen la primera alternativa como sustituto óseo, de tal manera que es considerado un recurso necesario en todo centro donde se tratan patologías de alta complejidad, por lo que su utilización se ha incrementado en 15 veces durante la última década, suponiendo en la actualidad un tercio de los sustitutos óseos utilizados en los Estados Unidos. La FDA lo

considera un tejido para trasplantar utilizado sin aditivos, almacenándose con esta finalidad en los establecimientos de tejidos^{158,159,160}.

Un homoinjerto o aloinjerto es un tejido trasplantado entre miembros genéticamente no idénticos de la misma especie. Se puede obtener de donantes vivos, frecuentemente de las cabezas femorales extraídas en las artroplastias de cadera, de donantes multiorgánicos o de donantes de tejidos¹⁵⁸. Las ventajas de los aloinjertos sobre los autoinjertos están en relación a su más fácil disponibilidad, ausencia de morbilidad de la zona donante, menor tiempo quirúrgico y sangrado, capacidad de reconstrucción de grandes defectos, etc. Entre sus desventajas están los tiempos de incorporación más prolongados y la capacidad osteoconductiva y osteoinductiva menores comparada con el autoinjerto. El punto más conflictivo está en relación con la transmisión de enfermedades^{161,162,163}. El riesgo de transmisión de enfermedades con injertos frescos y la dificultad para su almacenamiento y distribución, ha generalizado el uso de injertos frescos-congelados y liofilizados, con propiedades principalmente de osteoconducción, aunque también conservan algunas propiedades osteoinductivas que varían de acuerdo al tipo de injerto y al procesamiento utilizado en su preparación, esterilización y almacenamiento.¹⁶⁴

Entre los tipos de aloinjertos más frecuentemente utilizados están: el aloinjerto de hueso esponjoso, es el más común, se obtiene de cabeza femoral por lo general triturándola y se utiliza para relleno de cavidades óseas, artrodesis vertebrales extensas, recambio protésico, etc; el aloinjerto de hueso corticoesponjoso, que se utiliza para reconstruir pequeños segmentos óseos debiendo realizarse un tallado perfecto del injerto para obtener un mayor soporte mecánico, y por último el aloinjerto óseo masivo, destinado a reemplazar segmentos de gran tamaño (fémur distal, tibia proximal...) y cuyo uso ha supuesto un cambio importantísimo en el tratamiento y pronóstico de los tumores óseos malignos.

Las fuentes de aloinjertos óseos son principalmente dos: injertos de donantes cadáveres, obtenidos bajo los mismos estándares que para la obtención de otros órganos destinados a trasplantes, e injertos de donantes vivos, procedentes casi exclusivamente de las cabezas femorales obtenidas de resecciones realizadas en cirugías de reemplazo articular de la cadera, previo consentimiento de paciente. Ambas técnicas se realizan bajo técnica aséptica.

Los métodos de conservación son la congelación, criopreservación o liofilización, y puede ser fresco, congelado o procesado alternativamente para minimizar la posible respuesta inmunógena a la que se expondría al huésped al que se implanta el material. El homoinjerto

fresco se utiliza menos que el procesado por la dificultad para realizar el screening de enfermedades¹⁶⁴. En la criopreservación, la temperatura a la cual debe ser mantenido el tejido óseo depende del tiempo que se quiere conservar. La mayor ventaja de la liofilización es que puede conservarse a temperatura ambiente y su desventaja el alto coste del proceso.

El proceso de incorporación del aloinjerto en el esqueleto del huésped donde se trasplanta, comienza con una osteoconducción pasiva, a la que le sigue una formación ósea estimulada por las sustancias osteoinductivas.

Los injertos corticales se incorporan por trepanación y sustitución a través de un proceso de formación intramembranosa en las uniones corticales. El injerto cortical finaliza con una exposición medular al canal que se incorpora por osificación endocondral. Este proceso crea una estructura con una fortaleza débil, que es reabsorbida y, posteriormente, convertida en hueso nuevo. En contraste, el injerto medular se incorpora exclusivamente por formación endocondral, permitiendo la formación de hueso dentro del marco osteoconductor, aportando fortaleza desde el principio¹⁶⁵.

Ninguno de los métodos de conservación de hueso utilizados aseguran por sí mismos su esterilidad, por lo que es necesario utilizar diferentes procedimientos de esterilización. Los métodos de esterilización utilizados para erradicar la posible presencia de bacterias, hongos y virus y disminuir al máximo el riesgo de su transmisión (lo que se descarta mediante screening para el VIH-1, (virus de inmunodeficiencia humana-1) VIH-2 (virus de inmunodeficiencia humana 2), VHC (virus de la hepatitis C), VHB (virus de la hepatitis B), HTLV-I (virus linfotrópico de célula T humano-I) , HTLV-II (virus linfotrópico de célula T humano-II), sífilis y citomegalovirus) se basan en la utilización de radiación gamma o de óxido de etileno. El primero ofrece mejores efectos sobre la actividad mecánica, ya que el óxido de etileno afecta a las propiedades osteoinductivas del hueso¹⁶⁶, y es el método de esterilización que se utiliza con más frecuencia siendo su objetivo la obtención de tejidos que posean un aceptable margen de seguridad (a dosis de 25.000 grays, la totalidad de bacterias y hongos son inactivados) y cambios mínimos en su estructura y comportamiento. El segundo, disminuye las propiedades osteoinductivas y las características biomecánicas del tejido desaconsejándose además por la toxicidad de sus residuos¹⁶⁶.



Figura 31. Imágenes de aloinjertos óseos y ligamentosos. A) Aloinjerto osteocondral de fémur distal. B) Proceso de tallado de aloinjerto osteocondral unicondilar de fémur distal. C) Resultado radiológico de trasplante osteocondral unicondilar de fémur distal osteosintetizado con tornillos. D) Aloinjertos de tendón patelar (a la izquierda) y de tendón aquiliano (a la derecha) para cirugía de reconstrucción de ligamiento cruzado anterior. E) Congelador a -80°C

16

3.1.3 Isoinjerto o injerto singénico

Los isoinjertos son aquellos que se realizan entre individuos isogénicos, es decir, genéticamente idénticos, como es el caso de los gemelos homocigóticos idénticos^{158,162,167} o de animales de laboratorio procedentes del mismo ovocito. En este tipo de injertos no hay barreras inmunológicas.

3.1.4 Heteroinjerto o Xenoinjerto

Los heteroinjertos son los injertos que se realizan entre individuos de diferente especie. Se pueden conseguir con mucha facilidad por lo que en la actualidad existe un gran interés científico y se están realizando numerosos estudios sobre ellos. Su uso está muy limitado ya que la capacidad inmunogénica de las células y de la matriz orgánica hace necesaria su desproteinización^{158,162,167}.

Tabla 6. Función primaria de algunos sustitutos óseos.

FUNCIÓN PRIMARIA	SUSTITUTOS ÓSEOS
Osteogénesis	Aspirado de médula ósea Matriz ósea desmineralizada Proteínas morfogenéticas
Osteoinducción	Factores de crecimiento Terapia génica Sulfato cálcico Cemento de fosfato cálcico
Osteoconducción	Cerámicas Colágeno Polímeros sintéticos

Tabla 7. Propiedades de diferentes tipos de sustitutos óseos (DBM: matriz ósea desmineralizada. TCP: Fosfato tricálcico. BMA: Aspirado de médula ósea. BMP: Proteínas morfogenéticas. CPC: Cemento de fosfato cálcico. 0 = nada. 3 = excelente).

TIPO	INJERTO	OSTEOGÉNESIS	OSTEOINDUCCIÓN	OSTEOCONDUCCIÓN
Hueso	Autólogo	2	2	3
Biomateriales	DBM	0	2	1
	Colágeno	0	0	2
Cerámicas	TCP	0	0	1
	HA	0	0	1
	CPC	2	2	3
Injertos combinados	B-TCP/BMA BMP/compuestos sintéticos	-	3	-

3.2 Biomateriales

En ocasiones se necesita aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, para ello debemos utilizar diversas sustancias sintéticas o naturales, que sin ser fármacos se puedan usar como un sistema o parte de un sistema, a estas sustancias las llamamos comúnmente biomateriales^{168,169}. Estos materiales han de influir activamente en los procesos de cicatrización, dependiendo éstos de las propiedades fisicoquímicas, mecánicas, topografía superficial y diseño del implante¹⁷⁰. Presentan una serie de características genéricas como son la biocompatibilidad, propiedades mecánicas, biofuncionalidad, bioestabilidad o resistencia a la corrosión, seguridad biológica, disponibilidad y procesabilidad del material que son necesarias para que puedan llevar a cabo su función.

Cuando un material se pone en contacto con el tejido óseo puede que no produzca efectos tóxicos e interactúe favorablemente con las células del lecho óseo, dando lugar a su integración; puede que no libere sustancias tóxicas pero no sea capaz de interactuar con el lecho óseo, resultando así una integración difícil, o que sus moléculas interactúen con las células, pero esta interacción produzca tóxicos, haciendo fracasar el implante. O puede que el material cause una mortalidad celular moderada o por último, que cause necrosis tisular masiva, dando lugar a la pérdida espontánea del implante¹⁷¹.

3.2.1 Biocompatibilidad

Una de las definiciones más usuales de biocompatibilidad es la capacidad de un material de ser utilizado en una aplicación específica, con una respuesta adecuada del tejido receptor. Este término hace referencia al grado de aceptación de un material por parte del organismo y se denomina concretamente “aceptabilidad biológica”^{172,173}.

A pesar del uso tan extendido que tiene dentro de las ciencias de la salud, su definición no se aceptó en el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española hasta la edición de 2001 aunque ya aparece recogido en la European Society for Biomaterials desde 1986 que los define como “materiales que empleados en los dispositivos médicos, tienen como fin interactuar con sistemas biológicos”, modificando la definición original de material biocompatible como “material inerte en el entorno fisiológico”, ya que actualmente se incluyen como biocompatibles a materiales que pueden reaccionar con el entorno.

La biocompatibilidad es algo más que la ausencia de toxicidad. El término biocompatible aparece cuando la medicina, junto con toda la tecnología que le da soporte, evoluciona lo suficiente como para conseguir sustituir la totalidad o parte de un tejido, en nuestro caso tejido óseo, por un material, para lo cual es condición imprescindible que el material sea biocompatible. Las características de un tejido se basan en su hidratación, su celularidad, su complejidad estructural, los cambios que sufren con la edad y con diferentes estímulos, su actividad metabólica y, por último, su anisotropía, es decir, la variación de su comportamiento en función de la dirección del estímulo. Por el contrario, los biomateriales son acelulares, generalmente anhidros, con una microestructura más o menos compleja pero siempre estándar, no responden a estímulos ni participan en la actividad metabólica del organismo y son isotrópicos. A todo esto hay que añadir que nuestro cuerpo está diseñado para reconocer lo que le es propio y rechazar lo que le es ajeno a fin de defenderse de agresiones exteriores. Por ello, cuanto más inerte sea un material más probabilidad tendrá que el organismo no lo rechace. El carácter inerte de un material es relativo, ya que siempre quedan productos residuales, defectos de fraguado, productos de solubilización o de corrosión o de la misma dinámica de la reacción de fraguado, que poseen la capacidad de difundir y reaccionar químicamente con las moléculas biológicas por lo que la existencia de un material absolutamente inerte no es factible, aunque un material puede ser considerado biocompatible cuando la respuesta biológica se mantenga dentro de unos límites aceptables ^{174,175}.

Otro factor fundamental es que la mayoría de los biomateriales que se utilizan tienen que fraguar, por lo que necesitan ser químicamente activos. Como consecuencia de todo esto, se puede considerar la biocompatibilidad de un material como “el estado en el cual un material se encuentra en íntimo contacto con un organismo vivo, ejerciendo su función, sin dañarlo ni ser dañado por él”. Por lo tanto, la biocompatibilidad es bidireccional entre el organismo y el material y se debe tener en cuenta cómo puede dañar el material al organismo y cómo éste puede, a su vez, dañar al material ¹⁷⁶.

El objetivo principal de los estudios de biocompatibilidad es analizar las posibles respuestas adversas que pueden generar los biomateriales. En la normativa ISO 10993.1 sobre biocompatibilidad se detallan una serie de ensayos que debe superar un biomaterial para ser considerado biocompatible. La norma es útil sobre todo, para detectar posibles daños irreversibles sobre los tejidos, o del cuerpo en general y hacen referencia especial a la posible genotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad sobre el feto en gestación, citotoxicidad, alergias, sensibilización al mismo y efectos de los residuos procedentes de la esterilización.

Pruebas de toxicidad: Existen múltiples pruebas que se pueden clasificar en tres categorías: Nivel I, que son ensayos *in vitro* sobre toxicidad; Nivel II, ensayos *in vivo* con animales de experimentación y Nivel III, ensayos en humanos. Este tipo de experimentación debe estar muy bien controlada y cumplir todos los requisitos éticos y legales.

3.2.2. Bioestabilidad, bioactividad y seguridad biológica

No existe duda en lo relativo a que cualquier material que sea implantado en el cuerpo, y que deba permanecer un largo periodo en él, con la intención de sustituir a una parte o función del organismo, ha de ser lo suficientemente resistente al medio corporal, que puede llegar a ser muy hostil. La máxima resistencia a la corrosión o degradación es el primer requisito a largo plazo para un biomaterial, obviando aquellas situaciones en las que son deseables la reabsorción del material implantado. Estas degradaciones pueden tener causa mecánica o por biodegradación. Cuando es un metal, el material implantado ha de resistir a múltiples tipos de corrosiones y ser casi inerte.

En lo relativo a la seguridad biológica, los efectos adversos asociados a un material implantable, obviando la presencia física, pueden ser causados por la interacción del medio biológico con la superficie o liberación de parte del material al medio, por esto el biomaterial, y más concretamente su superficie, ha de poseer una excelente resistencia a la corrosión que minimice la liberación de partículas u otros elementos. Éstos, deben tener escasa actividad biológica, con ausencia o mínima presencia de citotoxicidad, o ser fisiológicamente indiferentes al ser tolerado por las células sin ningún efecto positivo pero también sin efecto negativo.

Visto lo anterior, los biomateriales, según los objetivos, han de reaccionar mínimamente con el cuerpo. Existen múltiples sistemas médicos que son elegidos por ser inertes y carecer así de capacidad para integrarse en los tejidos vivos, ya sea a nivel físico o biológico, y que funcionan como un adjunto al cuerpo sin constituir parte de él, existiendo el riesgo de separación y pérdida del implante con el tiempo. Esto da lugar a importantes reservas cuando se usa un material inerte en cirugía reconstructiva, por lo que cabe preguntarse si esta cualidad es buena para los implantes dentales en la actualidad, que requieren una unión específica y permanente al lecho óseo.¹⁷⁷

3.2.3 Biomateriales y tejido óseo

Cuando se trabaja con prótesis sobre bases óseas que han de ser permanentes, incluyendo los implantes dentales, no se busca la inactividad biológica del material implantado, sino que se requiere la capacidad de interacción en la interfaz hueso-implante, considerándose dos situaciones aceptables, siendo la primera una combinación de tejido óseo y blando, y la segunda con ausencia de tejidos blandos. Esto depende de un gran número de variables entre las que destacan la estabilidad mecánica, la rugosidad superficial y un material inerte. En la mayoría de las circunstancias, la aposición ósea y la estabilidad clínica de los implantes se logra mediante el método de maximizar la cualidad de material inerte, y como consecuencia de la baja reactividad disminuiría la respuesta inflamatoria y la formación de tejido blando. Por otro lado, la aposición del biomaterial al hueso no significa su adhesión, existiendo materiales bioactivos que permiten la unión activa al hueso. Una clave en esta situación es que el biomaterial permita la expresión fenotípica de los osteoblastos para que formen fosfato cálcico, y que éste se pueda adsorber a la superficie del implante uniéndolo al tejido óseo, buscando un equilibrio entre la estabilidad, seguridad y actividad biológica¹⁷⁸.

3.2.4 Clasificación de los biomateriales

Se utilizan diferentes clasificaciones de los biomateriales, una de las más utilizadas es según su origen^{179, 180, 181}:

- a) Materiales biológicos: incluye sustancias basadas en moléculas orgánicas tales como el colágeno o la fibrina, usados con diversos fines. Pueden ser tejidos blandos (piel, tendón, miocardio...) o Tejidos duros (hueso, dentina...)
- b) Materiales sintéticos: incluye a los polímeros, metales, cerámicas y vidrios.
 - Polímeros como el Polimetilmetacrilato, etc.
 - Metales: los implantes dentales metálicos son los más usados y conocidos. Dentro de éstos destaca el titanio comercialmente puro y sus aleaciones, por ejemplo, con vanadio y titanio. El acero inoxidable está en desuso en implantes dentarios debido a la poca resistencia a la corrosión y fatiga. También se usan aleaciones de cromo-cobalto, tantalio y otros.
 - Cerámicos: Se pueden definir como materiales sólidos, inorgánicos y no metálicos. Pueden ser bioinertes como la alúmina o el zafiro, o bioactivos como los basados en fosfato cálcico (hidroxiapatita, fosfato tricálcico), o vitrocerámicos.
 - Biovidrios: se usan como revestimiento de implantes o relleno de cavidades óseas.

^{181, 182}

- c) Semisintéticos: Se obtienen por la transformación química de los polímeros naturales sin que se destruya de modo apreciable su naturaleza macromolecular.

Ségún su respuesta biológica se pueden clasificar en:

- a) Biotolerados: Son encapsulados por una capa de tejido conjuntivo fibroso (PMMA, acero inoxidable, Cr-Co).
- b) Bioinertes: La superficie del material es recubierta por una capa de óxido estable, presenta contacto directo con el hueso y no se produce inhibición de la osteogénesis (Ti, Ti-aleaciones, alúmina, ciconia).
- c) Bioactivos: producen un enlace químico directo con el hueso circundante (fosfato cálcico, hidroxiapatita, biovidros), gracias a su capacidad para fijar proteínas inductoras en su superficie.

3.2.5 Matriz ósea desmineralizada (DBM)

La matriz ósea desmineralizada es un biomaterial que se obtiene de la descalcificación del hueso cortical. Mantiene la estructura trabecular de colágeno del tejido original y puede servir como andamiaje biológico osteoconductor, aunque pierde cierta resistencia en este proceso. La desmineralización no elimina completamente los factores de crecimiento, por lo que estos injertos pueden ser más osteoinductivos que el resto. Los resultados clínicos con su uso, no obstante, no son uniformemente buenos, debido principalmente a que el procesamiento no se realiza de manera uniforme, aunque mediante él se disminuye el riesgo de infección y de respuesta alérgica por parte del huésped. La DBM suele utilizarse como complemento de otros sustitutos óseos y se presenta de diferentes formas.



Figura 32. Diferentes presentaciones de DBM: en bloques (izda) o gránulos (dcha)

3.2.6 Colágeno

El colágeno constituye la principal proteína insoluble de la matriz extracelular y del tejido conectivo. Una de las características principales del colágeno es su estructura helicoidal de triple hebra, en la que tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas alfa, se envuelven entre ellas para formar una superhélice cordonal. La gran cantidad de prolina y glicina que posee el colágeno es fundamental en la formación de la triple hélice.

El colágeno como componente de la matriz extracelular puede ser un material de elección para su uso como almacén celular. Éste ayuda al depósito mineral, al crecimiento vascular, retiene los factores de crecimiento y favorece un entorno para la regeneración ósea. Además, en estudios recientes se ha demostrado útil como transportador de factores osteoconductivos, osteoinductivos y osteogénicos. Como inconvenientes se puede mencionar que puede crear reacciones inmunitarias y aporta poco poder estructural. Las membranas de colágeno son el elemento esencial en la regeneración tisular y ósea guiadas, tan importantes en periodoncia y ortopedia^{182,183,184}. Actúan como efecto barrera e impiden que las células de estirpe epitelial invadan el foco a regenerar, permitiendo de esta manera la reproducción y multiplicación de las células óseas¹⁸⁵.

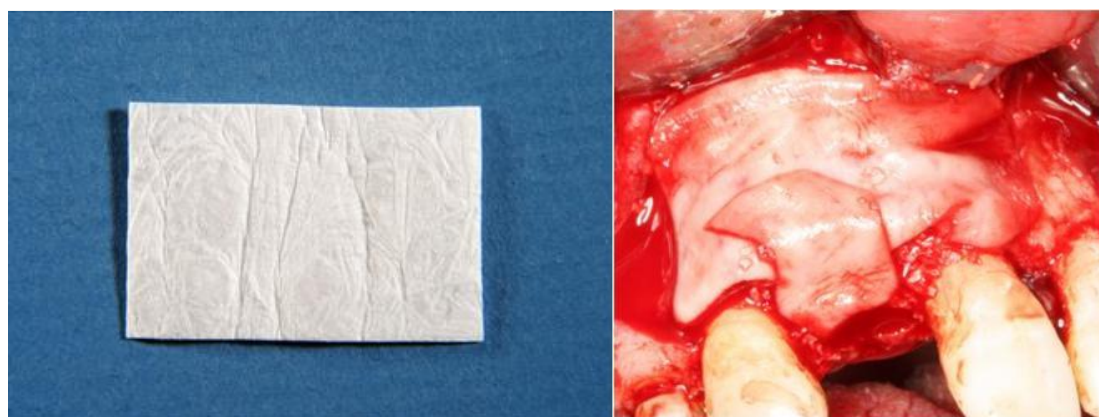


Figura 33. Membrana colágena (izda). Recubrimiento de un injerto mediante una membrana de colágeno reabsorbible (dcha).

3.2.7 Titanio

El titanio es el noveno elemento más abundante en la corteza terrestre y es obtenido a partir del óxido de titanio, TiO_2 , presente en minerales tales como el rutilo, la ilmenita la anatasa y el leucoxeno. El titanio es un elemento alotrópico, es decir, puede existir en más de una forma cristalográfica, con el número atómico 22 y una masa atómica 47,90. Su punto de fusión es 1675 °C. A temperatura ambiente forma una estructura cristalina denominada fase alfa, mientras que la fase beta se logra al solidificarlo desde el estado líquido o al calentar el

sólido a temperaturas superiores a 883 °C. Estas fases pueden coexistir en el mismo cuerpo de un implante estabilizándose mediante la aleación con otros metales. En estado puro posee un brillo de metal blanco o grisáceo muy claro. Tiene una baja densidad, ligereza, buena resistencia mecánica y una excelente resistencia a la corrosión química, ya que resiste la acción de ácidos tanto orgánicos como inorgánicos, paramagnético (no se imana), poca conductividad, reciclable, maleable y dúctil, muy resistente a la tracción y gran tenacidad puede mantener una lata memoria en su forma^{186,187}.

Las aplicaciones más tempranas como biomaterial del titanio se basaron en los avances realizados, después de la Segunda Guerra Mundial, en los procesos de manufacturado para necesidades militares y aeroespaciales. Se realizaron estudios sobre su biocompatibilidad y resistencia a la corrosión, generándose el interés en el desarrollo de nuevas aplicaciones del titanio para los sistemas médicos, quirúrgicos y dentales, que continúa en nuestros días.

Ya que el titanio puede ser procesado como material del cuerpo del implante, usando procesos convencionales, éste es apropiado para implantes que transmitan cargas y para la fabricación de otros instrumentos. Además, el titanio puede ser usado para recubrir superficies menos biocompatibles o servir como base de superficies bioactivas. Su uso como biomaterial depende de la formación de una fina capa, 5-20 nm de espesor, de óxidos de titanio, fundamentalmente TiO₂, que es compacta, adherente y protectora. Sobre las características de esta capa de óxido influyen las trazas de elementos y los metales que se alean con el titanio.

A pesar de los estudios realizados, su potencial está aún infravalorado, aunque con el convencimiento de que tendrá mayor importancia, en las generaciones futuras de nuevos sistemas médicos, incluyendo las aplicaciones tradicionales en odontología, ortopedia y sistema cardiovascular. Del mismo modo el dióxido de titanio disponible en varias configuraciones es un material prometedor como transporte de células y plataforma de tejidos en ingeniería tisular. Se demostró que el titanio es capaz de adsorber rápidamente proteínas desde los fluidos biológicos, éstas pueden ser albúmina, colágeno, fibrina, glucoaminoglicanos, proteínas de complemento, e inmunoglobulina G, entre otras; pero no existen conclusiones sobre la importancia de la formación de esta capa proteica sobre la reacción biológica del titanio, siendo importante en la regulación de la homeostasis cercana al implante, así como en la regulación de la respuesta inflamatoria, y por lo tanto en procesos de reparación tisular a corto plazo.^{188,189} Del mismo modo también une células, las cuales pueden experimentar crecimiento y diferenciación. Entre los tipos celulares más destacados que se unen al titanio se encuentran las células epiteliales, fibroblastos, condrocitos y células osteogénicas. Los

neutrófilos y los macrófagos son los primeros tipos celulares que se unen a la superficie del implante de titanio, y luego los macrófagos forman células gigantes de cuerpo extraño. Las células osteoprogenitoras migran al lugar de colocación del implante y pueden diferenciarse a osteoblastos^{190,191,192}.



Figura 34. Cuñas porosas de titanio empleadas en osteotomías correctoras (izda). Prótesis de cadera no cementada con recubrimiento de titanio a nivel del vástago y componente acetabular (dcha).

3.3 Factores crecimiento

Los factores de crecimiento son proteínas secretadas por las células que, actuando sobre la célula objetivo, llevan a cabo una acción específica. Existen tres tipos diferentes de actuación: autocrina, en la cual el factor de crecimiento actúa sobre la célula de la que proviene o sobre células con idéntico fenotipo (por ejemplo, un factor de crecimiento producido por un osteoblasto ejerce su función sobre otros osteoblastos); paracrina, en la cual los factores de crecimiento ejercen su influencia sobre células vecinas con un fenotipo diferente a la célula origen (por ejemplo, factores de crecimiento producidos por osteoblastos son capaces de estimular la diferenciación de una célula indiferenciada) y, por último, endocrina, en la cual los factores de crecimiento ejercen su influencia sobre una célula de fenotipo diferente y que se encuentra en una localización anatómica diferente (por ejemplo, factores de crecimiento producidos por tejido neural en el sistema nervioso central estimulando la actividad osteoblástica). Estos factores de crecimiento pueden actuar sobre múltiples tipos celulares y pueden inducir diferentes actividades en varios tejidos^{193,194}.

Los factores de crecimiento enlazan con el receptor de la célula diana e inducen un sistema de señales de transducción intracelular que finalmente culmina en el núcleo y con una respuesta biológica. La unión del factor de crecimiento y su receptor se conoce con el nombre

de interacción ligando-receptor. Estas interacciones son muy específicas y pueden ser simples interacciones entre un factor de crecimiento y su ligando o complejas entre uno ó más ligandos con uno o más receptores. Por otra parte, existe una redundancia en este sistema biológico, ya que diferentes formas del mismo factor de crecimiento puede unirse a un único receptor o diferentes factores de crecimiento pueden ser activados por el mismo ligando.¹⁹³

Una vez que se establece la interacción ligando-receptor, el receptor se activa a través de cambios en su conformación. Los receptores tienen dominios extracelulares que se unen al ligando, y dominios intracelulares que se unen y activan el sistema de transducción de señales. Parte de este sistema de transducción de señales se relacionan con el factor de transcripción, una proteína intracelular que es activada en el contexto de una secuencia de activación que se inicia a través del receptor del dominio intracelular. La activación del factor de transcripción llega al núcleo, se une al ADN nuclear e induce la expresión de un nuevo gen o conjunto de genes, que son los que cambian las características de la célula. El tipo de activación, así como el factor específico de transcripción, varían en función de la célula objetivo, la combinación del factor de crecimiento y su receptor y las características de las células.¹⁹³

Tabla 8. Factores de crecimiento.⁵

FACTOR DE CRECIMIENTO	FUENTE	TIPO DE RECEPTOR	FUNCIÓN
FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF- β)	Plaquetas, matriz ósea extracelular, matriz cartilaginosa	Serin-treonin sulfato	Factor de crecimiento pleotrópico que estimula la proliferación de células madre indiferenciadas
PROTEINAS ÓSEAS MORFOGENÉTICAS (BMP)	Células osteoprogenitoras, osteoblastos, matriz ósea extracelular	Serin-treonin sulfato	Promueve la diferenciación de células mesenquimales a condrocitos, osteoblastos. Promueve la diferenciación de osteoprogenitores a osteoblastos. Influye en los patrones de formación esquelética
FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)	Macrófagos, células mesenquimales, condrocitos, osteoblastos	Tirosin-quinasa	Mitógeno para células mesenquimales, condrocitos y osteoblastos

FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF)	Matriz ósea, condroblastos y condrocitos	Tirosin-quinasa	Promueve la diferenciación y proliferación de células osteoprogenitoras
FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS (PDGF)	Plaquetas, osteoblastos	Tirosin-quinasa	Mitógeno para células mesenquimales y osteoblastos, quimiotaxis macrófagos

Aunque se conocen las señales de transducción de los factores de crecimiento y de sus receptores, existe un conocimiento limitado de las vías por las cuales estos factores de crecimiento actúan en la regulación de la reparación ósea. En este ámbito, los factores de crecimiento derivados de las plaquetas son secretados por las plaquetas durante las fases precoces de la curación de las fracturas y estudios *in vivo* han demostrado que tienen actividad mitógena para los osteoblastos^{195,196,197}.

Con respecto a las proteínas morfogenéticas (BMP), esta extensa familia de proteínas ha suscitado el máximo interés desde que en 1965 Urist demostró que la matriz ósea desmineralizada implantada subcutáneamente o intramuscularmente inducía la formación de hueso. A estos factores que inducían la formación ósea se les denominó proteínas morfogenéticas ósea (BMP). Las BMP pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento beta, (TGF-beta), y aunque su actividad fue identificada por Urist, hasta la década de los 80 no se conoció su estructura con la purificación y secuenciación de la BMP-3 bovina y la clonación de las BMP-2 y BMP-4 humanas. En la actualidad se han caracterizado más de 20 tipos de BMP. Las formas recombinantes de BMP-2 y BMP-4 inducen generación de hueso ectópico. La BMP-2 puede regenerar defectos corticales mediante osificación endocondral, estimula el crecimiento y la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento *in vitro* y promueve la diferenciación de fenotipo osteoblástico en líneas pluricelulares murinas^{200,201}.

Las BMP más estudiadas por su capacidad para producir regeneración ósea han sido la BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) y la BMP-7 recombinante humana (rhBMP-7), también conocida como proteína osteogénica 1 (OP-1). Ambas se obtienen mediante técnicas de biotecnología en células de mamíferos y las investigaciones preclínicas y clínicas han demostrado que inducen la formación ósea y la reparación de defectos óseos, con resultados al menos comparables a los del injerto de hueso autólogo^{202,203}.

Rellenar un defecto óseo con BMP es realmente complicado ya que por su gran solubilidad se dispersa rápidamente lo que da lugar a una pobre inducción ósea. Para evitar este problema en diferentes estudios publicados aparecen asociaciones de esta proteína con otros biomateriales que actúan como vehículo como son cerámicas de fosfatos de calcio, sulfatos cálcicos, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polietilenglicol y otros biomateriales compuestos cuya función es retener las moléculas bioactivas en el lugar de implantación^{175, 204,205}.

Finalmente, la asociación de aspirados de médula ósea de cresta iliaca a otros injertos y a factores de crecimiento derivados de la sangre parece lógica con el fin de facilitar la curación ósea¹⁷⁵.

El concepto nace de la idea de que determinadas partes de la sangre contienen factores de crecimiento que regulan la estimulación ósea, como sería el plasma derivado de las plaquetas (PRP) y/o factores de crecimiento autólogo (FCA).



Figura 35. Muestra de sangre centrifugada en la que se indica la fracción correspondiente al PRP (izda). Tubos que contienen rhBMP2 liofilizado (dcha).

4 INGENIERIA TISULAR

La ingeniería tisular constituye un conjunto de conocimientos, técnicas y métodos de base biotecnológica que permiten diseñar y generar en el laboratorio sustitutos tisulares, tejidos artificiales de origen heterólogo o autólogo a partir de células madre y biomateriales. Esta ingeniería es una especialidad que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida a la fabricación de sustitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano.

De naturaleza eminentemente interdisciplinaria, la ingeniería de tejidos incluye conceptos de ramas tan diversas como la biología celular, la microfabricación, la robótica y la ciencia de los materiales para diseñar partes de reemplazo del cuerpo humano. En nuestra especialidad

se dirige fundamentalmente a la creación de tejido óseo de la mejor calidad posible²⁰⁶, y combina el aporte de células, indiferenciadas o no, que se colocan sobre una matriz a la cual se pueden añadir factores de crecimiento que aceleren su proliferación e indiferenciación para ser trasplantadas a una estructura dañada y conseguir su regeneración^{207,208}

La ingeniería tisular constituye un enorme avance para la terapia celular y la medicina regenerativa.

La primera mención escrita de la utilización de un sustituto óseo con fines terapéuticos correspondería a la implantación de un xenoinjerto de hueso y fue descrito en 1668 de forma anecdótica por el cirujano alemán Job Van Meekeren cuando describe el relato de un misionero en el que explicaba como se le había colocado hueso de la calota de un perro a un soldado ruso con un traumatismo craneoencefálico. Debe transcurrir muchos muchos años antes de que comiencen los verdaderos avances en el tratamiento de las soluciones de continuidad óseas. Las células mesenquimales multipotenciales son conocidas desde 1968, cuando Friedenstein *et al* establecieron que había unas células adherentes, que formaban clones, no fagocíticas y fibroblásticas, definidas como colony forming units fibroblastic (CFU-Fs) que pueden ser aisladas del estroma de la médula ósea de los individuos (Figura 36). Pueden proliferar en condiciones experimentales adecuadas en un amplio espectro de tejidos conectivos diferenciados, incluyendo cartílago, hueso, tejido adiposo, fibroso y estroma mieloide^{209,210}.

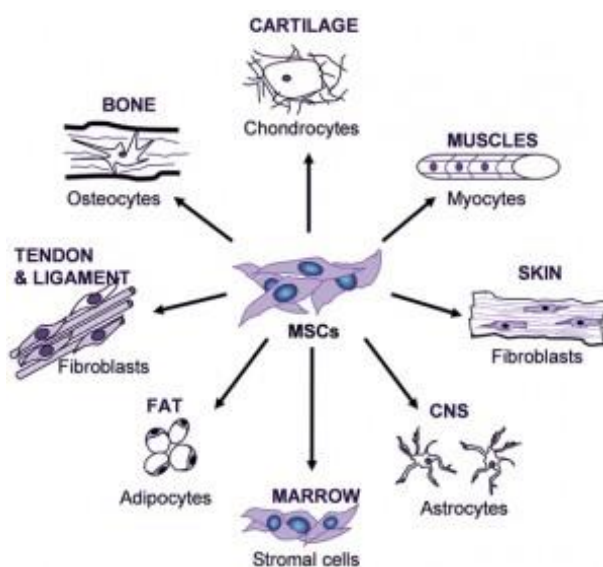


Figura 36. Diferentes tipos celulares obtenidos a partir de la diferenciación de MSCs.

4.1 Células

La reparación y la regeneración del hueso se produce a través de una secuencia ordenada de acontecimientos celulares que están influenciados por diversos condicionantes biológicos y mecánicos. El primer condicionante biológico es la necesidad de la presencia de células osteoprogenitoras capaces de formar hueso ²¹¹. Estas células son pluripotenciales y, por tanto, capaces de diferenciarse siguiendo varias líneas tisulares.

Las células madre pueden dividirse según su potencial de diferenciación en tres grupos: células totipotenciales, capaces de generar tejido embrionario y extraembrionario; células pluripotenciales, capaces de diferenciarse a tejidos de las tres capas embrionarias; y células multipotenciales, capaces de diferenciarse a diferentes tipos celulares de la misma capa embrionaria ^{212,213}.

Durante el desarrollo embrionario, las células de la capa mesodérmica se diferencian a múltiples tipos de tejidos, incluyendo hueso, cartílago, tendones, músculo, grasa y estroma medular. Estos precursores celulares, también presentes en la etapa postnatal, se denominan células madre mesenquimales o MSCs ²¹⁴ y son células no hematopoyéticas, estromales, que presentan multilinaje, con capacidad para diferenciarse a diferentes tejidos ²¹⁵.

En el año 2006 la sociedad internacional de Terapia Celular (International Society Cellular Therapy, ISCT) propuso tres criterios para definir las células madre mesenquimales: deben adherirse y crecer en plástico en condiciones normales de cultivo; más del 95% de la población de MSCs debe expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105, adicionalmente estas células no pueden expresar (menos del 2% positivas) CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD19 y HLA de clase II; las células deben ser capaces de diferenciarse in vitro, bajo los estímulos adecuados a diferentes linajes mesodérmicos, como pueden ser los osteoblastos, adipocitos y condroblastos ^{216,217}.

Su función en un organismo vivo consiste principalmente en el mantenimiento y reparación del tejido en el que se encuentran. Si antes se pensaba que se podían diferenciar únicamente en el linaje celular del tejido en el que se encontraban, actualmente se sabe que tienen un mayor grado de diferenciación plástica. De tal forma, se ha conseguido diferenciar células musculares a partir de células troncales neurales ^{218,219} y obtener células musculares, células grasas o células neurales a partir de células troncales de la dermis ²²⁰. Las MSCs se localizan principalmente en la médula ósea, originando fibroblastos medulares o celulares reticulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos pero también en el periostio, en el músculo,

en la grasa, en el cerebro y en la piel.

4.1.1 Biología de las MSCs

Una de las características que definen a MSCs es su capacidad para diferenciarse a diversos linajes, o lo que es lo mismo, su multipotencialidad. Diferentes trabajos sugieren que no solo pueden diferenciarse a linajes mesodérmicos como hueso, cartílago, adipocitos, tejido conectivo del estroma, miocitos y cardiomiocitos sino que también pueden diferenciarse a otros linajes de origen no mesodérmico como por ejemplo a neuronas o epitelio de origen ectodérmico, o incluso a células pancreáticas o hepatocitos, del linaje endodérmico.

Las MSCs son células capaces de diferenciarse al linaje osteoblástico *in vitro* y de mantener su habilidad de difusión cuando se implantan *in vivo*. Su migración, diferenciación y posterior desarrollo de la capacidad para formar tejidos están controlados por factores de crecimiento ²²¹. Las células osteogénicas son células capaces de producir hueso o de diferenciarse a células formadoras de hueso. Se localizan en el periostio, en el tejido blando peritrabecular y en la médula ósea obtenida por aspiración. Se supone que derivan de un pequeño grupo de células troncales pluripotenciales indiferenciadas del tejido conectivo cuya localización y características específicas se desconocen. Los progenitores osteoblásticos se pueden encontrar también en tejidos blandos ²²².

Fase expansiva: a la producción de la célula hija proliferativa sigue un periodo de proliferación o expansión. Durante esta fase, el número de progenitores aumenta considerablemente. A nivel óseo, se estima que una célula hija puede dividirse de 6 a 14 veces de media antes de convertirse en una con fenotipo de hueso maduro ²²³ mediante un fenómeno conocido como secuencia replicativa.

Plasticidad celular: Estudios recientes demuestran que las MSCs pueden diferenciarse no solamente en células del mesodermo sino que también pueden adoptar un destino endodermal o ectodermal, lo que se ha denominado plasticidad celular. La plasticidad celular se define como la capacidad de una célula para diferenciarse en células maduras distintas a las de su tejido de origen; es la flexibilidad de una célula y adoptar perfiles de expresión y fenotipos funcionales de células de otros tejidos ²²⁴. En numerosos estudios se ha demostrado que la diferenciación celular terminal puede cambiar su fenotipo bajo los estímulos apropiados de tal forma, las MSCs pueden diferenciarse no sólo a células del mesodermo, sino también a un destino endodermal o ectodermal. Muchos grupos de investigación han estudiado de forma muy profunda la plasticidad de estas células demostrando su capacidad para diferenciarse in

vivo e in vitro en miocitos, células de bazo, cartílago, médula, hueso y tejido pulmonar. En los últimos años se está centrando el esfuerzo en la plasticidad de las MSCs hacia tejido nervioso.

Otro aspecto a tener en cuenta es la heterogeneidad de las MSCs. Las colonias individuales derivan de precursores únicos, muestran una naturaleza heterogénea en términos de proliferación celular y potencial de diferenciación multilínea. De hecho, sólo una menor proporción de colonias (17%) que derivan de la médula ósea adulta humana continúa su crecimiento más allá de 20 divisiones, mientras que la mayoría de las células muestran envejecimiento precoz.

Capacidad inmunógena: las MSCs son hipoinmunógenas y pueden eludir el sistema inmune del receptor. Expresan el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y no el de clase II en su superficie CD40, CD80, CD86²²⁵. La expresión de MHC clase I ayuda a proteger a las MSCs de las células NK (natural killer); mientras que la ausencia de las de clase II les permite no ser reconocidas por los CD4+ T. Por otra parte, las MSCs contienen un conjunto de MHC de clase II en su interior que pueden expresarse en superficie cuando las tratamos con interferon γ (IFN- γ). En relación con el poder cancerígeno de las MSCs en su uso terapéutico, en la actualidad no existen pruebas al respecto

Adhesión celular: las MSCs se movilizan en la sangre periférica en respuesta a agresiones tales como quemaduras, lesiones musculoesqueléticas o en respuesta a lesiones hipóxicas.²²⁶ En esta función intervendrían muchas de las moléculas que se encuentran relacionadas con la captura, atrapamiento, rodamiento, adhesión y trans migración de los leucocitos de la sangre a los tejidos, también expresadas en las MSCs. Incluyen integrinas, selectinas y receptores de quimioquinas. Entre las integrinas que se expresan en las MSCs en relación con su adhesión al endotelio tenemos a las $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$. También intervienen la P-selectina y la VCAM-1 (proteína de adhesión de células vasculares -1), ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), ICAM-3, ALCAM (molécula de adhesión celular leucocito-activada), y la endoglobulina/CD105 y, en la mitad de los casos, la VLA-4, $\alpha 4\beta 1$ y CD49d. Sin embargo, la E y la L-selectina, relacionadas con la primera etapa del rodamiento leucocitario, no han demostrado expresión, o lo han hecho mínimamente. Cuando los anticuerpos neutralizan las integrinas, presentan una gran adherencia a las células endoteliales²²⁷

4.1.2 Obtención de las MSCs

La médula ósea es la principal fuente de aislamiento de MSCs, aunque se han aislado de tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana sinovial, hueso

trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal. No obstante, los tejidos más usados son la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo. Las MSCs también pueden obtenerse mediante la implantación de osteoblastos, sin capacidad inmunógena y con la posibilidad de expandirse *in vitro* después de obtenerse, o mediante el uso de células de donantes no humanos (células xenogénicas), lo que solventaría el problema del bajo número celular que las MSCs presentan en los tejidos donantes. Sin embargo, la inmunogenicidad de estas células, la posibilidad de transmisión de a infecciones y los problemas sociales y éticos derivados de su uso, han disminuido el interés por este tipo de método por lo que la célula madre parece ser la mejor opción²²⁸. Desde que se inició la utilización de células madre con fines terapéuticos han sido múltiples los estudios que se han realizado para entender y mejorar su obtención, debido a su demostrada capacidad para diferenciarse a células de origen mesodérmico, ectodérmico y endodérmico²²⁹.

