



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Técnicas de Imagen Aplicadas al Estudio de la
Regeneración Ósea y del Efecto de la Deferoxamina
en un Modelo *in vivo* de Ratas Wistar

D^a María Susana Sánchez Carrillo

2019

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Técnicas de imagen aplicadas al estudio de la
regeneración ósea y del efecto de la deferroxamina
en un modelo *in vivo* de ratas Wistar**

Memoria presentada para la obtención del título de Doctor en
Ciencias de la Salud por la Universidad de Murcia

Dña María Susana Sánchez Carrillo

2019

Dirección: Dra. Dña. M^a Pía López Jornet

Dra. Dña. Nuria García Carrillo

Quería expresar mi agradecimiento a todas las personas que han participado de alguna manera en el proceso de elaboración de este trabajo, porque la ciencia avanza gracias al esfuerzo de muchas mentes.

En primer lugar a mis directoras de tesis, M^a Pía López Jornet y Nuria García Carrillo, por guiarme a lo largo de todo el proceso. Aportando cada una de ellas la mayor experiencia en sus campos respectivos, haciendo de este, un trabajo transversal.

A Piedad por estar presente en los inicios y enseñarnos el arte de manejar animales.

A Ana Isabel por darme la idea de emprender este proyecto.

A Nabil por darme el aliento necesario en el momento oportuno y convertir la frustración en acción.

A mis padres y hermanos por apoyarme siempre. En todo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	12
A – EL TEJIDO ÓSEO.....	12
1 - ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	12
2 - OSIFICACIÓN, REMODELADO Y REPARACIÓN ÓSEA.....	18
B – DEFEROXAMINA	39
1 - DESCRIPCIÓN FARMACOLÓGICA	39
2 - PAPEL DE LA DEFEROXAMINA EN LA REGENERACIÓN ÓSEA	41
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	45
A – JUSTIFICACIÓN	45
B – OBJETIVOS	46
4. MATERIALES Y MÉTODOS	48
A - MATERIALES	48
B - MODELO ANIMAL.....	52
C - RADIOGRAFÍA DE RAYOS X	56
D - TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA.....	57
E - MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROANÁLISIS DE ELEMENTOS. SEM-EDX.....	60
F - ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
5. RESULTADOS	64
A. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA	64
B. RADIOLOGÍA DE RAYOS X.....	67
C. MICROTOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA	69
D. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROANÁLISIS DE ELEMENTOS. SEM-EDX.....	78
6. DISCUSIÓN	87
7. CONCLUSIONES	94
8. BIBLIOGRAFÍA	96

ABREVIATURAS

- DFO : Deferoxamina
- CT: Tomografía Computerizada
- SEM-EDX: Microscopía Electrónica de Barrido – Espectroscopía por Difracción de Rayos X
- PTH: Paratohormona
- TGF- β : Factor Transformante del Crecimiento β
- PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
- IGF-I: Factor Análogo a la Insulina I
- IGF-II: Factor Análogo a la Insulina II
- BMPs: Proteínas Morfogenéticas Óseas
- GH: Hormona del Crecimiento
- FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico
- EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
- VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial
- GM-CSF: Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos
- TNF: Factor de Necrosis Tumoral
- PGs: Prostaglandinas
- PGE₂: Prostaglandina E2
- IL-1: Interleuquina 1
- IL-6: Interleuquina 6
- IL-11: Interleuquina 11
- PHD: Prolil-hidroxilasa
- FIT: Asparagil-hidroxilasa
- pVHL: Proteína de von Hippel-Lindau
- MSCs: Células madre mesenquimales
- GBR: Regeneración ósea guiada.
- CBCT: Cone Beam Computerized Tomography o CT dental.
- QTC: Tomografía Computerizada Cuantitativa
- HU: Unidades Hounsfield

RESUMEN

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La regeneración ósea es un campo en plena expansión, debido a las implicaciones que la resección total o parcial de hueso tiene en pacientes que han sufrido traumas, tumores o infecciones óseas. Hay indicios en la literatura de que la deferoxamina, quelante del hierro, utilizada en intoxicaciones férricas entre otros, podría tener efecto sobre la regeneración ósea activando la vía del HIF-1 α . Las técnicas de imagen se desarrollan a gran velocidad, encontrando técnicas más precisas y sensibles en el estudio de la regeneración ósea. La microtomografía computerizada (microCT) es un valioso método no invasivo, que combina el estudio de los datos anatómicos y funcionales a la vez, permitiendo una mejor caracterización y localización de las lesiones óseas. El microscopio de barrido (SEM-EDX) nos permite obtener imágenes muy detalladas de cada uno de los defectos así como llevar a cabo un microanálisis de los elementos fundamentales en la formación de hueso, el calcio, el fósforo y el oxígeno.

OBJETIVOS: Este estudio tendrá una doble vertiente. Por un lado examinar cualitativamente la idoneidad de diferentes técnicas de imagen (fotografía, radiografía de rayos X, microCT y SEM) en el estudio de la regeneración ósea. Por otro lado, el estudio cuantitativo del efecto de la DFO como posible activador en la formación de nuevo hueso en defectos de tamaño crítico en un modelo de roedores *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS: Las ratas Wistar utilizadas en este trabajo se han dividieron en dos grupos, uno que fue tratado con DFO durante 3 semanas y el segundo durante 6 semanas. Se realizaron dos defectos de 3 mm en la calota de cada rata, uno control con una esponja de colágeno y el otro con la esponja de colágeno y la DFO. En primer lugar se comparó cualitativamente la idoneidad y precisión de la fotografía, radiografía de rayos X, la microCT y el SEM-EDX como técnicas de imagen. Posteriormente se ha utilizado la microCT, a través del porcentaje de hueso formado y de los porcentajes del tipo de hueso, y el EDX, a través del porcentaje de oxígeno y del ratio Ca/P, como técnicas para cuantificar la cantidad de hueso formado y la calidad de este.