La célula ideal para aplicaciones regenerativas debe estar en número suficientemente amplio (millones o billones de células), debería poder obtenerse por procedimientos mínimamente invasivos, poder diferenciarse a distintos linajes y poderse trasplantar de manera eficaz y segura a un mismo paciente o como implante alógeno. La proporción de células osteoprogenitoras en la médula ósea ha sido motivo de múltiples estudios. Según Muschler²³⁰ sería de un progenitor osteogénico por 23×10^3 células nucleadas en médula ósea humana. La determinación se realizó mediante la prueba de la fosfatasa alcalina. Además, se observó que existía una correlación positiva con el número de células nucleadas y una correlación negativa con la edad de los pacientes²³¹. En el aspirado de médula ósea la prevalencia de células madre mesenquimales sería de 1 /1.000 a 1 /10.000 células nucleadas, lo que equivaldría a una fracción del 0,001 al 0,01%. Un adulto joven y sano posee aproximadamente una célula progenitora por cada 100.000 células nucleadas^{232,233}.

La cantidad de células madre o células progenitoras disminuye de forma drástica con la edad y es muy baja en la médula ósea pero a pesar de su escasez, la población de células progenitoras locales suele ser suficiente para formar hueso en respuesta a una lesión o a otros estímulos. Sin embargo, en algunos casos, cuando existen muy pocas células osteoprogenitoras o cuando su capacidad de respuesta está disminuida, el potencial osteogénico de la médula ósea local es insuficiente para cubrir las necesidades de formación de hueso nuevo. En estas situaciones, la formación ósea no es adecuada y se producen pseudoartrosis u otros fracasos de la reparación.

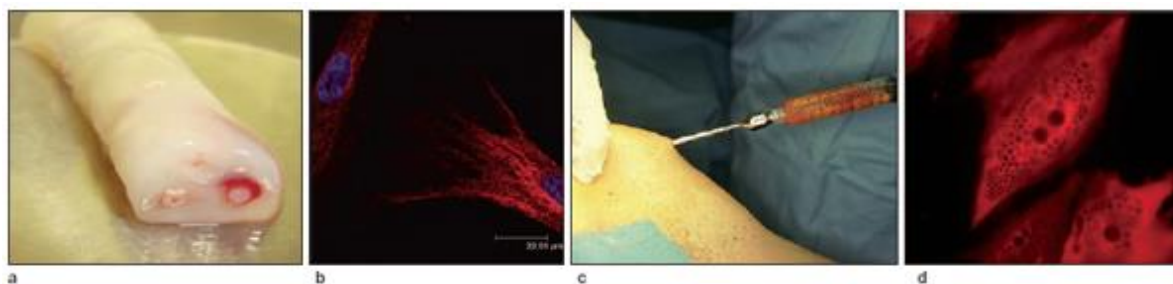


Figura 37. (a,b) Cordón umbilical y MSCs provenientes del cordón. (c,d) Extracción y MSCs provenientes de la grasa.¹⁷

4.1.3 Aislamiento de MSCs

En la década de los 90, Caplan y cols lograron obtener y diferenciar MSCs de humanos adultos modificando el método utilizado por Friedenstein^{235,236}

Se disponen de numerosos protocolos para obtener MSCs, los métodos más sencillos incluyen su característica de células adherentes. Se coloca un pequeño trozo de hueso directamente en el interior de un frasco de cultivo o sobre una placa y las células crecen sobre la base de plástico del frasco.

Una modificación de este protocolo incluye la densidad de centrifugación de la médula ósea que incluye el uso de soluciones de alta densidad con baja viscosidad y baja presión osmótica para conseguir la fracción mononucleada de la médula ósea que contiene MSCs. Subsecuentemente la adherencia al plástico se produce en la población de MSC. El número inicial de MSCs puede aumentar hasta un 36% con la recolección y recolocación en un nuevo frasco de la población celular inicial no adherente que es lavada.

Para el aislamiento de MSCs, intentando conseguir células más puras y homogéneas, se han utilizado diferentes protocolos. La obtención de médula ósea mediante gradientes de densidad tiene la desventaja de que en las primeras resiembras se encuentran tanto células endoteliales como macrófagos contaminando los cultivos, por lo que estos son muy heterogéneos.

Los métodos de separación celular utilizados se basan en algunas de las características físicas de las células, como el tamaño, y en aspectos inmunofenotípicos. De acuerdo con éstos, las células pueden ser seleccionadas mediante dos métodos (selección positiva y selección negativa), que precisan del uso de un citómetro de flujo o de una columna inmunomagnética. La selección positiva se basa en el reconocimiento por un anticuerpo de una molécula presente en la célula de interés. Este método es muy útil cuando el antígeno utilizado para reconocer a

la célula se expresa únicamente en ella. Su inconveniente es que hasta la fecha no se cuenta con un anticuerpo que reconozca únicamente a MSCs. La selección negativa se basa en la eliminación de células distintas a la población de interés. En el caso específico de las MSCs se utilizan anticuerpos dirigidos contra macrófagos, linfocitos, megacariocitos y células endoteliales.

Con cualquier método, el sistema debe procurar la pureza de las MSCs, sin contaminación con otro tipo de células como son las hematopoyéticas. Para evitarlo se han propuesto dos técnicas muy similares, la selección magnética y las células activadas por fluorescencia. La selección magnética utiliza epítopes positivos para MSCs los cuales están marcados con anticuerpos sobre bolitas magnéticas. La aplicación de un campo magnético externo separa las células marcadas positivas de las negativas. La selección de células activadas por fluorescencia es un método alternativo por el cual una población de células heterogeneas, de sangre, médula ósea, etc, son caracterizadas y separadas según la intensidad de la fluorescencia que emitan. El citómetro aislará únicamente aquellas células cuya emisión de luz encuentra los parámetros definidos. Más específico es marcar uno o más anticuerpos monoclonales con una tinción fluorescente para que se una a una población específica de células. Las células según sean negativas o positivas para estos anticuerpos serán incluidas o excluidas de los tubos colectores.

Una fuente alternativa para obtener MSCs de la médula ósea o también de tejidos sólidos, hueso, cartílago o grasa, es hacer un tratamiento con colagenasas, enzimas capaces de romper las uniones peptídicas en la triple hélice de la molécula de colágeno. De esta forma, las células se liberan del tejido y pueden ser recogidas por medio de lavado y centrifugación. La cantidad de MSCs obtenidas por este sistema sería muy superior a la centrifugación de la médula ósea y aunque la mayoría de los autores sugieren que las células así obtenidas serían idénticas tanto en el potencial de diferenciación como de las características fenotípicas otros defienden que las obtenidas por medio enzimático poseen mayor actividad metabólica, nivel de proteínas intracelulares y producción de calcio^{235,236,237}.

4.1.4 Diferenciación de las MSCs

La diferenciación de las MSCs está controlada por factores de crecimiento, hormonas, moléculas de la matriz extracelular y señales de direccionamiento. Esta diferenciación puede ser inducida *in vitro* por el tratamiento de las MSCs con glucocorticoides sintéticos (como la dexametasona), β -glicerolfosfato, ácido ascórbico y 1,25(OH)₃D. El marcador más utilizado

para detectar preosteoblastos es la actividad de la fosfatasa alcalina y para los osteoblastos maduros, la calcificación de la matriz extracelular respectivamente.

El tratamiento de MSCs humanas con IGF-1, con factor de crecimiento epitelial (EGF) y con VEGF aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y la mineralización in vitro lo que demostraría la importancia de los factores de crecimiento en la osteoinducción. En cuanto a PDGF, algunos autores creen que tienen un mínimo efecto inductor en la osteogénesis actuando sobre MSCs mientras que otros defienden su uso por lo contrario²³⁸.

Se ha descrito en la superficie de las MSCs positividad para SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124, SB10, SB20 y SB21, aunque no hay marcadores únicos ni combinaciones específicas. El SB10 se ha propuesto como diferenciador de célula osteoprogenitora humana, a pesar de que también se ha visto relacionado con otras especies.

4.1.5 MSCs procedentes de tejido adiposo

El tejido adiposo deriva del mesodermo embrionario y contiene un estroma que puede aislarse con facilidad. Recientemente se ha demostrado que su fracción estromal contiene células madre multipotentes que pueden diferenciarse hacia linajes específicos tales como adipogénico, condrogénico, osteogénico, miogénico y neurogénico²³⁹.

Obtención y procesamiento del tejido adiposo

La primera demostración de la existencia de células progenitoras mesenquimales en el estroma del tejido adiposo se produjo en el año 2000. Un grupo de investigadores liderado por Gimble, describieron la capacidad in vitro de estas células de diferenciarse a tejidos osteogénicos y mineralizar una matriz extracelular, cuando se las exponía a diferentes factores, demostrando la capacidad multipotencial de las células estromales residentes en el tejido adiposo. Durante los últimos años, este grupo de células estromales con capacidad de multipotentes ha tenido numerosos nombres en la literatura científica, entre los que podemos destacar: ADAS: Adipose-Derived Adult Stem cells; ADSC: Adipose Derived Stem Cells ; ATSC: Adipose Tissue Stem Cells; MADS: Multipotent Adipose-Derived Stem cells ; ASC: Adipose Stem Cells . En el año 2004, en el Congreso internacional de IFATS (Internacional Federation for Adipose Therapeutics and Science) se decidió unificar las diferentes nomenclaturas, dando como acrónimo ADSCs a las células troncales derivadas de la fracción vásculo-estromal del tejido adiposo; a pesar de ello, algunos importantes grupos de investigación no han aceptado este consenso y mantienen la nomenclatura anterior. Durante esta reunión se sentaron las

bases para definir a este tipo de células: Células con morfología fusiforme que se aíslan mediante digestión enzimática y adhesión a los plásticos, de la fracción vascular asociada a los tejidos adiposos de las diferentes especies animales, con capacidad de autorrenovación por largos periodos de tiempo y multipotenciales, ya que se pueden diferenciar a adipocitos, condrocitos y osteocitos. Además, y quizá lo más importante, se dieron un listado de marcadores de membrana celular para identificarlas, ya que no existe hasta ahora un marcador específico para este tipo de células; dentro de este listado de marcadores se propuso que al menos deberían tener un marcaje positivo para CD29, CD44, CD90 y CD105; y un marcaje negativo para CD34, CD45 y CD133²⁴⁰.

Tabla 9. Criterios para la identificación de MSCs ⁶

Criterios		
1- Adherencia al plástico en condiciones de cultivo estándar		
2 Fenotipo	Positivo ($\geq 95\%$)	Negativo ($\leq 2\%$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 o CD11b
		CD79 o CD19
		HLA-DR
3 Diferenciación <i>in Vitro</i>: osteoblastos, adipocitos, condroblastos (demostrado por tinción del cultivo celular)		

Como se puede comprobar, la definición de estas células es muy similar a la anteriormente expuesta de las células estromales obtenidas a partir de médula ósea, por ello el tejido adiposo, cada vez más, se considera una fuente alternativa de células estromales multipotenciales frente a la médula ósea u otros tejidos. De hecho, el tejido adiposo confiere numerosas ventajas terapéuticas frente a la extracción de células multipotenciales desde la médula ósea. Por ejemplo, para realizar una extracción medular, el paciente debe ser anestesiado por completo para obtener una pequeña cantidad de tejido estromal; por el contrario, para obtener la fracción estromal del tejido adiposo basta con una simple anestesia local y mediante una liposucción se puede obtener una gran cantidad de tejido; en resumen, una mayor cantidad de células con una menor morbilidad para el paciente^{240,241}.

Las células derivadas del tejido adiposo, que pueden ser digeridas enzimáticamente y separadas de los adipocitos flotantes por centrifugación, comparten muchas de las características de las células madre de la médula ósea, incluyendo el extenso potencial de diferenciación y la habilidad para la diferenciación multilínea²⁴².

El número aproximado de células madre que se obtienen de un lipoaspirado de tejido graso, aunque dependiente de la edad, del índice de masa corporal y del lugar de la obtención, es de 5.000 CFU-F por gramo de tejido adiposo. Es decir, al menos 500 veces más que las que se obtienen de la médula ósea, cuya prevalencia es de 100 a 1.000 por mililitro²⁴³ de hecho, consiguieron aislar células madre adultas mediante lipoaspiración del compartimento adiposo estromal en suficiente número, con un crecimiento estable y parámetros cinéticos en cultivo; y las mismas células se han conseguido diferenciar, con el tratamiento específico, a linajes mesenquimales clásicos (osteogénico, adiposo, miogénico y condrogénico) y a linajes no mesenquimales²⁴⁴.

El crecimiento y la diferenciación de las ADSCs, va a depender en gran parte del medio en el que se cultiva. Lo más frecuente es que las células se siembren en un cultivo que contenga una equilibrada solución de sales, como MEM (Minimal Essential Media), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI-1640 (medio Roswell Park Memorial Institute), BME (Basal Medium Eagle), DMEM: F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12), a los que se añade suero (generalmente 10-20 % de suero fetal bovino). Puesto que éste contiene citocinas y factores de crecimiento (PDGF y EFG), un aumento del 10-15% de su concentración incrementaría la proliferación de MSCs. Estos medios están suscitado cierta preocupación por la posibilidad de transmisión de enfermedades, lo que está estimulando la creación de otros con bajos requerimientos de suero, libres de proteínas o con constituyentes de bajo peso molecular²⁴⁵. La diferenciación osteogénica in vitro de las ADSCs sucede a las 3-4 semanas de cultivar las células en un medio que contenga dexametasona, β glicerolfosfato, L-glutamina y ácido ascórbico.

El proceso de inducción produce matriz mineralizada extracelular de fosfato cálcico, osteocalcina, fosfatasa alcalina, osteopontina, colágeno tipo I y expresión de factores genéticos de transcripción (genes como Runx2 y Osx), demostrándose mediante las tinciones del Rojo de Alizarina y Von Kossa. También se favorece por la adición de FGF-2 al medio de cultivo, así como por miembros de la superfamilia de las TGF- β , como serían las proteínas morfogenéticas.

El Runx2 actúa como mediador en la transcripción de la osteogénesis ejecutando señales de las BMPs y las Wnt promoviendo un direccionamiento fenotípico y osteogénesis. Añadiendo BMP-2, BMP-4 y BMP-6 activamos el R-Smad y facilitamos la formación del complejo Runx2-Smad, que regula los genes objetivo. Runx-2 es una proteína DNA que actúa como andamiaje en la regulación de factores relacionados con la expresión genética del esqueleto para la diferenciación osteoblástica y la morfogénesis esquelética. Una vez que la célula madre se ha diferenciado, los osteoblastos producen proteínas de matriz extracelular que indican un fenotipo osteoblástico²⁴⁵.

El fenotipo de la célula de superficie de ADSCs, es bastante similar a la MSCs. Los CD105, STRO-1 y CD166 (ALCAM) son tres marcadores que se utilizan para identificar el potencial de diferenciación multilineal y que se expresan tanto en las ADSCs como en las MSCs. También el CD117 (factor receptor de célula madre) se expresa en células totipotenciales y pluripotenciales, incluyendo células madre embrionarias, MSCs y ADSCs. Además de estos marcadores multipotenciales, las ADSCs y las MSCs presentan otros marcadores de superficie: CD29 (β 1 integrina, fundamental en la angiogénesis), CD44 (receptor hialuronato imprescindible en el desarrollo de la matriz extracelular y que juega un importante papel en numerosos procesos fisiológicos y patológicos) y el CD49e (α 5 integrina, importante para la adhesión a la fibronectina). Las ADSCs también expresan altos niveles de CD54 (ICAM-1) comparado con las MSCs. ICAM-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y puede estar sobrerregulado en respuesta a numerosos mediadores inflamatorios y citocinas.

La mayoría de las ADSCs expresan moléculas MHC clase I, sugiriendo su potencial para el trasplante alógeno. Sin embargo, no expresan marcadores hematopoyéticos o endoteliales, como son el CD3, CD4, CD11C, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31, CD33, CD38, CD56, CD62p, CD104 y CD144; y menos del 1% expresan el HLA-DR (antígeno leucocitario humano-DR). Una diferencia en la expresión de marcadores de superficie es en la expresión recíproca de VLA-4 (CD49d/CD29) y su receptor VCAM-1 (CD106)²⁴⁶.

4.2 Matrices celulares e injertos combinados (Biológicos y biomateriales)

Las matrices, son la base o sustrato donde colocamos las células y los factores de crecimiento para favorecer la regeneración ósea. Pueden ser de diferentes materiales pero deben tener la mismas características osteoconductoras.

Los sustitutos compuestos son injertos de células osteogénicas, factores de crecimiento osteoinductivos y matriz osteoconductiva. Las mezclas pueden ser múltiples: médula ósea con

compuesto sintético, ultraporos de β -TCP con matriz ósea desmineralizada, factores de crecimiento osteoinductivos con compuestos sintéticos, BMP con compuestos de polímeros de ácido poliglicólico y matriz ósea desmineralizada con BMP y compuestos polímeros de ácido poliglicólico²⁴⁷.

Los estudios preliminares muestran una funcionalidad comparable a la de los injertos autólogos y alogénicos, sin sus desventajas, debido al hecho de ser sintéticos. Un injerto compuesto combinado con una matriz osteoconductiva, con agentes bioactivos que aporten propiedades osteoinductivas y osteogénicas, sería una réplica de un injerto autólogo. La matriz osteoconductiva sería un sistema de liberación para los agentes bioactivos, requiriendo menos quimiotaxis y menos migración de progenitores osteoblásticos al sitio del injerto. Se comportaría, pues, como un transportador de células y factores de crecimiento y regularía su localización y tiempo de liberación, a diferencia de los geles y pellets que sólo controlan el tiempo de liberación. La infusión directa de las células progenitoras permitiría una mayor y más rápida reparación del hueso facilitando el reemplazo del almacén osteoconductor por el hueso nuevo mediante “creeping substitution”²⁴⁸.

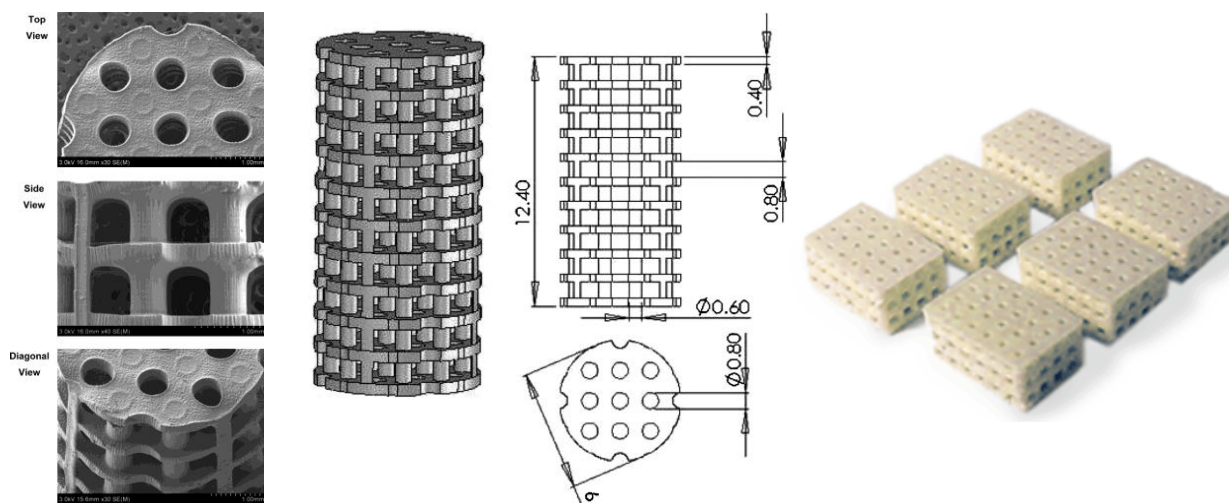


Figura 38. Diseños de diferentes matrices (“scaffolds”) que pueden servir de base o sustrato donde colocar células mesénquimales y factores de crecimiento para favorecer regeneración ósea.¹⁸

5 IMPLANTES DE TITANIO

Un implante endóatico es un material aloplástico insertado quirúrgicamente en un reborde óseo residual. Los implantes de titanio más frecuente utilizados en el campo sanitario son las prótesis de reemplazo articular, las placas de ostosíntesis y los implantes dentales.

Los implantes dentales tienen como función principal sustituir la raíz dentaria y servir como soporte prostodóntico. Actualmente existen más de 1.300 diseños de implantes dentales diferentes y 1.500 pilares en diferentes materiales, formas, tamaños, diámetros, longitudes, superficies, y conexiones.

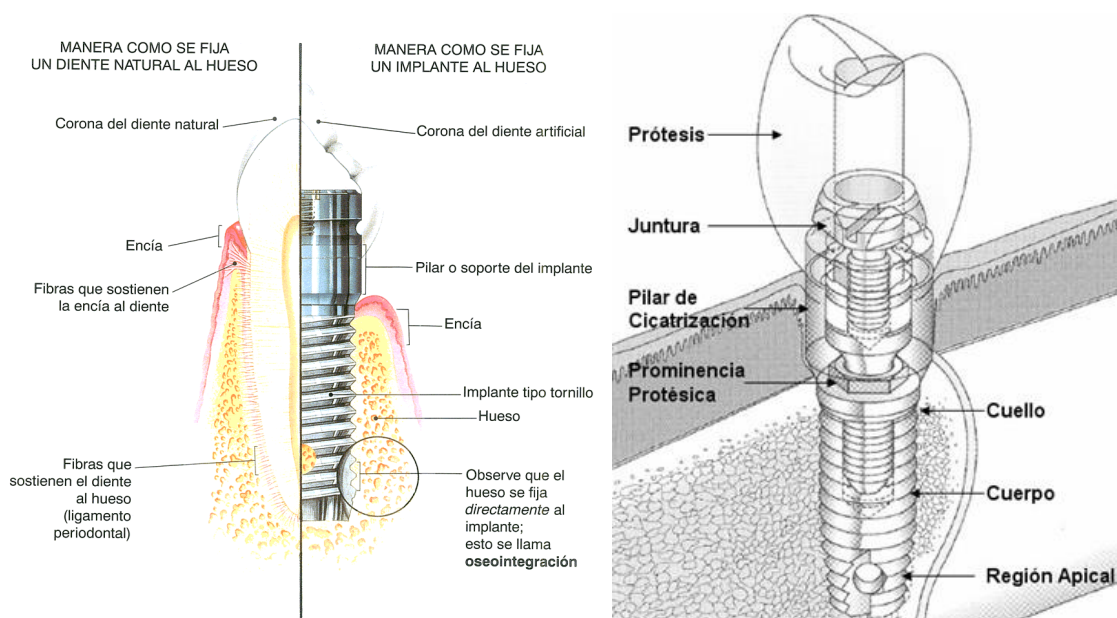


Figura 39. Partes de un implante dental endoóptico (dcha). Diferentes mecanismos de fijación del diente y del implante al tejido óseo (izqda).¹⁹

Los implantes dentales constan de diferentes partes:

1. **Cuerpo del implante:** es la porción del implante dental que se diseña para ser colocada en el hueso para anclar los componentes prostéticos. Consta de módulo de cresta, cuerpo y ápice²⁴⁹.
 - Módulo de cresta: es la porción superior.
 - Cuerpo: es la porción intermedia.
 - Ápice: es la punta o extremo final.
- 2 **Tornillo de cobertura:** después de insertar durante la 1.ª etapa quirúrgica el cuerpo del implante en el hueso, se coloca una cobertura sobre el módulo de cresta, con el fin de evitar el crecimiento de tejidos en el interior de la rosca que posee dicho módulo o porción superior.

- 3 Pilar de cicatrización: Tras haberse producido la osteointegración se realiza una 2.^a etapa quirúrgica, en la que se desenrosca y retira el tornillo de cobertura y se enrosca el pilar de cicatrización, cuya función es prolongar el cuerpo del implante sobre los tejidos blandos, y permitir la unión de la mucosa gingival al módulo de la cresta, dando así lugar al sellado gingival.
- 4 Conexión protética: Existen distintos tipos de conexión protética, entre los más conocidos podemos nombrar:
- Conexión a hexágono externo
 - Conexión a hexágono interno
 - Conexión tipo «cono Morse», conexión a fricción
- 5 Pilar: Es la porción del implante que sostiene la prótesis. Según el método por el que se sujete la prótesis al implante, distinguimos tres tipos de pilares:
- Pilar para atornillado: emplea un tornillo o rosca para fijar la prótesis.
 - Pilar para cementado: la prótesis se une al pilar mediante cementos dentales, comportándose como un muñón al que va unido una corona, un puente, o una sobredentadura.
 - Pilar para retenedor: consta de un sistema de anclaje que soportará una prótesis removible, que el paciente podrá colocar y retirar manualmente.



Figura 40. Diferentes tipos de pilares²⁰

5.1 Tipos de implantes dentales

Los implantes dentales se clasifican en función de la posición en la que van a ser colocados y por su forma. Por su posición, se pueden clasificar como subperiósticos, transóseos y endoóseos, existiendo otros de menor relevancia como son los intramucosos, los

endodónticos y los sustitutivos óseos. A continuación se realizará una breve descripción de los tres primeros sin profundizar en las características concretas de cada modelo.

Implante subperióstico: La idea básica fue concebida por Muller en 1937, pueden tener una morfología de arco completo para los edéntulos totales o ser unilaterales para los edéntulos parciales. No existe mucha literatura científica sobre este tipo de implantes y sin datos a largo plazo, refiriendo éxitos del 80% a los cinco años con un alto porcentaje de complicaciones. Están indicados en pacientes en los cuales existe un lecho óseo con reabsorción extrema en los que no estarían indicados los injertos autógenos o sintéticos, requiriendo unas relaciones dentarias concretas y senos maxilares sanos. Se introducen bajo la mucosa con gran trauma histológico. Están prácticamente en desuso.

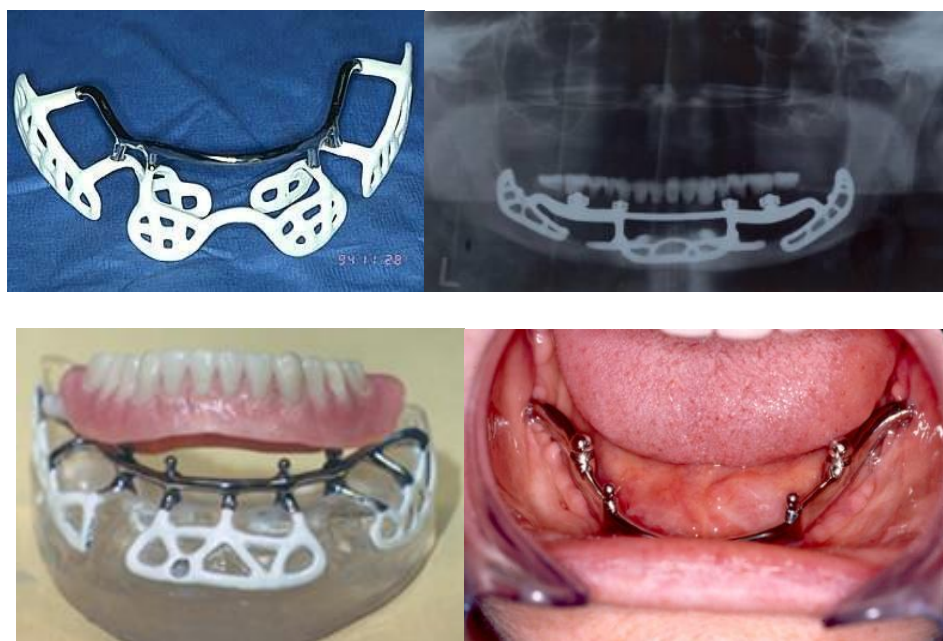


Figura 41. Implante subperióstico (arriba izda), radiografía oral de un paciente con implante subperióstico (arriba derecha), colocación de una prótesis sobre el implante (abajo izda), implante subperióstico colocado en un paciente.²¹

Implante transóseo mandibular fijo: Aparecen en 1968, consiguiendo éxitos del 91%, y una duraciones de 21 años. De uso exclusivo en región mandibular anterior y cuando la mandíbula tiene almenos 8 milímetros de grosor. Se utilizaban en pacientes desdentados total o parcialmente aunque prácticamente están en desuso. Consiste en una placa ósea ortopédica, fijada con tornillos, con dos o cuatro agujas roscadas que atraviesan todo el espesor mandibular entre los forámenes mentonianos. Se colocan en un solo procedimiento quirúrgico que resulta muy traumático^{250,251}.

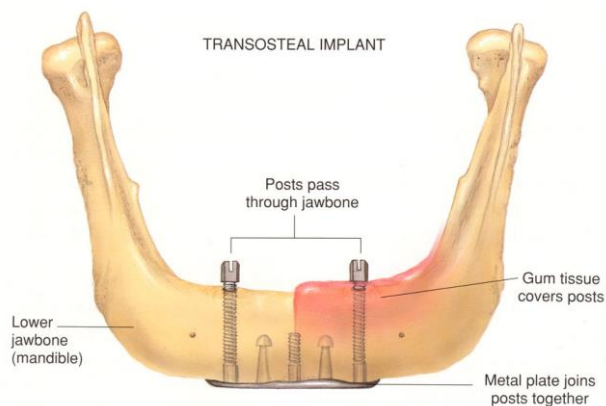


Figura 42. Implante transóseo mandibular fijo ²²

Implante endoóseo: Estos implantes se colocan tanto en la mandíbula como en el maxilar. Se realizan unas incisiones mucoperiósticas y se perfora la cortical proximal quedando la mayor parte del implante en su interior. Existen diferentes tipos de implantes endoóseos según su diseño: armazón de rama, implante de aguja, implante de disco, plataforma para diente sencillo, plataforma mandibular, bala cilíndrica, cesta cilíndrica, tornillo cilíndrico y aleta cilíndrica^{252,253} o bien como clavos, agujas, hojas, discos o con forma de raíz²⁵⁴, no obstante los más usados son los que tienen forma de raíz y los cilíndricos, roscados y basados en titanio. Este tipo de implantes se pueden usar en casi todas las indicaciones de tratamiento con implantes. El diseño más común en forma de raíz combina un cuerpo del Implante independiente del pilar protodónico para permitir únicamente la colocación del cuerpo del implante durante la cicatrización ósea inicial. Con este tipo de implante se requiere un segundo procedimiento quirúrgico para sujetar el pilar implantológico²⁴⁹.



Figura 43. Diferentes tipos de implantes endoóseos (izda). Implante endoóseo colocado en un paciente ²³

Implante endoóseo tipo hoja o lámina: indicados en pacientes con hueso atrófico que requieren implantes delgados. Constan de tres partes: El cuerpo, que tiene forma rectangular con estructura en rejilla o multiperforada, se inserta en el hueso, y existen muchos diseños pero ninguno debe superar los dos milímetros de ancho. El cuello conecta el cuerpo con la

cabeza, que es la parte transmucosa, a la que se acopla la prótesis dental²⁵⁵.

Implante endoóseo de rama: son implantes de una pieza que se asientan bilateralmente en la rama ascendente de la mandíbula y una base anterior en la sínfisis, originando una estructura tripodal. Tras una colocación muy protocolizada en mandíbulas totalmente desdentadas se puede poner inmediatamente en función²⁵⁶.

Implante endoóseo cigomático: son implantes muy largos que se colocan angulados en el hueso cigomático. Están indicados en pacientes con mucha atrofia ósea en el maxilar, en los que no se pueda o no quieran la colocación de injertos óseos. La cirugía es difícil y por la gran divergencia angular, requiere elementos angulados para la fabricación la colocación de la prótesis dental^{256,257}.

Implante endoóseo con forma de raíz: es el modelo de implante oral más usado en la actualidad. Hay una gran variedad de subtipos, clasificándose su composición química, geometría, características de superficie o método quirúrgico de colocación. Casi todos están fabricados con titanio, ya sea comercialmente puro o en aleación Ti-6Al-4V y sometidos a diversos tratamientos de superficie²⁵⁸.

Actualmente los diseños más populares son los roscados o con forma de tornillo, los cilíndricos, teniendo cada vez mayor interés los roscados cilíndricos afilados, decayendo el uso de los implantes huecos por presentar mayor tasa de fracasos por infecciones y periimplantitis, debido a que cuando los microorganismos colonizan los orificios es muy difícil tratar la infección por la existencia de espacios muertos derivados del propio diseño. También presentan un mayor índice de rotura que los de cuerpo sólido^{258,259}.

La función biológica de un material viene determinada en gran medida por las propiedades de su superficie, por lo que es necesaria la realización de tratamientos superficiales para eliminar residuos, deformaciones, etc y conseguir una superficie final uniforme y aceptable apta para uso médico^{257,260}.

5.2 Tratamientos de superficie

En los últimos años han aparecido diversos tratamientos de superficie aplicados a implantes dentales para aumentar la rugosidad superficial del implante. La aplicación de estos tratamientos demuestran que la osteointegración a corto y medio plazo se ve favorecida por una superficie de rugosidad micrométrica^{261,262}. Según diversos estudios, esta mejoría etá

ligada a la existencia en la superficie del implante de microrugosidades favorecedoras de la adhesión celular, dando lugar a una mayor diferenciación celular y a una mayor expresión de los osteoblastos²⁶³. Este efecto tiene como consecuencia una rápida regeneración y una mejor calidad del tejido óseo²⁶⁴ así como una mayor estabilidad e integración de la interfaz tejido-implante a largo plazo.^{263,265}

Otras modificaciones de la superficie surgidas en los últimos años están enfocadas a obtener un aumento del espesor y de la cristalinidad de la capa superficial de óxido de titanio, ya que algunos estudios sugieren una relación entre el incremento de uno o de los dos con una mayor adsorción de proteínas a la superficie, mayor diferenciación y crecimiento de los osteoblastos y mayor osteointegración de implantes tratados. El incremento de rugosidad se conseguiría mediante homogeneización previa de tensiones superficiales y un ataque químico de la superficie mientras que el incremento de espesor y de la cristalinidad de la capa de titanio mediante tratamiento térmico²⁶⁶.

La rugosidad, o morfología de la superficie, la composición química, el grosor y morfología de la capa de óxido, así como su estructura cristalina y eliminación de posibles contaminantes son las principales características que se intentan modificar con los tratamientos de superficie^{266,267}.

Por tanto se puede decir que existen dos clases de tratamientos de superficie del titanio, los que modifican la textura y los que modifican la composición química;²⁶⁸ los primeros dan lugar superficies que van desde la escala milimétrica a la nanométrica, proponiéndose un amplio rango de rugosidad para la unión ósea, mientras que los que modifican la química buscan una superficie bioactiva que consiga una unión verdadera al hueso.

5.2.1 Tratamientos mecánicos

Los distintos tratamientos se pueden combinar entre ellos e incluso entre distintas partes del implante pudiendo conseguir rugosidades similares con distintos tratamientos pero con propiedades estructurales y mecánicas muy diferentes. Cualquiera de ellos pueden ser pasos de finalización o intermedios²⁶⁷ y tienen en común el tratamiento, modelado o eliminación de material superficial mediante fuerzas físicas derivadas de la acción de otro material sólido, dividiéndose en métodos de eliminación por corte o abrasión, o la deformación por el bombardeo de partículas. A continuación se citan los tres principales:

Mecanizados: Con esta técnica se consigue una superficie con estrías y sin estructura

granular. Dependiendo de los parámetros de trabajo los valores de rugosidad superficial (Ra) oscilan entre 0,3-2 μm . La capa de óxido es principalmente TiO_2 e impurezas inorgánicas como Si, Ca, S. Se utilizó con éxito durante muchos años.

Desgaste y pulido: técnicas muy similares basadas en la eliminación de material por un medio abrasivo duro habitualmente SiO_2 , alúmina y diamante. La rugosidad obtenida por el desgaste es más grosera, entre 1-6 μm , mientras que por pulido se obtienen superficies muy lisas y brillantes, con rugosidades superficiales menores a 0,1 μm . Producen deformación plástica y contaminación por elementos de pulido.

Bombardeo/arenado: se basa en proyectar partículas duras de cerámicas de alúmina, silicio o titanio de diferentes grosores a alta velocidad sobre la superficie del implante, en medio húmedo o seco, provocando deformaciones plásticas localizadas y eliminación de material; dan lugar a diversos grados de rugosidad sin alterar cualitativamente las características electroquímicas. Se puede usar como método de limpieza de contaminantes gruesos, como paso intermedio en la modificación de superficie o como paso definitivo. Da lugar a superficies cuyas características dependen de los parámetros de procesado, siendo el más importante el tamaño de la partícula, por ejemplo con alúmina de 25-75 μm se consiguen Ra de 0,15-1,5 μm frente a los 2-6 μm obtenidos con partículas de 200-600 μm , produciendo una topografía irregular. De forma general a más grosor de partícula más Ra. También se vio que con igual tamaño el silicio produce menor rugosidad que la alúmina. Provoca contaminación por parte de los compuestos usados (el silicio y el aluminio son citotóxicos), recomendándose limpiarlos tras el tratamiento, si no se quiere modificar intencionadamente la composición, aunque se comprobó que los residuos de óxido de aluminio en la superficie de los implantes de titanio no afectan a la integración en el lecho óseo¹⁶⁶, así como tampoco producen reacciones alérgicas en pruebas cutáneas.

Los últimos estudios se centran en el estudio del arenado con compuestos reabsorbibles u otras partículas o combinaciones de arenado y grabado ácido son: el arenado reabsorbible con fosfato cálcico que consigue una superficie muy rugosa e irregular, pero que da lugar a una superficie sin residuos citotóxicos²⁶⁹ y el arenado modificado que consiste en la proyección de partículas de Al_2O_3 asociado a un grabado con ácido oxálico.

5.2.2 Métodos químicos

Basados en reacciones químicas que tienen lugar en la interfaz entre una solución y el titanio. Entre los métodos más utilizados en estudios de biomateriales derivados del titanio

destacan:

Limpieza con disolventes: eliminan contaminantes diversos tras la fabricación del implante, sin intención de modificar el óxido superficial, pero pueden dejar residuos propios. Los más utilizados son los hidrocarburos, alcoholes o cetonas, diversos detergentes y ácidos con o sin agitación por ultrasonidos. El mejor tratamiento en esta categoría sería el HCL con acetona.²⁷⁰

Grabado químico húmedo: su finalidad es disolver la capa superficial inicial, tanto el óxido como el metal que esta inmediatamente debajo. Su basa en la aplicación de soluciones que reaccionan con el titanio dando lugar a productos solubles; según el pH de estas soluciones el grabado puede ser ácido o alcalino²⁷¹.

Tratamientos de pasivación: se puede realizar de varias formas: con ácido nítrico, pasivación por calor o con peróxido de hidrógeno. Se utiliza para conseguir un estado de oxidación uniforme en la superficie del implante, además aumenta la resistencia a la corrosión, formando sobre el titanio una capa densa y estable.

5.2.3 Métodos electroquímicos

Se basan en reacciones químicas que ocurren en la superficie del electrodo colocado en una solución de electrolitos. Puede usarse la técnica del electropulido que es una técnica de finalización del implante que proporciona una superficie muy lisa y brillante de composición uniforme, con una Ra menor de 10 nm, no soportando deformaciones ni estrés, y con escasos residuos o la de la oxidación anódica que permite la producción de diferentes tipos de capas de óxido. Se utiliza fundamentalmente para mejorar la capacidad de adhesión del implante, aumentar el grosor del óxido, producir coloraciones y topografía porosa. Dan lugar a rugosidades de 1 µm sobre una estructura porosa en la que predomina el dióxido de titanio. En ambas el implante es el ánodo y al conectar una corriente eléctrica en la solución se produce un flujo de iones que afectan a la superficie según los electrolitos del medio, diferencia de potencial, temperatura, etc²⁷².

5.2.4 Métodos fotolitográficos

Utiliza técnicas similares a la elaboración de microcircuitos electrónicos. Con láser se consiguen tallados muy precisos en la superficie del implante que son detectados a nivel celular e inducen la migración de las células siguiendo los tallados. Este desplazamiento controlado evita la penetración de células epiteliales en la interfaz hueso-implante. Este

método no altera la estructura cristalina del titanio ni aporta contaminación a la superficie, e incluso la disminuye²⁷³.

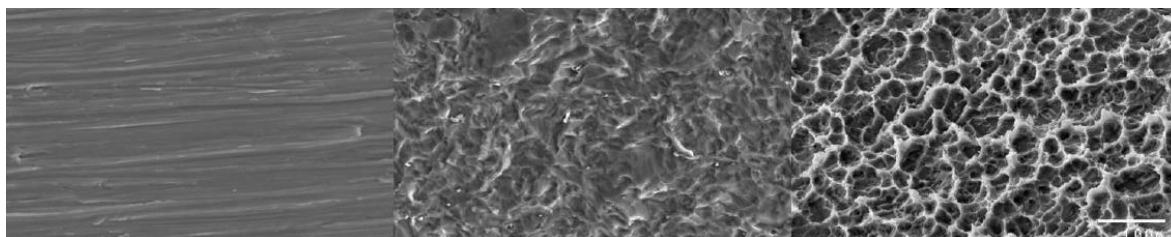


Figura 44. Diferentes tratamientos de superficie de implantes observados mediante microscopía electrónica: mecanizado (izda), grabado ácido (centro) y avantblast (dcha).²⁴

5.3 Recubrimientos del implante

Existen otros métodos de modificación de la superficie del implante. Se puede realizar un recubrimiento con distintas capas de materiales o con la adhesión de ciertos factores biológicos. No hay alteración del metal ni de su capa de óxido, mejoran su función en lo relativo a la fijación, disminuyen la corrosión y el desgaste y aportan actividad biológica. Estos recubrimientos han de ser biocompatibles, estables mecánica y químicamente, y favorecer la interacción con moléculas o células en un medio biológico²⁷⁴.

Capa Sol-Gel: su objetivo es recubrir el implante con una capa cerámica (fosfato cálcico, biovidrios, zirconia), a partir de componentes moleculares en una solución por medio de una reacción de condensación a altas temperaturas. Mejora la integración en los tejidos, tanto en cantidad como en calidad, protegiendo la superficie de desgastes y oxidaciones. Como inconveniente tenemos que valorar la alteración del cuerpo del implante por el proceso de cubrición²⁷⁵.

Deposición de vapor: permite el crecimiento de una capa por la reacción entre la superficie del implante y un vapor adyacente que proporciona un recubrimiento en forma de átomos, moléculas o iones, que se condensan en la superficie. Aporta características semejantes al plasma frío.

Rociado térmico: el objetivo de esta técnica es conseguir un mayor grosor de la fase de cubrición. Consta de gotitas de material fundido que son propulsadas hacia el implante, y al contacto con la superficie se enfrían y solidifican, formando un armazón continuo de varias capas con distinto nivel de solidificación, determinando la estructura del recubrimiento y las características morfoquímicas de la superficie. En principio se puede usar cualquier material o combinaciones de materiales que sean estables en estado líquido, destacando la zirconia y la

alúmina.

Modificación bioquímica, recubrimientos biomiméticos: consiste en el recubrimiento o inclusión de variadas moléculas orgánicas con el fin de permitir el reconocimiento por parte de los fluidos y células del receptor, creando un medio que permitiría una respuesta más cercana a la fisiológica. Aumentan la biocompatibilidad de la superficie, sin alterar el cuerpo del implante al formar una capa externa biomimética que regula la función, adhesión, diferenciación y remodelación celular. Las biomoléculas más usadas son péptidos y proteínas de adhesión (colágeno, fibronectina), factores de crecimiento (BMP, TGF), o apatitas, las cuales se pueden incorporar al implante mediante adsorción física o unión química.^{274,275}

Nanocerámicas: en estado de investigación, principalmente alúmina, titania e hidroxiapatita. Están diseñadas y sintetizadas de tal forma que posean estructura química, propiedades topográficas, propiedades mecánicas, así como distribución y tamaño granular similares al tejido óseo. Permiten mayor viabilidad y mejor función que las topografías convencionales²⁷⁶.

5.4 Esterilización de los implantes

A pesar de que algunos de los tratamientos utilizados en la fabricación de los implantes dentales pueden eliminar la contaminación biológica, no se pueden considerar estériles desde el punto de vista quirúrgico, por lo que deben esterilizarse antes de su comercialización y colocación en el paciente. El proceso de esterilización del implante tiene como objetivo garantizar la seguridad sanitaria del dispositivo mediante la eliminación efectiva de los agentes transmisibles como son las esporas, bacterias, virus, hongos y otros. Para este tipo de dispositivos el proceso se lleva a cabo mediante la esterilización por rayos gamma. Los rayos gamma se componen de ondas electromagnéticas de longitud de onda muy corta que penetran en los envases y productos expuestos a dicha fuente, ocasionando pequeños cambios estructurales en la cadena de ADN de las bacterias o microorganismos causándoles la muerte o dejándolas estériles, sin capacidad de replicarse. El proceso de esterilización necesita varias horas para que los rayos gamma pasen a través de los implantes ya empaquetados con el fin de que el material sea completamente estéril dentro de su envase final. Esta esterilización debera realizarse siguiendo la normativa vigente que regula su fabricación.

5.5 Cirugía implantológica

Debemos seguir un protocolo, muy estricto con el fin de respetar al máximo el tejido óseo donde pensamos colocar el implante. La cirugía traumática y agresiva es una de las causas más frecuente de pérdida del implante junto con el aumento de temperatura que se produce localmente por efecto del fresado y que puede provocar la necrosis de las células, impidiendo la integración del implante. Para evitar esto es imprescindible usar fresas bien afiladas, de diferentes diámetros que serán utilizadas de menor a mayor y con la presión adecuada; de micromotores con sistemas de reducción de velocidad que permitan trabajar entre 100 y 2000 rpm, mientras son refrigeradas de manera continua con suero fisiológico para que se mantenga la temperatura del hueso en niveles fisiológicos.

Mantener el campo estéril a lo largo de toda la cirugía es importantísimo ya que su contaminación puede llevarnos en un periodo muy corto de tiempo a la pérdida del implante.

5.6 Osteointegración de implantes

La respuesta del hueso ante el implante da lugar a diferentes tipos de interfases entre el implante y el tejido hospedador. Así, desde el punto de vista conceptual, la osteointegración supone la curación de la herida quirúrgica que completa su contacto con el biomaterial implantado, sin residuos cicatriciales o reacciones de cuerpo extraño. Como ya citamos con anterioridad, tras reponer el aporte sanguíneo aparecerán nuevas células que se encargarán de transformar el coágulo formado y el hueso dañado en matriz ósea, que posteriormente será calcificada y finalmente reestructurada hasta alcanzar la disposición de hueso lamelar maduro. Esto significa que la interfase está formada por una gran variedad de moléculas y diferentes tipos de estructuras que contienen elementos celulares y cristalinos, lo que da lugar a diferentes tipos de interfases^{277,278}.

Fibroosteointegración: hace referencia al tejido conectivo formado por las fibras de colágeno bien organizadas, presentes entre el implante y el hueso. Las fibras actuarían de manera similar a las fibras de Sharpey en la dentición natural. Las fibras afectan a la remodelación del hueso, donde se crea una tensión bajo condiciones óptimas de carga. Las fibras de colágeno situadas alrededor del implante están dispuestas de manera distinta a las fibras de los ligamentos periodontales de los dientes naturales. Dichas fibras están dispuestas de manera irregular, paralelas al cuerpo del implante²⁷⁹. Cuando aplicamos fuerzas, éstas no se transmiten a través de las fibras como ocurre en la dentición natural. No hay fibras de Sharpey presentes entre el hueso y el implante, por lo que resulta difícil transmitir las

cargas. Por tanto, no podemos esperar que en la fibrointegración se produzca una remodelación del hueso. La concentración notable de fuerzas en la interfase del tejido conectivo al hueso causa resorción en un área indirecta como respuesta al lado de presión^{280,281}. La reparación del hueso nunca se llevará a cabo hasta que las fuerzas se retiren. Resulta difícil detectar este fenómeno al principio; una vez formado el tejido conectivo, el grosor de éste aumenta con las presiones de fuerzas oclusales. Longitudinalmente, los implantes con integración fibroósea tiende a aumentar su movilidad. Se produce con implantes de material biotolerado como el acero inoxidable, metales nobles y aleaciones de cromo-cobalto-molibdeno. El mismo efecto se obtiene con el micromovimiento y carga durante la fase de integración de implantes de titanio. Un ejemplo son los implantes de titanio tipo lámina, cuya carga al cabo de uno o dos meses produce la encapsulación en tejido conectivo^{281,282,283}.

Fibrointegración: consistiría en la existencia de tejido fibroso no diferenciado, a modo de cápsula o cuerpo extraño, que rodea a la fijación. Conduce al fracaso para la mayoría de los autores. Los primeros estudios publicados sobre los implantes de tipo hoja de titanio mostraban una separación entre el implante y el hueso compuesta por una o varias capas de tejido fibroso de origen conjuntivo. Este tejido era descrito^{283,284} como altamente organizado, pero, como ya se indicó anteriormente, los estudios publicados sobre fibrointegración por Bert en 1981 mostraron que los resultados no son estables a medio y largo plazo.²⁸⁴ Según indicó Bert en 1996, los resultados demostraban claramente que el mantenimiento de los implantes a largo plazo, colocados según el concepto de la interposición de tejido fibroso, es aleatorio y esta concepción de la interfase hueso-implante sólo entraña fracaso a corto, medio o largo plazo²⁸⁵. Como conclusión, la interposición de tejido fibroso entre hueso e implante, que es el concepto clásico de implantología tradicional, no permite asegurar anclajes de larga duración por los elementos protésicos²⁸⁶. Entre las causas por las que puede producirse fibrointegración destacaríamos la discrepancia del diámetro entre el neoalveolo y el diámetro del implante, la inestabilidad primaria, cirugía traumática y séptica, restos de tejido fibroso en el neoalveolo y material del implante no biocompatible^{287,288,289}.

Osteointegración: Inicialmente la oseointegración fue definida con un criterio histológico, como la conexión directa entre el hueso y el implante sin interposición de tejidos blandos. Sin embargo, posteriormente fue redefinida desde una perspectiva clínica, como el anclaje de un implante al hueso, capaz de satisfacer las exigencias clínicas de funcionamiento como pilar de prótesis, transmitiendo las fuerzas oclusales directamente sobre el tejido óseo, y

manteniéndose fijo en el mismo, de forma asintomática, a lo largo del tiempo y en condiciones de carga funcional^{290,291}. Además deben valorarse otros factores como la ausencia de espacio radiotransparente periimplantario y la pérdida ósea inferior a 0,2 mm por año después del primer año. La osteointegración puede conseguirse con implantes de material bioinerte como el titanio y aleaciones de titanio y cerámicas de óxido de aluminio²⁹².

Biointegración: Se produce a través de la unión bioquímica entre el hueso y un material bioactivo (hidroxiapatita y biocristales), con intercambio iónico entre ambas superficies^{293,294}. Este término parte de las investigaciones publicadas en los últimos veinticinco años, fundamentalmente por Meffert (1985),²⁹⁵ que insiste en modificar la terminología consagrada por Brånemark²⁹⁶ para definir la retención estable y predecible del implante en el hueso como “biointegración”; en sus estudios recoge el criterio de DePuter y sus colaboradores (citado en Meffert, 1985), que llamaron la atención sobre la existencia de dos formas de anclaje de los implantes en función de su composición. Reciben el nombre de retención mecánica y bioactiva^{297,298}:

Retención mecánica y biológica: la retención mecánica se logra en los implantes con superficie metálica, como el titanio y aleaciones, y se establece en base a la morfología de esta superficie (irregular, con ranuras...). Implica la existencia de un contacto directo, íntimo, pero neutro entre la base metálica y el hueso sin intermediación de ningún otro tipo de conexión.^{299,300} De acuerdo con este criterio, la osteointegración definida por Brånemark sería un exponente de retención mecánica. La retención biológica requiere la presencia de materiales bioactivos en la superficie periférica del implante, responsables de una interacción química con el hueso, de forma similar a la fijación observada de forma natural, sin necesidad de retención mecánica.³⁰¹ Esta unión directa hueso-implante es identificable al microscopio electrónico y, a diferencia de los implantes osteointegrados, no existe interfase sin calcificar. Su mejor exponente son los materiales conocidos como cerámicas cristalinas, hidroxiapatita y fosfato tricálcico³⁰².



Figura 45. Diferentes tipos de interfases de implantes: osteointegración (izda), fibrosteointegración (centro), fibrointegración (dcha).

5.7 Técnicas de análisis de la osteointegración

Análisis histológico:

Las técnicas de microscopía óptica y electrónica permiten analizar la respuesta ósea en los defectos críticos y tejido periimplantario³⁰³. La microscopía óptica proporciona información sobre toda el área a estudio mientras que la de transmisión sólo de una pequeña parte de su superficie. Algunas técnicas de barrido con RX, nos darían información sobre la composición química en la interfaz. Debido a las restricciones de la microscopía electrónica, la óptica sigue siendo el mejor método para valorar la respuesta del tejido al material del implante^{304,305}.

Los métodos de exploración no invasivos carecen de resolución y son caros, los métodos bioquímicos no proporcionan información sobre la topografía por lo que la histología sigue estando en la vanguardia de los análisis de la respuesta ósea en implantología oral^{306,307}.

Una preparación histológica sólo representa un momento concreto de la respuesta biológica que de manera continua se produce en el hueso tras ser colocado un implante. Para tener información adecuada sobre el progreso y el estado actual de la interfaz, debemos utilizar varias técnicas³⁰⁸:

Microscopia óptica subjetiva: proporciona una descripción de la respuesta tisular mediante la valoración de la posición del implante, la estructura ósea, respuesta tisular (células inflamatorias, macrófagos,...), respuesta de la interfaz, así como problemas relacionados con el implante (fractura, resorción,...).

Marcaje fluorocrómico: se basa en que ciertas sustancias se unen directa y específicamente a la hidroxapatita por quelación con el calcio cuando se deposita hueso nuevo. Resulta muy útil para obtener información sobre el inicio del proceso de formación

ósea, tanto en la superficie del implante como en cualquier otra zona, así como de la actividad de remodelación alrededor del implante. Los marcadores se administran al animal por variadas vías a diversos tiempos.

Microrradiografía: es un método mediante el cual las secciones preparadas para microscopia óptica son examinadas con rayos X. Proporciona información sobre el progreso de la actividad reparadora y de remodelación ósea alrededor del implante. En desuso desde la aparición de la microtomografía asistida por ordenador con la que se obtiene una resolución mucho mayor.

Análisis histomorfométrico: para una adecuada evaluación del implante debe realizarse la histomorfometría cuantitativa, en la que se pueden examinar varias áreas de interés:³⁰⁹

- **Implante:** valorar la estabilidad o degradación y comportamiento del material.
- **Tejido circundante:** la zona remodelada del hueso o del tejido blando que rodea el implante se considera como reacción inflamatoria y/o curativa en respuesta al trauma quirúrgico y la presencia continua del implante.
- **Interfaz:** es la zona directamente adyacente a la superficie del implante. La naturaleza de ésta viene determinada por las propiedades físicas, químicas y biológicas del biomaterial.
- **Tejido intersticial:** es el tejido que crece dentro de los poros de un implante poroso.

En base a estas áreas de interés, se pueden usar varios parámetros para describir la estructura del hueso que está en contacto con el implante. Éstos han de ser lo más simples posibles para proporcionar la información requerida, aunque existe un amplio arsenal de métodos analíticos para evaluar los tejidos circundantes al implante.

Escalas de clasificación histológica: se puede considerar la realización de escalas histológicas como la primera evaluación histomorfométrica, asignando puntuaciones a las características semicuantitativas y cualitativas de la reacción ósea, de la interfaz y del intersticio a distintos niveles del implante. Es subjetivo, y requiere un consenso previo sobre la apariencia histológica de diferentes situaciones.

Análisis cuantitativo de la interfaz: con la valoración cuantitativa de la respuesta se trata de evaluar, mediante el uso de analizadores de imagen informáticos, por conjunto o independientemente, alguno de los siguientes parámetros:

Porcentaje de contacto óseo: es el porcentaje de la longitud del implante que se halla en contacto directo con el tejido óseo. Aporta información sobre la fijación del implante en el hueso y del efecto de las propiedades fisicoquímicas, así como del protocolo de carga sobre la reparación ósea. Resulta intuitivo que los implantes con un mayor porcentaje de contacto óseo sean los de mayor éxito, sin embargo este contacto oscila entre el 50% y el 90% en implantes clínicamente válidos. Los implantes en hueso vital nunca tienen toda su superficie en contacto con tejido óseo, ya que el proceso de remodelación hace que existan cavidades de resorción. Algunos autores indicaron que tan sólo se necesita un contacto del 10% para un adecuado anclaje^{310,311}.

Densidad ósea: porcentaje de relleno óseo en áreas predeterminadas alrededor del implante. Proporciona una idea del grado de compatibilidad e integración del implante bajo determinadas condiciones.

Procesado histológico: existen varios métodos de histomorfometría ósea, entre los que se encuentran los físicos, los histológicos y los microanatómicos³¹². Los métodos físicos nos darían información sobre la mineralización del tejido óseo, y prácticamente se usan sólo para diagnosticar osteomalacia.

Para la realización de los métodos histológicos se puede proceder a la descalcificación o no de la muestra. Para la histomorfometría en investigación de implantes dentales son más interesantes los protocolos sin descalcificar, con el fin de conservar la integridad del tejido óseo y valorar mejor la respuesta. El método más usado para valorar la histomorfometría consiste en la realización de finas secciones de una muestra incluida en resina tras su preservación y deshidratación.

Otros procesados para histomorfometría son el marcaje con fluorocromos del frente de calcificación y estudio con microscopio de fluorescencia, o reconstrucción a partir de varias secciones de una misma muestra y métodos microanatómicos para observar la arquitectura trabecular mediante analizadores de imagen en dos o tres dimensiones.³¹³

Posiblemente, la combinación de técnicas más útil para estudiar la interfaz ósea en microscopio óptico consiste en la inclusión de la muestra sin descalcificar en resinas, preparación de secciones óseas con el sistema Exakt y técnicas de tinción de cortes incluidos en resinas. Este es el proceso que se describirá detalladamente en la sección de material y métodos^{314,315}.

Otros análisis: Otros métodos de análisis diferentes a la Histometría pueden aportar información sobre la respuesta biomecánica de la interfaz³¹⁶.

El análisis del par de apriete o esfuerzo de torsión así como la fuerza de agarre, informa de la estabilidad y unión física lograda en la interfaz.

El método de medición directa “indentation testing”, o prueba de la muesca, proporciona datos sobre las propiedades mecánicas, representando una ventaja frente a pruebas de microdureza, pero tiene igualmente limitaciones por las propiedades del hueso.

La tecnología emergente de “la imagen de dispersión” tiene una gran aplicación en ortopedia dentofacial. Evalúa las propiedades mecánicas de la interfaz de los implantes endoóseos, mediante la valoración del contenido mineral óseo, sabiéndose que un leve incremento del contenido mineral aumenta marcadamente la dureza y resistencia, además de poder usarse para análisis cualitativos y de morfología semejantes a la microrradiografía, pero con mayor resolución.³¹⁷

Mediante microscopia analítica de barrido de Rx o difracción de electrones, se puede obtener información acerca de la distribución, concentración y disolución de componentes de los implantes metálicos^{318,319}.

La reconstrucción tridimensional del bloque implante-hueso con analizadores de imagen, da una idea más detallada de la biomecánica del conjunto.

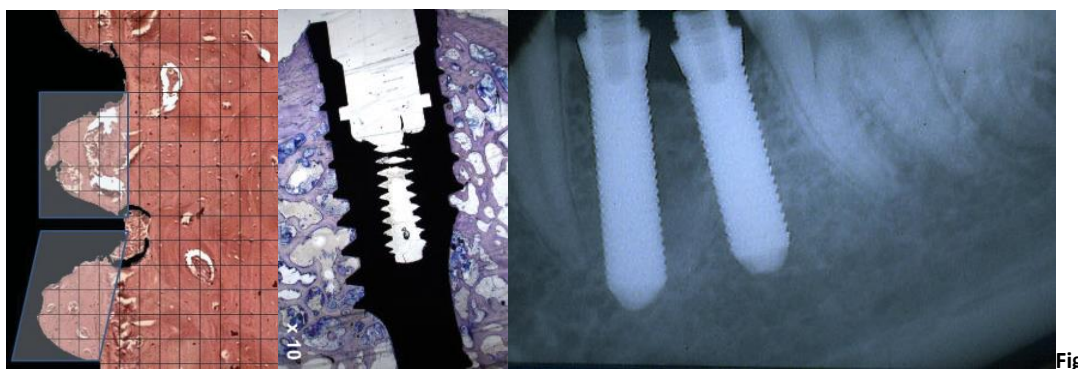


Figura 46. Imagen de la región cervical de un implante cónico con aumento de 10x para estudio histomorfométrico (izda). Imagen histológica de un implante colocado en la mandíbula de un cerdo minipig y correctamente osteointegrado (centro). Estudio radiológico para valorar osteointegración de implantes (dcha).^{25,26}

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis del trabajo

1. Nuestro modelo experimental de oveja osteoporótica es realizable y aplicable para la investigación.
2. Dicho modelo puede ser validado mediante la utilización de densitometría e histomorfometría ósea.
3. El uso de PRP, BMP2 y células madres facilita la cicatrización ósea de los defectos críticos y la osteointegración de implantes de titanio en hueso osteoporótico de oveja.

Objetivos generales

1. Desarrollar un modelo ovino de osteoporosis.
2. Comprobar y estudiar la curación de defectos críticos óseos condilares en ovejas osteoporóticas con el uso de PRP y BMP2 y con PRP+BMP2 y células madre mesenquimales alógenas.
3. Estudiar la osteointegración de implantes dentales de titanio en hueso osteoporótico y con la ayuda de PRP, BMP2 y células madre.

Objetivos específicos

1. Establecer un protocolo anestésico efectivo y seguro que permita llevar a cabo las mediciones densitométricas y procedimientos quirúrgicos pertinentes.
2. Estandarizar el posicionamiento del animal para garantizar la reproductibilidad y fiabilidad de las mediciones densitométricas.
3. Valorar el uso de la densitometría en el modelo osteoporótico ovino.
4. Establecer un protocolo para aplicar en ovejas una terapia combinada de corticoterapia, esterilización y alimentación con una dieta pobre en Ca y Vitamina D, con el fin de desarrollar osteoporosis.
5. Protocolo y estandarización de valores normales densitométricos en la especie ovina.
6. Valorar la cicatrización ósea del hueso osteoporótico de oveja.
7. Valorar la efectividad del uso del PRP y BMP2 en la cicatrización de hueso osteoporótico y en la osteointegración de implantes.

8. Estudio de la influencia de uso de células madres mesenquimales en la cicatrización de defectos óseos.

9. Estudio de la influencia del uso de células madres mesenquimales en la osteointegración de implantes de titanio.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Este estudio experimental fue llevado a cabo bajo la aprobación y supervisión del Comité de ética de la Universidad de León. Para el desarrollo del mismo se emplearon 20 ovejas sanas de raza Churra con un peso de entre 55 y 65 kg y una edad comprendida entre los 3 y 5 años. En todos los individuos se realizaron analíticas sanguíneas completas (Hematología y Bioquímica) previas al inicio del estudio experimental y antes de la eutanasia para monitorizar su estado. Dos ovejas fueron excluidas del estudio, la primera por encontrarse en estado de gestación y la segunda por presentar una malformación vertebral a nivel de L4-L5, que fue detectada durante la realización de una exploración densitométrica. Constituyendo el material final de estudio 18 ovejas que se repartieron en 3 grupos:

Grupo I (n=6): animales sanos que no fueron tratados, fueron alimentados convencionalmente y en los que se efectuaron mediciones densitométricas y extracción post-mortem de muestras óseas para su posterior estudio histomorfométrico.

Grupo II (n=6): animales sanos que fueron sometidos a ovariectomía bilateral, alimentados con una dieta baja en calcio y vitamina D basada fundamentalmente en salvado de trigo y paja y que recibieron corticoterapia durante un periodo de 5 meses y en los que se efectuaron mediciones densitométricas y extracción post-mortem de muestras óseas para su posterior estudio histomorfométrico.

Grupo III (n=6): animales sanos que fueron sometidos a ovariectomía bilateral, alimentados con una dieta baja en calcio y vitamina D, basada fundamentalmente en salvado de trigo y paja y que recibieron corticoterapia durante un periodo de 5 meses, tras el cual se efectuó una retirada gradual de la corticoterapia y un cambio progresivo de alimentación a una dieta convencional. Dos meses después de la retirada definitiva de la corticoterapia estos animales fueron intervenidos quirúrgicamente. En este grupo también se efectuaron mediciones densitométricas y tras un periodo postoperatorio de 2 meses se procedió a la extracción post-mortem de muestras óseas para su posterior estudio histomorfométrico.

Tabla 10. Plan de trabajo en los diferentes grupos:

Grupo1: Control (n=6)

	Castración	GC	DO	Hist V	Hist F
1	No	No	Si	Si	Si
2	No	No	Si	Si	Si
3	No	No	Si	Si	Si
4	No	No	Si	Si	Si
5	No	No	Si	Si	Si
6	No	No	Si	Si	Si

GC: glucocorticoides, DO: Densitometría ósea; Hist: Histomorfometría ósea, V: Vértebra; F: Fémur.

Grupo 2: Osteoporosis (n=6)

	Castración	GC	DO	Hist V	Hist F
1	Si	Si	Si	Si	Si
2	Si	Si	Si	Si	Si
3	Si	Si	Si	Si	Si
4	Si	Si	Si	Si	Si
5	Si	Si	Si	Si	Si
6	Si	Si	Si	Si	Si

GC: glucocorticoides, DO: Densitometría ósea; Hist: Histomorfometría ósea, V: Vértebra; F: Fémur.

Grupo 3: Células (n=6)

	Castración	GC	DO	Hist V	Hist F	Implantes y defectos
1	Si	Si	Si	No	No	Si
2	Si	Si	Si	No	No	Si
3	Si	Si	Si	No	No	Si
4	Si	Si	Si	No	No	Si
5	Si	Si	Si	No	No	Si
6	Si	Si	Si	No	No	Si

GC: glucocorticoides, DO: Densitometría ósea; Hist: Histomorfometría ósea, V: Vértebra; F: Fémur.

2. MATERIAL Y EQUIPAMIENTO

Densitometría ósea: para la realización de los estudios densitométricos se dispuso de un equipo General Electrics Lunar Prodigy Primo con software en CORE v. 13.20.033.

Anestesia: para efectuar los procedimientos anestésicos se utilizaron dos equipos diferentes: un equipo Dräger modelo Medical Julian y un equipo Dräger modelo Fabius.

Material Quirúrgico e implantes

- Ovariectomías: instrumental de cirugía general.
- Creación de defectos óseos y colocación de implantes:
 - Instrumental de cirugía general
 - Una caja quirúrgica de Klockner Implant System.
 - 24 implantes Essential de 4.0 de diámetro y 8.0 mm de longitud.
 - 12 membranas de colágeno Bioguide
 - Mango de bisturí
 - Despegador mucoperióstico de Molt
 - Cíncel tipo Back action o Kirkland
 - Pinzas Adson de disección
 - Pinza mosquito
 - Portaagujas de Mayo
 - Tijera Metzenbaum
 - Separador de mejilla (tipo Minnesota o Langenbek)
 - Cureta o cucharilla de legrado
 - Motor de implantes dentales Celerex con bomba para suero fisiológico.
 - Dos contra-ángulos de implantes.
 - Material quirúrgico desechable (suturas, hojas de bisturí...)



Figura 47. Caja quirúrgica del sistema Essential de Klockner



Figura 48. Implante dental Essential de Klockner de 4.0 mm de diámetro y 8.0 mm de longitud



Figura 49. Membrana de colágeno Jason de Botiss dental.

Histomorfometría ósea

- Sierra de banda (Exakt 400, System, Aparatebau GMBH)
- Agitador de vaivén
- Glicolmetacrilato (Technovit 7200®, VLC - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania)
- Fotopolimerizador
- Máquina de pulido (Exakt-Micro Grinding System®, Aparatebau GMBH)
- Resina fotopolimerizable (Technovit 7210® - Heraeus Kulzer GMBH)
- Máquina de vacío con luz azul (Exakt 530, System, Aparatebau GMBH)
- Prensa de fotopegado (Exakt 402)
- Soluciones para tinción de las muestras por el método de Levai Laczcó
- Cámara digital acoplada a un microscopio óptico motorizado (BX51, Olympus, Japón)
- Software informático (Cell Sens Dimensions, Olympus, Japón)

Cultivos celulares

- Campana de flujo laminar (Telstar Biostar)
- Incubador a 37 °C, 5% CO₂, 95% de aire y a 1 atm de presión (Thermo Electron Corporation)
- Centrífuga (Allegra 21R Centrifuga Beckman & Coulter)
- Agitador a 37 °C (MaxQTM 4000 Barstead)
- Baño a 37 °C
- Microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse TS 100)
- Pipetas serológicas de vidrio de rangos adecuados
- Falkon de 50 ml
- Viales de células
- Placas de Petri de 60 mm de diámetro para cultivo celular
- Cestillas NETWELL
- Filtros de 0.2 µm (Corning)
- Material de disección de grasa (pinzas y tijeras)
- Aspirador para pipetas serológicas

Estudios histológicos: microscopio LEICA DM2000 con cámara incorporada Leica EC3 y lupa estereoscópica OLYMPUS – FEX-ILLB2 – 200 con cámara DP12 OLYMPUS.

3. MÉTODOS

3.1 Ovariectomía

Preparación del paciente

Las ovejas fueron sometidas a un período de ayuno de 24 horas. Una hora antes de la cirugía se administró por vía subcutánea amoxicilina-colistina (Eupen plus® Fatro) a una dosis de 15 mg/kg y carprofeno a dosis de 4 mg/kg (Rimadyl®). Posteriormente se procedió a la premedicación e inducción de la anestesia general de los animales (ver apartado protocolos anestésicos). A continuación se procedió al afeitado de la zona quirúrgica, flanco, fosa ilíaca y región lumbar izquierdas (Figura 50). Los animales fueron posicionados en decúbito lateral derecho y se aplicaron en la zona afeitada soluciones desinfectantes de alcohol y povidona yodada.



Figura 50. Afeitado del área quirúrgica.

Técnica quirúrgica

Se comenzó la intervención realizando una incisión transversal sublumbar en el flanco izquierdo del animal de 10 cm. Posteriormente se seccionó el músculo cutáneo. A continuación y con tijera de disección se procedió a la sección de los músculos oblicuo externo, oblicuo interno y transversal del abdomen siguiendo en cada uno de ellos la dirección de sus fibras (técnica estrellada). Para abordar la cavidad abdominal se incidió el peritoneo. A través de la abertura abdominal practicada se procedió a localizar el útero en posición caudal a la herida quirúrgica. Una vez localizado, se extrajo uno de los cuernos uterinos y siguiendo éste en dirección craneal hasta el ovario. Con el fin de extirparlo, se practicaron ligaduras con seda quirúrgica de un cero. Dos ligaduras separadas unos milímetros entre sí en el mesovario, que contiene la arteria y vena ováricas, y otras dos igualmente separadas a nivel de la unión ovariouterina hasta la que se extienden la arteria y vena uterina craneales. Se seccionó a continuación entre las ligaduras de ambas zonas y se pudo de esta manera extraer el ovario con seguridad y evitando el sangrado. Se localizó el cuerno contralateral repitiendo la misma

operación. Una vez extirpados los dos ovarios se recolocó el útero en su posición natural y se situó adecuadamente el omento mayor para evitar adherencias peritoneales. Por último, se suturó por planos, con puntos entrecortados simples y con sutura reabsorbible sintética del cero. En primer lugar el peritoneo y el músculo transverso, seguidos de los músculos oblicuo interno y del externo. Se finalizó con una sutura subcutánea continua, y la piel se suturó mediante puntos simples con nailon del cero.



Figura 51. Ovariectomía por laparotomía. Incisión de la piel. Disección del tejido subcutáneo. Identificación de los ovarios.



Figura 52. Ligadura de la arteria y vena ováricas. Sutura de la pared abdominal por planos.

3.2 Alimentación

En este estudio experimental se han utilizado dos dietas distintas:

- 1) Una **dieta baja en calcio y Vitamina D** basada en paja y salvado de trigo. Ésta fue administrada ad libitum a los animales de los grupos II y III durante un periodo de 5 meses, y en cantidades decrecientes durante el sexto mes en los animales del grupo III hasta llegar a sustituirla por completo por una dieta convencional al inicio del séptimo mes. El análisis bioquímico del salvado de trigo y la paja empleada se detalla a continuación:

Fecha de emisión: 12/06/2012	Página 1 de 2
Informe: 36825	
	
LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA	LABORATORIO AGROALIMENTARIO

ANÁLISIS DE SALVADO

Datos cliente: UNIVERSIDAD DE LEON-DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Nº de muestra:	36825	Acreditaciones:	NORMA ISO 9001 ER 1252/2007 LABORATORIO DE SALUD ALIMENTARIA DE CASTILLA Y LEON 085/LE
Recogido por:	EXTERNO		
Fecha de recogida:	15/05/2012	Fecha de inicio:	15/05/2012
Fecha de entrada:	15/05/2012	Fecha fin:	11/06/2012
Temperatura producto:		Temp. almacenamiento:	
Motivo de la recolección:			
Método de muestreo:			
Recipiente contenedor:	BOLSA DE PLÁSTICO		
Observaciones:	MUESTRA: SALVADO DE TRIGO		

LEÓN, martes 12 de junio de 2012



APROBADO POR:
PABLO FLOREZ MAGADÁN
Director Técnico



REVISADO POR:
DIEGO GONZÁLEZ GARCÍA
Responsable Dep. Atención Cliente



REALIZADO POR:
ALBERTO LÓPEZ PÉREZ
Responsable Técnico

Estos resultados pertenecen a una muestra analizada en el laboratorio, y no deben reproducirse sin la autorización por escrito del mismo

AGROVET
Crt. León-Zamora Km 8,2 . 24231 Onzonilla, LEÓN
Tlf. 987214826

Fecha de emisión: 12/06/2012

Página 2 de 2

Informe: 36825



LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA

LABORATORIO AGROALIMENTARIO

Prueba	Resultado	Unidades	Método	Método ref.
HUMEDAD	14.13 %		PNT-FQ 601	MOA MAPA TOMO I
MATERIA SECA	85.87 %		PNT-FQ 601	MOA MAPA TOMO I
CENIZAS	5.29 %		PNT-FQ 602	MOA MAPA TOMO I
PROTEINA BRUTA	17.53 %		PNT-FQ 603	MOA MAPA TOMO I
GRASA BRUTA	2.27 %		PNT-FQ 604	MOA MAPA TOMO I
FIBRA BRUTA	5.34 %		PNT-FQ 605	MOA MAPA TOMO I
FIBRA NEUTRO DETERGENTE	33.10 %		PNT-FQ 610	MOA MAPA TOMO I
FIBRA ÁCIDO DETERGENTE	9.37 %		PNT-FQ 611	MOA MAPA TOMO I
FOSFORO	0.01 %		PNT-FQ 607	MOA MAPA TOMO I
CALCIO	0.05 %		PNT-FQ 606	MOA MAPA TOMO I
VITAMINA D	<0.1 ppb		PNT FQ-101	HPLC

LEÓN, martes 12 de junio de 2012

APROBADO POR:
PABLO FLOREZ MAGADÁN
Director Técnico

REVISADO POR:
DIEGO GONZÁLEZ GARCÍA
Responsable Dep. Atención Cliente

REALIZADO POR:
ALBERTO LÓPEZ PÉREZ
Responsable Técnico

Estos resultados pertenecen a una muestra analizada en el laboratorio, y no deben reproducirse sin la autorización por escrito del mismo

AGROVET
Crta. León-Zamora Km 8,2 . 24231 Onzonilla, LEÓN
Tlf. 987214826

Fecha de emisión:12/06/2012	Página 1 de 2
Informe: 36826	
LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA	LABORATORIO AGROALIMENTARIO

ANÁLISIS DE PAJA

Datos cliente:	UNIVERSIDAD DE LEON-DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA		
Nº de muestra:	36826	Acreditaciones:	NORMA ISO 9001 ER 1252/2007 LABORATORIO DE SALUD ALIMENTARIA DE CASTILLA Y LEON 085/LE
Recogido por:	EXTERNO		
Fecha de recogida:	15/05/2012	Fecha de inicio:	15/05/2012
Fecha de entrada:	15/05/2012	Fecha fin:	11/06/2012
Temperatura producto:		Temp. almacenamiento:	
Motivo de la recolección:			
Método de muestreo:			
Recipiente contenedor:	BOLSA DE PLÁSTICO		
Observaciones:	MUESTRA: PAJA		

LEÓN, martes 12 de junio de 2012



APROBADO POR:
PABLO FLOREZ MAGADÁN
Director Técnico



REVISADO POR:
DIEGO GONZÁLEZ GARCÍA
Responsable Dep.Atención Cliente



REALIZADO POR:
ALBERTO LÓPEZ PÉREZ
Responsable Técnico

Estos resultados pertenecen a una muestra analizada en el laboratorio, y no deben reproducirse sin la autorización por escrito del mismo

AGROVET
Crt. León-Zamora Km 8,2 . 24231 Onzonilla, LEÓN
Tlf. 987214826

Fecha de emisión: 12/06/2012

Página 2 de 2

Informe: 36826



LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA

LABORATORIO AGROALIMENTARIO

Prueba	Resultado	Unidades	Método	Método ref.
HUMEDAD	8.31 %		PNT-FQ 601	MOA MAPA TOMO I
MATERIA SECA	91.69 %		PNT-FQ 601	MOA MAPA TOMO I
CENIZAS	5.66 %		PNT-FQ 602	MOA MAPA TOMO I
PROTEINA BRUTA	4.94 %		PNT-FQ 603	MOA MAPA TOMO I
GRASA BRUTA	1.21 %		PNT-FQ 604	MOA MAPA TOMO I
FIBRA BRUTA	41.16 %		PNT-FQ 605	MOA MAPA TOMO I
FIBRA NEUTRO DETERGENTE	77.93 %		PNT-FQ 610	MOA MAPA TOMO I
FIBRA ÁCIDO DETERGENTE	53.41 %		PNT-FQ 611	MOA MAPA TOMO I
FOSFORO	0.01 %		PNT-FQ 607	MOA MAPA TOMO I
CALCIO	0.36 %		PNT-FQ 606	MOA MAPA TOMO I
VITAMINA D	<0.10 ppb		PNT-FQ 101	HPLC

LEÓN, martes 12 de junio de 2012

APROBADO POR:
PABLO FLOREZ MAGADÁN
Director Técnico

REVISADO POR:
DIEGO GONZÁLEZ GARCÍA
Responsable Dep. Atención Cliente

REALIZADO POR:
ALBERTO LÓPEZ PÉREZ
Responsable Técnico

Estos resultados pertenecen a una muestra analizada en el laboratorio, y no deben reproducirse sin la autorización por escrito del mismo

AGROVET
Crt. León-Zamora Km 8,2 . 24231 Onzonilla, LEÓN
Tlf. 987214826

- 2) Una **dieta convencional** basada en 500 gramos al día de pienso concentrado (Pasaranda ovifeed) y heno de hierba ad libitum. Esta dieta fue administrada a los animales del grupo I y a los animales del grupo III de manera progresiva durante el sexto mes y de manera exclusiva a partir del séptimo mes. El análisis bioquímico del heno de hierba empleado se detalla a continuación:

Fecha de emisión:12/06/2012	Página 1 de 2
Informe: 36827	
	
LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA	LABORATORIO AGROALIMENTARIO

ANÁLISIS DE HIERBA

Datos cliente: **UNIVERSIDAD DE LEON-DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

Nº de muestra: **36827**

Acreditaciones: NORMA ISO 9001 ER 1252/2007
LABORATORIO DE SALUD ALIMENTARIA DE CASTILLA Y LEON 085/LE

Recogido por: **EXTERNO**

Fecha de recogida: **15/05/2012**

Fecha de inicio: **15/05/2012**

Fecha de entrada: **15/05/2012**

Fecha fin: **11/06/2012**

Temperatura producto

Temp. almacenamiento:

Motivo de la recolección

Método de muestreo

Recipiente contenedor: **BOLSA DE PLÁSTICO**

Observaciones: **MUESTRA : HIERBA**

LEÓN, martes 12 de junio de 2012



APROBADO POR:
PABLO FLOREZ MAGADÁN
Director Técnico



REVISADO POR:
DIEGO GONZÁLEZ GARCÍA
Responsable Dep.Atención Cliente



REALIZADO POR:
ALBERTO LÓPEZ PÉREZ
Responsable Técnico

Estos resultados pertenecen a una muestra analizada en el laboratorio, y no deben reproducirse sin la autorización por escrito del mismo

AGROVET
Crt. León-Zamora Km 8,2 · 24231 Onzonilla, LEÓN
Tlf. 987214826

Fecha de emisión: 12/06/2012

Página 2 de 2

Informe: 36827



LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA

LABORATORIO AGROALIMENTARIO

Prueba	Resultado	Unidades	Método	Método ref.
HUMEDAD	9.97 %		PNT-FQ 601	MOA MAPA TOMO I
MATERIA SECA	90.02 %		PNT-FQ 601	MOA MAPA TOMO I
CENIZAS	11.96 %		PNT-FQ 602	MOA MAPA TOMO I
PROTEINA BRUTA	6.66 %		PNT-FQ 603	MOA MAPA TOMO I
GRASA BRUTA	1.74 %		PNT-FQ 604	MOA MAPA TOMO I
FIBRA BRUTA	27.06 %		PNT-FQ 605	MOA MAPA TOMO I
FIBRA NEUTRO DETERGENTE	60.96 %		PNT-FQ 610	MOA MAPA TOMO I
FIBRA ÁCIDO DETERGENTE	44.97 %		PNT-FQ 611	MOA MAPA TOMO I
FOSFORO	0.02 %		PNT-FQ 607	MOA MAPA TOMO I
CALCIO	0.61 %		PNT-FQ 606	MOA MAPA TOMO I
VITAMINA D	<0.10 ppb		PNT-FQ 101	HPLC

LEÓN, martes 12 de junio de 2012

APROBADO POR:
PABLO FLOREZ MAGADÁN
Director Técnico

REVISADO POR:
DIEGO GONZÁLEZ GARCÍA
Responsable Dep. Atención Cliente

REALIZADO POR:
ALBERTO LÓPEZ PÉREZ
Responsable Técnico

Estos resultados pertenecen a una muestra analizada en el laboratorio, y no deben reproducirse sin la autorización por escrito del mismo

AGROVET
Crt. León-Zamora Km 8,2 . 24231 Onzonilla, LEÓN
Tlf. 987214826

3.3 Corticoterapia

A los animales de los grupos II y III se les administró una inyección semanal intramuscular de dexametasona fosfato sódico (Fortecortin, Merck) a una dosis de 1mg/kg durante un periodo de 5 meses. Los animales del grupo III prosiguieron con la corticoterapia durante el sexto mes pero la dosis fue reducida de forma progresiva un 50% cada semana para ser retirada de forma definitiva al inicio del séptimo mes.