RESULTADOS: Cualitativamente hablando, solo la microCT permite ver diferencias en el crecimiento óseo entre los defectos tratados con DFO y los defectos control a cualquier tiempo. Con todas las técnicas se aprecia resorción ósea a las 6 semanas de tratamiento. Cuantitativamente, con microCT se encuentran porcentajes de crecimiento óseo mayores en los defectos tratados con DFO tanto a las 3 como a las 6 semanas respecto de los controles. Sin embargo el porcentaje de hueso formado es mayor a las 3 semanas frente a las 6 en los defectos con DFO. El porcentaje de hueso de mayor calidad lo encontramos en las muestras tratadas con DFO a las 6 semanas. Con EDX encontramos que no hay diferencias en el porcentaje de oxígeno entre los defectos control y los tratados ni a las 3, ni a las 6 semanas. Pero si es mayor a las 6 semanas frente a las 3. El ratio Ca/P nos indica que la calidad del hueso formado es mayor conforme avanza el tiempo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES: Aunque el SEM permite llegar a ver estructuras más pequeñas, sólo la microCT es suficientemente completa para el estudio de la regeneración ósea. Las demás técnicas pueden ser complementarias a otras. La DFO tiene un efecto positivo sobre la formación de hueso a las 3 semanas y un efecto inhibitorio a las 6 semanas. Sin embargo, la calidad del hueso formado es mayor, cuanto más tiempo pasa.

PALABRAS CLAVE: deferoxamina, regeneración ósea, tomografía computerizada, SEM-EDX

ABSTRACT

INTRODUCTION: Bone regeneration is a research field of increasing interest due to the physical and emotional implications that total or partial bone resection have in patients who suffered traumas, tumors or bone infections. There are indications in the literature that deferoxamine, iron chelator, used in ferric intoxications among others, could have an effect on bone regeneration by activating the HIF-1 α pathway. Furthermore, imaging techniques are developing at high pace, enabling more precise and more sensitive ways to study bone regeneration. Computed microtomography (microCT) is a valuable non-invasive method that combines the study of anatomical and functional data at the same time, allowing enhanced characterization and localization of bone lesions. The scanning microscope (SEM-EDX) makes it possible to obtain very detailed images of each bone's defect as well as carry out a microanalysis of the fundamental elements in the bone formation such as calcium, phosphorus and oxygen.

OBJECTIVES: This study will be targeting two aspects. On one hand, it will qualitatively assess the suitability of different imaging techniques (photography, X-ray radiography, microCT and EDX) in the study of bone regeneration. On the other hand, it will quantitatively study the effect of DFO as a possible activator in the formation of new bone in critical size defects in a rodent model in vivo.

MATERIALS AND METHODS: In this work, Wistar rats were divided into two groups: one that was treated with DFO for three weeks and another one for six weeks. Two defects of 3 mm were made in the calvaria of each rat, one control with a collagen sponge and another with a collagen sponge and DFO. At first, suitability qualitative comparison of photography, X-ray radiography, microCT and SEM-EDX was performed. Subsequently, microCT and SEM-EDX were used to carry out a quantitative analysis of regenerated bone and to assess its quality. Hence, microCT was used for its capacity to provide the percentage of new formed bone as well as the breakdown percentage of every bone type. SEM-EDX was rather used to measure the percentage of oxygen and the Ca/P ratio.

RESULTS: Qualitatively, only microCT allowed us to see differences in bone regeneration when comparing defects treated with DFO to control at both 3 weeks and 6 weeks. With all techniques, bone resorption was observed at 6 weeks of treatment. Quantitatively, using microCT, bone growth percentages were higher in defects treated with DFO both at 3 and 6 weeks compared to controls. However, the percentage of bone formed is greater at 3 weeks compared to 6 weeks in DFO defects. Higher quality bone percentage was found in the group treated with DFO at 6 weeks. Using SEM-EDX, we found no differences in the percentage of oxygen between DFO and control groups neither at 3 nor at 6 weeks. However, oxygen percentage was greater at 6 weeks than at 3 weeks. The Ca/P ratio indicated that the quality of the new formed bone formed was getting greater as time goes by.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS: Although the SEM-EDX allowed us to see smaller structures, only microCT was complete enough for the study of bone regeneration. Other techniques (photography, X-Ray radiography) can be used to complement the assessment provided by microCT and SEM-EDX but can't substitute them. DFO had a positive effect on bone formation at 3 weeks and an inhibitory effect at 6 weeks. However, the quality of the bone formed is greater as time goes by.

KEY WORDS: deferoxamine, bone regeneration, computerized tomography, SEM-EDX

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

Ha existido, a lo largo de la historia de la humanidad, una preocupación por la reparación, regeneración y formación de hueso de forma local para solventar problemas tan frecuentes como traumas, tumores, infecciones o resecciones de hueso, que generan importantes dificultades físicas y emocionales en los pacientes que lo sufren. Disciplinas tan variadas como la cirugía ortopédica y traumatología, neurocirugía, cirugía maxilofacial y odontología, encuentran un interés común en el estudio de las ventajas e inconvenientes de biomateriales, de la regeneración ósea y de los métodos de análisis de esta.