Figura 53. Dexametasona inyectable (Fortecortin® Merck)

3.4 Protocolos anestésicos

Ovariectomías: los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno de 24 horas. Una hora antes de la cirugía se les administró por vía subcutánea Amoxicilina-Colistina a dosis de 15 mg/kg (Eupen) y Carprofeno (Rimadyl) a dosis de 4 mg/kg.

Premedicación: para la premedicación se administró por vía intramuscular xilacina (Rompún) a dosis de 0,2 mg/kg y Buprenorfina (Buprex) a dosis de 0,02 mg/kg. Tras un periodo de 15 minutos se procedió a la colocación de un catéter intravenoso en la vena auricular marginal.

Inducción: la inducción se realizó con Propofol (Propovet) administrado por vía intravenosa a dosis de 4 mgr/kg.

Mantenimiento: los animales fueron intubados y mantenidos mediante anestesia inhalatoria con Isoflurano (Isovet) al 2%. Durante esta fase anestésica se llevó a cabo la monitorización de los animales mediante pulsioximetría y capnografía.

Recuperación: tras el cese de la administración de isoflurano los animales despertaban espontáneamente y con normalidad y no se administró ningún fármaco durante esta fase anestésica.

Analgesia y antibioterapia postoperatoria: se administró a los animales por vía subcutánea Carprofeno (Rimadyl) a dosis de 0,2 mg/Kg y Amoxicilina-Colistina (Eupen) a dosis de 15 mg/kg cada 24 horas durante un periodo de 5 días.

Mediciones densitométricas: los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno de 24 horas.

Premedicación: para la premedicación se administró por vía intramuscular xilacina (Rompún) a dosis de 0,2 mg/kg. Tras un periodo de 15 minutos se procedió a la colocación de un catéter intravenoso en la vena auricular marginal.

Inducción: la inducción se realizó con Propofol (Propovet) administrado por vía intravenosa a dosis de 4 mgr/kg.

Mantenimiento: los animales se mantuvieron anestesiados mediante infusión continua vía intravenosa de Propofol (Propovet) diluido al 33 % en suero glucosado a dosis de 12 mg/kg/h. Durante esta fase anestésica la monitorización de los animales se llevó a cabo valorando exclusivamente la frecuencia respiratoria, pulso, reflejo palpebral y posición del globo ocular.

Recuperación: tras el cese de la administración intravenosa de Propofol los animales se despertaban espontáneamente y con normalidad y no se administró ningún fármaco durante esta fase anestésica.

Procedimiento quirúrgico para la creación de defectos óseos y colocación de implantes: los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno de 24 horas. Una hora antes de la cirugía se les administró por vía subcutánea Amoxicilina-Colistina a dosis de 15 mg/kg (Eupen) y Carprofeno (Rimadyl) a dosis de 4 mg/kg.

Premedicación: para la premedicación se administró por vía intramuscular xilacina (Rompún) a dosis de 0,2 mg/kg y Buprenorfina (Buprex) a dosis de 0,02 mg/kg. Tras un periodo de 15 minutos se procedió a la colocación de un catéter intravenoso en la vena auricular marginal.

Inducción: la inducción se realizó con Propofol (Propovet) administrado por vía intravenosa a dosis de 4 mgr/kg.

Mantenimiento: los animales fueron intubados y mantenidos mediante anestesia inhalatoria con Isoflurano (Isovet) al 2%. Durante esta fase anestésica se llevó a cabo la monitorización de los animales mediante pulsioximetría y capnografía.

Recuperación: tras el cese de la administración de isoflurano los animales despertaban espontáneamente y con normalidad y no se administró ningún fármaco durante esta fase anestésica.

Analgesia y antibioterapia postoperatoria: se administró a los animales por vía intramuscular buprenorfina (Buprex)a dosis de 0,02 mg/kg cada 24 durante un periodo de 2 días y por vía subcutánea Carprofeno (Rimadyl) a dosis de 0,2 mg/Kg y Amoxicilina-Colistina (Eupen) a dosis de 15 mg/kg cada 24 horas durante un periodo de 5 días.

3.5 Técnica densitométrica

Antes de llevar a cabo las densitometrías in vivo, se efectuaron mediciones en huesos aislados (pelvis y fémur izquierdo) y cadáver de oveja.



Figura 54. Pelvis y fémur izquierdo



Figura 55. Pruebas densitométricas en cadáver

Uno de los principales problemas que nos encontramos a la hora de usar el densitómetro es que los posicionadores están diseñados para medicina humana y no son compatibles con nuestro modelo animal. Con el fin de garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de las mediciones se diseñaron sistemas para estandarizar el posicionamiento.

Otro problema no menos importante, fue que debido a las diferencias anatómicas, para conseguir una máxima exposición del cuello femoral, la posición de los miembros inferiores de la especie humana y la de los miembros posteriores en la especie ovina debe ser completamente distinta. En humana las piernas deben estar en extensión con cierto grado de rotación interna, mientras que en ovejas, si posicionamos así las extremidades posteriores, el trocánter mayor del fémur se superpone con el cuello femoral. Para resolver este conflicto se anestesió una oveja y se obtuvieron imágenes mediante un arco de radioscopia realizando movimientos completos de las extremidades. Finalmente se determinó que la mejor

visualización se obtiene con los miembros del tercio posterior en flexión y abducción. No obstante, se realizó un estudio radiológico para confirmar este hallazgo.



Figura 56. Estudio radiológico del paciente.

Para posicionar a la oveja utilizamos un colchón-posicionador inflable radiolúcido de 95 x 65 cm (posicionador A; Fig.57) sobre el que colocamos al animal en posición decúbito supino y una jaula de ratas modificada (posicionador B; Fig.58) a la que fijamos los tarsos, y que nos permite obtener el grado de flexión y abducción necesario en los miembros posteriores. Recurrimos al colchón-posicionador porque los posicionadores que se utilizan habitualmente en veterinaria para el diagnóstico radiológico en perros no eran lo suficientemente grandes para asegurar adecuadamente a la oveja. Una vez que nos aseguramos de que la oveja está correctamente posicionada y centrada en la mesa, se efectúa vacío en el colchón-posicionador. Por último se coloca en el extremo caudal del animal el posicionador B y fijamos los tarsos (Fig. 59) De esta manera podemos garantizar un correcto alineamiento del eje axial y una óptima exposición de los cuellos femorales.



Figura. 57. Posicionador A.



Figura 58. Posicionador B



Figura 59. Oveja posicionada

El densitómetro que utilizamos dispone del software propio de medicina humana y no dispone de software específico para animales. Esto nos plantea un inconveniente: debemos delimitar manualmente las regiones anatómicas a medir una vez obtenemos las imágenes. Esto no supone un problema cuando la medición se efectúa en una vértebra lumbar pero si puede serlo a la hora de medir una región concreta del fémur. Para ello tomamos como referencia los extremos caudal y craneal del borde acetabular y el trocánter mayor, y a partir de éstos describimos un área rectangular que abarca la región del cuello femoral. Tomando como referencia este área creamos una plantilla que utilizamos en cada una las mediciones. Una vez salvados todos estos obstáculos efectuamos las mediciones.

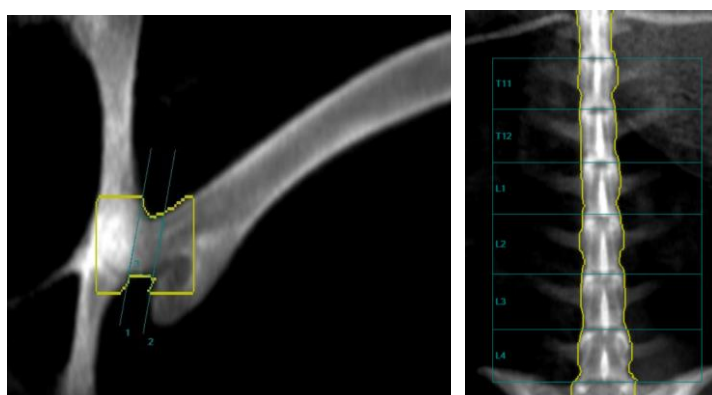


Figura 60. Densitometrías de cuello femoral y columna vertebral

3.6 Obtención, aislamiento, cultivo y diferenciación celular.

3.6.1 Protocolo de obtención de la grasa

La extracción de la grasa se realizó en condiciones de esterilidad. En primer lugar se procedió a anestesiarse a la oveja donante (oveja hembra Assaff de 2 años de edad). Posteriormente se colocó al animal en posición decúbito lateral, se rasuró el flanco lateral derecho y se desinfectó el área quirúrgica mediante lavados sucesivos con alcohol y povidona yodada. Se practicó una incisión vertical de unos 5-10 cm en la región sublumbar derecha situada unos 5 cm cranealmente al aspecto craneal del ala del ilion. Tras seccionar el tejido subcutáneo se extrajeron aproximadamente unos 20 cm³ de grasa que fueron introducidos en un Falcon estéril con suero fisiológico de 50 ml. Durante este procedimiento se empleó material de cirugía general.

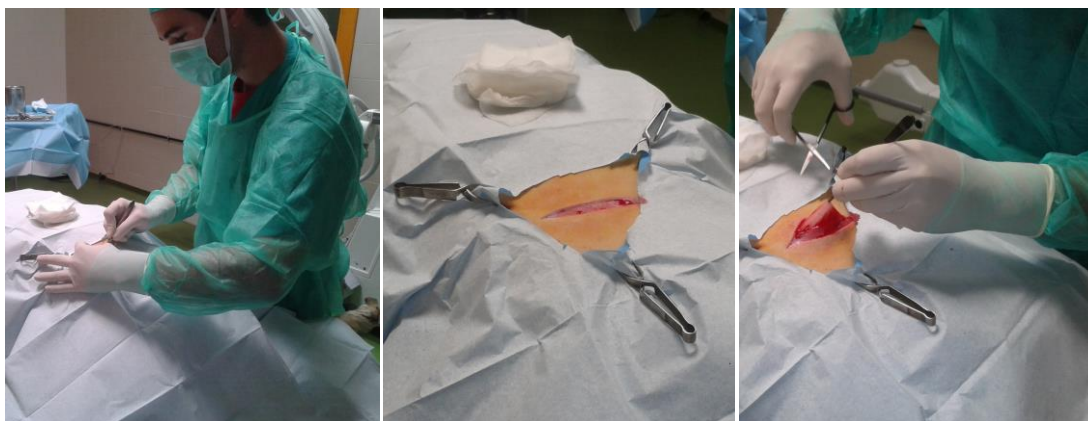


Figura 61. Extracción de la grasa bajo condiciones de esterilidad.

3.6.2 Procesado de la grasa para la obtención de las ADSCs

La grasa fue sometida a lavados sucesivos con suero salino tamponado (PBS, Na_2HPO_4 10 mM, K_2HPO_4 1,7 mM, NaCl 0,14 mM, KCl 2,7 mM) para eliminar el componente sanguíneo en una campana de flujo laminar (Telstar Biostar) y con material estéril para evitar contaminación microbiana.



Figura 62. Campana de flujo laminar.

A continuación la grasa fue troceada en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm². Éstos se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma-Aldrich) y con collagenasa tipo I (0.5% Labclinics) previamente filtrada con filtros de 0.2 μm (Corning). Los fragmentos se trituraron con una pipeta de 5 ml por aspiración-impulsión y se pasaron por cestillas NETWELL. Tras la separación mecánica, para que se dé la digestión

química por la enzima colagenasa se incubó a 37°C en agitación (250 rpm) al menos 35 minutos (MaxQTM 4000 Barstead ®).



Figura 63. Agitador a 37 °C

Tras la incubación los viales se centrifugaron a 1300 rpm (304g) (Allegra 21R Centrifuga, Beckman Coulter) durante 5 minutos a 20°C (para que la grasa no solidifique). Se desechó el sobrenadante y la fracción del estroma vascular se resuspendió en 1 ml de medio completo de cultivo ADSCs. Este medio se compone de DMEM, el cual proporciona los nutrientes necesarios y el equilibrio osmótico de las células, 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), 1% de glutamina (aminoácidos esenciales) (Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal bovino (FSB) (Sigma-Aldrich) que proporciona los factores de crecimiento de las células y 2.5 ng/ml del factor de crecimiento fibroblástico (FGF, Sigma-Aldrich).



Figura 63. Centrífuga Allegra 21R Beckman Coulter

3.6.3 Cultivo primario y expansión de las ADSCs

Las suspensiones celulares obtenidas fueron sembradas en placas de 60 mm añadiendo otros 4 ml de medio completo a una densidad de 30.000 cels/cm², suplementando el medio de expansión de ADMCs con factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF-b) e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda (Thermo Electron Corporation).



Figura 64. Incubador a 37°C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda

Pasadas 48 horas se lavó con PBS para eliminar el componente eritrocitario y se mantuvieron durante 5 días en el mismo medio de cultivo para obtener un crecimiento adecuado. Tras los cuales cada 2-3 días se cambió el medio de cultivo.

Al alcanzar el estado de preconfluencia los cultivos fueron tripsinizados (Tripsina-EDTA-PAA Lab) y se estimó la viabilidad celular mediante Azul Tripán.

Protocolo de tripsinización:

Se aspiró el medio de cultivo con la ayuda de una pipeta serológica. Se realizaron 2 lavados con 1-2 ml de PBS estéril atemperado, se retiró el PBS y se añadió 1 ml de tripsina (Gibco) para despegar las células. Se dejó actuar a la tripsina de 30" a 1' en un incubador a 37°C hasta que las células se hubieran despegado de la placa, comprobándolo con la ayuda del microscopio. Una vez despegadas se recogió todo el volumen de la placa pasándolo a un

Falkon al que se añadió 1 ml de medio de cultivo completo para inactivar la tripsina. Este Falcon se centrifugó durante 10 minutos a 1300 rpm, se desechó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 ml de medio completo. Se sembró en placas de desechar el sobrenadante y resuspender el 100 mm añadiendo más medio y agitando en cruz para evitar que las células quedaran en los bordes de la placa. Se observaron las células usando un microscopio de contraste de fase de Nikon Eclipse TS 100 y se fotografiaron usando el software NIS-Elemento (Nikon).



Figura 65. Microscopio de

contraste de fase

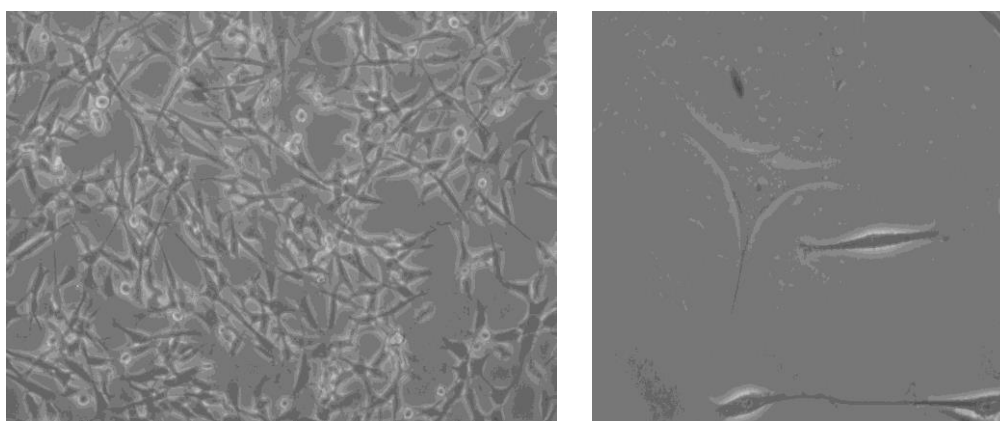


Figura 66. ADMCs de 4 días con un aumento de 10x (izquierda) y de 20x (derecha)

3.6.4 Inducción osteogénica de las ADSCs

Las células obtenidas a partir de cultivos primarios confluentes de ADSCs fueron sembradas en las mismas placas utilizadas previamente y se cultivaron en un medio de expansión para ADSCs hasta que alcanzaron el estado de preconfluencia (7-14 días).

Siguiendo el anterior protocolo de tripsinización se separó la superficie de cultivo y se sembraron en placas de superficie para su expansión *in vitro* con medio de inducción osteogénico DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina, 10 μ M de dexametasona (Sigma-Aldrich), 150 mM

de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich) y 10 mM de B-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich), con la adición durante las primeras 48 horas de BMP2 (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich). Se observaron las células usando un microscopio de contraste de fase de Nikon Eclipse TS 100 y se fotografiaron usando el software NIS-Elemento (Nikon).

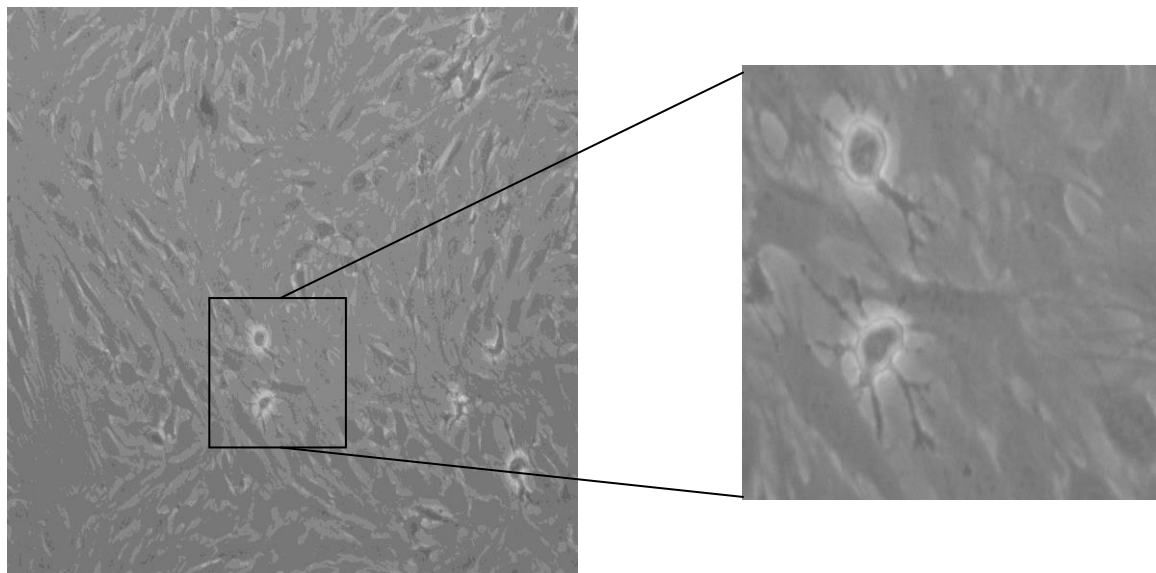


Figura 67. ADSCs diferenciadas a osteocitos (10x). A la derecha inset de los osteocitos.

Se cambió el medio con regularidad en función del estado del mismo y del grado de confluencia y se sembró en 6 placas de Petri cada una para un individuo experimental, conteniendo cada placa un número aproximado de 5 millones de ADSCs.

3.6.5 Obtención del PRP y resuspensión de las células

Previamente a la cirugía se extrajeron de cada oveja 20 ml de sangre de la vena yugular que fueron introducidos en tubos con citrato de sodio al 3,8 %, a partir de los cuales se obtuvieron 4 ml de PRP mediante el siguiente protocolo:

- Primer centrifugado a 2500 rpm durante 15 minutos separando el plasma de los glóbulos rojos.
- Segundo centrifugado de la capa superficial a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener una capa superior de PPP y otra inferior de PRP que es la que se utilizó.
- Los 4 ml de PRP que se obtuvieron por oveja fueron divididos en dos viales de dos mililitros.

A cada uno de los dos viales se les añadió 40 µg BMP-2. Las células se tripsinizaron como anteriormente se ha explicado, se centrifugaron y el pellet de células se resuspendió en uno de

los dos viales con PRP y BMP-2. Se llevaron los viales hasta el quirófano, para ser posteriormente activado el PRP mediante la adición de 0,05 ml de gluconato de calcio al 10% por cada ml de PRP.

3.7 Creación de defectos y colocación de implantes

Distribución de los defectos e implantes

Oveja 1 (G3)

- Extremidad derecha:
 - Defecto fémur membrana PRP+BMP
 - Implante tibial craneal: vacío
 - Implante tibial caudal: PRP + BMP
- Extremidad izquierda:
 - Defecto fémur membrana células+PRP+BMP
 - Implante tibial craneal células+PRP+BMP
 - Implante tibial caudal: células+PRP+BMP

Oveja 2 (G3)

- Extremidad derecha:
 - Defecto fémur membrana PRP+BMP
 - Implante tibial craneal: vacío
 - Implante tibial caudal: PRP+BMP
- Extremidad izquierda:
 - Defecto fémur membrana células+PRP+BMP
 - Implante tibial craneal células+PRP+BMP
 - Implante tibial caudal: células+PRP+BMP

Oveja 3 (G3)

- Extremidad derecha:
 - Defecto fémur membrana: PRP +BMP
 - Implante tibial craneal: PRP + BMP
 - Implante tibial caudal: vacío
- Extremidad izquierda:
 - Defecto fémur membrana: células+PRP+BMP

- Implante tibial craneal células+PRP+BMP
- Implante tibial caudal: células+PRP+BMP

Oveja 4 (G3)

- Extremidad derecha:
 - Defecto fémur membrana PRP +BMP
 - Implante tibial craneal vacío
 - Implante tibial caudal: PRP+BMP
- Extremidad izquierda:
 - Defecto fémur membrana células+PRP+BMP
 - Implante tibial craneal células+PRP+BMP
 - Implante tibial caudal: células+PRP+BMP

Oveja 5 (G3)

- Extremidad derecha:
 - Defecto fémur membrana PRP+BMP
 - Implante tibial craneal: PRP+BMP
 - Implante tibial caudal vacío
- Extremidad izquierda:
 - Defecto fémur membrana células+PRP+BMP
 - Implante tibial craneal células+PRP+BMP
 - Implante tibial caudal: células+PRP+BMP

Oveja 6 (G3)

- Extremidad derecha:
 - Defecto fémur membrana PRP +BMP
 - Implante tibial craneal PRP+BMP
 - Implante tibial caudal: vacío
- Extremidad izquierda:
 - Defecto fémur membrana células+PRP+BMP
 - Implante tibial craneal células+PRP+BMP
 - Implante tibial caudal: células+PRP+BMP

*Nota aclaratoria:

Defecto fémur membrana, PRP+BMP: el defecto se rellenaba con plasma rico en plaquetas con BMP-2 y se cubría con una membrana de colágeno reabsorbible.

Defecto fémur membrana células+PRP+BMP: el defecto se rellenaba con plasma rico en plaquetas con BMP-2 y células madre mesenquimales homólogas procedentes de la grasa de una oveja distinta a la problema de raza Merina y se cubría con una membrana de colágeno reabsorbible.

Implante tibial PRP+BMP: en el orificio del implante se colocaba plasma rico en plaquetas en forma de moco con BMP-2.

Implante tibial vacío, el orificio se rellenaba con el implante sin más, de manera tradicional.

Implante tibial: células+PRP+BMP: en el orificio del implante se colocaban células mesenquimales, plasma rico en plaquetas en forma de moco y BMP-2

3.7.1 Método de la creación de defectos óseos en el cóndilo medial femoral

Incidíamos la piel en la cara medial de la rodilla desde la región metafisaria del fémur hasta la porción distal del tercio proximal de la tibia. Procedíamos a continuación a abrir el tejido subcutáneo y las aponeurosis hasta llegar a la cara medial del cóndilo medial y medial de la tibia.

A continuación creábamos un defecto óseo de 10 mm de diámetro y 10 mm de profundidad con un trépano de esa misma medida y a continuación procedíamos a retirar y a desechar el cilindro óseo.

Posteriormente procedíamos a colocar PRP en caso de la extremidad derecha y PRP más células en la extremidad izquierda. A continuación colocábamos una membrana de colágeno cerrando el defecto y sutura a los tejidos próximos.

En la epífisis tibial instalamos los implantes tal y como se estableció en los grupos. Empezábamos determinando la zona de colocación y en cada una de ellas perforamos con irrigación externa con las fresas, x, y, z y colocamos el implante autoroscante de 4 mm diámetro y 8 mm de longitud. Unos se dejaban vacíos y en otros se introducía o PRP+BMP-2, o PRP+BMP-2+células.



Figura 68. Posicionamiento de la oveja en la mesa quirúrgica, colocación de paños de campo e incisión cutánea en la cara medial del cóndilo femoral.



Figura 69. Trepanación del cóndilo



Figura 70. Elevación del fragmento óseo trepanado.

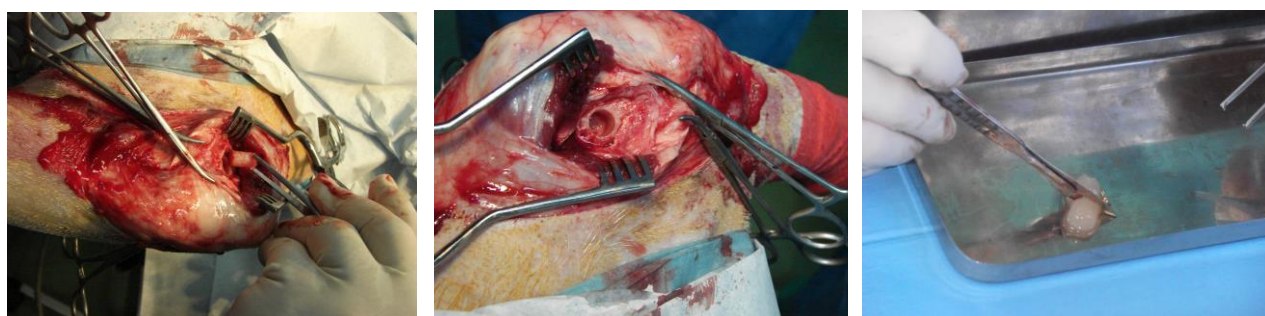


Figura 71. Observesé la forma cilíndrica del fragmento trepanado y la cavidad resultante. En la bandeja se procede a cortar por la mitad el PRP.



Figura 72. Colocación del PRP y situación de la membrana de colágeno en posición.

3.7.2 Método de la colocación de los implantes

En la epífisis tibial instalamos los implantes tal y como se estableció en los grupos. Empezábamos determinando la zona de colocación y en cada una de ellas perforamos con irrigación externa con las fresas, 2,8, 3,3, 3,6 y colocamos el implante autoroscante de 4mm de diámetro y 8 mm de longitud. Unos se dejaban vacíos y en otros se introducía o PRP, o PRP con células.



Figura 73. Abordaje a la cara medial tibial, realización de las dos primeras perforaciones con la fresa de 2.8mm



Figura 74. Fresado con 3.3, 3.6, instalación del implante autoroscante de 4.0 de diámetro y 8 mm de largo. Antes de colocar el implante y en el caso de tener que poner PRP o PRP con células se procedía a su introducción en el agujero prfeporado



Figura 75. Colocación del primer implante y los dos implantes colocados

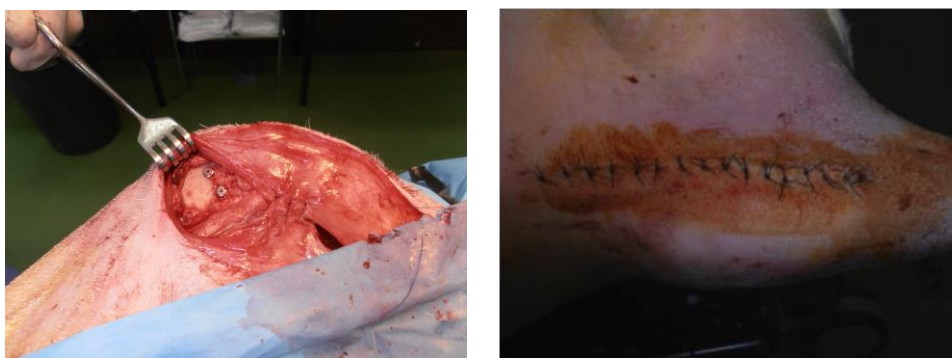


Figura 76. Cierre por planos y sutura cutánea

3.8 Procesado de las muestras y estudio histomorfométrico

3.8.1 Preparación

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la toma de diferentes muestras óseas para su posterior estudio histomorfométrico e histopatológico. En los individuos de los grupos 1 y 2 se extrajeron la epífisis proximal femoral izquierda y la penúltima vertebra lumbar (L6). En los individuos del grupo 3 se extrajeron las epífisis distales de ambos fémures (que incluían los defectos óseos condilares) y la epífisis proximal de ambas tibias (que incluían los implantes de titanio). Una vez extraídas, todas las muestras fueron introducidas en botes con formol al 10% durante un periodo de 24h. Posteriormente se procedió a su procesado, para lo cual se siguió un proceso minucioso utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato que se describen a continuación:

1) Tallado:

De cada pieza ósea se obtuvo 1 bloque de 10 cm de grosor que fue estandarizado para cada tipo de muestra en base a referencias anatómicas, y que incluía los defectos óseos y los implantes de titanio en el caso de las muestras procedentes de los fémures y tibias de los

individuos del grupo 3. Para realizar este paso se utilizó una sierra de banda con refrigeración de agua.



Figura 77. Sierra de banda (Exakt 400, System, Aparatebau GMBH)

2) Deshidratación:

La deshidratación de las muestras supuso el paso previo a la inclusión de las muestras en bloques de metacrilato. Para permitir la entrada del metacrilato en el tejido óseo es fundamental extraer el agua antes. Se procedió a la deshidratación de las muestras en concentraciones crecientes de etanol bajo agitación constante, como se indica a continuación:

- 80 % alcohol durante tres días.
- 96 % alcohol durante tres días.
- 100 % alcohol durante tres días.
- 100 % alcohol durante tres días.



Figura 78. Agitador de vaivén que acoge recipientes con diferentes concentraciones de alcoholes. Las muestras permanecen 3 días en en cada concentración de alcohol.

3) Infiltrado

Durante este paso se procedió a sustituir el alcohol por una concentración creciente de metacrilato. La infiltración plástica se efectuó mezclando glicolmetacrilato (Technovit 7200®, VLC - Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania), con alcohol etílico a distintas concentraciones, finalizando con dos infiltraciones glicolmetacrilato puro. Todos los pasos se realizan bajo agitación constante con la misma máquina utilizada en el paso anterior. El protocolo de infiltración que se siguió fue el siguiente:

- Technovit 7200: alcohol, en proporción 30:70 respectivamente durante un periodo de tres días.
- Technovit 7200: alcohol, en proporción 50:50 respectivamente durante un periodo de tres días.
- Technovit 7200: alcohol, en proporción 70:30 respectivamente durante un periodo de tres días.
- Technovit 7200: alcohol, en proporción 30:70 respectivamente durante un periodo de tres días.
- Technovit 7200 al 100% durante dos pases sucesivos de 3 días cada uno.

4) Inclusión y polimerización

Para llevar a cabo la inclusión se introdujeron las muestras de tejido en unos moldes de polietileno que se llenaron de glicolmetacrilato (Tecnovit 7200®) bajo efecto de vacío, para eliminar las posibles burbujas existentes en el tejido y someterlas a polimerización por luz.

La fotopolimerización tuvo lugar en dos pasos:

- Paso 1: se aplicó una luz de baja intensidad, manteniendo los moldes a una temperatura por debajo de 40° C, para que la resina se polimerizara extensamente. Este estadio duró 4 horas.

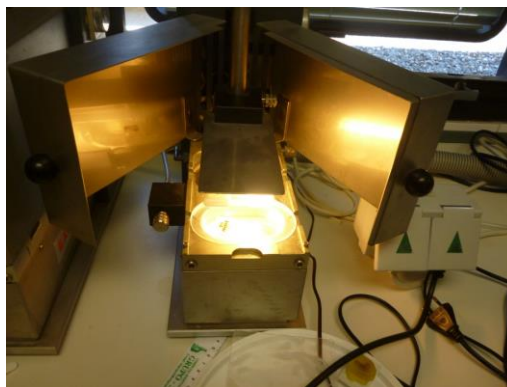


Figura 79. Aplicación de luz blanca para la fotopolimerización inicial.

- Paso 2: se aplicó una luz azul ultravioleta de gran intensidad, de forma que el metacrilato que se encontraba en el interior del tejido terminara completamente polimerizado. Este paso tuvo una duración de 12 horas.

Por último los bloques permanecieron en una estufa a 37 °C durante 24 horas y se procedió a la retirada del molde.

5) Preparación del bloque para obtener una superficie paralela

Los bloques se fijaron a la sierra de banda para realizar el corte seleccionado en cada tipo de muestra. Una vez cortados una de las dos partes se destinó para análisis y la otra se almacenó como muestra de reserva. En el caso de los bloques que contenían implantes se procedió a realizar una radiografía de cada espécimen para ver con claridad el interior de cada muestra y saber por dónde realizar el corte por la mitad de cada implante. En la radiografía se apreciaba con mayor radiopacidad la figura de cada implante, seguido de la silueta del tejido óseo (más radiolúcida que el implante) y pudiendo delimitar también la forma del bloque de metacrilato como la parte más radiolúcida. Este paso sirvió para superponer cada bloque a su radiografía correspondiente y trazar en el mismo una línea con rotulador por el eje longitudinal de cada implante. La línea fue la referencia utilizada para realizar el corte de la muestra.



Figura 80. Bloque fijado a la sierra de banda y listo para ser seccionado

Los semibloques designados para analizar se montaron en una primera lámina acrílica provisional (porta) que se adhirió con una resina (Technovit 4000® - Heraus Kulzer GMBH) y permite utilizar la muestra en la siguiente fase de preparación.

6) Preparación de la superficie de interés

La superficie de interés mostraba irregularidades y poros, por lo que el siguiente paso consistió en el pulido de la muestra con una máquina de pulido (Exakt-Micro Grinding System®, Aparatbau GMBH) a la que se acoplan lijas paños de pulido abrasivas de distintos granos. La superficie se sometió a un micropulido con lijas de carburo de silicio de grosor de grano 800, 1200, 2400 y 4000, empleando refrigeración por agua hasta que la superficie estuvo preparada.



Figura 81. Máquina de pulido con refrigeración de agua. En la base tiene un disco al que se le acoplan las lijas de distinto grano. En el centro existe un espacio donde el porta provisional queda fijado, dejando la superficie de la muestra de cara a las lijas.

Una vez pulida la superficie de interés, para eliminar los orificios correspondientes a burbujas de aire que pudieran existir en la superficie, se realizó una reinfiltración. Para ello se sumergió la superficie de la muestra en glicolmetacrilato (Technovit 7200®) y se colocó en una

máquina de vacío para extraer las posibles burbujas retenidas en el interior de la muestra sustituyéndolas por resina. Una vez que las burbujas hubieron desaparecido, manteniendo el efecto de vacío, se procedieron a polimerizar de nuevo con luz azul durante 3 horas y a continuación se mantuvieron 24h en estufa para que la resina terminase de endurecerse.

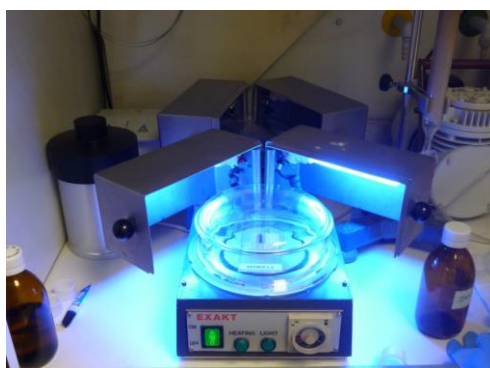


Figura 82. Máquina de vacío con luz azul (Exakt 530, System, Aparatebau GMBH).

Tras volver a preparar la superficie de la muestra en la máquina de pulido (repitiendo el paso anterior), la superficie de la muestra se adhirió a un segundo porta (definitivo) con resina fotopolimerizable (Technovit 7210® - Heraeus Kulzer GMBH) mediante el empleo de una prensa de fotopegado (Exakt 402). La fotopolimerización se activó con luz ultravioleta. Una vez fijada la muestra al portaobjetos definitivo, mediante una sierra de banda conectada a un micrómetro, se procedió a realizar un corte en el bloque a unas 200-300 micras de distancia del porta definitivo, obteniéndose como resultado un portaobjetos con una muestra de aproximadamente 250 micras. A la muestra obtenida tras el corte se aplicaron paños de pulido de distintos grosores para rebajar su grosor hasta aproximadamente 60µm.

7) Tinciones

Las muestras con la superficie pulida y tratada fueron sometidas a un proceso de tinción con el método de Levai Laczó para su posterior análisis en el microscopio.

Tabla 11. Protocolo de la tinción de Lévai Laczcó.

TINCIÓN DE LÉVAI LACZCÓ					
Procedimiento: 1. Inmersión en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% durante 5 minutos con movimiento constante. 2. Lavado con agua destilada dos veces. 3. Inmersión en Ácido acético (CH_3COOH) al 5% durante 1 minuto. 4. Lavado con agua destilada dos veces. 5. Inmersión en la solución A durante 20 minutos 6. Lavado con agua destilada dos veces 7. Inmersión en la solución B durante 5 segundos. Los cortes se deben sumergir individualmente en esta tinción. 8. Lavado con agua destilada y secado.					
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Materiales</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2"> * Las soluciones deben ser filtradas antes de su uso. <u>Solución A:</u> Azur II al 1% en agua destilada. Azul de metileno al 1% en agua destilada. Na_2CO_3 al 1% en agua destilada. *Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na_2CO_3 (1%). <u>Solución B:</u> Pararosanilina al 1% en agua destilada. </td></tr> </tbody> </table>		Materiales		* Las soluciones deben ser filtradas antes de su uso. <u>Solución A:</u> Azur II al 1% en agua destilada. Azul de metileno al 1% en agua destilada. Na_2CO_3 al 1% en agua destilada. *Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na_2CO_3 (1%). <u>Solución B:</u> Pararosanilina al 1% en agua destilada.	
Materiales					
* Las soluciones deben ser filtradas antes de su uso. <u>Solución A:</u> Azur II al 1% en agua destilada. Azul de metileno al 1% en agua destilada. Na_2CO_3 al 1% en agua destilada. *Una parte de Azur II con una parte de azul de metileno y dos partes de Na_2CO_3 (1%). <u>Solución B:</u> Pararosanilina al 1% en agua destilada.					

8) Descripción de la técnica histométrica.

Las preparaciones se fotografiaron utilizando una cámara digital a 40 aumentos empleando un microscopio óptico motorizado (BX51, Olympus, Japón). Dichas fotografías son combinadas por un programa informático (Cell Sens Dimensions, Olympus, Japón) para obtener imágenes de alta resolución de toda la muestra en su conjunto y con el que se efectuaron las mediciones ayudados de una tableta digitalizadora (Intuos 4 large, Wacom, Saitama, Japón).

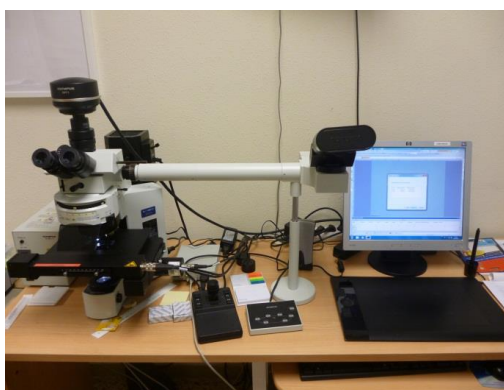


Figura 83. Microscopio óptico acoplado a un sistema informático.

En este estudio se realizaron varios tipos de medidas:

A nivel de los implantes: porcentaje de integración (también conocido como porcentaje de contacto óseo o “BIC”) y densidad de hueso perimplantaria (BAP/TA; BAP = área de hueso perimplantaria, TA = área total) e interrosca (BAI/TA; BAI = área de hueso interrosca, TA = área total). El contacto hueso implante (BIC) se definió como la longitud de hueso en contacto directo con la superficie del implante en relación al perímetro total del implante empezando desde el hombro del implante hasta la rosca más apical. Debido a que en muchas ocasiones el implante no estaba más que parcialmente cubierto de hueso se utilizó también el término “contacto hueso implante cortical” (BICc) como la misma medición que la anterior, pero eliminando las zonas del implante que no están en la región cortical del hueso en sus porciones coronal y apical.

A nivel de los defectos: dentro del área del defecto se calculó la BA (“Bone Area” o área total de hueso), la TA (“Total Area” o área total del defecto) y el porcentaje BA/TA (que es equivalente al porcentaje de regeneración).

En las preparaciones de cuello femoral y vértebra lumbar: dentro de la sección de la muestra de hueso se calculó la BA (“Bone Area” o área total de hueso), la TA (“Total Area” o área total de la sección) y el porcentaje BA/TA que corresponde al porcentaje de superficie ósea dentro de la muestra.

4. MANEJO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los resultados aparecen expresados como media $\pm$ SD. Para el estudio de las BA/TA de los defectos se realizó una t de Student pareada y no pareada. En el caso de los implantes, las mediciones histomorfométricas y las densitometrías se realizó un ANOVA de una vía con Holm-Sidak. El intervalo de confianza establecido fue del 95% y se realizó con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA).

5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Como todo procedimiento experimental, este estudio no está exento de limitaciones. La principal limitación de este estudio fue la utilización de un número reducido de animales. Por un lado esto supuso que no se hayan podido probar un mayor número de terapias de regeneración y osteointegración ósea, ya que el número de defectos a realizar e implantes a colocar en cada animal es limitado, y que algunos de los resultados no hayan presentado diferencias estadísticamente significativas, que posiblemente con una mayor potencia estadística, si hubieran existido. No obstante hemos de considerar que la tendencia actual dentro la utilización de animales de experimentación es utilizar el menor número de animales posible para llevar a cabo estudios científicos (regla de las 3 R) y que tampoco es ético utilizar números de individuos excesivamente grandes.

En cuanto a la utilización de células madre mesénquimales homólogas, podría haber tenido interés la realización de estudios inmunológicos para detectar respuestas de rechazo. Sin embargo, basándonos en la bibliografía existente no se describen este tipo de reacciones al emplear células madre mesénquimales heterólogas entre distintos individuos de la especie ovina. Además su utilización hubiera aumentado considerablemente los costes del estudio.

En los individuos del grupo 3 no se efectuaron estudios histomorfométricos a nivel de los cuerpos vertebrales y cuellos femorales. Sin embargo, una vez validado el modelo mediante la utilización de la técnica densitométrica se consideraron prescindibles y hubieran supuesto una pérdida de dinero y tiempo considerable. Por el contrario si que se efectuaron a nivel de los defectos óseos e implantes para poder valorar la regeneración ósea y el grado de osteointegración.

VI. RESULTADOS

1. DENSITOMETRÍA ÓSEA

Tabla 12. Valores densitométricos obtenidos en los tres grupos

	DMO ₀ CF (g/cm ²) ± SD	DMO ₀ VL (g/cm ²) ± SD	DMO _{5m} CF (g/cm ²) ± SD	DMO _{5m} VL (g/cm ²) ± SD	DMO _{9m} CF (g/cm ²) ± SD	DMO _{9m} VL (g/cm ²) ± SD
Grupo 1 (n=6)	1,09±0,08	1,476 ±0,08				
Grupo 2 (n=6)	0,997±0,10	1,39 ±0,08	0,546 ±0,05	0,938±0,11		
Grupo 3 (n=6)	1,023±0,08	1,421 ±0,05	0,586 ±0,06	1,00±0,06	0,728±0,06	1,123±0,06

	ΔDMO _{5meses} CF % ± SD	ΔDMO _{5meses} VL % ± SD	ΔDMO _{9meses} CF % ± SD	ΔDMO _{9meses} VL % ± SD
Grupo 2 (n=6)	45,174±2,26	32,711±4,90		
Grupo 3 (n=6)	42,732±1,68	29,304±2,25	28,828±2,91	21,007±2,27

	ΔDMO ₀ CF (g/cm ²) ± SD	ΔDMO ₀ VL (g/cm ²) ± SD
Grupo 1+2+3 (n=18)	1,036±0,047	1,429±0,043

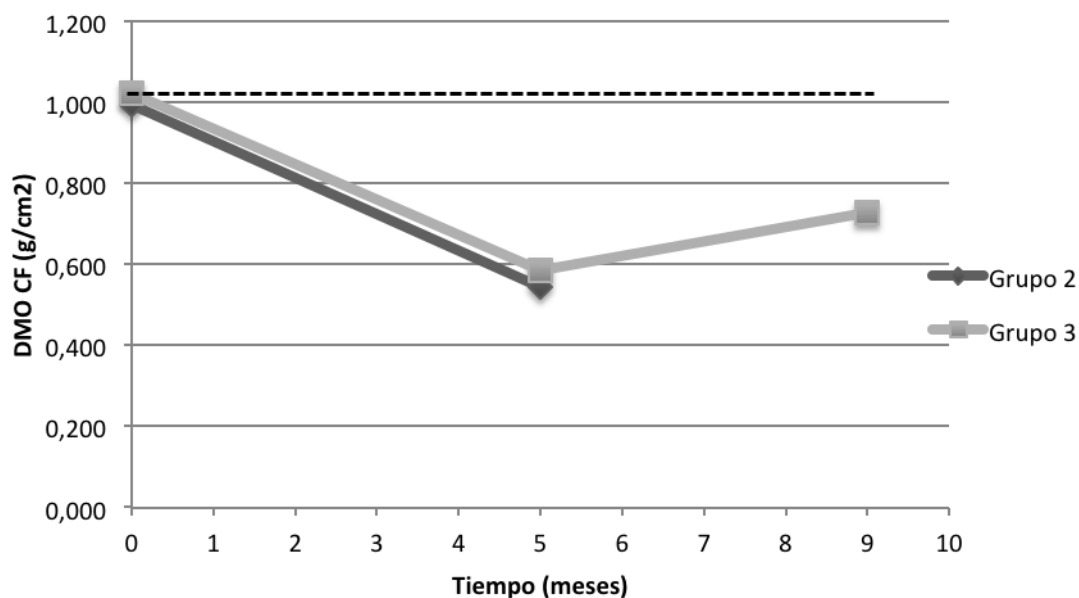


Figura 84. Evolución en el tiempo de los valores de DMO a nivel del Cuello Femoral (CF) en los individuos de los grupos 2 y 3. La línea discontinua indica el valor medio inicial de DMO a nivel del CF de los individuos de los tres grupos.

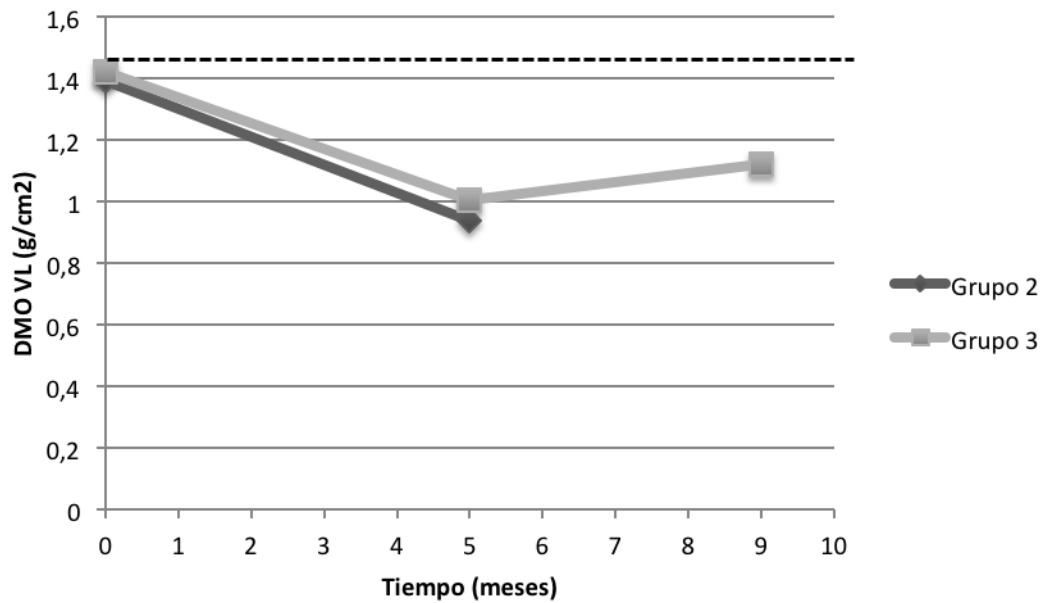


Figura 85. Evolución en el tiempo de los valores de DMO a nivel de las Vértabras Lumbares (VL) en los individuos de los grupos 2 y 3. La línea discontinua indica el valor medio inicial de DMO a nivel del VL de los individuos de los tres grupos.

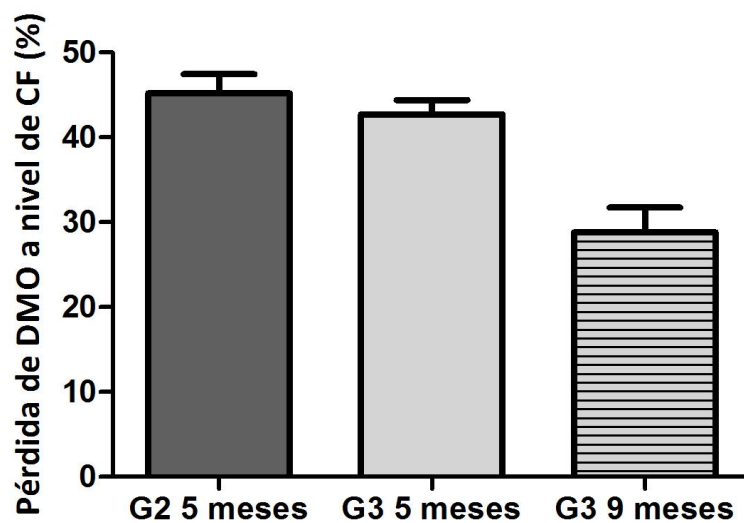


Figura 86. . Porcentaje de pérdida de densidad mineral ósea a nivel del cuello femoral en los individuos de los grupos dos y tres.

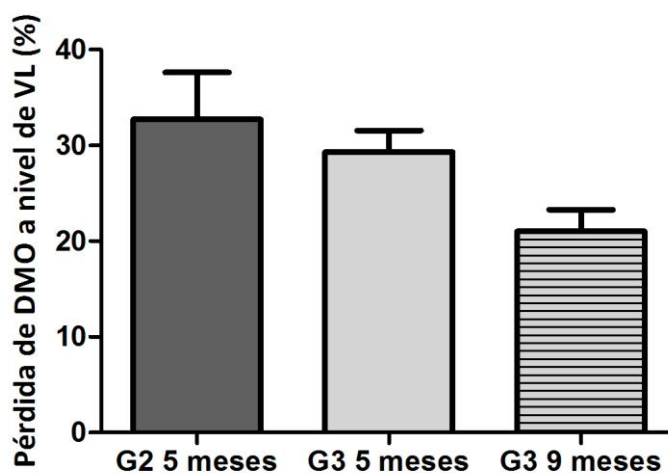


Figura 87. Porcentaje de pérdida de densidad mineral ósea a nivel de las vértebras lumbares en los individuos de los grupos dos y tres.

2. HISTOMORFOMETRÍA ÓSEA

2.1 Regeneración de defectos óseos

Tabla 13. Valores de BA/TA a nivel de los defectos femorales tratados con PRP y BMP-2 con y sin células.

DEFECTOS CON CÉLULAS +PRP+BMP-2			
Oveja	TA (m ²)	BA (m ²)	BA/TA (%)
1	49416689,09	16726512,72	33,85
2	67399741,77	6622537,61	9,83
3	83088200,70	16167103,77	19,46
4	78107335,10	19178146,64	24,55
5	78391078,82	14000759,02	17,86
6	82551489,57	8913551,32	10,80
			19,392 ± 8,980

DEFECTOS CON PRP+BMP-2			
Oveja	TA (m ²)	BA (m ²)	BA/TA (%)
1	70093930,81	11266284,19	16,07
2	46670305,97	15720567,36	33,68
3	86738662,13	4086356,60	4,71
4	59983672,42	24149081,29	40,26
5	80708071,19	31030765,50	38,45
6	88998896,91	20155587,03	22,65
			25,970 ± 14,003

BA: "Bone Area" o área total de hueso, TA: "Total Area" o área total del defecto y porcentaje BA/TA, equivalente al porcentaje de regeneración.

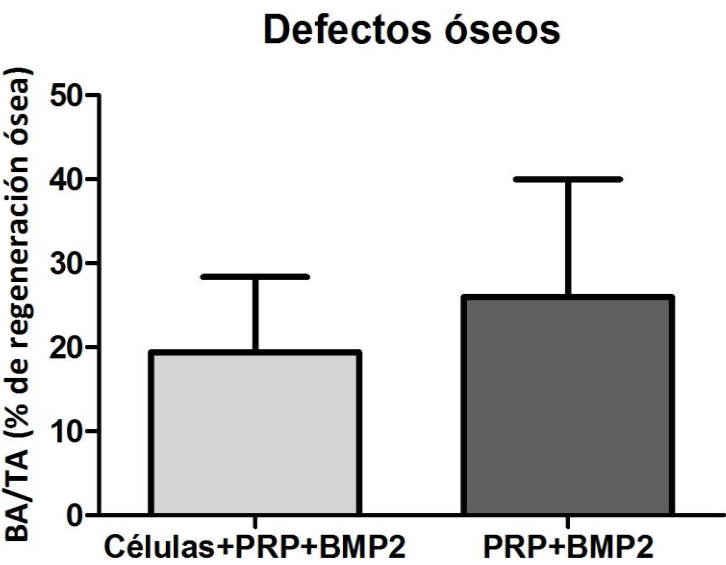


Figura 88. Porcentajes de BA/TA a nivel de los defectos femorales tratados con PRP y BMP-2 con y sin células.

2.2 Osteointegración de implantes

Tabla 14. Valores de diferentes parámetros de osteointegración de implantes sometidos a diferentes tratamientos.

SÓLO IMPLANTES						
Oveja	BAI/TAnew	BAP/TAnew	BAI/TA	BAP/TA	BIC (%)	BICc (%)
1	7,33	16,62	11,36	24,91	33,15	80,05
2	32,13	39,72	40,29	56,50	44,98	65,50
3	6,03	13,77	11,34	25,97	28,31	60,56
4	2,93	8,20	9,84	25,06	44,87	72,55
5	16,89	27,97	27,13	42,23	33,88	52,72
6	12,85	18,55	19,12	34,75	31,32	70,65
					36,085 ± 7,112	67,005 ± 9,613

IMPLANTES CON PRP + BMP-2						
Oveja	BAI/Tanew	BAP/Tanew	BAI/Ta	BAP/Ta	BIC (%)	BICcortic (%)
1	21,76	26,07	27,66	44,91	43,07	79,65
2	42,52	52,24	50,47	66,15	43,80	59,14
3	8,10	14,01	12,81	28,07	31,45	69,73
4	37,13	34,08	47,00	65,40	58,13	76,17
5	24,66	31,48	33,82	41,90	29,07	45,96
6	10,71	19,30	14,35	31,74	30,87	70,83
					39,398± 11,192	66,913± 12,415

IMPLANTES CON CÉLULAS + PRP + BMP-2						
Oveja	BAI/Tanew	BAP/Tanew	BAI/Ta	BAP/Ta	BIC (%)	BICc (%)
1	19,46	33,55	27,28	42,64	27,76	59,45
2	37,07	42,21	44,95	56,71	46,66	51,05
3	5,51	21,17	10,59	25,86	18,67	11,07
4	0,52	14,62	6,06	19,42	4,97	12,13
5	3,14	10,50	8,90	16,35	11,34	25,95
6	7,48	21,25	18,56	34,72	13,31	27,58
7	12,42	28,19	24,36	42,77	23,05	46,80
8	1,36	16,30	10,13	20,04	1,57	8,10
9	8,50	21,36	33,40	27,76	1,52	4,09
10	28,99	44,19	36,00	50,87	8,10	13,59
					15,695 ± 14,005	25,981 ± 19,864

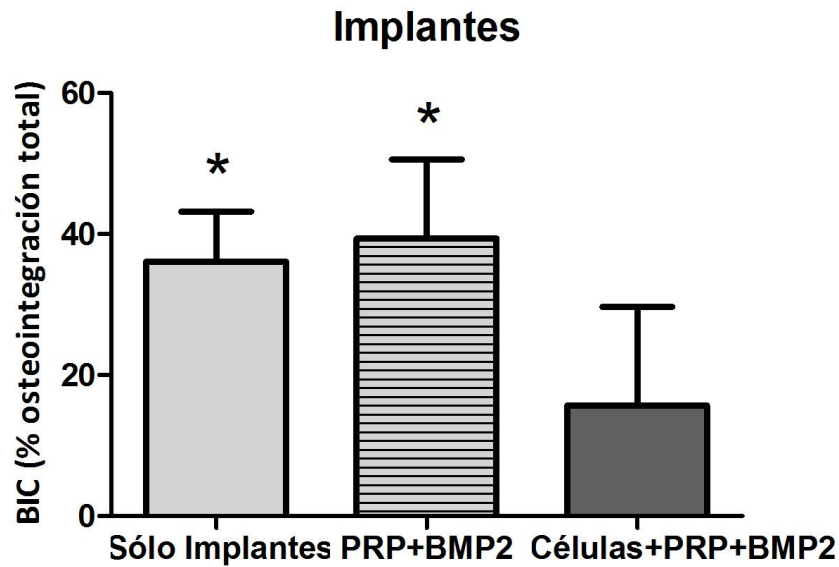


Figura 89. Porcentajes de osteointegración obtenidos en implantes sometidos a diferentes tratamientos. * representa diferencias significativas al comparar el porcentaje de osteointegración ósea total de los implantes sólo y el de los implantes con PRP y BMP-2 con el porcentaje de osteointegración ósea total de los implantes con células, PRP y BMP-2 ($p < 0.05$).

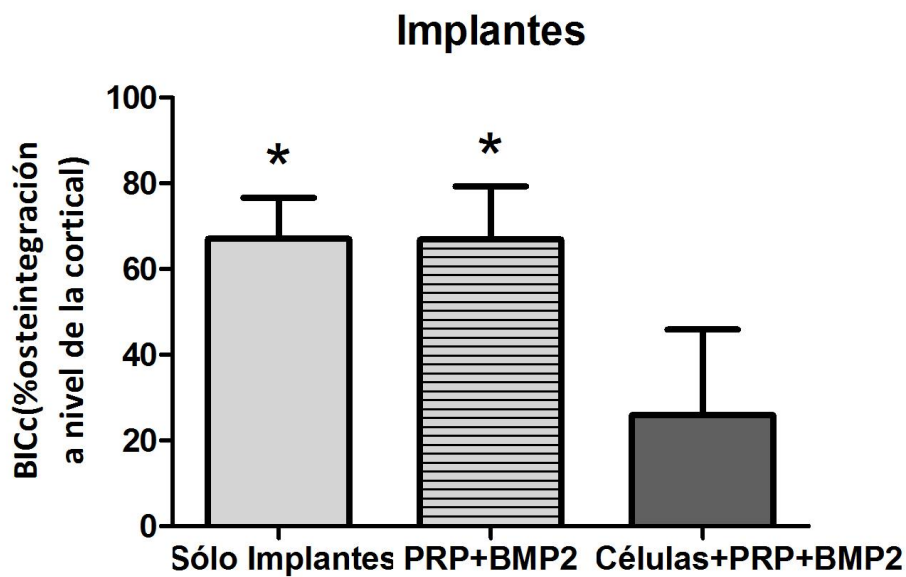


Figura 90. Porcentajes de osteointegración a nivel de la cortical obtenidos en implantes sometidos a diferentes tratamientos. * representa diferencias significativas al comparar el porcentaje de osteointegración ósea a nivel de la cortical de los implantes sólo y el de los implantes con PRP y BMP-2 con el porcentaje de osteointegración ósea a nivel de la cortical de los implantes con células, PRP y BMP-2 ($p < 0.05$).

2.3 Medidas a nivel del cuello femoral y vértebra lumbar

	Oveja	BA/TA Cuello Femoral	BA/TA Vértebra Lumbar
Control (Grupo 1)	1	27,81	36,25
	2	29,91	49,87
	3	35,06	43,44
	4	23,25	33,52
	5	28,75	46,42
	6	31,02	45,22
		29,3 ± 3,88	42,453 ± 6,28
Osteoporótico (Grupo 2)	1	16,04	23,64
	2	20,44	27,10
	3	18,17	24,63
	4	17,92	21,44
	5	15,25	16,52
	6	17,69	20,92
		17,585 ± 1,814	22,375 ± 3,640

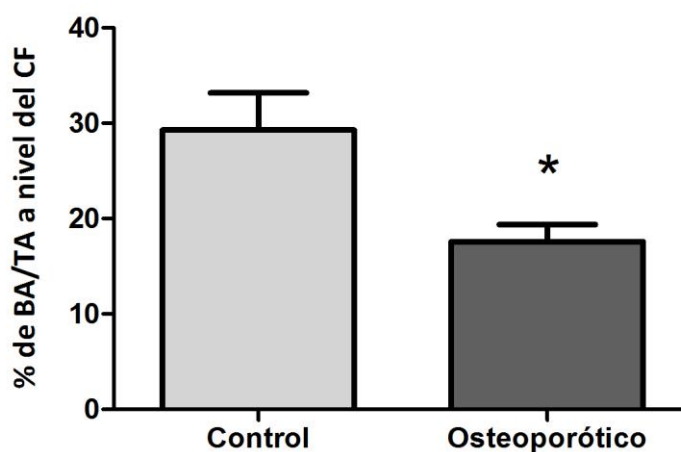


Figura 91. Porcentaje de BA/TA de los grupos 1 y 2 a nivel del cuello femoral. * representa diferencias significativas al comparar el porcentaje de BA/TA ósea a nivel del cuello femoral del grupo control con el del grupo osteoporótico ($p < 0.05$).

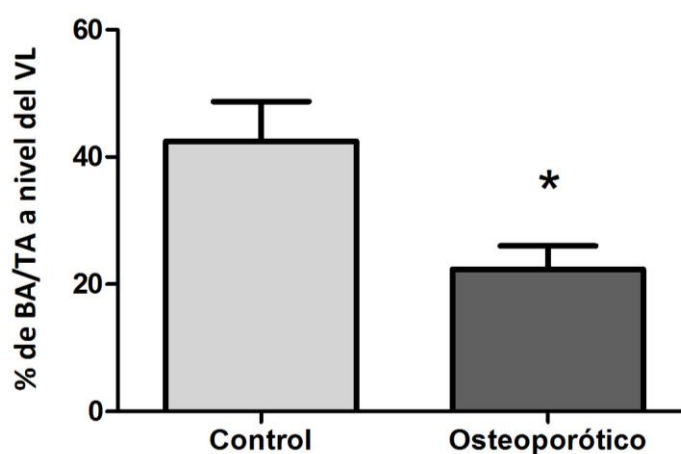


Figura 92. Porcentaje de BA/TA de los grupos 1 y 2 a nivel de las vértebras lumbares. * representa diferencias significativas al comparar el porcentaje de BA/TA ósea a nivel de las vértebras lumbares del grupo control con el del grupo osteoporótico ($p < 0.05$).

2.4 Hallagos histológicos

2.4.1 Hueso cortical y trabecular normal y osteoporótico

Macroscópicamente a la sección transversal de las piezas óseas procedentes de vértebras lumbares y cuellos femorales podemos observar dos zonas bien diferenciadas, una más externa correspondiente a hueso compacto o cortical y otra más interna que presenta una malla reticular que conforma el hueso trabecular, cuyas cavidades presentan médula ósea en su interior.

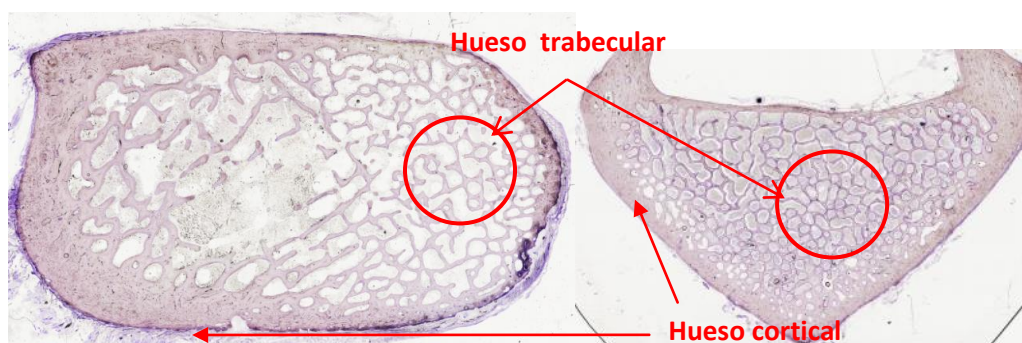


Figura 93. Hueso compacto y trabecular a nivel de los cortes histológicos de un cuello femoral (izda) y de un cuerpo vertebral (dcha).

El tejido óseo cortical, carece de cavidades vasculares, ya que su matriz extracelular se ordena en laminillas óseas, que se pueden disponer de manera paralela (hueso cortical laminar) o de manera concéntrica alrededor de un canal (hueso compacto de tipo osteónico). A través de dichos canales discurren vasos sanguíneos y nervios, y junto con las laminillas óseas concéntricas y los osteocitos, dispuestos entre las laminillas, forman un conjunto denominado “osteona” o sistema de Havers. Los canales de Havers de osteonas cercanas están conectados mediante canales transversales denominados canales de Volkmann. Del orden de 4 a 20 laminillas óseas se disponen alrededor de un canal de Havers. Los osteocitos se encuentran en unos huecos localizados en las laminillas óseas denominados lagunas. De estas lagunas salen pequeños conductos denominados canalículos por donde los osteocitos emiten prolongaciones celulares. Los canalículos se abren directamente a los canales de Havers.

El tejido cortical óseo encierra en su interior al hueso esponjoso o trabecular. Este está formado por septos o trabéculas óseas de gran grosor, que forman un fuerte entramado, que le confiere gran resistencia. Éstas se conectan entre sí y con la cara interna de las corticales óseas. Presentan grandes espacios denominados cavidades vasculares, ocupados por vasos sanguíneos y médula ósea. La superficie de las trabéculas aparece tapizada por el endostio que

tiene capacidad osteogénica. Las trabéculas óseas están formadas por fibras de colágeno pueden estar dispuestas de manera entrecruzada (hueso trabecular no laminar) o bien ordenadas en laminillas óseas (hueso trabecular laminar) sobre las que se deposita en calcio en forma de cristales de hidroxiapatita.

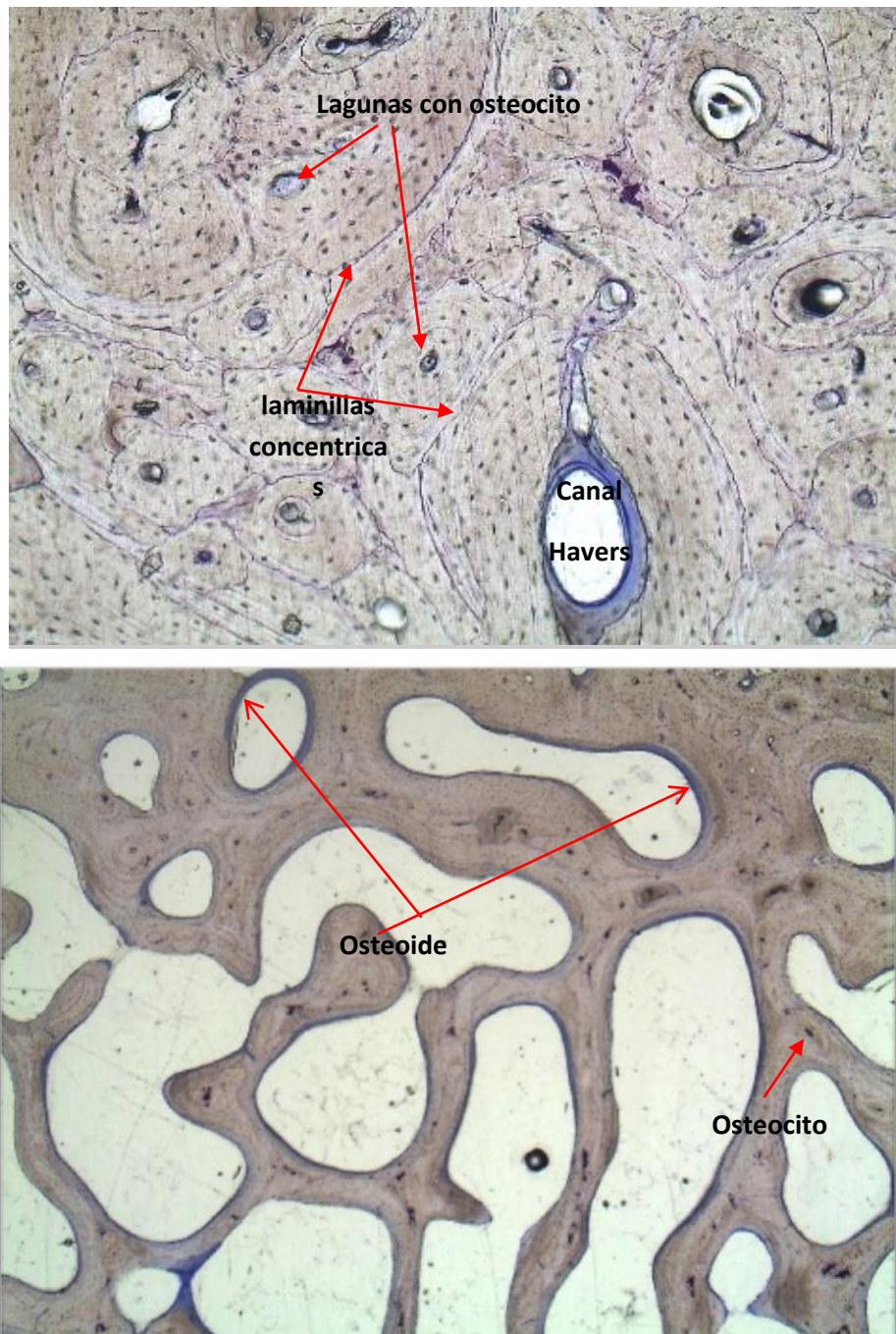


Figura 94. Aspecto microscópico de hueso trabecular y cortical en condiciones no patológicas.

El estudio de las muestras de los animales en los que se indujo la condición osteoporótica revela una disminución evidente del grosor cortical y trabecular, con respecto a las muestras de los animales del grupo control. Así mismo se puede observar una disminución del número trabecular y un aumento de separación entre las mismas.

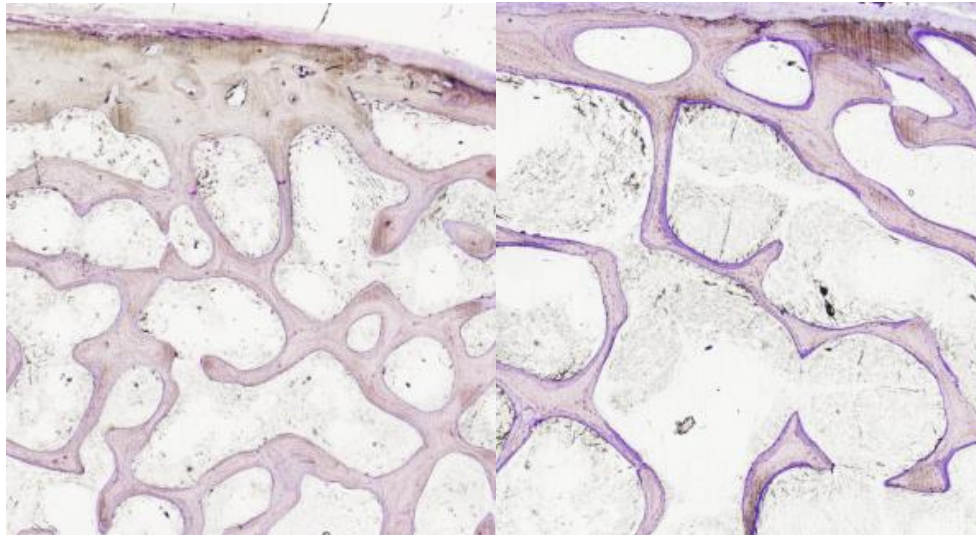


Figura 95. Hueso trabecular y cortical en condiciones no patológicas (izda) y en condiciones osteoporóticas (dcha).

A nivel microscópico llama la atención la disminución de la superficie de osteoide y de densidad osteocítica. Por el contrario se observa un aumento de las zonas de erosión y aumento de las lagunas osteocíticas vacías.

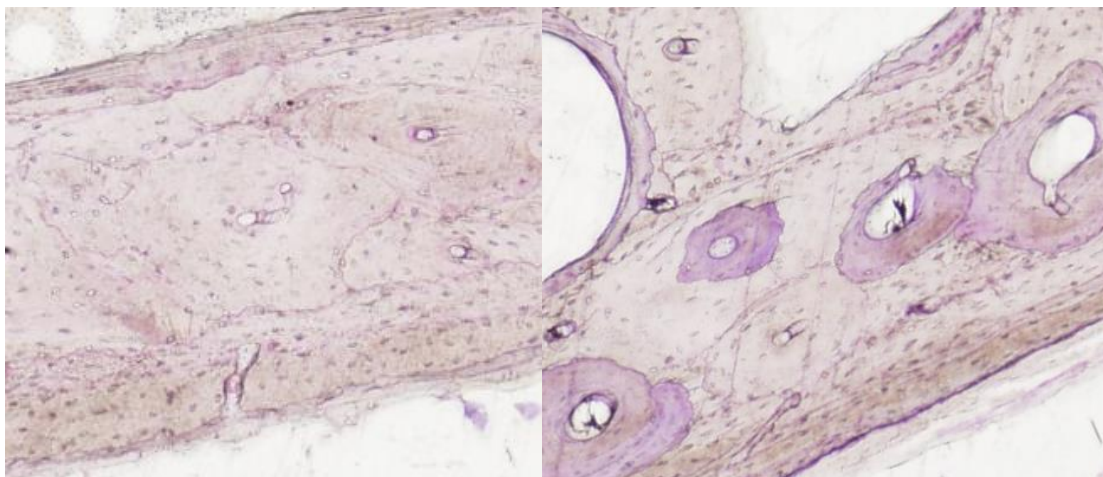


Figura 96. Aspecto microscópico de hueso cortical en condiciones no patológicas (izda) y en condiciones osteoporóticas (dcha).

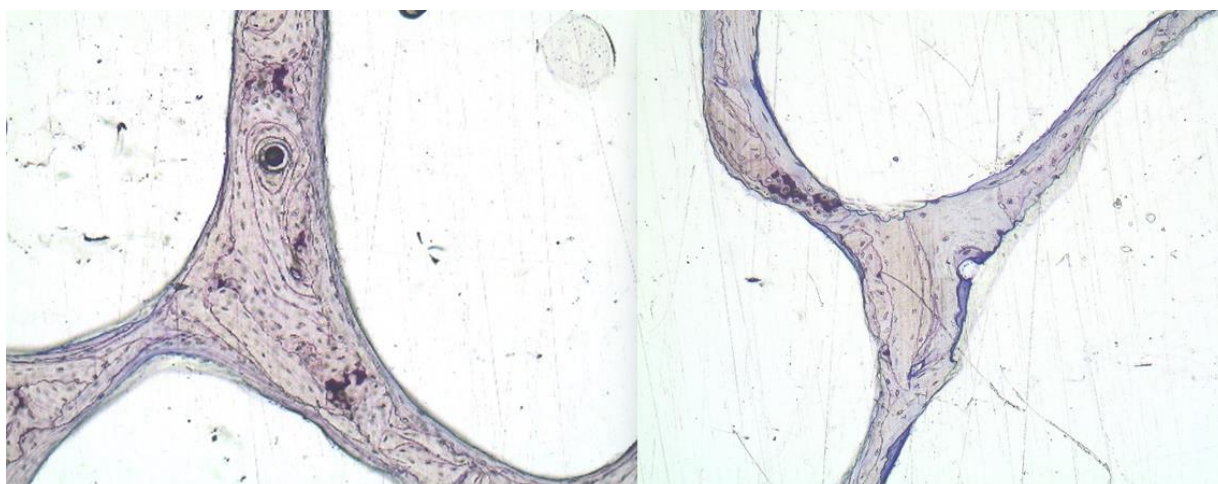


Figura 97. Aspecto microscópico de hueso trabecular en condiciones no patológicas (izda) y en condiciones osteoporóticas (dcha).

2.4.2 Defectos femorales

A nivel de los defectos los resultados de regeneración ósea obtenidos a partir de la aplicación de las células madre, han sido dispares, presentando en dos ovejas mejores resultados con células y en cuatro sin células. Puesto que algunas ovejas presentaban un grado mayor de osteoporosis, nos hemos planteado la posibilidad de que éste pudiera influir en los resultados. De los 6 animales en los que se indujo la osteoporosis mediante la ovariectomía bilateral, la administración de corticoterapia y una dieta específica baja en calcio y vitamina D durante un período de 5 meses podemos comparar la densidad ósea tanto en las vértebras lumbares como en el cuello del fémur en la fase inicial y la previa a la cirugía, momento en el cual vamos a estudiar el proceso de osificación en estos animales osteoporóticos. Con el fin de agrupar a los animales, consideraremos la densidad ósea en las vértebras lumbares como criterio a considerar, así realizamos tres grupos:

- Grupo 1: con grado menor de osteoporosis.
- Grupo 2: con grado intermedio de osteoporosis.
- Grupo 3: con un grado mayor de osteoporosis.

Grupo	Oveja	DMO inicial	DMO previa a la cirugía(g/cm2)
Vértebrae lumbares			
1	7008	1,481	1,091
1	46741	1,458	1,052
2	46747	1,457	1,032
2	35879	1,418	1,012
3	7003	1,362	0,932
3	46742	1,351	0,915
Cuellos femorales			
1	7008	1,137	0,671
1	46741	1,089	0,642
2	46747	1,031	0,589
2	35879	1,01	0,561
3	7003	0,943	0,546
3	46742	0,928	0,511

Defectos tratados con PRP y BMP-2

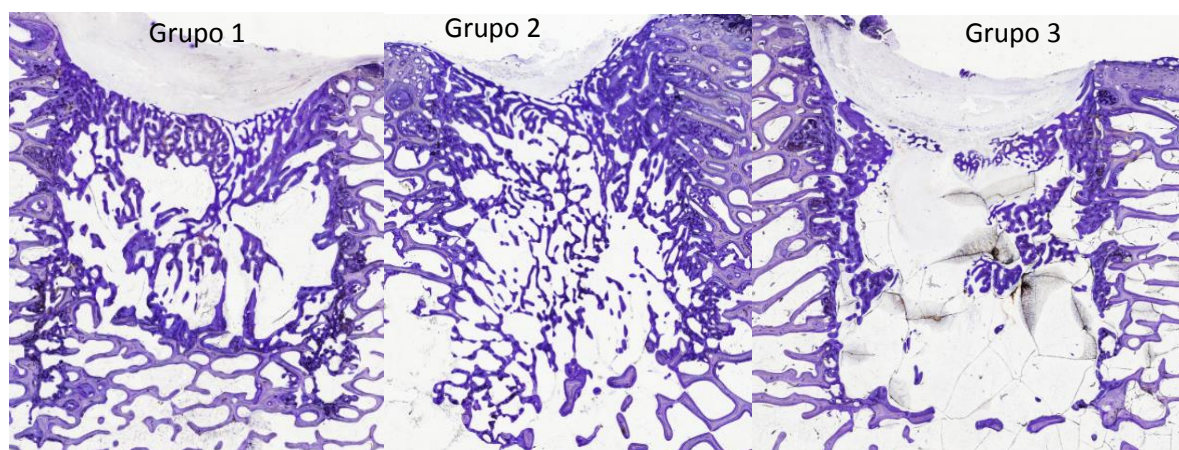


Figura 98

En la Figura 9 podemos observar la reorganización del defecto óseo a los 2 meses postcirugía, en la extremidad derecha con el empleo de PRP y BMP en los distintos grupos. Se aprecia un claro retraso en la osteointegración del defecto, más evidente en los grupos 2 y 3 con un mayor índice de osteoporosis. El hueso cortical en el grupo 1, presenta un defecto en fase de organización (Figura 98) en el que podemos diferenciar dos zonas A y B donde apreciamos componentes celulares y de matriz extracelulares diferentes (Figura 99).

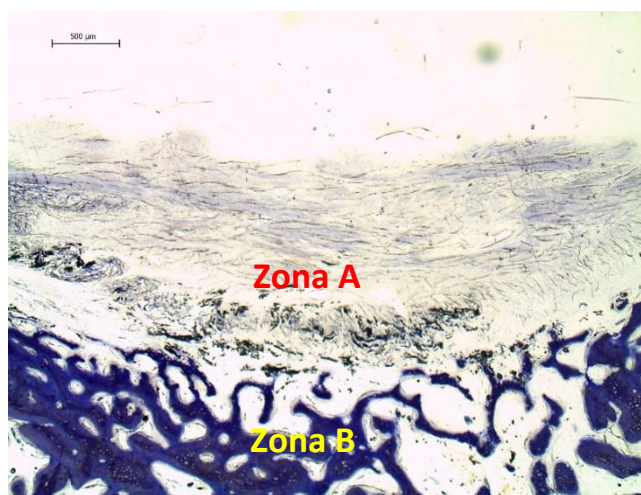


Figura 99

La zona A se caracteriza por un coágulo organizado en la zona superficial, con abundante entramado de fibrina (Figura 100) entre la que se observan glóbulos rojos, algunos neutrófilos y sobre todo células redondas, principalmente linfocitos y macrófagos, muchos de ellos cargados con hemosiderina (Figura 100). En la zona B, se aprecia una reacción perióstica marcada por una fibrosis e inicio de una osificación endocondral desde el borde del defecto como parte de la respuesta (Figura 101).

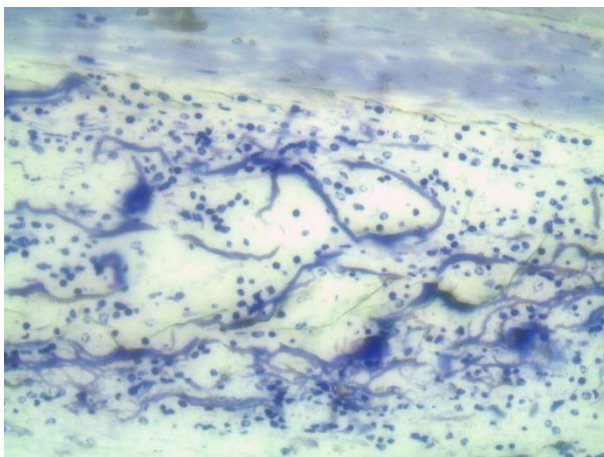


Figura 101

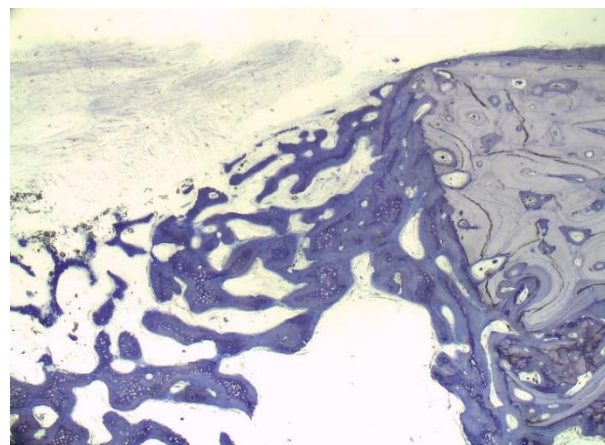


Figura 100

De forma progresiva, desde la zona perióstica y de desde la zona subyacente al coágulo, se produce una proliferación de células mesenquimales fusiformes, con núcleo oval y citoplasma basófilo que se asocia a una mayor presencia de tejido conjuntivo fibrilar, colágeno (Figura 102 flecha). A partir de aquí, bien por el crecimiento expansivo del cartílago del desde el borde del defecto o bien por diferenciación de las células mesenquimales a cartílago, se

producen unos crecimientos que terminan por cerrar el defecto, al menos de forma superficial (Figura 101).