Desde hace más de un siglo numerosas técnicas y materiales han sido experimentados y llevados a la clínica en forma de alguna de las modalidades de injerto. Se ha hecho habitual el uso de biomateriales y sustancias aceleradoras de la formación de hueso, etc... pero, a menudo, conllevan efectos adversos de gran importancia. En esta parte del trabajo, vamos a repasar las características propias del hueso, así como el proceso de destrucción/generación de hueso fisiológico y patológico. Veremos también qué técnicas conocemos para la reparación del hueso dañado y biomateriales conocidos.

A – EL TEJIDO ÓSEO

1 - ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Un total de 206 huesos conforman el tejido óseo de un esqueleto humano adulto (1). Es un tejido conjuntivo especializado cuya matriz extracelular se haya mineralizada en su mayor parte. Tiene unas funciones de vital importancia, como:

- Soporte de la musculatura y otros tejidos blandos, con una función protectora, especialmente de órganos vitales.
- Permite el movimiento y la locomoción, siendo anclaje para los músculos.
- Alojamiento de la médula ósea hematopoyética.
- Mantenimiento de la homeostasis mineral y del equilibrio ácido-básico.
- Reserva de factores de crecimiento y citoquinas.

Cada uno de los huesos está en constante remodelamiento durante toda la vida, para adaptarse a los cambios de las fuerzas biomecánicas, renovar hueso envejecido o dañado, remplazándolo por tejido nuevo, mecánicamente más fuerte (2).

Está compuesto por un 50-70% de mineral, 20-40% de matriz orgánica, 5-10% de agua y < 3% de lípidos. En esta matriz extracelular además de las fibras de colágeno también se alojan los diferentes tipos celulares específicos del tejido óseo.

1.1 TIPOS DE HUESO:

Histológicamente existen dos clases de hueso (3), ambos están compuestos por osteones, que son:

- **Hueso compacto:** Es denso y sólido. Rodea la médula ósea hematopoyética. Está formado por osteonas o sistema de Havers, unidad anatómica y funcional del tejido óseo compacto, sistema de cilindros concéntricos en torno a un canal central, donde se encuentran los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios. Suele ser metabólicamente menos activo que el hueso esponjoso. La porosidad suele ser de menos del 5%, aunque depende de la proporción de remodelación del hueso. La actividad de la superficie del periostio es importante para la reparación de fracturas y el remodelamiento óseo. Normalmente la formación de hueso es mayor que la resorción en el periostio. El endostio tiene una mayor actividad remodeladora, en la que la resorción es mayor que la formación de hueso, esto es debido a la mayor exposición a citoquinas de la médula ósea adyacente y al estrés biomecánico.
- **Hueso esponjoso:** Formado por una red de trabéculas dispuestas en placas y barras intercaladas de compartimentos de médula ósea. Por su proximidad a esta, la tasa metabólica y de remodelación es mucho más alta en el hueso esponjoso que en el hueso compacto. La porosidad es mucho más importante que en el hueso compacto.

El esqueleto humano está compuesto por un 80% de hueso compacto y un 20% de hueso esponjoso (4). Tanto el hueso compacto como el hueso esponjoso siguen un patrón de láminas concéntricas, en las cuales se depositan fibras de colágeno con orientaciones alternas (4).

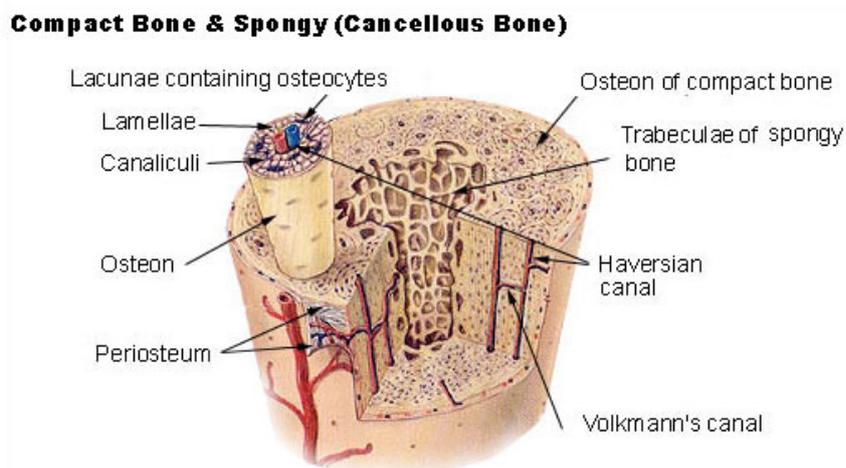


Fig.1- Esquema de la estructura del hueso, tanto del hueso compacto como del esponjoso. (<http://doctorsgates.blogspot.com.es/2010/11/compact-and-spongy-bones.html>)

Teniendo en cuenta la orientación de las fibras de colágeno podemos hacer otra clasificación de los huesos (3):