Figura 102



Esta imagen se puede apreciar tanto en los animales del grupo 1 como del 2, en este último el cierre no es tan completo y no se extiende a la totalidad del defecto como se observa en el grupo 1. Además en grupo 1, el defecto se rellena con cartílago hialino, el cual se remodela con el inicio de una osificación intramembranosa con el depósito de un tejido óseo esponjoso primario (flechas) que comienza una remodelación osteonal (Figura 103).

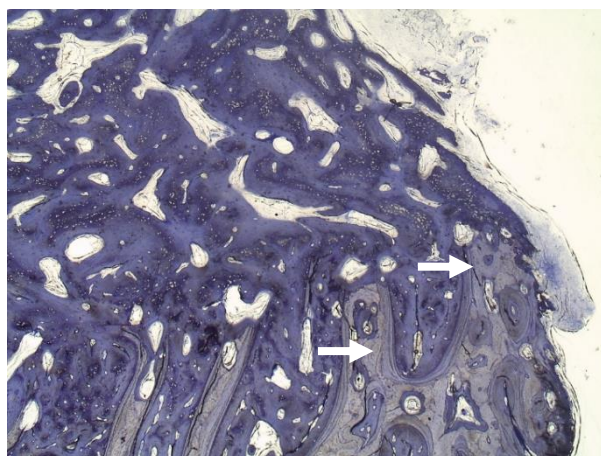


Figura 103

El grupo 3 presenta un retraso evidente de la reorganización del defecto sin cierre del mismo. Todavía quedan restos de la organización del coágulo, que consisten en focos de hemosiderófagos entremezclados con la trama fibrilar del tejido conjuntivo (colágeno fibrilar maduro) (Figura 104 – flecha roja). Hay pequeños focos de osificación endocondral dispersos, asociados a la reacción perióstica, con tabiques de escasas micras de grosor. El resto corresponde con proliferación mesenquimal que rellena el defecto.

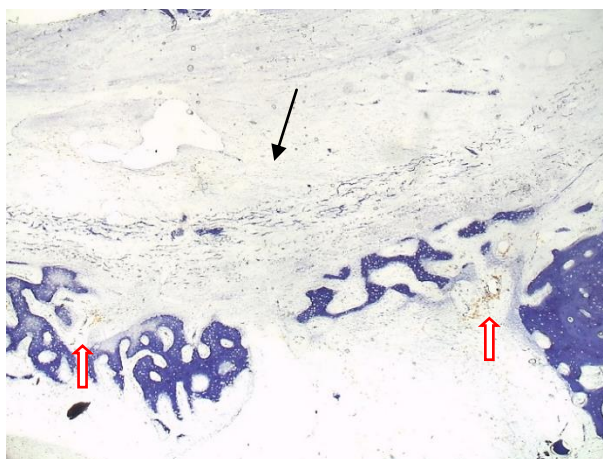


Figura 104

Defectos tratados con PRP, BMP-2 y células

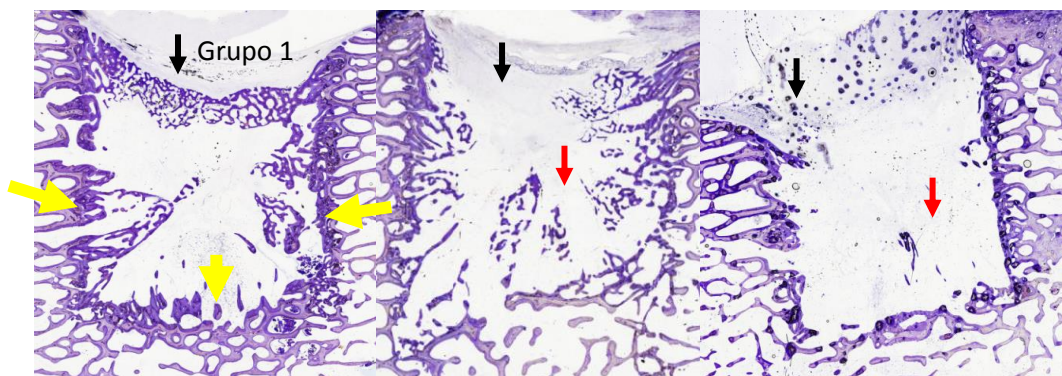


Figura 105

Histológicamente, el defecto aparecía ópticamente vacío con pequeños aumentos (lupa esteroscópica - Figura 105) en los tres grupos, debido al procedimiento técnico de las muestras para su corte y tinción. En los animales del grupo 1 vemos el cierre superior completo del defecto; incompleto en el grupo 2 e inexistente en el grupo 3 (Figura 105 – flechas negras). Existe un evidente refuerzo del tejido óseo alrededor de la hendidura en el grupo 1 (Figura 105 – flechas amarillas) como consecuencia de una osificación endocondral, que contrasta con la escasa reacción del grupo 2 y la práctica inexistente reacción en el grupo 3.

A mayores aumentos en los tres grupos, se observan zonas con una mayor densidad donde apreciamos un proceso inflamatorio crónico reagudizado (Figura 106), afectando al tejido adiposo y conjuntivo que se había formado. Encontramos numerosos focos de neovascularización, formados por un tejido conjuntivo más laxo, abundantes

hemosiderófagos, una discreta infiltración de células redondas y hendiduras vasculares, principalmente vasos linfáticos dilatados (Figura 107 - flechas).

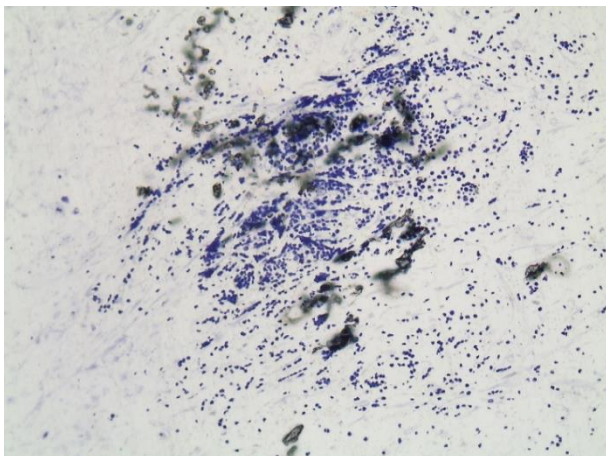


Figura 106

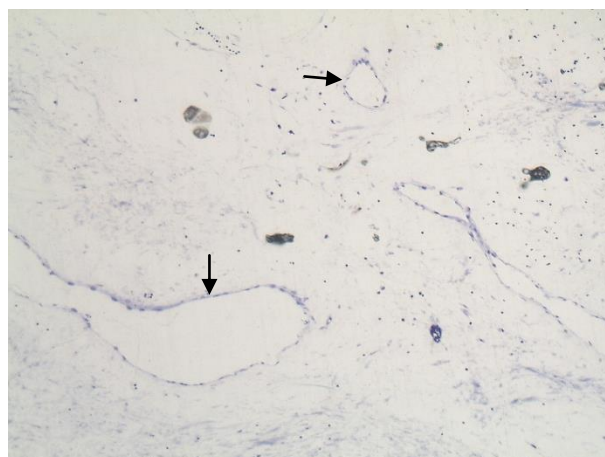


Figura 107

Además pudimos comprobar zonas de mayor densidad de proliferación conjuntiva con acúmulo de colágeno y diferenciación hacia tejido cartilaginoso, constituyendo un foco de osificación endocondral primario (Figura 105 – flechas amarillas y Figura 108 - flecha). En los grupos 2 y 3 se produce de forma progresiva un aumento de la densidad fibrilar con presencia de múltiples focos de osificación endocondral (Figuras 109 y 110) más marcado en el grupo 2 (Figura 109). Sin embargo, no se produce una osificación endocondral tan intensa como en el grupo 1 donde se forman puentes entre los distintos grupos de osificación primarios.

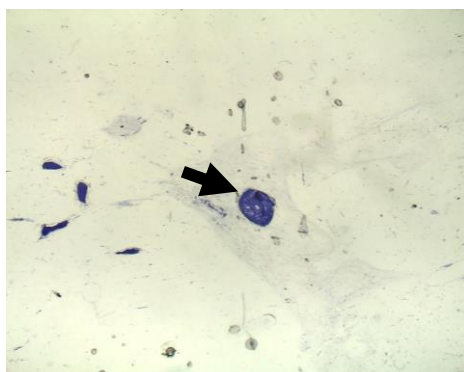


Figura 108

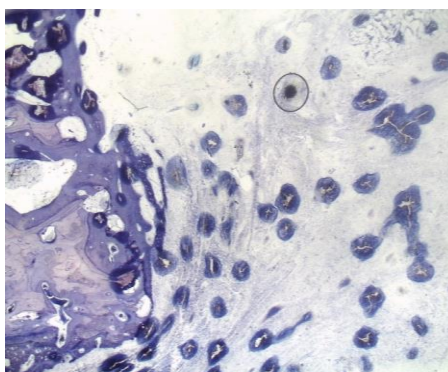


Figura 109

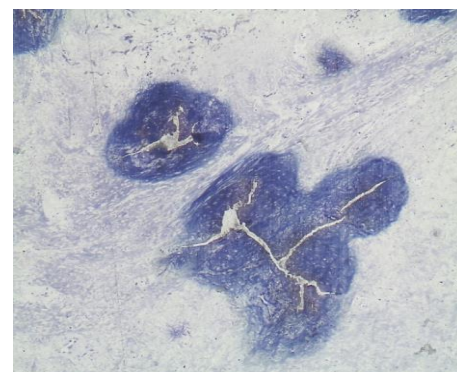


Figura 110

En el grupo 2 los focos de osificación primaria son más numerosos (Figura 109) y caracterizados defecto por grupos isogénicos de cartílago con inicio de osificación como puede observarse en la figura 110 de color grisáceo (flecha), observándose una menor respuesta con menor numero de puentes en el borde del (Figura 111).

El defecto sigue prácticamente vacío en el grupo 3 (Figura 105 y Figura 108), con tejido mesenquimal y adiposo, y con escasos focos de osificación primarios consistentes en material cartilaginoso sin signos de tejido óseo, por lo que no se produce el cierre de esta zona.



Figura 111

2.4.3 Implantes

Implantes en tibia sin tratar (orificio vacío)

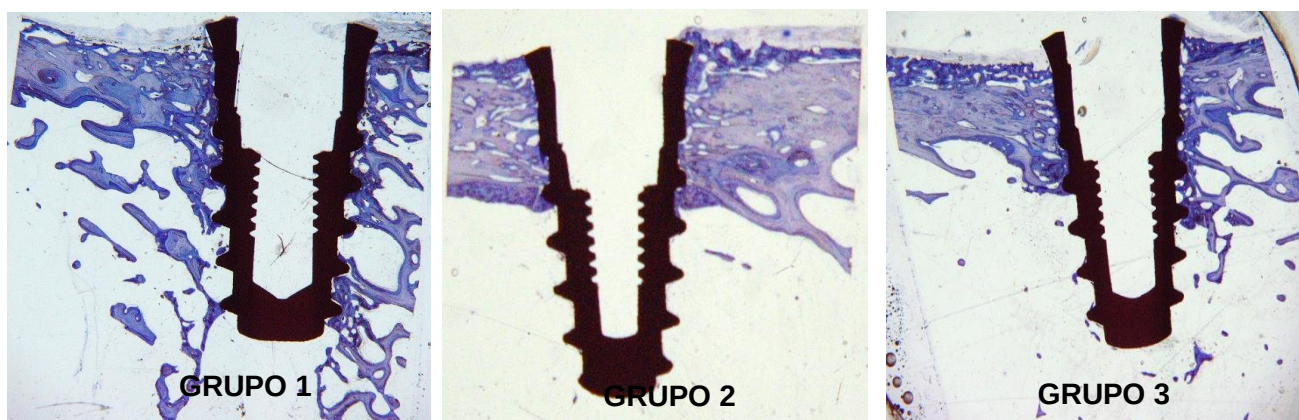
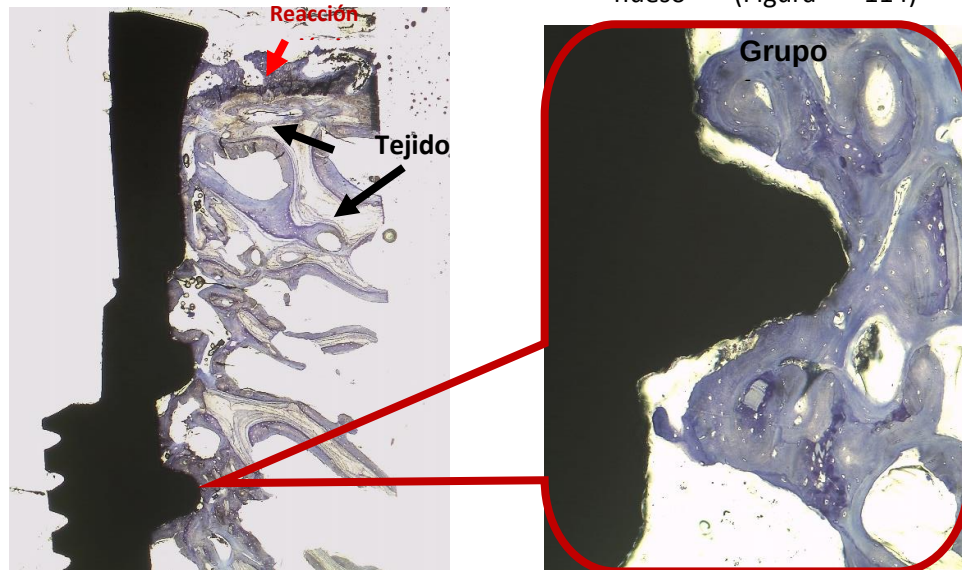


Figura 112

A la hora de valorar la osteointegración de los implantes también nos pareció interesante la comparación entre los mismos grupos que se establecieron en función de la densidad mineral ósea para valorar la regeneración de los defectos. En el grupo 1 se aprecia una evidente osteointegración (Figura 112) del implante a lo largo de toda la estructura. En la zona superior, zona correspondiente a la capa cortical de la tibia, se observa una reacción perióstica (Figura 113) más marcada que en los otros grupos, pero de menor

intensidad de la que se produce en un hueso no osteoporótico. Dicha reacción presenta numerosos puentes cartilaginosos que rodean toda la estructura de titanio integrándola al

hueso (Figura 114) mayores



aumentos, la osificación endocondral ha dado paso a una calcificación y remodelación ósea. De esta forma podemos empezar a ver que el hueso no laminar esponjoso formado, comienza a reorganizarse hacia una estructura osteonal con la formación del sistema de laminillas concéntricas (Figura 114).

Figura 113

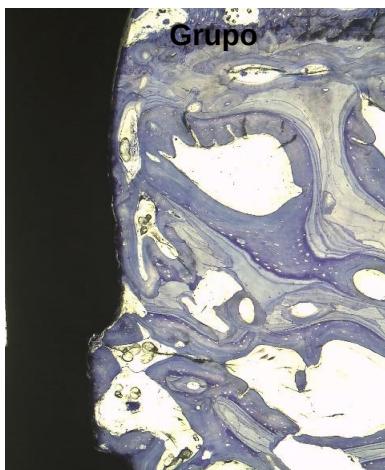


Figura 115

Figura 114

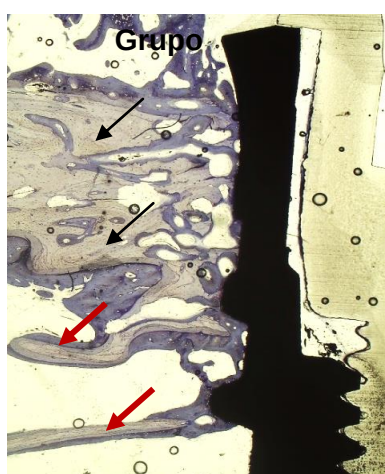


Figura 116

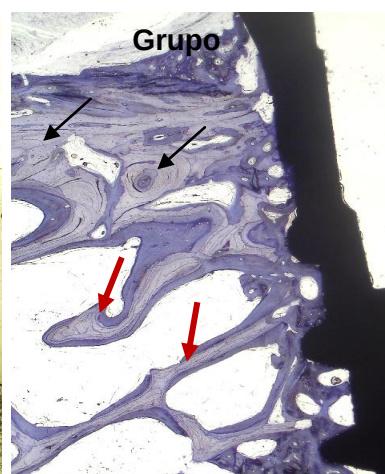
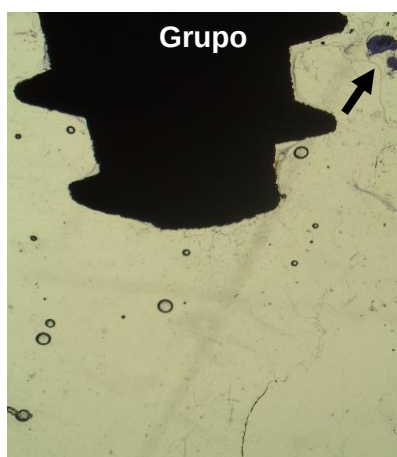
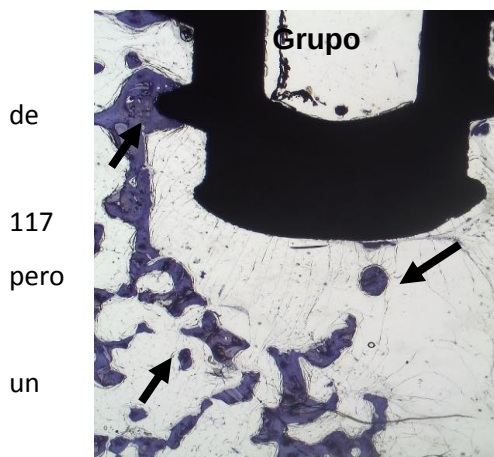


Figura 117

En las figuras de la 115 a la 117 podemos apreciar, la diferente reacción perióstica de la cortical, cuya intensidad puede ser graduada en función del nivel de osteoporosis de cada animal. En el grupo 1, la reacción es moderada con respecto al grupo control pero de mayor intensidad si la comparamos con los grupos 2 y 3. En el grupo 2, presenta un mayor grosor de osificación endocondral que el grupo 3 en el cuello del implante. Llama la atención la mayor transformación del tejido cartilaginoso en tejido óseo esponjoso, presentando áreas completamente osificadas con estructura osteonal (Figura 116 – flecha). Contrasta la escasa respuesta perióstica en la cortical del hueso en estos animales con índices de densidad ósea por debajo de 1,00 g/cm². Existe una osificación prácticamente completa de la zona con



estructura
secundaria
hueso
(Figura
- flechas),
con la
imagen de
hueso
esponjoso

frágil en la que los tabiques son delgados y existen pocos puentes de conexión que refuercen la estructura ósea de la cortical (Figuras 116 y 117 – flechas rojas). Además, al igual que en el grupo 2 en el 3 no existe osteointegración del implante, ya que el crecimiento óseo queda restringido a la zona del cuello del implante. El resto del defecto, en ambos casos está prácticamente vacío con escasos focos de osificación endocondral alrededor de la estructura basal del implante (Figura 119 - flechas). Esto marca una importante diferencia con el grupo 1 que presenta un crecimiento multifocal de focos de osificación primaria que forman un entramado de puentes alrededor del extremo profundo del implante (Figura 118 – flechas).

Figura 118

Figura 119

Implantes en tibias tratados con PRP y BMP-2

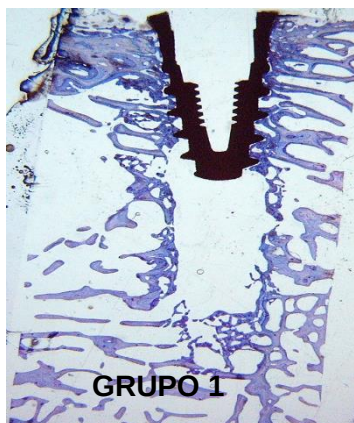


Figura 120

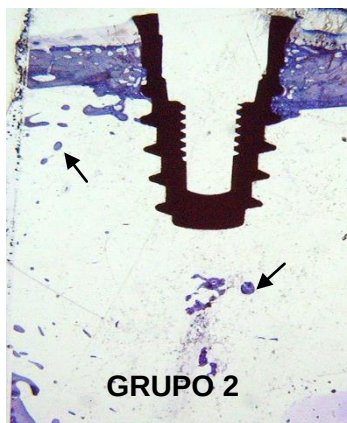


Figura 121



Figura 122

La imagen con lupa del fragmento cortical de la tibia (izquierda y derecha) con implante y con la aplicación de plasma rico en plaquetas (PRP) y proteína ósea morfogénica (BMP), no revela diferencias en el grupo 1 con respecto a su ausencia. La respuesta cortical, sigue siendo más intensa en el grupo 1 (Figura 120), que en los otros grupos, apreciándose también en este caso la integración del implante al tejido óseo esponjoso de nueva formación. Tampoco se aprecian diferencias sustanciales en cuanto al grosor de la reacción perióstica en los grupos 2 y 3 (Figura 121 y 122). No se aprecian diferencias en los tres grupos, en cuanto al grado de osificación que se traduce en la proporción de tejido cartilaginoso y óseo de la zona. La osteointegración no es completa en los grupos 2 y 3, sólo alrededor del cuello del implante correspondiente a la reacción cortical. No obstante, llama la atención el mayor número de focos de osificación endocondral repartidos alrededor del implante y en la zona basal del defecto óseo practicado (Figura 123).

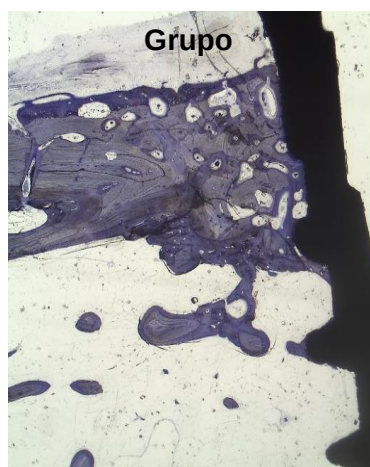


Figura 123

Implantes en tibias tratados con PRP, BMP-2 y células mesenquimales

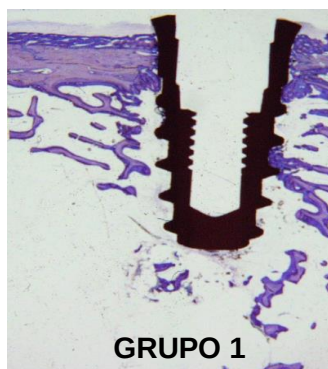


Figura 124



Figura 125

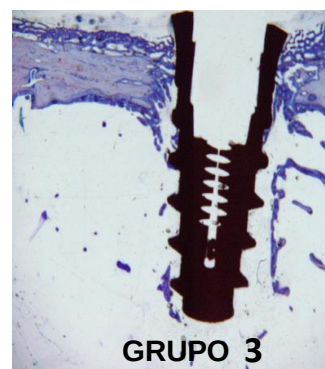


Figura 126

La inclusión de células madre mesenquimales en el defecto con el implante se realizó en la extremidad posterior izquierda, en la cortical de la tibia. Se practicaron dos defectos, uno craneal y otro caudal por cada animal.

En examen histológico con pequeños aumentos revela una reacción cortical del periostio semejante en los tres grupos (Figuras 124, 125 y 126). Existe una prematura osificación de la zona periostica en los grupos de implante, en relación a los con la administración de

estudio, a nivel del cuello del estudios del implante en vacío y PRP/BMP.



Figura 127

La integración del implante en el grupo 1, es menor que la observada en vacío y con PRP/BMP (Figura 127). Existe una menor osificación endocondral alrededor del implante, que abrace al mismo integrándolo en el hueso, y además las escasas trabéculas que se ven muestran una osificación primaria.

El extremo inferior del implante y del fondo del defecto, aparecen ópticamente vacíos (Figura 127 – área en rojo), aunque con grandes aumentos existe una proliferación mesenquimal de tejido conjuntivo laxo en los tres grupos de estudio (Figuras 128 y 129 – flechas). Existen pequeños focos cartilaginosos con inicio de osificación (hueso primario), dispersos en el defecto practicado (Figuras 128 y 129 – flechas rojas).

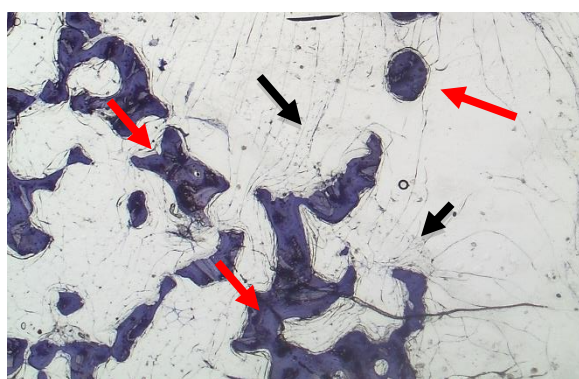


Figura 128

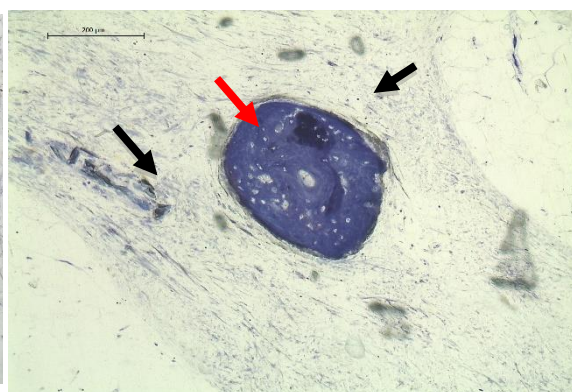


Figura 129

Al igual que en los implantes en vacío y con PRP/BMP, no se aprecia osteointegración en el grupo 2 y 3. Sin embargo, si existe alrededor del implante y en el fondo del defecto un mayor número de focos de osificación endocondral en la zona de proliferación y crecimiento conjuntivo. Esto implica un proceso más lento, pero que podrá terminar desarrollando una mayor integración del implante al tejido óseo osteoporótico.

VII. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En la actualidad la osteoporosis es un problema socioeconómico y sanitario que tiene una importancia excepcional a nivel global y que aumenta su incidencia año tras año. La OMS considera la osteoporosis el segundo problema de salud en importancia, siendo el primero las enfermedades cardiovasculares. Se trata de un proceso prevenible y tratable, pero la falta de signos de alerta previos a la aparición de fracturas, conlleva que pocos pacientes sean diagnosticados en fases tempranas y tratados de forma efectiva⁶. Sin duda alguna, el desarrollo de modelos experimentales, es fundamental tanto para profundizar en el conocimiento de los diferentes mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad como para mejorar en la prevención, diagnóstico y tratamiento de ésta.

El objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue desarrollar un modelo osteoporótico aplicable y reproducible en la investigación validado mediante el uso de diferentes técnicas diagnósticas, y llevar a cabo en el mismo un estudio experimental de regeneración de defectos óseos y osteointegración de implantes. Dentro de los múltiples modelos animales que han sido objeto de estudio dentro de la investigación en el campo de la osteoporosis la especie ovina ha cobrado una especial importancia durante los últimos años, aunque hemos de considerar que otras especies han sido y son ampliamente utilizadas en este campo como son los primates¹¹³,¹¹⁴, la rata^{121,122,123,124,125,126,127,128}, el conejo^{133,134,135,140,141,142} y la especie porcina^{144,145}. Los más empleados han sido sin duda alguna la rata y el conejo, probablemente, debido a su frecuente utilización como animales de laboratorio, ya que aunque presentan ventajas (menores limitaciones legales, coste, accesibilidad y facilidad de manejo entre otras) presentan también múltiples inconvenientes (estructura macro y microscópica ósea, diferencias biomecánicas, reproductibilidad de la enfermedad, imposibilidad de probar implantes y prótesis utilizados en medicina humana, etc). Las ovejas son un modelo prometedor por varias razones: son dóciles, fáciles de manejar y de mantener, son relativamente baratas, fáciles de conseguir, ovulan espontáneamente y presentan huesos lo suficientemente grandes como para evaluar implantes ortopédicos humanos¹¹². El modelo ideal debería permitirnos aproximarnos con mayor fiabilidad a la anatomía, biomecánica, biología celular y cambios patológicos observados en el esqueleto de la especie humana y al mismo tiempo ser reproducible, ético, económico y eficiente.

El modelo experimental que se plantea en el presente trabajo de tesis doctoral recurre a la ovariectomía bilateral, la corticoterapia y la utilización de dietas específicas para inducir la enfermedad. Diferentes autores han propuesto múltiples alternativas para conseguir este

objetivo en la especie ovina, algunos autores han recurrido exclusivamente a la ovariectomía^{15,152,320,321}. La ventaja principal que presenta dicho método es que al recurrir exclusivamente a la ovariectomía es que reproduce con mayor similitud el mecanismo fisiopatológico derivado del déficit estrógeno que tiene lugar en la mujer postmenopáusica. No obstante, la utilización de forma exclusiva de la ovariectomía presenta dos grandes inconvenientes. Por un lado, las pérdidas de DMO que se obtienen no son suficientes ni comparables a las que se obtienen en la especie humana, como para justificar la condición osteoporótica, por lo que muchos autores defienden que se trata más bien de un modelo ostopénico^{147,148,322}. Por otro lado, los tiempos de espera necesarios tras la ovariectomía que se describen en la bibliografía son largos, generalmente comprenden un periodo mínimo de 12 meses^{151,152,320,321}. Otras vías empleadas para el desarrollo de la osteoporosis son la utilización exclusiva de glucocorticoides¹⁴⁵ o la combinación de la corticoterapia con dietas pobres en calcio y vitamina D³²³. Por estos métodos se consiguen pérdidas de DMO muy significativas y que permiten garantizar una condición osteoporótica. No obstante, la combinación de la corticoterapia con la ovariectomía y las dietas específicas permite obtener una mayor pérdida de DMO en menor tiempo^{146,148} y garantizar el mantenimiento de la condición osteoporótica durante una ventana de tiempo suficiente tras la retirada gradual de los corticoides¹⁴⁷. Basándonos en estos hechos nos decidimos a utilizar este último tipo de modelo. Cabe destacar que aunque la utilización de esta vía para desarrollar la enfermedad ya había sido descrita, el modelo desarrollado presenta muchas diferencias con respecto a otros anteriores. Por un lado, la utilización de la raza Churra que es barata y accesible puesto que se trata de una raza muy común en la producción animal ovina. Muchos autores han justificado la utilización de determinadas razas como pueden ser la Merina Australiana o Suiza Alpina^{147,148,324} puesto que determinados factores intrínsecos de la raza como la estacionalidad, ya que la oveja es una especie poliéstrica estacional, o la rusticidad de la raza, que podría variar el efecto de la administración de dietas específicas, podrían dificultar la aparición de la osteoporosis. En nuestro modelo, conseguimos el desarrollo de la enfermedad en esta raza, lo que podría facilitar estudios en este campo a nivel nacional sin tener que importar razas foráneas. Otro aspecto que facilita su utilización es la utilización de una dieta baja en calcio y vitamina D que se basa en salvado de cereal y paja y que no requiere la utilización de preparados específicos. En la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas para inducir la enfermedad por otros mecanismos como por ejemplo desconexión hipotalámico-pituitaria^{325,326}.

Otro aspecto no menos novedoso de este estudio experimental, es la validación de la condición osteoporótica mediante la técnica densitométrica empleando un sistema de

posicionamiento específicamente desarrollado para este fin, que permite la cuantificación de la DMO a nivel del cuello femoral. La utilización de DXA en modelos animales osteoporóticos plantea siempre dificultades a la hora de efectuar las mediciones y normalmente se recurre a equipos de densitometría centrales que presentan softwares específicos para llevar a cabo dichas mediciones en individuos de la especie humana^{112, 116, 148, 326}. Generalmente en la especie ovina se efectúa la cuantificación de la DMO exclusivamente a nivel de las vértebras lumbares^{146,147,152,327}. En este caso, nos parece muy interesante el estudio de la DMO a nivel del cuello femoral, puesto que es en esta región donde se localiza el mayor porcentaje de fracturas de cadera osteoporóticas³²⁸. A diferencia de otros sistemas de posicionamiento, como por ejemplo el descrito por Zarrinkalanam et al¹⁴⁸, el nuestro permite establecer un ROI (region of interest) a nivel del cuello femoral sin que exista superposición con el trocánter mayor del fémur. Así mismo, los resultados correspondientes a la disminución de DMO que obtuvimos fueron suficientes para garantizar la condición osteoporótica de los individuos de los grupos 2 y 3 (grupo 2: 45,174 ±2,26% a nivel de CF y 32,711 ±4,90 % a nivel de VL; grupo 3: 28,828±2,91% a nivel de CF y 21,007±2,27% a nivel de VL), y son comparables a los obtenidos por otros autores que han desarrollado modelos osteoporóticos similares^{146,147,148,327}.

Otra técnica empleada en la validación del modelo fue la histomorfometría realizada sobre piezas óseas obtenidas postmortem, para lo cual se siguió un proceso minucioso utilizando las técnicas de inclusión en metacrilato. Dicha técnica permitió la conservación de la estructura trabecular de las muestras y la diferenciación entre hueso mineralizado y osteoide, lo cual es imposible cuando se emplean técnicas que requieren la descalcificación de las muestras, y que constituye el “gold standard” para el estudio histomórfométrico de biopsias óseas^{329,330,331}. Los parámetros histomorfométricos analizados en este estudio fueron la BA/TA a nivel de los cuellos femorales y cuerpos vertebrales en los individuos de los grupos 1 y 2, así como la BIC y BICc a nivel de los implantes y la BA/TA (% regeneración ósea) a nivel de los defectos femorales en los individuos del grupo 3. Respecto a los resultados obtenidos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los individuos del grupo 2 y los individuos del grupo 1 tanto a nivel de las vértebras lumbares como a nivel de los cuellos femorales. Así mismo estos valores son semejantes a los obtenidos por autores que han empleado modelos experimentales similares¹⁴⁸.

La oveja ha sido un modelo ampliamente utilizado para la valoración de la osteointegración de implantes dentales. Muchos de los estudios experimentales que se han realizado en este modelo animal han utilizado la tibia como hueso diana para la colocación de implantes^{332,333,334,335,336}, y algunos se han llevado a cabo en ovejas osteoporóticas^{337,338,339}. No

obstante, la mayor parte de estas investigaciones se basan en la comparación de resultados obtenidos mediante la utilización de diferentes tratamientos de superficie, tipos de implantes o injertos óseos, por lo que sus resultados no son comparables a los de nuestro estudio. Sachsen *et al* realizó un estudio en 2005 el que demuestra que la utilización de BMP-2 como recubrimiento de implantes de titanio favorecía la osteointegración y cicatrización ósea tras su implantación en tibias de ovejas de edad avanzada³⁴⁰. Así mismo Wikejsö demostró un mayor grado de osteointegración de implantes de titanio recubiertos con PRP y diferentes concentraciones de BMP-2 implantados a nivel mandibular en perros de raza Beagle³⁴¹. En cuanto a los porcentajes medios de osteointegración obtenidos en nuestro estudio experimental, éstos fueron superiores en los implantes tratados con BMP-2 y PRP ($39,398\% \pm 11,192\%$) respecto a los implantes que fueron no tratados ($36,085\% \pm 7,112\%$), sin embargo estas diferencias fallaron a la hora de presentar significación estadística. Probablemente con un mayor número de animales se hubiera tenido una mayor potencia estadística y dichas diferencias hubieran resultado significativas. En cuanto a los porcentajes de osteointegración a nivel cortical, éstos presentaron porcentajes muy similares en los implantes tratados BMP-2 y PRP y en los implantes que no recibieron nada (concretamente de un $66,913\% \pm 12,425\%$ y de un $67,005\% \pm 9,613\%$ respectivamente), y tampoco se pudieron establecer diferencias estadísticamente significativas. Otro tema que ha sido ampliamente investigado es la utilización de diferentes vehículos para transportar el BMP-2. En un estudio realizado por Jung *et al*³⁴² no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a regeneración ósea en conejos blancos de Nueva Zelanda cuando se comparó la utilización de geles de fibrina y PRP como vehículos para transportar el BMP-2. No obstante si que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la utilización del PRP sólo y la utilización del PRP con el BMP-2, siendo este último grupo el que presentó mejores resultados.

Respecto a la utilización de células madre para favorecer la osteointegración de implantes existe muy poca bibliografía descrita. Muchos de los artículos científicos publicados sobre células madre e implantes son estudios *in vitro* que estudian la adhesión o comportamiento de linajes celulares frente a diferentes tratamientos de superficie de implantes y biomateriales, pero existen pocos estudios realizados en modelos *in vivo*^{343,344,345,346}. Recientemente Hosgör *et al*³⁴⁷ ha realizado un estudio experimental sobre ovejas en el que ha empleado satisfactoriamente células de linaje osteoblástico autólogas para favorecer la osteointegración de implantes de titanio a nivel mandibular. En este estudio los implantes fueron colocados sin nada, con PRP o con osteoblastos procedentes de células mesénquimales embebidos en PRP. En este caso, los implantes que recibieron el PRP con los osteoblastos presentaron un mayor

porcentaje de osteointegración con diferencias estadísticamente significativas. Así mismo Ito *et al*³⁴⁸ realizó en 2011 un estudio sobre mandíbulas de perros de raza Beagle en los cuales empleo diferentes linajes celulares autólogos (células madre procedentes de la pulpa dentaria, células madre mesenquimales y células periósticas) embebidos en PRP para valorar el grado de osteointegración. En sus resultados evidenció un mayor grado de osteointegración mediante la utilización de las células madres procedentes de la pulpa dentaria ($66,7 \pm 3,6\%$), seguido de las células madre mesenquimales ($62,5 \pm 3,1\%$), las células periósticas ($39,4 \pm 2,4\%$) y por los implantes que no llevaban nada ($30,3 \pm 2,6\%$). Los resultados obtenidos por estos dos autores se contradicen con los que derivan de nuestro estudio experimental. En nuestro caso los porcentajes de osteointegración de los implantes tanto a nivel cortical (BICc) como a nivel global (BIC) fueron inferiores en todos los animales para los implantes tratados con BMP-2, PRP y células madre mesenquimales ($BIC=15,695\% \pm 14,05\%$; $BICc=25,981\% \pm 19,864\%$), presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los que no fueron tratados con nada ($BIC=36,085\% \pm 7,112\%$; $BICc=67,005\% \pm 9,613\%$) y a los que llevaban PRP y BMP-2 ($BIC=39,398\% \pm 11,192\%$; $BICc=66,913\% \pm 12,425\%$).

Respecto a la regeneración de defectos óseos, en nuestro modelo experimental se obtuvieron porcentajes medios de regeneración ósea inferiores en los defectos que fueron tratados con BMP-2, PRP y células mesenquimales ($19,392\% \pm 8,980\%$), respecto a los que fueron tratados sólo con PRP y BMP-2 ($25,970\% \pm 14,003\%$). Dichas diferencias fallaron, no obstante a la hora de presentar significación estadística. En este aspecto si que encontramos dentro de la bibliografía existente múltiples publicaciones sobre la aplicación de células mesenquimales para la regeneración de defectos óseos tanto en modelos animales osteoporóticos como no osteoporóticos. Recientemente Kikuta *et al*³⁴⁹ ha descrito un incremento de la regeneración ósea mediante la utilización de células mesenquimales autólogas en defectos óseos creados a nivel de la cabeza femoral en conejos osteoporóticos sometidos a ovariectomía bilateral observándose diferencias estadísticamente significativas, demostrando también un aumento de DMO en los fémures que recibieron las células mesenquimales. Así mismo, en 2006 Wang Z *et al*³⁵⁰ describió un incremento de los parámetros histomorfométricos óseos y resistencia biomecánica al implantar células madre mesenquimales autólogas en la región distal del fémur de conejos previamente sometidos a ovariectomía. En 2012 Coa *et al*³⁵¹ efectuó un estudio en cabras osteoporóticas también sometidas a ovariectomía bilateral sobre la utilización de células mesenquimales autólogas en la reparación de defectos óseos en cóndilos femorales donde se observó una mayor regeneración ósea en los defectos tratados con células. Estudios similares han sido llevados a

cabo también en ratas ovariectomizadas describiéndose resultados satisfactorios derivados del empleo de células mesenquimales³⁵². Nuestros resultados se contradicen, no obstante, con los descritos por todos estos autores. En cuanto a la utilización de células madre mesenquimales alógenas en la regeneración de defectos óseos en modelos osteoporóticos existe escasa literatura al respecto. Takada *et al*³⁵³ consiguió aumentar la densidad mineral ósea en huesos de ratas osteoporóticas tras la implantación en los mismos de células mesenquimales alógenas, demostrando además su supervivencia e inmunocompatibilidad. Pero no sólo las células mesenquimales alógenas parecen sobrevivir y favorecer la regeneración ósea. La utilización de este tipo de células madre entre diferentes especies, es decir, la utilización de células madres xenogénicas también parece estimular la formación de hueso en diferentes especies y no desencadenar en el individuo receptor reacciones inmunes. De especial interés, es el estudio realizado por Niemeyer *et al*³⁵⁴ en 2010, en el que empleó tanto células mesenquimales humanas como células madre de origen alógeno en la regeneración de defectos críticos segmentarios en ovejas no osteoporóticas. Sus resultados demostraron la eficacia, supervivencia y ausencia de ambos tipos de células en el individuo receptor, presentando una mayor capacidad de regeneración ósea las células de tipo alógeno. Esta publicación justificaba el hecho de no realizar pruebas inmunogénicas de rechazo en los individuos de nuestro estudio experimental. Otros autores también han evidenciado la supervivencia en ausencia de reacciones inmunes derivadas de la aplicación de células mesenquimales xenogénicas tanto en rata como en conejo. Si no existen problemas de inmunocompatibilidad derivados de la aplicación de células mesenquimales xenogénicas, menos aún deberían existir al emplear células madre alógenas^{355,356}. También se ha descrito la utilización de rhBMP-2 en modelos osteoporóticos. En este sentido tiene un especial interés el estudio llevado a cabo por Zarrinkalam *et al*. en 2013 en ovejas osteoporóticas sometidas a corticoterapia y ovariectomía y alimentadas con una dieta pobre en calcio y vitamina D, en el que, en un modelo osteoporótico ovino muy similar al nuestro, el autor demuestra la eficacia de la utilización del BMP-2 a nivel de las vértebras lumbares para aumentar la DMO y densidad y grosor trabecular en las zonas colindantes al área de implantación³⁵⁷. Así mismo existen múltiples publicaciones que defienden la eficacia de la utilización del PRP en la regeneración de defectos óseos tanto en modelos animales no osteoporóticos^{358,358}, como en modelos animales osteoporóticos³⁶⁰, así como en pacientes de medicina humana y veterinaria^{361,362,363}, puesto que hemos de recordar que la utilización del PRP en la práctica clínica es procedimiento rutinario desde hace ya muchos años. Por lo tanto, la utilización de BMP-2 y PRP estaba más que justificada en nuestro modelo.