- **Hueso primario o reticular:** Las fibras de colágeno están depositadas de forma aleatoria y desordenada. Es el que se forma en el periodo embrionario, en la denominada osificación primaria, que serán reemplazados por hueso laminar en la osificación secundaria. El hueso reticular o no laminar es mecánicamente débil. Las fibras de colágeno están desordenadas a causa de la rapidez del proceso de osificación, también es común este tipo de hueso en la reparación de fracturas y en los osteosarcomas, enfermedad de Paget u osteogénesis imperfecto (huesos de cristal). El número de células, especialmente de osteocitos es superior que en el hueso laminar, también están dispuestos de forma aleatoria y son irregulares en tamaño y forma y no presentan una disposición regular ni con las fibras de colágeno, ni con los vasos sanguíneos. Tiene menor cantidad de calcio.
- **Hueso secundario o laminar:** Las fibras de colágeno son paralelas y están ordenadas en forma de laminillas. Las laminillas vecinas se disponen paralelas entre sí y las fibras de colágeno de una laminilla respecto a la siguiente, cambian bruscamente la dirección, con una angulación de casi 90°. Las células se disponen entre las laminillas. Hay canales que atraviesan las laminillas. Mucho más resistente mecánicamente que el hueso primario.

Según su morfología podemos determinar los siguientes tipos:

- **Largos:** Sus extremos (epífisis) están formados por hueso esponjoso, rodeados por una delgada capa superficial de tejido óseo compacto. La parte central (diáfisis) está formada en su práctica totalidad por hueso compacto, confiriéndole gran resistencia a la torsión. Ejemplos de huesos largos son el húmero, radio, fémur y tibia, entre otros.
- **Cortos:** La diáfisis está formada por hueso esponjoso y está rodeada en toda su superficie por hueso compacto. Carpo, tarso, rótula y los huesos sesamoideos son ejemplos de huesos cortos.
- **Planos:** Compuestos por dos capas de hueso compacto separadas por hueso esponjoso. Ejemplos: cráneo, mandíbula, escápula, esternón y costillas.
- **Irregulares:** Los que por su forma no pueden clasificarse en ninguno de los otros grupos. Suelen formar cavidades en el cuerpo. En este grupo encontramos a vértebras, sacro, cóccix y el hueso hioides.

1.2 PERIOSTIO Y ENDOSTIO

Diferenciamos en los huesos un revestimiento interno llamado endostio y otro externo llamado periostio, compuestos de tejido conjuntivo con células osteogénicas y altamente vascularizados. La nutrición del tejido óseo y el suministro de células para su crecimiento y regeneración son sus principales funciones (4).

- **Periostio:** Es la capa de tejido conjuntivo que está en la parte exterior de todos los huesos excepto, las fracturas en estas zonas se recuperan con mayor dificultad:
 - Las articulaciones
 - Los huesos intraarticulares (rótula, huesos sesamoideos...)
 - En los cuellos del fémur y del húmero.

Es tejido fibroso denso en colágeno no ordenado. Las células se encuentran mayoritariamente en la cara interna que es por donde crecerá el hueso. La cara más externa es más fibrosa, aunque también está altamente vascularizada. Presenta fibras de colágeno perpendiculares que desde esta capa se insertan al sistema circunferencial externo para anclarse. En algunas ubicaciones se pueden ver al microscopio ya que se mineralizan, son las llamadas fibras de Sharpey.

- **Endostio:** Es tejido conjuntivo laxo, fino y delicado. Es el que recubre la parte interna. Posee muchas células indiferenciadas preparadas para el crecimiento.

1.3 CÉLULAS DEL TEJIDO ÓSEO:

El tejido óseo posee diferentes tipos de células específicas que permiten la creación, remodelación y reparación del hueso a lo largo del tiempo. Podemos diferenciar los siguientes tipos celulares (10,11):

- **Células Osteoprogenitoras:** Derivan de las células mesenquimales indiferenciadas, presentan una morfología fusiforme mononuclear con finas prolongaciones citoplasmáticas. Son células poco activas. A pesar de ser indiferenciadas ya tienen la capacidad de formar hueso. Son más numerosas durante el desarrollo fetal y en periodo de crecimiento activo, también se encuentran activas en el adulto en caso de fractura. Se localizan en la cara interna del periostio, endostio, rodeando los conductos de Havers y a nivel de las metafisis, rodeando las cavidades que deja el cartílago cuando degenera.
- **Osteoblastos:** Son las células formadoras de hueso, provienen de las células osteoprogenitoras que se redondean y forman núcleos de osificación, que formarán después los osteoides. Constituyen una capa única con disposición

epiteloidea. Están unidas mediante nexos. Su morfología es cúbica, con un núcleo con cromatina laxa, señal de que están activas. Secretan colágeno tipo I para la formación de fibras, proteínglicanos y glucosamínglicanos, glucoproteínas para la adhesión, factores de crecimiento y citocinas. Presentan receptores para la paratohormona (PTH) y la vitamina D, en su superficie.

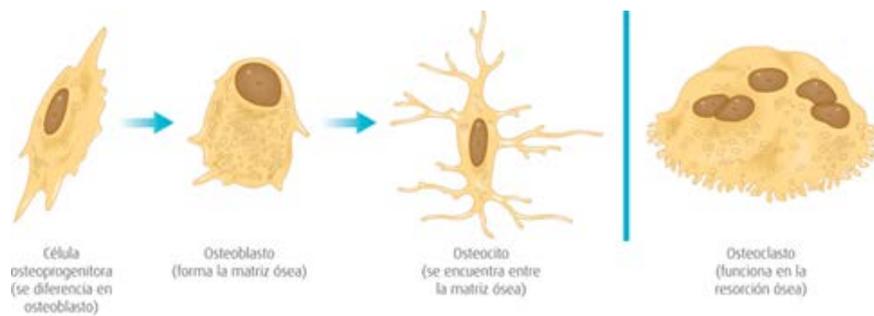


Fig.2- Tipos de células óseas y la evolución que siguen (51)

- **Osteocitos:** Son los osteoblastos rodeados totalmente de matriz intercelular. Sobre la matriz se va depositando el componente mineral y se calcifica. Son las células principales del hueso completamente formado. Tiene morfología lenticular, adaptándose al espacio denominado osteocele y emite prolongaciones que discurren a través de conductos calcóforos, comunicándose así, a través de nexos, con células vecinas (6). También están conectadas con el periostio desde donde les llegan las sustancias nutritivas. Los osteocitos, unidos entre sí mantienen la estructura del hueso pero no sintetizan más.
- **Células de la superficie ósea:** Son células inactivas que se originan a partir de osteoblastos u osteocitos que han finalizado la formación de hueso. Son células aplanadas y fusiformes que revisten las superficies óseas tanto internas como externas que no tienen actividad. Si se necesita más hueso se vuelven a convertir en osteoblastos.
- **Osteoclastos:** No proceden de las células mesenquimales, si no del sistema monocito-macrófago, es decir, de una célula madre hematopoyética. Inicialmente se forma una célula sanguínea, el monocito, que pasa al tejido conjuntivo convirtiéndose en un macrófago especializado y este da lugar finalmente al osteoclasto. Son las encargadas de la reabsorción de hueso. Son células gigantes, multinucleares y polarizadas, ya que los núcleos se sitúan en el punto más alejado de donde se reabsorbe hueso. Tiene múltiples prolongaciones digitiformes de la membrana plasmática en el lado donde se reabsorbe el hueso, se denomina borde fruncido o canto

plegado. Se sitúan en cavidades formadas por ellas mismas, denominadas lagunas de Howship. No tiene receptores para la PTH, pero si para la calcitonina (que inhibe la acción de los osteoclastos). Llevan a cabo el proceso de reabsorción ósea por mecanismos químicos principalmente (favoreciendo un entorno ácido), aunque también se ha observado cierta actividad fagocítica. El final de vida de estas células se lleva a cabo por apoptosis o migración.

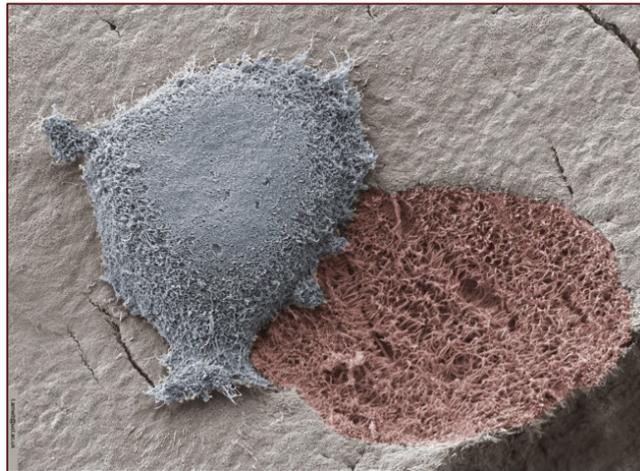


Fig.3- Imagen de microscopía electrónica de un osteoclasto activado.
(<http://boneresearchsociety.org/resources/gallery/40/#top>)

1.4 MATRIZ EXTRACELULAR Y MINERALIZACIÓN:

Está constituida por fibras y sustancia fundamental. Primero los osteoblastos sintetizan la parte orgánica. Debido a su alta mineralización tiene alta resistencia y estabilidad, mientras que la parte orgánica le confiere elasticidad y flexibilidad. Tiene dos componentes:

- **Componente orgánico:** El 90% son fibras de colágeno tipo I (colágeno nativo), aunque existen pequeñas cantidades del tipo V y XII (7). El 10% que no corresponde al colágeno corresponde a:
 - Proteoglicanos: Incluyen ácido hialurónico, condroitín sulfato y keratán sulfato.
 - Glucoproteínas: Son las encargadas de unir el componente orgánico al inorgánico. Encontramos la osteocalcina, osteonectina y sialoproteína.
 - Factores de crecimiento: Intervienen en la actividad celular.
- **Componente inorgánico:** Formado por trifosfatos cálcicos que forman cristales de hidroxapatita, tienen forma de bastón, pero son de mucho menor tamaño que los que se encuentran en la naturaleza, lo que las hace

más solubles. Se encuentran embebiendo a las moléculas de colágeno. También actúa como reservorio para iones de magnesio, sodio y flúor.

Los osteoblastos sintetizan vesículas extracelulares que generan un micro entorno en el cual las concentraciones de calcio y fósforo aumentan lo suficiente para provocar la precipitación de los cristales. Proteínas como la osteocalcina o sialoproteína ayudan a regular la cantidad y tamaño de los cristales de hidroxapatita depositados. Estas vesículas contienen un núcleo compuesto de proteínas, fosfolípidos, calcio y fósforo inorgánico.

La mineralización del hueso empieza en las zonas huecas del final de las fibras de colágeno (8). Aunque el colágeno tipo I no es un promotor de la mineralización. También existen enzimas que participan en la regulación de este proceso, como las fosfoproteínquinas y la fosfatasa alcalina, la cual aumenta las concentraciones locales de fósforo.