A la vista de los resultados cabe plantearse porqué en nuestro caso las células mesénquimales alogénicas que empleamos en nuestro modelo no funcionaron como se hubiera esperado. Como ya se citó anteriormente, los resultados descritos derivados de su utilización son generalmente satisfactorios. Aunque muchos de estos estudios se han realizado con células de origen autólogo^{341,347,348,350,351}, también se han efectuado estudios experimentales con células de origen alogénico^{353,354} o xenogénico^{355,356} y no parece haber reacciones inmunes derivadas de su utilización que afecten a su eficacia. Nos decidimos por utilizar células mesenquimales de origen alogénico puesto que muchos autores han descrito un potencial osteogénico deficitario cuando se han obtenido células mesenquimales a partir de individuos osteoporóticos, y porqué, el hecho de no presentar reacciones de histocompatibilidad podría permitir en el futuro la utilización de células mesenquimales de individuos donadores en pacientes que presenten fracturas u otras patologías, sin tener que esperar a realizar cultivos autólogos. Esto supondría además un ahorro de tiempo y dinero, lo cual nos pareció especialmente interesante, y podría permitir en el futuro disponer de bancos de células que podrían funcionar mejor incluso que las de origen autólogo en individuos osteoporóticos. Puesto que las células mesenquimales presentan capacidad inmunomoduladora, pueden evitar el rechazo alogénico mediante diferentes mecanismos. Estudios realizados por diversos autores han demostrado que las MSCs no permiten el reconocimiento de antígenos puesto que interfieren en la función de las células dendríticas y de los linfocitos T, careciendo de un efecto inmunosupresor local debido a su capacidad de secretar citocinas. Este efecto se ve potenciado cuando las células son expuestas a un medio con actividad inflamatoria o caracterizada por la presencia de altos niveles de interferón gamma^{364,365}. En estudios *in vitro* se ha demostrado que las MSCs no expresan los antígenos del sistema principal de histocompatibilidad de clase II, lo que indica que constituyen un potencial terapéutico en la enfermedad injerto contra huésped porque pueden reducir o suprimir las reacciones inmunes inducidas^{366, 367, 368}. Llama la atención, sin embargo, que en nuestro estudio 2 de las 6 ovejas del grupo en el que se valoró la regeneración de defectos óseos y osteointegración de implantes, presentaron un mayor porcentaje de regeneración en los defectos tratados con células. Curiosamente, tres de las otras cuatro ovejas restantes presentaron una marcada inflamación de la extremidad izquierda que fue en la que se implantaron las células y que comenzó a los dos días posteriores a la cirugía y que se resolvió de forma espontánea. Basándonos en la bibliografía existente decidimos no realizar pruebas inmunológicas de rechazo, pero a la vista de los resultados y de este hallazgo, nos hubiera parecido interesante. Las células mesenquimales empleadas podrían haber desencadenado una reacción inmune en algunos de los individuos que hubiera dificultado de manera inicial la regeneración a nivel de

los defectos y que con el tiempo se hubiera resuelto, razón por la que no se observaron en los estudios histopatológicos. Sólo se observaron dichas inflamaciones en estas tres ovejas, y sólo en las extremidades tratadas con células. A la hora de valorar los resultados de osteointegración obtenidos mediante la utilización células mesenquimales, se obtuvieron valores de BIC inferiores en todos los individuos tratados con células, siendo estas diferencias estadísticamente significativas si las comparamos con los implantes que no fueron tratados y los que fueron tratados con PRP y BMP2. Esto contradice los resultados obtenidos por otros autores^{348,349}. No obstante estos autores emplearon células de origen autólogo y en este aspecto no hemos encontrado publicaciones que describan la utilización de células mesenquimales alógenicas para favorecer la osteointegración de implantes. También se han realizado múltiples estudios valorando la interacción de diferentes tratamientos de superficie y células mesenquimales, puesto que en este sentido las células al hallarse en las proximidades de titanio y otros materiales podrían encontrarse fuera de un ambiente óptimo y esto podría alterar sus capacidades de adhesión y multiplicación o interferir con las de las células del organismo receptor^{343,344,345,346}. Si valoramos los hallazgos histopatológicos a nivel de los implantes y los defectos, cabe destacar que en los defectos que fueron tratados con células mesenquimales se observan zonas con una mayor densidad donde apreciamos un proceso inflamatorio crónico reagudizado (Figura 106), afectando al tejido adiposo y conjuntivo que se había formado. Encontramos numerosos focos de neovascularización, formados por un tejido conjuntivo más laxo, abundantes hemosiderófagos, una discreta infiltración de células redondas y hendiduras vasculares, principalmente vasos linfáticos dilatados. Curiosamente esta reacción es mucho menos evidente en las dos ovejas que presentaron un mayor grado de regeneración ósea en los defectos con células mesenquimales. Además, los defectos tratados con células parecen presentar un patrón de regeneración distinto, observándose un refuerzo óseo en “herradura” del defecto, lo que podría suponer que el crecimiento de las células interfiere en cierta medida con los mecanismos de regeneración ósea del individuo receptor. Esta reacción también se observa a nivel de los implantes tratados con células, dificultando la osteointegración de los mismos. Otro hallazgo de gran interés, es la presencia de múltiples focos de osificación independientes en los defectos e implantes tratados con células, y que no parecen seguir un patrón de regeneración convencional. Aunque esto supone un potencial de crecimiento caótico y quizás no tan efectivo como el observado mediante mecanismos de regeneración ósea convencionales, podría presentar un especial interés en el tratamiento de defectos críticos de gran tamaño donde los mecanismos de regeneración propios del individuo podrían ser insuficientes. También parece existir cierta relación entre el grado de osteoporosis de los individuos, los hallazgos histológicos y el grado de regeneración ósea y de osteointegración,

siendo estos dos últimos mayores, lógicamente, en los individuos que presentan DMO superiores.

Desde nuestro punto de vista queda mucho por investigar antes de poder aplicar de manera rutinaria, efectiva y segura este tipo de terapias en pacientes en la práctica clínica.

VIII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. El modelo experimental desarrollado es válido y aplicable en la investigación.
2. La técnica densitométrica empleada permite la validación del modelo y el sistema de posicionamiento desarrollado garantiza la fiabilidad y reproducibilidad de las mediciones, permitiendo además la obtención de valores de DMO a nivel de los cuellos femorales.
3. Aunque los valores de BIC (osteointegración) fueron ligeramente superiores en los implantes tratados con PRP y BMP-2 respecto a los que no fueron tratados ($39,398\% \pm 11,192$ frente a un $36,085\% \pm 7,112\%$ respectivamente), dichas diferencias fallaron a la hora de mostrar significación estadística.
4. En este modelo experimental la utilización de células mesenquimales dificultó la osteointegración de los implantes, siendo los valores de BIC obtenidos en los implantes tratados con PRP, BMP-2 y células mesenquimales inferiores respecto a los obtenidos en los otros dos grupos, observándose en este caso diferencias estadísticamente significativas.
5. Los valores de regeneración ósea a nivel de los defectos fueron dispares, observándose un mayor grado de regeneración ósea en los defectos tratados con células en dos de los individuos y menor en los cuatro restantes. No obstante no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los defectos tratados con y sin células.
6. Las células mesenquimales alogénicas podrían haber desencadenado una respuesta de rechazo puesto que en el interior de los defectos que fueron tratados con células mesenquimales se observan zonas con una mayor densidad donde apreciamos un proceso inflamatorio crónico reagudizado, afectando al tejido adiposo y conjuntivo que se había formado. Encontramos numerosos focos de neovascularización, formados por un tejido conjuntivo más laxo, abundantes hemosiderófagos, una discreta infiltración de células redondas y hendiduras vasculares, principalmente vasos linfáticos dilatados. Curiosamente esta reacción es mucho menos evidente en las dos ovejas que presentaron un mayor grado de regeneración ósea en los defectos con células mesenquimales.

7. Los defectos tratados con células parecen presentar un patrón de regeneración distinto, observándose un refuerzo óseo en “herradura” del defecto, lo que podría suponer que el crecimiento de las células interfiere en cierta medida con los mecanismos de regeneración ósea del individuo receptor. Esta reacción también se observa a nivel de los implantes tratados con células, dificultando la osteointegración de los mismos.
8. La aplicación de células mesenquimales alogénicas originó la aparición de focos de osificación independientes en los defectos e implantes tratados con células, y que no parecen seguir un patrón de regeneración convencional. Aunque esto supone un potencial de crecimiento caótico y quizás no tan efectivo como el observado mediante mecanismos de regeneración ósea convencionales, podría presentar un especial interés en el tratamiento de defectos críticos de gran tamaño donde los mecanismos de regeneración propios del individuo podrían ser insuficientes.
9. Desde nuestro punto de vista queda mucho por investigar antes de poder aplicar de manera rutinaria, efectiva y segura este tipo de terapias en pacientes en la práctica clínica.

CONCLUSIONS

1. The developed experimental animal model is valid and applicable for research.
2. The bone densitometry technique performed is useful to validate the model and guarantee the reproducibility and fiability of the BMD measurements, allowing to obtain BMD values of the femoral neck area.
3. Although BIC mean values (osseointegration) values were slightly superior in the implants treated with PRP and BMP2 compared with BIC mean values of non-treated implants ($39,398\% \pm 11,192$ and $36,085\% \pm 7,112\%$ respectively), these differences failed to achieve statistical significance.
4. The application of ADSCs diffculted the titanium implants osseointegration in this experimental animal model. BIC mean values were higher in implants treated with PRP and BMP2 and in non-treated implants compared with the BIC mean values of the implants that were treated with PRP, BMP2 and ADSCs.
5. The application of ADSCs in the condylar cavitary defects improved the bone healing in two individuals but in four sheep the bone regeneration mean values were lower. However, these differences failed to achieve statistical significance.
6. The ADSCs could have produce an immune rejection response, because in the interior of the defects that were treated with ADSCs there are high cellular density areas that could be related with a chronic inflammatory process, that affects the recently formed adipose and connective tissue. We can also observe multiple neovascularization foci, compound by loose connective tissue, hemosiderin-laden macrophages, round cells infiltration and dilated lymphatic vessels. This reaction is less evident in the two sheep that presented improved bone regeneration values after the application of ADSCs.
7. The defects treated with stem cells seem to have a different regeneration pattern, in which a "horseshoe" bone reinforcement in the defect edges is observed. This fact could be dued to an interference between the receptor bone regeneration mechanisms and the ADSCs. This reaction is also observed around the titanium implants diffculting their osseointegration.

8. The application of ADSCs triggered the formation of multiple independent ossification foci that do not follow a standard bone regeneration pattern. Although this is fact could be considered as a chaotic growth potential and perhaps could be not so effective as the conventional bone regeneration mechanisms, it could have an interesting application to treat large size critical defects, where the individual regeneration response would not be able to develop a proper bone defect healing.
9. We consider that further investigation is required in order to apply this kind of therapies in an effective, safe and routinely way in clinical patients.

IX. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA DEL TEXTO

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA 2001 Feb 14;285(6):785-795.
2. Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med 1991; 90: 107-110.
3. Beers MH, Fletcher AJ. The Merck Manual of Medical Information. 2ed. Osteoporosis: Simon&Schuster; 2004.
4. Templeton K. Secondary osteoporosis. J Am Acad Orthop Surg 2005; 13(7):475-486.
5. Lafita J, Pineda J, Fuentes C, Martínez JP. Osteoporosis secundaria, Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2003;26(3).
6. Muñoz-Torres M, Varsavsky M, Avilés Pérez MD. Osteoporosis. Definición. Epidemiología. Rev Osteoporos Metab Miner 2010;2(3): S5-S7.
7. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. Am J Obstet Gynecol 2006 Feb;194(2 Suppl):S3-11.
8. Silverman SL, Madison RE. Decreased incidence of hip fracture in Hispanics, Asians, and blacks: California Hospital Discharge Data. Am J Public Health 1988 Nov;78(11):1482-1483.
9. Tobias JH, Cook DG, Chambers TJ, Dalzell N. A comparison of bone mineral density between Caucasian, Asian and Afro-Caribbean women. Clin Sci (Lond) 1994 Nov;87(5):587-591.
10. Mikhail MB, Vaswani AN, Aloia JF. Racial differences in femoral dimensions and their relation to hip fracture. Osteoporos Int 1996;6(1):22-24.
11. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int 2006 Dec;17(12):1726-1733.

12. Guía de Práctica Clínica de la SEIOMM. Osteoporosis Postmenopáusica.
13. González LA, Vasquez GM, Molina JF. Epidemiology of osteoporosis Revista Colombiana de Reumatología 2009 Vol 16 (1); 61-75.
14. Kanis JA, Oden A, Johnell O, Jonsson B, de Laet C, Dawson A. The burden of osteoporotic fractures: a method for setting intervention thresholds. Osteoporos Int 2001;12(5):417-427.
15. Johnell O, Kanis JA, Oden A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Pettersson C, et al. Mortality after osteoporotic fractures. Osteoporos Int 2004 Jan;15(1):38-42.
16. Musculoskeletal system. In: Gray's Anatomy, 39th Ed., edited by Standring S, New York, Elsevier, 2004 83–135.
17. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol 2008 Nov;3 Suppl 3:S131-9.
18. García MP, Pombal MA, Megías M. Atlas de Histología Animal y Vegetal de la Universidad de Vigo. Dpto de Biología Funcional y CC. de la Salud. Universidad de Vigo.
19. González VG. Fisiopatología de la osteoporosis. Boletín de la escuela de Medicina UCC 1999; 28:10-12,
20. Thorne CE. Osteoporosis: consideraciones diagnósticas y terapéuticas. Rev Med Hered. 2004;15 (2)
21. Lafita J. Fisiología y fisiopatología ósea. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2003;26(3)
22. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci 2006 Dec;1092:385-396.
23. Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2008 Oct;22(5):701-722.

24. Gonzalez Macias, J. Fisiopatología de la osteoporosis y mecanismo de acción de la PTH. Rev. Osteoporos Metab Miner 2010; 2 S(2): S5-S17.
25. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000 Sep 1;289(5484):1504-1508.
26. Gallagher AJ, Sai. Biología de la remodelación ósea : implicaciones para los nuevos blancos terapéuticos de la osteoporosis. Rev Metab óseo y Min 2010; 8(2):60-71.
27. Ott SM. Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength. J Clin Endocrinol Metab 2005 Dec;90(12):6741-6743.
28. Jackson A, Vayssiere B, Garcia T, Newell W, Baron R, Roman-Roman S, et al. Gene array analysis of Wnt-regulated genes in C3H10T1/2 cells. Bone 2005 Apr;36(4):585-598.
29. Larroudé MS, Man Z. Osteoporosis inducida por corticoides.Revista Colombiana de Reumatología 2004; 11 (2):111-139
30. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). 1932. Obes Res 1994 Sep;2(5):486-508
31. Lukert BP, Raisz LG. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis and management. Ann Intern Med 1990 Mar 1;112(5):352-364.
32. Angeli A, Guglielmi G, Dovio A, Capelli G, de Feo D, Giannini S, et al. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in post-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-sectional outpatient study. Bone 2006 Aug;39(2):253-259.
33. Feldstein AC, Elmer PJ, Nichols GA, Herson M. Practice patterns in patients at risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. Osteoporos Int 2005 Dec;16(12):2168-2174.
34. Shaker JL, Lukert BP. Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. Endocrinol Metab Clin North Am 2005 Jun;34(2):341-56, viii-ix.
35. Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: summary of a workshop. J Clin Endocrinol Metab 2001 Dec;86(12):5681-5685.

-
36. Orth DN. Glucocorticoid effects on bone, muscle and connective tissue. 2003 Up To Date. Versión 11.1.Nov; 6.
 37. Sambrook PN, Hughes DR, Nelson AE, Robinson BG, Mason RS. Osteocyte viability with glucocorticoid treatment: relation to histomorphometry. *Ann Rheum Dis* 2003 Dec;62(12):1215-1217.
 38. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000 Apr;21(2):115-137.
 39. Gutierrez-Polo R. Osteoporosis inducida por glucocorticoides. *Anales Sis San Navarra* . 2003; 26(3).
 40. Natsui K, Tanaka K, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, Ozasa A, et al. High-dose glucocorticoid treatment induces rapid loss of trabecular bone mineral density and lean body mass. *Osteoporos Int* 2006 Jan;17(1):105-108.
 41. Lane NE. An update on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2001 Feb;27(1):235-253.
 42. Rubin MR, Bilezikian JP. Clinical review 151: The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Sep;87(9):4033-4041.
 43. Clowes JA, Pee N, Eastell R. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 28:2289-2293.
 44. McKinlay SM, Bifano NL, McKinlay JB. Smoking and age at menopause in women. *Ann Intern Med* 1985 Sep;103(3):350-356
 45. Seeman E. Pathogenesis of bone fragility in women and men. *Lancet* 2002 May 25;359(9320):1841-1850.

46. Manson JE, Martin KA. Clinical practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med* 2001 Jul 5;345(1):34-40.
47. Kelly A, Houtwed CW. Colegio de Médicos y Cirujanos de la Universidad de Columbia. Programa de Autoevaluación y Actualización Científica Unidad 3: La deficiencia de estrógeno y la Menopausia 1996
48. Díaz López JB, Rodríguez Rodríguez A, Ramos B, Caramelo C, Rodríguez García M, Cannata Andía JB. Osteoporosis, estrógenos y metabolismo óseo. Implicaciones en la insuficiencia renal crónica. *Nefrología*. 2003; 23 (2).
49. Riancho JA, Gutiérrez GA. Factores reguladores de la resorción ósea. *Rev Metabolismo óseo y mineral* 2003; 1(2):51-6).
50. Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Nov 20;98(24):13960-13965.
51. Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, Godecke A, Helfrich MH, Reid DM, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 2001 Feb;142(2):760-766.
52. Rosen CJ. Restoring aging bones. *Sci Am* 2003 Mar;288(3):70-77.
53. Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ, et al. FSH directly regulates bone mass. *Cell* 2006 Apr 21;125(2):247-260.
54. Iqbal J, Sun L, Kumar TR, Blair HC, Zaidi M. Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Oct 3;103(40):14925-14930.
55. Link TM. Osteoporosis imaging: state of the art and advanced imaging. *Radiology* 2012 Apr;263(1):3-17.

56. Romero Barco CM, Manrique Arijá S, Rodríguez Pérez M. Biochemical markers in osteoporosis: usefulness in clinical practice. *Reumatol Clin* 2012 May-Jun;8(3):149-152.
57. Guzmán Cruz J, Flores Martínez R, Gómez Martínez J, Soberanes Gutiérrez E, Escalera Serrano R, d'Hyver de las Deses C. Osteoporosis. Conceptos básicos para la práctica diaria. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*.2011;14(3):128-140.
58. Murphy E, Bresnihan B, FitzGerald O. Validated measurement of periarticular bone mineral density at the knee joint by dual energy x ray absorptiometry. *Ann Rheum Dis* 2001 Jan;60(1):8-13.
59. Caeiro JR, Blanco M, Dapía S, Fernández F. Diagnóstico mediante DXA periférica de la osteoporosis postmenopáusica en la provincia de Orense. *Rev Esp Enferm Metab Ósea*. 2004.13 (2):30-33.
60. Álvarez González M, Elena Aldana DM, Carmona Rosa M. Densitometría ósea: Prueba diagnóstica de la imagen para la detección de osteoporosis. 2012 .
61. Link TM, Majumdar S, Lin JC, Newitt D, Augat P, Ouyang X, et al. A comparative study of trabecular bone properties in the spine and femur using high resolution MRI and CT. *J Bone Miner Res* 1998 Jan;13(1):122-132.
62. Link TM, Vieth V, Langenberg R, Meier N, Lotter A, Newitt D, et al. Structure analysis of high resolution magnetic resonance imaging of the proximal femur: in vitro correlation with biomechanical strength and BMD. *Calcif Tissue Int* 2003 Feb;72(2):156-165..
63. Majumdar S, Kothari M, Augat P, Newitt DC, Link TM, Lin JC, et al. High-resolution magnetic resonance imaging: three-dimensional trabecular bone architecture and biomechanical properties. *Bone* 1998 May;22(5):445-454.
64. Phan CM, Matsuura M, Bauer JS, Dunn TC, Newitt D, Lochmueller EM, et al. Trabecular bone structure of the calcaneus: comparison of MR imaging at 3.0 and 1.5 T with micro-CT as the standard of reference. *Radiology* 2006 May;239(2):488-496.

65. Cortet B, Boutry N, Dubois P, Bourel P, Cotten A, Marchandise X. In vivo comparison between computed tomography and magnetic resonance image analysis of the distal radius in the assessment of osteoporosis. *J Clin Densitom* 2000 Spring;3(1):15-26.
66. Link TM, Majumdar S, Augat P, Lin JC, Newitt D, Lu Y, et al. In vivo high resolution MRI of the calcaneus: differences in trabecular structure in osteoporosis patients. *J Bone Miner Res* 1998 Jul;13(7):1175-1182.
67. Majumdar S, Link TM, Augat P, Lin JC, Newitt D, Lane NE, et al. Trabecular bone architecture in the distal radius using magnetic resonance imaging in subjects with fractures of the proximal femur. *Magnetic Resonance Science Center and Osteoporosis and Arthritis Research Group. Osteoporos Int* 1999;10(3):231-239.
68. Wehrli FW, Gomberg BR, Saha PK, Song HK, Hwang SN, Snyder PJ. Digital topological analysis of in vivo magnetic resonance microimages of trabecular bone reveals structural implications of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2001 Aug;16(8):1520-1531.
69. Kalpakcioglu BB, Engelke K, Genant HK. Advanced imaging assessment of bone fragility in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Bone* 2011 Jun 1;48(6):1221-1231.
70. Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006 Jan;2(1):35-43.
71. Baker LL, Goodman SB, Perkash I, Lane B, Enzmann DR. Benign versus pathologic compression fractures of vertebral bodies: assessment with conventional spin-echo, chemical-shift, and STIR MR imaging. *Radiology* 1990 Feb;174(2):495-502.
72. Bousson V, Le Bras A, Roqueplan F, Kang Y, Mitton D, Kolta S, et al. Volumetric quantitative computed tomography of the proximal femur: relationships linking geometric and densitometric variables to bone strength. Role for compact bone. *Osteoporos Int* 2006;17(6):855-864.
73. Genant HK, Engelke K, Prevrhal S. Advanced CT bone imaging in osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)* 2008 Jul;47 Suppl 4:iv9-16.

-
74. Malluche, H. Faugere, MC, . Eds. Atlas of Mineralized bone histology. 1986.
 75. Gomez Alonso, C; Menendez Rodriguez, P; Cannata Andia, JB. Osteoporosis y Menopausia. Histomorfometría y biopsia ósea en la práctica clínica. Ed. Médica panamericana, 2008. p.(187-196).
 76. Szulc P, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2008 Dec;19(12):1683-1704.
 77. Camacho P, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. In: Murray J, Favus, editors. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2006. p. 127–33.
 78. Melton LJ, 3rd, Khosla S, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J Bone Miner Res* 1997 Jul;12(7):1083-1091.
 79. Torres E, Mezquita P, De la Higuera M, Fernández D, Muñoz M. Actualización sobre la determinación de marcadores de remodelado óseo. *Endocrinol Nutr.* 2003;50:237–43.
 80. Sugiyama T, Meakin LB, Galea GL, Jackson BF, Lanyon LE, Ebetino FH, et al. Risedronate does not reduce mechanical loading-related increases in cortical and trabecular bone mass in mice. *Bone* 2011 Jul;49(1):133-139.
 81. Lems WF, den Heijer M. Established and forthcoming drugs for the treatment of osteoporosis. *Neth J Med* 2013 May;71(4):188-193
 82. Lips P, van Schoor NM. The effect of vitamin D on bone and osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011 Aug;25(4):585-591..
 83. Bone HG, Hosking D, Devogelaer JP, Tucci JR, Emkey RD, Tonino RP, et al. Ten years' experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004 Mar 18;350(12):1189-1199.

-
84. Rosen CJ. Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2005 Aug 11;353(6):595-603.
 85. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 2006 May;38(5):617-627.
 86. Lawson MA, Xia Z, Barnett BL, Triffitt JT, Phipps RJ, Dunford JE, et al. Differences between bisphosphonates in binding affinities for hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010 Jan;92(1):149-155.
 87. Roelofs AJ, Coxon FP, Ebetino FH, Lundy MW, Henneman ZJ, Nancollas GH, et al. Fluorescent risedronate analogues reveal bisphosphonate uptake by bone marrow monocytes and localization around osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res* 2010 Mar;25(3):606-616.
 88. North American Menopause Society. Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2006 May-Jun;13(3):340-67; quiz 368-9.
 89. Camacho-Alonso F, Lopez-Jornet P, Vicente-Hernandez A. Short-term effect of zoledronic acid upon fracture resistance of the mandibular condyle and femoral head in an animal model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013 May 1;18(3):e421-6.
 90. Hernandez CJ. How can bone turnover modify bone strength independent of bone mass? *Bone* 2008 Jun;42(6):1014-1020.
 91. Burr DB, Diab T, Koivunemi A, Koivunemi M, Allen MR. Effects of 1 to 3 years' treatment with alendronate on mechanical properties of the femoral shaft in a canine model: implications for subtrochanteric femoral fracture risk. *J Orthop Res* 2009 Oct;27(10):1288-1292.
 92. Montenegro SD, Pedroza NI, Vargas ES. Metabolismo óseo: Actualización. *Revista de postgrado de la VI Cátedra de Medicina* 2002; 117:116-123.

93. Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther* 2013 May 31;7:435-448.
94. Seeman E, Delmas PD, Hanley DA, Sellmeyer D, Cheung AM, Shane E, et al. Microarchitectural deterioration of cortical and trabecular bone: differing effects of denosumab and alendronate. *J Bone Miner Res* 2010 Aug;25(8):1886-1894.
95. Malan J, Ettinger K, Naumann E, Beirne OR. The relationship of denosumab pharmacology and osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012 Dec;114(6):671-676.
96. Watson PH, Hanley DA. Parathyroid hormone: regulation of synthesis and secretion. *Clin Inves Med* 1993 Feb;16(1):58-77.
97. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev* 2005 Aug;26(5):688-703.
98. Lee WL, Chao HT, Cheng MH, Wang PH. Rationale for using raloxifene to prevent both osteoporosis and breast cancer in postmenopausal women. *Maturitas* 2008 Jun 20;60(2):92-107.
99. Recker RR, Kendler D, Recknor CP, Rooney TW, Lewiecki EM, Utian WH, et al. Comparative effects of raloxifene and alendronate on fracture outcomes in postmenopausal women with low bone mass. *Bone* 2007 Apr;40(4):843-851.
100. Boivin G, Deloffre P, Perrat B, Panczer G, Boudeulle M, Mauras Y, et al. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J Bone Miner Res* 1996 Sep;11(9):1302-1311.
101. Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone* 2008 Jan;42(1):129-138.

102. Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, et al. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 May;90(5):2816-2822..
103. Parreño JR. Aspectos socioasistenciales de la osteoporosis del anciano. Manual práctico de osteoporosis en atención primaria. Monografía del fondo editorial FOHEMO. Madrid 1996.
104. Cabo JA, Lopez V, Castillo P, García ME, Lara F. Deporte y mujer. *Traumatología y medicina deportiva*. Tomo 3. Madrid, Paraninfo 2002; 315-332.
105. Wong CC, McGirt MJ. Vertebral compression fractures: a review of current management and multimodal therapy. *J Multidiscip Healthc* 2013 Jun 17;6:205-214.
106. Ensrud KE, Schousboe JT. Clinical practice. Vertebral fractures. *N Engl J Med* 2011 Apr 28;364(17):1634-1642.
107. Rommens PM, Wagner D, Hofmann A. Surgical management of osteoporotic pelvic fractures: a new challenge. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2012 Oct;38(5):499-509.
108. Bhandari M, Devereaux PJ, Tornetta P, 3rd, Swiontkowski MF, Berry DJ, Haidukewych G, et al. Operative management of displaced femoral neck fractures in elderly patients. An international survey. *J Bone Joint Surg Am* 2005 Sep;87(9):2122-2130.
109. Bracho C, Arizaga E. Consenso de manejo de fracturas osteoporóticas. Sociedad ecuatoriana de Ortopedia y Traumatología. 2009
110. Jornadas sobre envejecimiento y Osteoporosis: Situación actual y perspectiva de futuro. Fundación ramón Areces. Madrid 29 de Abril 2013).
111. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 2007 Mar;22(3):465-475.

112. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001 Jun 22;1:66-81.
113. Brommage R. Perspectives on using nonhuman primates to understand the etiology and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001 Jun;1(4):307-325.
114. Havill LM. Osteon remodeling dynamics in *Macaca mulatta*: normal variation with regard to age, sex, and skeletal maturity. *Calcif Tissue Int* 2004 Jan;74(1):95-102.
115. Smith SY, Jolette J, Turner CH. Skeletal health: primate model of postmenopausal osteoporosis. *Am J Primatol* 2009 Sep;71(9):752-765.
116. Cerroni AM, Tomlinson GA, Turnquist JE, Grynpas MD. Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. *Am J Phys Anthropol* 2000 Nov;113(3):389-410.
117. Monteiro BS, Argolo-Neto NM, Nardi NB, Chagastelles PC, Carvalho PH, Bonfa LP, et al. Treatment of critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. *An Acad Bras Cienc* 2012 Sep;84(3):841-851.
118. Monteiro BS, Del Carlo RJ, Argolo-Neto NM, Nardi NB, Carvalho PH, Bonfa Lde P, et al. Association of mesenchymal stem cells with platelet rich plasma on the repair of critical calvarial defects in mice. *Acta Cir Bras* 2012 Mar;27(3):201-209.
119. Streckbein P, Jackel S, Malik CY, Obert M, Kahling C, Wilbrand JF, et al. Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg* 2013 Sep;41(6):496-503.
120. Okamoto Y, Tateishi H, Kinoshita K, Tsuchiya S, Hibi H, Ueda M. An experimental study of bone healing around the titanium screw implants in ovariectomized rats: enhancement of bone healing by bone marrow stromal cells transplantation. *Implant Dent* 2011 Jun;20(3):236-245.

121. Glosel B, Kuchler U, Watzek G, Gruber R. Review of dental implant rat research models simulating osteoporosis or diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010 May-Jun;25(3):516-524.
122. Okamura A, Ayukawa Y, Iyama S, Koyano K. Effect of the difference of bone turnover on peri-titanium implant osteogenesis in ovariectomized rats. *J Biomed Mater Res A* 2004 Sep 1;70(3):497-505.
123. Qi MC, Zhou XQ, Hu J, Du ZJ, Yang JH, Liu M, et al. Oestrogen replacement therapy promotes bone healing around dental implants in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004 Apr;33(3):279-285.
124. He X, Dziak R, Yuan X, Mao K, Genco R, Swihart M, et al. BMP2 genetically engineered MSCs and EPCs promote vascularized bone regeneration in rat critical-sized calvarial bone defects. *PLoS One* 2013;8(4):e60473.
125. Cho P, Schneider GB, Krizan K, Keller JC. Examination of the bone-implant interface in experimentally induced osteoporotic bone. *Implant Dent* 2004 Mar;13(1):79-87.
126. Bolgen N, Korkusuz P, Vargel I, Kilic E, Guzel E, Cavusoglu T, et al. Stem cell suspension injected HEMA-lactate-dextran cryogels for regeneration of critical sized bone defects. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2013 Mar 11.
127. Choi JW, Park EJ, Shin HS, Shin IS, Ra JC, Koh KS. In Vivo Differentiation of Undifferentiated Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Critical-Sized Calvarial Bone Defects. *Ann Plast Surg* 2012 Dec 6.
128. He X, Dziak R, Mao K, Genco R, Swihart M, Li C, et al. Integration of a novel injectable nano calcium sulfate/alginate scaffold and BMP2 gene-modified mesenchymal stem cells for bone regeneration. *Tissue Eng Part A* 2013 Feb;19(3-4):508-518.
129. Agacayak S, Gulsun B, Ucan MC, Karaoz E, Nergiz Y. Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012 May;16(5):679-686.

130. Yang G, Song L, Guo C, Zhao S, Liu L, He F. Bone responses to simvastatin-loaded porous implant surfaces in an ovariectomized model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012 Mar-Apr;27(2):369-374.
131. Almagro MI, Roman-Blas JA, Bellido M, Castaneda S, Cortez R, Herrero-Beaumont G. PTH [1-34] enhances bone response around titanium implants in a rabbit model of osteoporosis. *Clin Oral Implants Res* 2013 Sep;24(9):1027-1034
132. Luo E, Hu J, Bao C, Li Y, Tu Q, Murray D, et al. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits. *Acta Biomater* 2012 Feb;8(2):734-743.
133. Qi M, Hu J, Li J, Li J, Dong W, Feng X, et al. Effect of zoledronate acid treatment on osseointegration and fixation of implants in autologous iliac bone grafts in ovariectomized rabbits. *Bone* 2012 Jan;50(1):119-127.
134. Martin-Monge E, Tresguerres IF, Blanco L, Khraisat A, Rodriguez-Torres R, Tresguerres JA. Validation of an osteoporotic animal model for dental implant analyses: an in vivo densitometric study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011 Jul-Aug;26(4):725-730.
135. Lai YL, Kuo NC, Hsiao WK, Yew TL, Lee SY, Chen HL. Intramarrow bone morphogenetic protein 4 gene delivery enhances early implant stability in femurs of ovariectomized rabbits. *J Periodontol* 2011 Jul;82(7):1043-1050.
136. Bellido M, Lugo L, Castaneda S, Roman-Blas JA, Rufian-Henares JA, Navarro-Alarcon M, et al. PTH increases jaw mineral density in a rabbit model of osteoporosis. *J Dent Res* 2010 Apr;89(4):360-365.
137. Vidigal GM,Jr, Groisman M, Gregorio LH, Soares Gde A. Osseointegration of titanium alloy and HA-coated implants  in healthy and ovariectomized animals: a histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res* 2009 Nov;20(11):1272-1277.
138. Waters RV, Gamradt SC, Asnis P, Vickery BH, Avnur Z, Hill E, et al. Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop Scand* 2000 Jun;71(3):316-321.

139. Oliveira LD, Giovanini AF, Abuabara A, Klug LG, Gonzaga CC, Zielak JC, et al. Fragmented adipose tissue graft for bone healing: histological and histometric study in rabbits' calvaria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013 May 1;18(3):e510-5.
140. Arrigoni E, de Girolamo L, Di Giancamillo A, Stanco D, Dellavia C, Carnelli D, et al. Adipose-derived stem cells and rabbit bone regeneration: histomorphometric, immunohistochemical and mechanical characterization. *J Orthop Sci* 2013 Mar;18(2):331-339.
141. Lu LX, Zhang XF, Wang YY, Ortiz L, Mao X, Jiang ZL, et al. Effects of hydroxyapatite-containing composite nanofibers on osteogenesis of mesenchymal stem cells in vitro and bone regeneration in vivo. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013 Jan 23;5(2):319-330.
142. Kasten P, Beverungen M, Lorenz H, Wieland J, Fehr M, Geiger F. Comparison of platelet-rich plasma and VEGF-transfected mesenchymal stem cells on vascularization and bone formation in a critical-size bone defect. *Cells Tissues Organs* 2012;196(6):523-533.
143. Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stills HF, Jankowsky ML, Ebert DC, et al. Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs: a pilot study. *J Bone Miner Res* 1993 Nov;8(11):1311-1321.
144. Scholz-Ahrens KE, Delling G, Stampa B, Helfenstein A, Hahne HJ, Acil Y, et al. Glucocorticosteroid-induced osteoporosis in adult primiparous Gottingen miniature pigs: effects on bone mineral and mineral metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 Jul;293(1):E385-95.
145. Chavassieux P, Pastoureau P, Chapuy MC, Delmas PD, Meunier PJ. Glucocorticoid-induced inhibition of osteoblastic bone formation in ewes: a biochemical and histomorphometric study. *Osteoporos Int* 1993 Mar;3(2):97-102.

146. Dvorak G, Reich K, Tangl S, Lill CA, Gottschalk-Baron M, Watzek G, et al. Periodontal histomorphometry and status of aged sheep subjected to ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application. *Arch Oral Biol* 2009 Sep;54(9):857-863
147. Zarrinkalam MR, Schultz CG, Parkinson IH, Moore RJ. Osteoporotic characteristics persist in the spine of ovariectomized sheep after withdrawal of corticosteroid administration. *J Osteoporos* 2012;2012:182509.
148. Zarrinkalam MR, Beard H, Schultz CG, Moore RJ. Validation of the sheep as a large animal model for the study of vertebral osteoporosis. *Eur Spine J* 2009 Feb;18(2):244-253.
149. Manassero M, Viateau V, Deschepper M, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H, et al. Bone regeneration in sheep using acropora coral, a natural resorbable scaffold, and autologous mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2013 Jul;19(13-14):1554-1563.
150. Dvorak G, Reich KM, Tangl S, Goldhahn J, Haas R, Gruber R. Cortical porosity of the mandible in an osteoporotic sheep model. *Clin Oral Implants Res* 2011 May;22(5):500-505.
151. Wu ZX, Lei W, Hu YY, Wang HQ, Wan SY, Ma ZS, et al. Effect of ovariectomy on BMD, micro-architecture and biomechanics of cortical and cancellous bones in a sheep model. *Med Eng Phys* 2008 Nov;30(9):1112-1118.
152. Newton BI, Cooper RC, Gilbert JA, Johnson RB, Zardiackas LD. The ovariectomized sheep as a model for human bone loss. *J Comp Pathol* 2004 May;130(4):323-326.
153. Aref M, Gallant MA, Organ JM, Wallace JM, Newman CL, Burr DB, et al. In vivo reference point indentation reveals positive effects of raloxifene on mechanical properties following 6 months of treatment in skeletally mature beagle dogs. *Bone* 2013 Oct;56(2):449-453.
154. Dimopoulou M, Kirpensteijn J, Nielsen DH, Buelund L, Hansen MS. Nutritional secondary hyperparathyroidism in two cats: evaluation of bone mineral density with

- dual-energy X-ray absorptiometry and computed tomography. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010;23(1):56-61..
155. del Real RP, Ooms E, Wolke JG, Vallet-Regi M, Jansen JA. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A* 2003 Apr 1;65(1):30-36
156. Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 2000 Jul;31(3):389-398
157. Shih TC, Teng NC, Wang PD, Lin CT, Yang JC, Fong SW, et al. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in beagles: histological properties. *J Biomed Mater Res A* 2013 Aug;101(8):2405-2411.
158. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011 May 31;9:66-7015-9-66.
159. Xiao W, Fu H, Rahaman MN, Liu Y, Bal BS. Hollow hydroxyapatite microspheres: a novel bioactive and osteoconductive carrier for controlled release of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. *Acta Biomater* 2013 Sep;9(9):8374-8383.
160. de Peppo GM, Marcos-Campos I, Kahler DJ, Alsalman D, Shang L, Vunjak-Novakovic G, et al. Engineering bone tissue substitutes from human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 May 21;110(21):8680-8685.
161. Geng W, Ma D, Yan X, Liu L, Cui J, Xie X, et al. Engineering tubular bone using mesenchymal stem cell sheets and coral particles. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Apr 19;433(4):595-601.
162. Mobbs RJ, Chung M, Rao PJ. Bone graft substitutes for anterior lumbar interbody fusion. *Orthop Surg* 2013 May;5(2):77-85.
163. Li M, Liu X, Liu X, Ge B. Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res* 2010 Jul;468(7):1978-1985

164. Fleming JE,Jr, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000 Jul;31(3):357-374.
165. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002 May;25(5 Suppl):s601-9
166. Larsson S, Bauer TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2002 Feb;(395)(395):23-32
167. Saldaña, A. Efecto de La implantación de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos en la reparación de defectos cavitarios del fémur en un modelo experiemtal ovino. Tesis Doctoral. Universidad de León. 2010.
168. Di Palma F, Douet M, Boachon C, Guignandon A, Peyroche S, Forest B, et al. Physiological strains induce differentiation in human osteoblasts cultured on orthopaedic biomaterial. *Biomaterials* 2003 Aug;24(18):3139-3151.
169. Haggerty AE, Oudega M. Biomaterials for spinal cord repair. *Neurosci Bull* 2013 Aug;29(4):445-459.
170. Walboomers XF, Jansen JA. Cell and tissue behavior on micro-grooved surfaces. *Odontology* 2001 Nov;89(1):2-11.
171. Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Interfacial reactions of osteoblasts to dental and implant materials. *J Oral Maxillofac Surg* 1994 Jan;52(1):52-56.
172. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. Fundamentos de Biomecánica y Biomateriales. Proubasta I., Gil J., Planell J.A. (Eds.), Ergon, Madrid.1999.
173. Vielreicher M, Schurmann S, Detsch R, Schmidt MA, Buttgereit A, Boccaccini A, et al. Taking a deep look: modern microscopy technologies to optimize the design and functionality of biocompatible scaffolds for tissue engineering in regenerative medicine. *J R Soc Interface* 2013 Jul 17;10(86):20130263.