La vitamina D juega un papel indirecto en la estimulación de la mineralización del hueso. Una vez metabolizado por hígado y riñones y transformado en 1,25-(OH)₂D sérico, es el responsable del mantenimiento de los niveles séricos de calcio y fósforo. Estimula la absorción intestinal de ambos iones, también promueve la diferenciación de los osteoblastos y la segregación por parte de estas células de la fosfatasa alcalina específica de hueso, osteocalcina, osteonectina y numerosas otras citoquinas.

2 - OSIFICACIÓN, REMODELADO Y REPARACIÓN ÓSEA

El hueso experimenta crecimiento longitudinal y radial, remodelado y reparación a lo largo de toda la vida. Los crecimientos longitudinales y radiales ocurren sobre todo en la infancia y adolescencia.

2.1 OSIFICACIÓN

Se denomina así al proceso de creación de tejido óseo nuevo a partir bien de un molde conjuntivo o de un molde cartilaginoso. Es el tipo de proceso que ocurre en el periodo fetal y en crecimiento de largura o anchura del hueso. Podemos diferenciar dos tipos de osificación:

- **Intramembranosa o directa:** Muchos de los huesos que se forman mediante este tipo, son huesos planos del cráneo como los huesos frontal, occipital, temporal y también la clavícula y la mandíbula. Se forman inicialmente núcleos de tejido conjuntivo fetal rico en células mesenquimales y se produce un aumento de vascularización. A distancia equidistante de los vasos sanguíneos se forman masas eosinofílicas. Comienza la diferenciación de células mesenquimales en células osteoprogenitoras y posteriormente estas en osteoblastos. Se sintetiza matriz ósea y se forman espículas óseas que se van desarrollando y fusionando con otras dando lugar a trabéculas. Conforme van

aumentando las trabéculas se van interconectando entre sí. La siguiente fase es la de la mineralización, con el depósito de sales cálcicas y otros minerales, endureciendo la matriz. Todo este proceso da lugar a tejido óseo esponjoso con un borde pseudoepitelioideo donde encontramos osteoblastos y algunos osteoclastos. A este conjunto se le denomina núcleo de osificación primario y es hueso no laminar con organización trabecular.

Este tejido es también denominado primario o inmaduro ya que las fibras de colágeno no tienen el mismo orden que podemos encontrar en el tejido más antiguo.

La acción conjunta de osteoblastos y osteoclastos reemplazará este tejido por secundario maduro (9).

- **Endocondral o indirecta:** Determinante en la formación de los huesos largos, cortos y la mandíbula. Se lleva a cabo sobre un modelo de cartílago hialino, el cual va siendo paulatinamente eliminado y sustituido por tejido óseo (Fig.4). Es un proceso que se desarrolla desde el interior hacia el exterior. El molde cartilaginoso está recubierto de pericondrio, una capa de tejido conectivo denso, salvo en la superficie de las articulaciones.

En la primera fase el cartílago es calcificado. El siguiente paso es el desarrollo de la diáfisis ósea a través de la invasión de capilares sanguíneos y células osteogénicas, que se extienden por el espacio previamente ocupado por los condrocitos. Se produce la diferenciación a osteoblastos que secretan matriz ósea sobre el cartílago. Las primeras trabéculas tendrán un eje central de cartílago recubierto por hueso. Después se produce la migración de los osteoblastos hacia los extremos, dando lugar al cartílago de crecimiento, responsable del crecimiento en longitud del hueso, y zona de alta actividad celular.

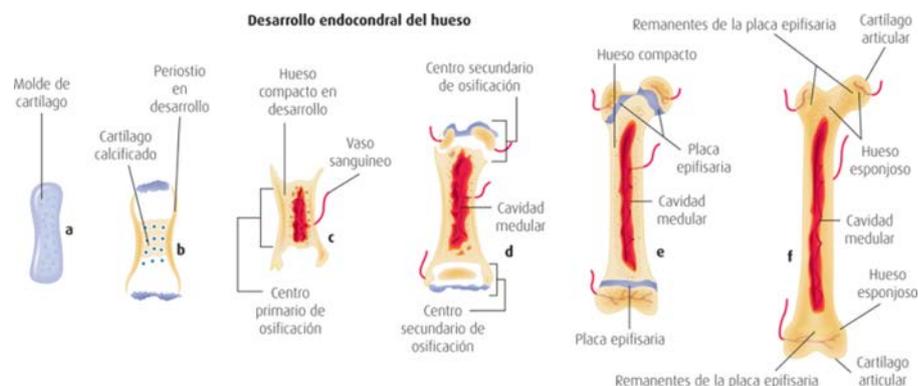


Fig.4- Tipos de células óseas y la evolución que siguen. Atlas de Histología. Biología tisular y celular (51).

Lo siguiente es el desarrollo de la epífisis ósea. Aparecen los centros secundarios, denominados también placas de crecimiento o epifisarias. Este proceso se lleva a cabo en la época perinatal, en las que las diáfisis de los huesos largos principales ya están formadas, estableciendo el tejido óseo compacto, mientras que en las epífisis se formará el tejido óseo esponjoso. El pericondrio no se transforma en periostio.

2.2 REMODELADO ÓSEO

El remodelado es el proceso por el cual el hueso cambia como respuesta a influencias fisiológicas o fuerzas mecánicas, para mantener la resistencia y la homeostasis mineral. Es un proceso que se extiende a lo largo de toda la vida, aunque su actividad está aumentada en el periodo perimenopáusico y postmenopáusico temprano en las mujeres y después va disminuyendo.

o Fases:

- Quiescente: Es la fase en la que el hueso está en reposo.
- Activación: Se llama así a la retracción de los osteoblastos de la superficie endóstica y la digestión de la membrana por acción de las colagenasas, dejando expuesta la superficie mineralizada, lo que atrae a los osteoclastos circulantes.
- Reabsorción: Los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide, proceso continuado por los macrófagos. Se produce la liberación de factores de crecimiento contenidos en la matriz: TGF- β (Factor transformante del crecimiento β), PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) e IGF-I y II (factor análogo de la insulina I y II), principalmente.
- Formación: Los preosteoblastos se agrupan en las zonas reabsorbidas, atraídos por los factores de crecimiento, sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va adherir tejido nuevo y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas) responsables de la diferenciación. Las zonas huecas se rellenan con la sustancia osteoide sintetizada por los osteoblastos ya diferenciados. El colágeno se polimeriza rápidamente formando las fibras de colágeno, dando lugar al tejido osteoide que es similar al colágeno pero que permite la precipitación en su interior de las sales de calcio. Los osteoblastos que quedan en el interior, pasan a denominarse osteocitos.
- Mineralización: Tras 30 días, aproximadamente, del depósito de la sustancia osteoide, comienzan a precipitar las sales de calcio en la superficie de las fibras colágenas, creciendo y dando lugar a cristales de hidroxapatita. Existe un 20-30% que puede quedar en forma amorfa, lo que permite una rápida disolución para pasar al líquido extracelular si

es necesario. Este proceso dura 130 días en hueso cortical 90 en hueso trabecular (10)

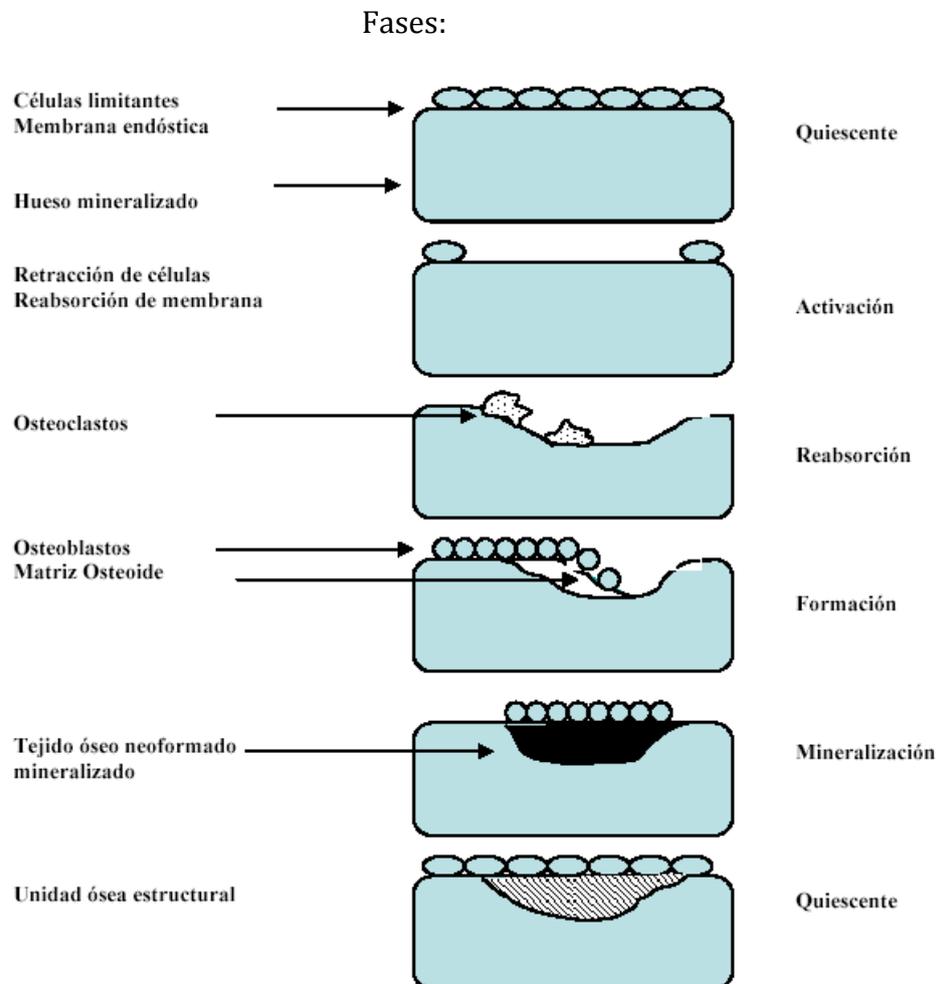


Fig. 1. Fases del remodelado óseo (Modificado de Compston) (2)

Fig.5- Fases del Remodelado óseo (10)

○ **Factores Reguladores:**

- Genéticos: Son determinantes en el pico de masa ósea, ya que entre el 60 y el 80% de ésta se encuentra determinada genéticamente. La masa ósea se transmite de padres a hijos, por ello la predisposición a padecer osteoporosis es mayor en hijas de madres que la padecen (10).