174. López F, López H. La interfase hueso-implante. En Bases para una Implantología segura. López Rubín F., López Rubín H (Eds.). TRP Ediciones, España, 1994. pps. 22-27.
175. Miño N . Estudio comparativo de la respuesta ósea generada por dos cementos y un biovidrio basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experiemntales.Tesis doctoral de la Universidad de Santiago de Compostela. 2006.
176. López F., López H. Mantenimiento de los implantes endoóseos. En Bases para una Implantología segura. Eds. López Rubín F., López Rubín H. TRP Ediciones, España. 1994. pps. 220-226.
177. Williams DF. Titanium for Medical Aplications. En DM Brunette, P Tengvall, M Textor, P Thomsen eds. Titanium in Medicine. Cap 2:14-23. Ed Springer, Berlin. 2001.
178. Pozio A, Palmieri A, Girardi A, Cura F, Carinci F. Titanium nanotubes stimulate osteoblast differentitaion of stem cells from pulp and adipose tissue. Dent Res J (Isfahan).2012 Dec;9(Suppl 2):S169-74.
179. Santamaría j, Martínez r, Goiriena fj Materiales Implantarios de Uso más Frecuente en el Territorio Oro-Maxillo-Facial. Rev Eur Odontoestomatol .1989. 102-104.
180. Jebahi S, Oudadesse H, Jardak N, Khayat I, Keskes H, Khabir A, et al. Biological therapy of strontium-substituted bioglass for soft tissue wound-healing: responses to oxidative stress in ovariectomised rats. Ann Pharm Fr 2013 Jul;71(4):234-242.
181. Gomes FO, Pires RA, Reis RL. Aluminum-free glass-ionomer bone cements with enhanced bioactivity and biodegradability. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2013 Apr 1;33(3):1361-1370.
182. Vitale-Brovarone C, Baino F, Tallia F, Gervasio C, Verne E. Bioactive glass-derived trabecular coating: a smart solution for enhancing osteointegration of prosthetic elements. J Mater Sci Mater Med 2012 Oct;23(10):2369-2380.

183. Visser R, Arrabal PM, Santos-Ruiz L, Fernandez-Barranco R, Becerra J, Cifuentes M. A Collagen-Targeted Biomimetic RGD Peptide to Promote Osteogenesis. *Tissue Eng Part A* 2013 Aug 29.
184. Oliveira MR, Martins E, Celio-Mariano R, Sonoda CK, Rangel Garcia I,Jr, de Melo WM. Tissue engineering: using collagen type I matrix for bone healing of bone defects. *J Craniofac Surg* 2013 Jul;24(4):e394-6.
185. Ullah M, Sittering M, Ringe J. Extracellular matrix of adipogenically differentiated mesenchymal stem cells reveals a network of collagen filaments, mostly interwoven by hexagonal structural units. *Matrix Biol* 2013 Jul 12.
186. Williams df Titanium for Medical Applications. En DM Brunette, P Tengvall, M Textor, P thomsen eds. *titanium in medicine*. cap 2:14-23. ed springer, Berlin. 2001.
187. Freese hl, Volas mg, Wood jr Metallurgy and Technological Properties of Titanium and Titanium Alloys. En DM Brunette, P Tengvall, M Textor, P Thomsen eds. *Titanium in Medicine*. Cap 3:26-49. Ed Springer, Berlin. 2001.
188. Tengvall P. Proteins at Titanium Interfaces. En DM Brunette, P Tengvall, M Textor, P Thomsen eds. *Titanium in Medicine*. Cap 14:457-484. Ed Springer, Berlin. 2001.
189. Mundt T, Schwahn C, Stark T, Biffar R. Clinical response of edentulous people treated with mini dental implants in nine dental practices. *Gerodontology* 2013 Jul 17.
190. Kim J, Kim HN, Lim KT, Kim Y, Pandey S, Garg P, et al. Synergistic effects of nanotopography and co-culture with endothelial cells on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2013 Oct;34(30):7257-7268.
191. Rivera-Chacon DM, Alvarado-Velez M, Acevedo-Morantes CY, Singh SP, Gultepe E, Nagesha D, et al. Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J Biomed Nanotechnol* 2013 Jun;9(6):1092-1097.

192. Yoo D, Tovar N, Jimbo R, Marin C, Anchieta RB, Machado LS, et al. Increased osseointegration effect of bone morphogenetic protein 2 on dental implants: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2013 Jul 12.
193. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002 Jun;84-A(6):1032-1044.
194. Fisher DM, Wong JM, Crowley C, Khan WS. Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013 May;8(3):260-268.
195. Xu H, Ke K, Zhang Z, Luo X, Jin X, Liu SS, et al. Effects of platelet-rich plasma and recombinant human bone morphogenetic protein-2 on suture distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg* 2013 Mar;24(2):645-650.
196. Berner A, Boerckel JD, Saifzadeh S, Steck R, Ren J, Vaquette C, et al. Biomimetic tubular nanofiber mesh and platelet rich plasma-mediated delivery of BMP-7 for large bone defect regeneration. *Cell Tissue Res* 2012 Mar;347(3):603-612.
197. Chaput CD, Patel KV, Brindley GW, Roux MA, Hu N, Dmitriev A, et al. Influence of a platelet concentrate on prosthetic bone ingrowth in a rabbit model. *J Surg Orthop Adv* 2007 Winter;16(4):159-163.
198. Hughes-Fulford M, Li CF. The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization. *J Orthop Surg Res* 2011 Feb 9;6:8-799X-6-8.
199. Chen S, Yang J, Wang H, Chao Y, Zhang C, Shen J, et al. Adenovirus encoding BMP-7 immobilized on titanium surface exhibits local delivery ability and regulates osteoblast differentiation in vitro. *Arch Oral Biol* 2013 Sep;58(9):1225-1231.
200. Hsu WK, Wang JC, Liu NQ, Krenek L, Zuk PA, Hedrick MH, et al. Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am* 2008 May;90(5):1043-1052.

201. Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 2006 Dec;27(36):6052-6063.
202. Elefteriou F, Campbell P, Ma Y. Control of Bone Remodeling by the Peripheral Sympathetic Nervous System. *Calcif Tissue Int* 2013 Jun 14.
203. Livingstone C. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. *Clin Sci (Lond)* 2013 Sep;125(6):265-280.
204. Giatsidis G, Dalla Venezia E, Bassetto F. The role of gene therapy in regenerative surgery: updated insights. *Plast Reconstr Surg* 2013 Jun;131(6):1425-1435.
205. Di Alberti L, Rossetto A, Albanese M, D'Agostino A, De Santis D, Bertossi D, et al. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) mRNA in healthy bone tissue around implants and in peri-implantitis. *Minerva Stomatol* 2013 Jun 11.
206. Bauer TW, Smith ST. Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations. *Clin Orthop Relat Res* 2002 Feb;(395)(395):11-22.
207. Shors E. In: Shors E, ed. Bone graft substitutes. ASTM International, 2003: 271- 88.
208. Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin Orthop Relat Res* 1983 Oct;(179)(179):246-252.
209. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002 Jun;84-A(6):1032-1044.
210. Petrovic V, Zivkovic P, Petrovic D, Stefanovic V. Craniofacial bone tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012 Sep;114(3):e1-9.
211. Nather N. In: Philips O, ed. Bone biology and healing. 1 ed. Singapore: World Scientific, 2003: 47-67.
212. del Real RP, Ooms E, Wolke JG, Vallet-Regi M, Jansen JA. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A* 2003 Apr 1;65(1):30-36.

-
213. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int* 2013;2013:496218.
 214. Fleming JE,Jr, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000 Jul;31(3):357-374.
 215. Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 2000 Jul;31(3):389-398.
 216. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002 May;25(5 Suppl):s601-9.
 217. Larsson S, Bauer TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2002 Feb;(395)(395):23-32.
 218. Zimmermann R, Gabl M, Lutz M, Angermann P, Gschwentner M, Pechlaner S. Injectable calcium phosphate bone cement Norian SRS for the treatment of intra-articular compression fractures of the distal radius in osteoporotic women. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003 Feb;123(1):22-27.
 219. Cassidy C, Jupiter JB, Cohen M, Delli-Santi M, Fennell C, Leinberry C, et al. Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study. *J Bone Joint Surg Am* 2003 Nov;85-A(11):2127-2137.
 220. Kopylov P, Runnqvist K, Jonsson K, Aspenberg P. Norian SRS versus external fixation in redisplaced distal radial fractures. A randomized study in 40 patients. *Acta Orthop Scand* 1999 Feb;70(1):1-5.
 221. Horstmann WG, Verheyen CC, Leemans R. An injectable calcium phosphate cement as a bone-graft substitute in the treatment of displaced lateral tibial plateau fractures. *Injury* 2003 Feb;34(2):141-144.
 222. Pensak MJ, Lieberman JR. Gene therapy for bone regeneration. *Curr Pharm Des* 2013;19(19):3466-3473.

-
223. Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. *Plast Reconstr Surg* 2004 Oct;114(5):1155-63; discussion 1164-5.
224. Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, et al. Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res* 2002;63(2):115-121.
225. Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 2002 Feb;(395)(395):66-80.
226. Forriol F, Esperanza R. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma Fund Mapfre* 2008;19:88-101
227. Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS, Mosca JD, Kraus KH, Kadiyala S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998 Oct;(355 Suppl)(355 Suppl):S247-56.
228. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001 Sep;3(9):778-784.
229. Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000 Oct;3(10):986-991.
230. Prosper F. Células madre adulta. *Cardiovascular risk factors* 2004;13:11-8.
231. Kakar S, Einhorn T. En: Friedlander G, Mankin H, Goldberg V, eds. *Injertos y sustitutos óseos*. 1 ed. Barcelona: Ars medica, 2008: 23-35.

-
232. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997 May 30;89(5):773-779.
233. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003 Nov 15;102(10):3483-3493.
234. Bennett JH, Joyner CJ, Triffitt JT, Owen ME. Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *J Cell Sci* 1991 May;99 (Pt 1)(Pt 1):131-139.
235. Forriol F, Espqarza R. Tissue engineering: application of pluripotent stem cells in traumatology and orthopedic surgery. *Trauma Fund MAPFRE* (2008; 19(2):88-101.
236. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007 Nov;25(11):2739-2749.
237. Mansilla E, Marin GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, et al. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplant Proc* 2006 Apr;38(3):967-969.
238. Ramirez M, Lucia A, Gomez-Gallego F, Esteve-Lanao J, Perez-Martinez A, Foster C, et al. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *Br J Sports Med* 2006 Aug;40(8):719-722.
239. Takigawa M. CCN2: a master regulator of the genesis of bone and cartilage. *J Cell Commun Signal* 2013 Aug;7(3):191-201.
240. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells--their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000 Nov;24 Suppl 4:S41-4.
241. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;251:3-11.

-
242. Schade A, Delyagina E, Scharfenberg D, Skorska A, Lux C, David R, et al. Innovative Strategy for MicroRNA Delivery in Human Mesenchymal Stem Cells via Magnetic Nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2013 May 23;14(6):10710-10726.
 243. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 1988;136:42-60.
 244. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974;2(2):83-92.
 245. Gao X, Usas A, Lu A, Tang Y, Wang B, Chen C, et al. BMP2 is superior to BMP4 for promoting human muscle derived-stem cell mediated bone regeneration in a critical size calvarial defect model. *Cell Transplant* 2012 Nov 1.
 246. Castro-Govea Y, Cervantes-Kardasch VH, Borrego-Soto G, Martinez-Rodriguez HG, Espinoza-Juarez M, Romero-Diaz V, et al. Human bone morphogenetic protein 2-transduced mesenchymal stem cells improve bone regeneration in a model of mandible distraction surgery. *J Craniofac Surg* 2012 Mar;23(2):392-396.
 247. Hsu WK, Wang JC, Liu NQ, Krenek L, Zuk PA, Hedrick MH, et al. Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am* 2008 May;90(5):1043-1052.
 248. Jakob F, Ebert R, Ignatius A, Matsushita T, Watanabe Y, Groll J, et al. Bone tissue engineering in osteoporosis. *Maturitas* 2013 Jun;75(2):118-124.
 249. Misch, Carl E , *Implantología Contemporánea* . Editorial Elsevier . 3ª Edición, 2009.
 250. Esposito M. Titanium for Dental Applications (I). En DM Brunette, P Tengvall, M Textor, P Thomsen eds. *Titanium in Medicine*. Cap 24:828-860. Ed Springer, Berlin. 2001.
 251. Small IA. The fixed mandibular implant: its use in reconstructive prosthetics. *J Am Dent Assoc* 1990 Sep;121(3):369, 372, 374.

-
252. Wood I. Implant dentistry. *Prim Dent J* 2013 Apr;2(2):5.
253. Meffert RM, Langer B, Fritz ME. Dental implants: a review. *J Periodontol* 1992 Nov;63(11):859-870.
254. Hahn JA. The blade implant. *J Am Dent Assoc* 1990 Sep;121(3):394, 396, 400 passim
255. Steflik DE, Lake FT, Sisk AL, Parr GR, Hanes PJ, Davis HC, et al. A comparative investigation in dogs: 2-year morphometric results of the dental implant--bone interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996 Jan-Feb;11(1):15-25.
256. Trisi P, Quaranta M, Emanuelli M, Piattelli A. A light microscopy, scanning electron microscopy, and laser scanning microscopy analysis of retrieved blade implants after 7 to 20 years of clinical function. A report of 3 cases. *J Periodontol* 1993 May;64(5):374-378.
257. Turner HF. Ramus frame implant technique. *J Am Dent Assoc* 1990 Sep;121(3):418-420.
258. Rees J. Asepsis in implant dentistry. *Prim Dent J* 2012 Oct;1(1):47-49.
259. Louropoulou A, Slot DE, Van der Weijden F. The effects of mechanical instruments on contaminated titanium dental implant surfaces: a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 2013 Jul 8.
260. Mehrali M, Shirazi FS, Mehrali M, Metselaar HS, Kadri NA, Osman NA. Dental implants from functionally graded materials. *J Biomed Mater Res A* 2013 Oct;101(10):3046-3057.
261. Puleo DA, Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials* 1999 Dec;20(23-24):2311-2321.
262. Yun KD, Park SW, Lee KM, Kim HS, Vang MS, Yang HS, et al. Titanium dioxide nanotube modified implants: an animal study on bone formation. *J Nanosci Nanotechnol* 2013 Jun;13(6):3864-3867.

-
263. Chun HJ, Cheong SY, Han JH, Heo SJ, Chung JP, Rhyu IC, et al. Evaluation of design parameters of osseointegrated dental implants using finite element analysis. *J Oral Rehabil* 2002 Jun;29(6):565-574.
264. Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, et al. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomed Pharmacother* 2004 Nov;58(9):487-493.
265. Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Interfacial reactions of osteoblasts to dental and implant materials. *J Oral Maxillofac Surg* 1994 Jan;52(1):52-56.
266. Bathomarco RV, Solorzano G, Elias CN, Prioli R. Atomic Force Microscopy Analysis of Different Surface Treatments of Ti Dental Implant Surfaces. *Appl Surf Scie* 2004 233:29-3.
267. Sul YT, Johansson CB, Roser K, Albrektsson T. Qualitative and quantitative observations of bone tissue reactions to anodised implants. *Biomaterials* 2002 Apr;23(8):1809-1817.
268. Ratner BD. A Perspective on Titanium Biocompatibility. En DM Brunette, P Tengvall, M Textor, P Thomsen eds. *Titanium in Medicine*. Cap 1:2-10. Ed Springer, Berlin. 2001.
269. Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials* 2003 Jan;24(2):263-273.
270. Takeuchi M, Abe Y, Yoshida Y, Nakayama Y, Okazaki M, Akagawa Y. Acid pretreatment of titanium implants. *Biomaterials* 2003 May;24(10):1821-1827.
271. Hamad K, Kon M, Hanawa T, Yokoyama K, Miyamoto Y, Asaoka K. Hydrothermal modification of titanium surface in calcium solutions. *Biomaterials* 2002 May;23(10):2265-2272.
272. -272 Sul YT, Johansson CB, Petronis S, Krozer A, Jeong Y, Wennerberg A, et al. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials* 2002 Jan;23(2):491-501.

-
273. Walboomers XF, Jansen JA. Cell and tissue behavior on micro-grooved surfaces. *Odontology* 2001 Nov;89(1):2-11.
274. Xiang W, Baolin L, Yan J, Yang X. The effect of bone morphogenetic protein on osseointegration of titanium implants. *J Oral Maxillofac Surg* 1993 Jun;51(6):647-651.
275. Xiao SJ, Kenausis G, Textor M. Biochemical Modification of Titanium Surfaces. En DM Brunette, P Tengvall, M Textor, P Thomsen eds. *Titanium in Medicine*. Cap 13:417-456. Ed Springer, Berlin 2001.
276. Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Nanoceramic Surface Roughness Enhances Osteoblast and Osteoclast Functions for Improved Orthopaedic/Dental Implant Efficacy. *Scripta Mater*. 2001. 44:1639-1642.
277. Chappard D. Bone modeling and remodeling during osseointegration. *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale* 2013 Jun;114(3):159-165.
278. Donado A., Guisado B., Ortega R. y Sanz J. V. Respuesta ósea en implantología. Osteointegración. Anatomía implantológica. En Bases morfológicas y su aplicación clínica en implantología dental. Eds. Donado M. Ars Medica, España, 2003. pps. 42-47.
279. Planas A. Comportamiento de los materiales en el medio biológico. Biocompatibilidad de los BMO. En Arte y ciencia de los materiales odontológicos. Eds. Toledano Pérez M., Osorio Ruiz R., Sánchez Aguilera F., Osorio Ruiz E. Ediciones Avances Medico-Dentales, España, 2003 pps. 13-37.
280. Weiss A, von der Mark K, Silbermann M. A tissue culture system supporting cartilage cell differentiation, extracellular mineralization, and subsequent bone formation, using mouse condylar progenitor cells. *Cell Differ* 1986 Sep;19(2):103-113.
281. Gutiérrez J., García M. Fundamentos de la Implantología actual. Concepto de osteointegración. Aspectos estructurales y biológicos de los implantes. En Integración de la implantología en la práctica odontológica. Eds. Gutiérrez Pérez J. L., García Calderón M. Ediciones Ergon, España. 2002.pps. 1-9.

-
282. Hughes ER. Food and Drug Administration: reclassification of blade form dental implants. *J Oral Implantol*. 2013 Oct;39(5):523-4.
283. Herrero M., Herrero F. Interfases osteoimplantarias. En *Atlas de procedimientos clínicos en implantología oral*. Eds. Herrero Climent M., Herrero Climent F. TRP Ediciones, España. 1995 pps. 5-6.
284. Donado A., Guisado B., Ortega R. y Sanz J. V. Respuesta de la mucosa periimplantaria. En *Anatomía implantológica. Bases morfológicas y su aplicación clínica en implantología dental*. Ed. Donado M. Ars Medica, España, 2003 pps. 49-59.
285. Bert M., Missika P. Osteointegración. En *Implantología Quirúrgica y Protésica*. Bert M., Missika P. (Eds.) Masson, España, 1997 pps. 3-10.
286. Jakobsen C, Sorensen JA, Kassem M, Thygesen TH. Mesenchymal stem cells in oral reconstructive surgery: a systematic review of the literature. *J Oral Rehabil* 2013 Sep;40(9):693-706.
287. Rani VV, Vinoth-Kumar L, Anitha VC, Manzoor K, Deepthy M, Shantikumar VN. Osteointegration of titanium implant is sensitive to specific nanostructure morphology. *Acta Biomater* 2012 May;8(5):1976-1989.
288. Ochsner PE. Osteointegration of orthopaedic devices. *Semin Immunopathol* 2011 May;33(3):245-256.
289. Gasik M, Van Mellaert L, Pierron D, Braem A, Hofmans D, De Waelheyns E, et al. Reduction of biofilm infection risks and promotion of osteointegration for optimized surfaces of titanium implants. *Adv Healthc Mater* 2012 Jan 11;1(1):117-127
290. Manderson RD. Experimental intra-osseous implantation in the jaws of pigs. *Dent Pract Dent Rec* 1972 Feb;22(6):225-231.
291. James RA. Training programs in oral implantology at Loma Linda University. *Oral Implantol* 1974 Summer;5(1):80-84.

292. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977;16:1-132.
293. Branemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lindstrom J, Rockler B. An experimental and clinical study of osseointegrated implants penetrating the nasal cavity and maxillary sinus. *J Oral Maxillofac Surg* 1984 Aug;42(8):497-505
294. Meenaghan MA, Natiella JR, Armitage JE, Wood RH. Evaluation of the crypt surface adjacent to metal endosseous implants: an electron microscopic study in clinically successful implants. *J Prosthet Dent* 1974 May;31(5):574-581.
295. Guidi R, Viscioni A, Dattola F, Carinci F. Dental implants inserted in native bone: Cases series analyses. *Dent Res J (Isfahan)* 2012 Dec;9(Suppl 2):S175-80.
296. López F., López H. Oseointegración. En *Bases para una Implantología segura*. López Rubín F., López Rubín H. (Eds.) Offser color, España, 1994 pps. 8-21.
297. Meffert R. The soft Tissue-Implant Interface. En *The Dental Implant. Clinical and Biological Response of Oral Tissues*. McKinney R., Lemons J. (Eds.) PSG Publishing Company, Massachusetts, 1985 pps. 95-113.
298. Siegel MA. Osseointegration? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Aug;88(2):113.
299. Babbush CA. Endosseous blade-vent implants: a research review. *J Oral Surg* 1972 Mar;30(3):168-175.
300. Doms P. The tissue response to endosteal blade implants--microradiographic and tetracycline marking. I. *Oral Implantol* 1974 Spring;4(4):470-474.
301. Calvo-Guirado JL, Mate-Sanchez J, Delgado-Ruiz R, Ramirez-Fernandez MP, Cutando-Soriano A, Pena M. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clin Oral Implants Res* 2011 Jun;22(6):587-593.

302. Calvo-Guirado JL, Gomez-Moreno G, Lopez-Mari L, Guardia J, Martinez-Gonzalez JM, Barone A, et al. Actions of melatonin mixed with collagenized porcine bone versus porcine bone only on osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 2010 Apr;48(3):194-203.
303. Lopez, M, Estudio experimental en el cerdo del uso de implantes dentales ante situaciones de carga inmediata. Tesis de la Universidad de Santiago de Compòstela. 2006
304. -Jansen JA Histological Analysis of Bone-Implant Interface. En *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. An Y.H., Martin K.L. (Eds.), Humana Press Inc., New Jersey 2003 Cap 26:353-360.
305. Vandeweghe S, Coelho PG, Vanhove C, Wennerberg A, Jimbo R. Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: a comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2013 Oct;101(7):1259-1266.
306. Abd El-Fattah H, Helmy Y, El-Kholy B, Marie M. In vivo animal histomorphometric study for evaluating biocompatibility and osteointegration of nano-hydroxyapatite as biomaterials in tissue engineering. *J Egypt Natl Canc Inst* 2010 Dec;22(4):241-250.
307. Tire A, Martini D, Orsini E, Franchi M, De Pasquale V, Bacchelli B, et al. Correlative microscopy of bone in implant osteointegration studies. *ScientificWorldJournal* 2010 Nov 16;10:2238-2247.
308. Xia L, Feng B, Wang P, Ding S, Liu Z, Zhou J, et al. In vitro and in vivo studies of surface-structured implants for bone formation. *Int J Nanomedicine* 2012;7:4873-4881.
309. Jansen JA Histological Analysis of Bone-Implant Interface. En *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. An Y.H., Martin K.L. (Eds.), Humana Press Inc., New Jersey 2003 Cap 26:353-360.
310. Huga SS, Roberts WE Mechanism of Osseointegration: Characterization of Supporting Bone with Indentation Testing and Backscattered Imaging. *Semin Orthod* 2004 10:162-173.

311. Schreiner U, Koester H, Pott P, Scheller G, Schwarz M. Osteointegration of an alumina matrix composite ceramic with a porous surface: mechanical and histological results of an animal experiment. *Z Orthop Unfall* 2009 Sep-Oct;147(5):603-609.
312. Sprecher CM, Gahlert M, Rohling S, Kniha H, Gueorguiev B, Milz S. Comparison of imaging methods used for dental implant osseous integration assessment. *J Mater Sci Mater Med* 2013 Sep;24(9):2195-2200.
313. Akagawa Y, Wadamoto M, Sato Y, Tsuru H. The three-dimensional bone interface of an osseointegrated implant: a method for study. *J Prosthet Dent* 1992 Nov;68(5):813-816.
314. Tanaka N, Ichinose S, Kimijima Y, Mimura M. Investigation of titanium leak to bone tissue surrounding dental titanium implant: electron microscopic findings and analysis by electron diffraction. *Med Electron Microsc* 2000;33(2):96-101.
315. Uo M, Watari F, Yokoyama A, Matsuno H, Kawasaki T. Tissue reaction around metal implants observed by X-ray scanning analytical microscopy. *Biomaterials* 2001 Apr;22(7):677-685.
316. Ronold HJ, Ellingsen JE. Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting--tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. *Biomaterials* 2002 Nov;23(21):4211-4219.
317. Huga SS, Roberts WE Mechanism of Osseointegration: Characterization of Supporting Bone with Indentation Testing and Backscattered Imaging. *Semin Orthod* 2004 10:162-173.
318. Schreiner U, Koester H, Pott P, Scheller G, Schwarz M. Osteointegration of an alumina matrix composite ceramic with a porous surface: mechanical and histological results of an animal experiment. *Z Orthop Unfall* 2009 Sep-Oct;147(5):603-609.
319. Berardi D, Colagiovanni M, Scoccia A, Raffaelli L, Manicone PF, Perfetti G. Evaluation of a new laser surface implant: scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray and X-

- ray photoelectron spectroscopy analyses. *J Biol Regul Homeost Agents* 2008 Jul-Sep;22(3):161-167.
320. Holland JC, Brennan O, Kennedy OD, Mahony NJ, Rackard S, O'Brien FJ, et al. Examination of osteoarthritis and subchondral bone alterations within the stifle joint of an ovariectomised ovine model. *J Anat* 2013 Jun;222(6):588-597.
321. Shi L, Wang L, Zhang Y, Guo Z, Wu ZX, Liu D, et al. Improving fixation strength of pedicle screw by microarc oxidation treatment: an experimental study of osteoporotic spine in sheep. *J Orthop Res* 2012 Aug;30(8):1296-1303.
322. -Oheim R, Amling M, Ignatius A, Pogoda P. Large animal model for osteoporosis in humans: the ewe. *Eur Cell Mater* 2012 Nov 12;24:372-385.
323. Ding M, Danielsen CC, Overgaard S. The effects of glucocorticoid on microarchitecture, collagen, mineral and mechanical properties of sheep femur cortical bone. *J Tissue Eng Regen Med* 2012 Jun;6(6):443-450.
324. -Klopfenstein Bregger MD, Schawalter P, Rahn B, Eckhardt C, Schneider E, Lill C. Optimization of corticosteroid induced osteoporosis in ovariectomized sheep. A bone histomorphometric study. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2007;20(1):18-23.
325. Oheim R, Beil FT, Kohne T, Wehner T, Barvencik F, Ignatius A, et al. Sheep model for osteoporosis: sustainability and biomechanical relevance of low turnover osteoporosis induced by hypothalamic-pituitary disconnection. *J Orthop Res* 2013 Jul;31(7):1067-1074.
326. Oheim R, Beil FT, Krause M, Bindl R, Ignatius A, Pogoda P. Mandibular bone loss in ewe induced by hypothalamic-pituitary disconnection. *Clin Oral Implants Res* 2013 Sep 19
327. Veigel E, Moore RJ, Zarrinkalam MR, Schulze D, Sauerbier S, Schmelzeisen R, et al. Osteopenia in the maxillofacial area: a study in sheep. *Osteoporos Int* 2011 Apr;22(4):1115-1121.

328. Dall'ara E, Luisier B, Schmidt R, Pretterklieber M, Kainberger F, Zysset P, et al. DXA predictions of human femoral mechanical properties depend on the load configuration. *Med Eng Phys* 2013 Nov;35(11):1564-1572.
329. Chappard D, Palle S, Alexandre C, Vico L, Riffat G. Bone embedding in pure methyl methacrylate at low temperature preserve enzyme activities. *Acta Histochem* 1987; 81(2):183-190.
330. Blythe D, Hand NM, Jackson P, Barrans SL, Bradbury RD, Jack AS. Use of methyl methacrylate resin for embedding bone marrow trephine biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1997; 50(1):45-49.
331. Wittenburg G, Volkel C, Mai R, Lauer G. Immunohistochemical comparison of differentiation markers on paraffin and plastic embedded human bone samples. 2009; 60 (Supp 8): 43-49.
332. Karl M, Palarie V, Nacu V, Krafft T. Effect of intraoperative bone quality testing on bone healing and osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013 Sep-Oct;28(5):1254-1260.
333. Abdel-Haq J, Karabuda CZ, Arisan V, Mutlu Z, Kurkcu M. Osseointegration and stability of a modified sand-blasted acid-etched implant: an experimental pilot study in sheep. *Clin Oral Implants Res* 2011 Mar;22(3):265-274.
334. Franchi M, Bacchelli B, Martini D, Pasquale VD, Orsini E, Ottani V, et al. Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants. *Biomaterials* 2004 May;25(12):2239-2246.
335. Rammelt S, Heck C, Bernhardt R, Bierbaum S, Scharnweber D, Goebbels J, et al. In vivo effects of coating loaded and unloaded Ti implants with collagen, chondroitin sulfate, and hydroxyapatite in the sheep tibia. *J Orthop Res* 2007 Aug;25(8):1052-1061.

336. De Riu G, De Riu N, Spano G, Pizzigallo A, Petrone G, Tullio A. Histology and stability study of cortical bone graft influence on titanium implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 Apr;103(4):e1-7.
337. Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Giardino R. Titanium alloy osseointegration in cancellous and cortical bone of ovariectomized animals: histomorphometric and bone hardness measurements. *Int J Oral Maxillofac implants* 2002 Jan-Feb;17(1):28-37.
338. Rocca M, Fini M, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Giardin R. Tibial implants: biomechanical and histomorphometric studies of hydroxyapatite-coated and uncoated stainless steel and titanium screws in long-term ovariectomized sheep. *Int J Artif Organs* 2001 Sep;24(9):649-654.
339. Borsari V, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Consolo U, Chiusoli L, et al. Osteointegration of titanium and hydroxyapatite rough surfaces in healthy and compromised cortical and trabecular bone: in vivo comparative study on young, aged, and estrogen-deficient sheep. *J Orthop Res* 2007 Sep;25(9):1250-1260.
340. Sachse A, Wagner A, Keller M, Wagner O, Wetzel WD, Layher F, et al. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone* 2005 Nov;37(5):699-710.
341. Wikesjo UM, Qahash M, Polimeni G, Susin C, Shanaman RH, Rohrer MD, et al. Alveolar ridge augmentation using implants coated with recombinant human bone morphogenetic protein-2: histologic observations. *J Clin Periodontol* 2008 Nov;35(11):1001-1010.
342. Jung RE, Schmoekel HG, Zwahlen R, Kokovic V, Hammerle CH, Weber FE. Platelet-rich plasma and fibrin as delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res* 2005 Dec;16(6):676-682.
343. Iafisco M, Quirici N, Foltran I, Rimondini L. Electrospun collagen mimicking the reconstituted extracellular matrix improves osteoblastic differentiation onto titanium surfaces. *J Nanosci Nanotechnol* 2013 Jul;13(7):4720-4726.

344. Chien CY, Tsai WB. Poly(dopamine)-assisted immobilization of Arg-Gly-Asp peptides, hydroxyapatite, and bone morphogenic protein-2 on titanium to improve the osteogenesis of bone marrow stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013 Aug 14;5(15):6975-6983.
345. Wang M, Castro NJ, Li J, Keidar M, Zhang LG. Greater osteoblast and mesenchymal stem cell adhesion and proliferation on titanium with hydrothermally treated nanocrystalline hydroxyapatite/magnetically treated carbon nanotubes. *J Nanosci Nanotechnol* 2012 Oct;12(10):7692-7702.
346. Tatray P, Sagi B, Szigeti A, Szepesi A, Szabo I, Bosze S, et al. A novel cyclic RGD-containing peptide polymer improves serum-free adhesion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to bone implant surfaces. *J Mater Sci Mater Med* 2013 Feb;24(2):479-488.
347. Hosgor F, Yilmaz N, Senyurt O, Gumusova S, Cam B, Ceylan G, et al. Effect of osteoblast cell culture on the bone implant contact. *Acta Odontol Scand* 2013 May-Jul;71(3-4):626-631.
348. Ito K, Yamada Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011 Sep-Oct;26(5):947-954.
349. -349 Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, Kazama M, Kano K, Ryu J, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng Part A* 2013 Aug;19(15-16):1792-1802.
350. Wang Z, Goh J, Das De S, Ge Z, Ouyang H, Chong JS, et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng* 2006 Jul;12(7):1753-1761.7
351. Cao L, Liu G, Gan Y, Fan Q, Yang F, Zhang X, et al. The use of autologous enriched bone marrow MSCs to enhance osteoporotic bone defect repair in long-term estrogen deficient goats. *Biomaterials* 2012 Jul;33(20):5076-5084.

-
352. Yu Z, Zhu T, Li C, Shi X, Liu X, Yang X, et al. Improvement of intertrochanteric bone quality in osteoporotic female rats after injection of polylactic acid-polyglycolic acid copolymer/collagen type I microspheres combined with bone mesenchymal stem cells. *Int Orthop* 2012 Oct;36(10):2163-2171.
353. Takada K, Inaba M, Ichioka N, Ueda Y, Taira M, Baba S, et al. Treatment of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem Cells* 2006 Feb;24(2):399-405.
354. Niemeyer P, Schonberger TS, Hahn J, Kasten P, Fellenberg J, Suedkamp N, et al. Xenogenic transplantation of human mesenchymal stem cells in a critical size defect of the sheep tibia for bone regeneration. *Tissue Eng Part A* 2010 Jan;16(1):33-43.
355. Kim HJ, Park JB, Lee JK, Park EY, Park EA, Riew KD, et al. Transplanted xenogenic bone marrow stem cells survive and generate new bone formation in the posterolateral lumbar spine of non-immunosuppressed rabbits. *Eur Spine J* 2008 Nov;17(11):1515-1521.
356. Zong C, Xue D, Yuan W, Wang W, Shen D, Tong X, et al. Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater* 2010 Sep 1;20:109-120.
357. Zarrinkalam MR, Schultz CG, Ardern DW, Vernon-Roberts B, Moore RJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-type 2 (rhBMP-2) enhances local bone formation in the lumbar spine of osteoporotic sheep. *J Orthop Res* 2013 Sep;31(9):1390-1397.
358. Moghe S, Saini N, Moghe A. Platelet-rich plasma in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *Natl J Maxillofac Surg* 2012 Jul;3(2):139-143.
359. Bou Assi T, Rahme M, Saghie S, Bou Raad Azoury N, Abdallah Hajj Hussein I, Leone A, et al. Effect of autologous platelet-rich plasma on distraction osteogenesis in the mandible of rabbits: a morphologic and morphometric approach. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013 Jan-Mar;27(1):177-187.

360. Liu HY, Wu AT, Tsai CY, Chou KR, Zeng R, Wang MF, et al. The balance between adipogenesis and osteogenesis in bone regeneration by platelet-rich plasma for age-related osteoporosis. *Biomaterials* 2011 Oct;32(28):6773-6780.
361. Lenza M, Ferraz Sde B, Viola DC, dos Santos OF, Cendoroglo Neto M, Ferretti M. Platelet-rich plasma for long bone healing. *Einstein (Sao Paulo)* 2013 Jan-Mar;11(1):122-127.
362. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G. Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing* 2013 Jun 13;10(1):23-4933-10-23.
363. Rabillard M, Grand JG, Dalibert E, Fellah B, Gauthier O, Niebauer GW. Effects of autologous platelet rich plasma gel and calcium phosphate biomaterials on bone healing in an ulnar ostectomy model in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009;22(6):460-466.
364. Macías C, del Valle L, Hernández P, Ballester J. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2010 Dic;26(4):256-75.
365. Wen Z, Zheng S, Zhou C, Wang J, Wang T. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2011 May;15(5):1032-1043.
366. Bertha Beatriz Socarrás-Ferrer, Lic. Lázaro Orlando del Valle-Pérez, Lic. Karelys de la Cuétara-Bernal, Dra. Vianed Marsán-Suárez, Dra. Miriam-Sánchez Segura, Dra. C.M. Consuelo Macías-Abrahaml Células madre mesenquimales: aspectos relevantes y aplicación clínica en la medicina regenerativa 2013 29(1); 25-31.
367. Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther* 2010 Sep 24;1(4):30.
368. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res* 2012 Feb;35(2):213-221.

BIBLIOGRAFÍA DE LAS FIGURAS

1. Roy DK, O'Neill TW, Finn JD, Lunt M, Silman AJ, Felsenberg D, et al. Determinants of incident vertebral fracture in men and women: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Osteoporos Int* 2003 Jan;14(1):19-26.
2. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2006 Dec;17(12):1726-1733.
3. Carretero M. Novedades en el tratamiento de la osteoporosis. *Rev Ofic Farm* 2002 21; 168-172.
4. Tortora, G. J.. *Principles of Human Anatomy*. New York, Harper and Row.1983.
5. Montoya M. Clases teóricas. Curso Cariología 2008, Fac. Odontología, U. Mayor.
6. Montecinos BR, Zeni SN. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica *Acta bioquím. Clín. latinoam*.v.43n.2
7. Morote J, Planas J. Loss of bone mass in patients with prostate cancer subjected to androgenic deprivation. *Actas Urol Esp* 2011 Apr;35(4):232-239.
8. Moritz N, Alm JJ, Lankinen P, Makinen TJ, Mattila K, Aro HT. Quality of intertrochanteric cancellous bone as predictor of femoral stem RSA migration in cementless total hip arthroplasty. *J Biomech* 2011 Jan 11;44(2):221-227
9. Kraenzlin ME, Meier C. Parathyroid hormone analogues in the treatment of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol* 2011 Jul 12;7(11):647-656.
10. <http://www.traumazamora.org/articulos/vertebroplastia/vertebroplastia.html>
11. <http://www.traumazamora.org/articulos/vertebroplastia/vertebroplastia.html>
12. <http://orthoinfo.aaos.org/topic.cfm?topic=A00392>
13. <http://www.markploftus.com/wright-medical-hip>

14. Alvarez J. Prevención de la osteoporosis: El coste de la desinformación del paciente. Rev Esp Econ Salud 2002; 1(4)
15. Galler RM, Volker KH, Sonntag MD. Bone Graft Harvest Barrow Quarterly. 2003; 19(4).
16. Calv R, Figueroa D, Díaz-Ledezma C, Vaisman A, Figueroa F. Aloinjertos óseos y la función del banco de huesos Rev Med Chile 2011; 139: 660-666.
17. Planas Ribo J., Coronel Gagliardi R. Collecting and criopreservation of stem cells obtained by liposuction from fat tissue. Cir. plást. iberolatinoam. 2011 Dec; 37(4).
18. Kim K, Yeatts A, Dean D, Fisher JP. Stereolithographic bone scaffold design parameters: osteogenic differentiation and signal expression. Tissue Eng Part B Rev 2010 Oct; 16(5):523-539.
19. Vanegas JP, Landinez N, Diego A. Garzón-Alvarado II. Generalidades de la interfase hueso-implante dental. Rev Cubana Invest Bioméd. 2009 Sep; 28(3).
20. : <http://es.biohorizons.com/prosthetics.aspx>
21. <http://www.dentalimplantsnek.com/subperiosteal.htm>
22. <http://dentalimplants.uchc.edu/about/types.html> copyrighted by Quintessence Publishing Co
23. <http://www.meetadentist.com/dentalcare/different-types-of-dental-implants/>
24. Rodríguez Rius D, García Saban FJ. Caracterización físico-química de la superficie de 9 implantes dentales con 3 distintos tratamientos de superficie Med. oral patol. oral cir. bucal (Ed.impr.) v.10 n.1 Valencia ene.-feb. 2005
25. Olate S, Duque de Miranda H, Netto C, Muñante-Cárdenas JL, Mazzonetto R. The Cervical Area of Dental Implants Present More Osseous Formation Than Apical Area in Different Load and Design Condition. Preliminary Results. Int. J. Morphol 2009; 27(2):407-412.

26. Neugebauer J, Thams U, San Roman F, Steveling H, Zöller JE. Immediate Bridge Restored Implants Under Functional LoadingInt Poster J Dent Oral Med 2003; 5(01):168.

BIBLIOGRAFÍA DE LAS TABLAS

1. Lafita J, Pineda J, Fuentes C, Martínez JP. Osteoporosis secundaria. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. vol 26, suplemento 3 (2003)
2. Larroudé MS, Man Z. Osteoporosis inducida por corticoides.Revista Colombiana de Reumatología 2004; 11 (2) ; 111-139
3. Torres E, Mezquita P, De la Higuera M, Fernández D, Muñoz M. Actualización sobre la determinación de marcadores de remodelado óseo. Endocrinol Nutr.2003;50:237–43.
4. Alvarez J. Prevención de la osteoporosis: El coste de la desinformación del paciente Rev Esp Econ Salud 2002 ;1(4)
5. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am 2002 Jun;84-A(6):1032-1044.
6. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8(4):315-317.