- Mecánicos: La actividad física es imprescindible para el correcto desarrollo del hueso. Existe la hipótesis de que la acción muscular transmite al hueso una tensión que es detectada por la red de osteocitos incluida en el interior del fluido óseo. Estos osteocitos producen mediadores como prostaglandinas, óxido nítrico e IGF-I, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan una mayor formación ósea. Y por el contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez, tienen un efecto perjudicial sobre el hueso, acelerando la reabsorción (10).
- Vasculonerviosos: El sistema vascular aporta células, oxígeno, minerales, iones, glucosa, hormonas y factores de crecimiento, es, por tanto, un elemento clave. Es el primer paso para la osificación, los vasos sanguíneos invaden el cartílago y posteriormente se produce la reabsorción ósea por los osteoclastos. El hueso es inervado por el sistema autónomo y por fibras nerviosas sensoriales, en todos los estratos y tipos de hueso (10).
- Nutricionales: Existe una cantidad mínima de calcio que es necesario ingerir para permitir la correcta mineralización. Hasta los 25 años es de 1200 mg al día, hasta los 45 no debe ser inferior a 1 gramo y tras la menopausia aumenta hasta 1,5 g. También ciertas sustancias provocan un efecto nocivo sobre el hueso: tabaco, cafeína, alcohol y exceso de sal, siendo factores de riesgo en la aparición de osteopenia.
- Hormonales: El desarrollo normal del esqueleto está condicionado de forma muy importante por el sistema hormonal, tanto de forma endocrina (mensajeros sistémicos a distancia del lugar de producción), como autocrina y paracrina (acción local sobre la síntesis y efecto de los factores que intervienen directamente en el metabolismo celular). Las más importantes son:
 - *Hormonas Tiroideas*: Poseen dos acciones contrapuestas. Por un lado, a través de la síntesis de IGF-I, estimulan la síntesis de la matriz osteoide por los osteoblastos y su mineralización. Y por el otro, se estimula la reabsorción al aumentar el número y función de los osteoclastos.
 - *Parathormona (PTH)*: Controla la homeostasis del calcio a través de su acción directa sobre el hueso y el riñón e indirecta en el intestino. Cuando existe un descenso en la calcemia se segrega en las glándulas paratiroides, es la hormona hipercalcemiantes por excelencia, al favorecer la reabsorción.
 - *Calcitonina*: Producida en las células parafoliculares del tiroides, inhibidora de la reabsorción ósea, reduciendo el número y actividad de los osteoclastos. Es una acción transitoria, pues se

produce una tolerancia de los osteoclastos a la calcitonina en pocos días.

- *Calcitriol (1,25(OH)₂ vitamina D₃):* Favorece la absorción intestinal del calcio y fósforo y por tanto la mineralización ósea. Podría ser producida por células linfocíticas o monocíticas del hueso, ejerciendo un papel importante como regulador local de la diferenciación de los osteoclastos (12).
- *Andrógenos:* Tienen un efecto anabolizante sobre el hueso, a través del estímulo de los receptores de los osteoblastos. También actúan de mediadores en el pico de hormona del crecimiento durante la pubertad (12).
- *Estrógenos:* Son esenciales para el cierre de los cartílagos de conjunción. Tienen un doble efecto sobre el metabolismo óseo, por un lado favorecen la formación ósea al aumentar el número y función de los osteoblastos y por el otro disminuyen la reabsorción. Existen receptores estrogénicos en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (12).
- *Progesterona:* También tiene efecto anabolizante, directamente a través de los osteoblastos que poseen receptores o indirectamente, mediante la competición por los receptores osteoblásticos de los glucocorticoides (13).
- *Insulina:* Estimula la síntesis de la matriz directa e indirectamente a través del aumento de la síntesis hepática de IGF-I (13).
- *Glucocorticoides:* Inhiben la síntesis de IGF-I y suprimen la BMP-2, con lo que tienen efecto catabólico a dosis altas. Sin embargo a dosis fisiológicas tienen capacidad osteogénica favoreciendo la actividad osteoblástica (13).
- *Hormona del Crecimiento (GH):* De forma directa actúa sobre los osteoblastos, aumentando la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina. Indirectamente, es a través del aumento de la síntesis de IGF-I y II por los osteoblastos (13).

- Locales:

- *Factores de Crecimiento:* Son polipéptidos producidos por las propias células óseas o en tejidos extra-óseos. Modulan las funciones celulares de crecimiento, diferenciación y proliferación celular. Las más importantes son:

- ★ **IGF-I y II:** Los factores de crecimiento análogos a la insulina, son estructuralmente similares a esta y se sintetizan en el hígado y en los osteoblastos. Están en gran concentración en la matriz osteoide. Incrementan el número y la función de osteoblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno. Median en la interacción osteoblasto-osteoclasto e intervienen de forma activa en la remodelación ósea.
- ★ **TGF- β :** Los factores transformantes del crecimiento β son una superfamilia de proteínas muy abundantes en el tejido óseo. Se activan durante la reabsorción osteoclástica. Es un potente estimulador de la formación ósea, inhibiendo la síntesis de proteasas y potenciando la diferenciación osteoblástica y la síntesis de la matriz osteoide. También reduce la formación y diferenciación de osteoclastos, así como la actividad de los osteoclastos maduros y estimula su apoptosis.
- ★ **BMPs:** Las proteínas morfogenéticas óseas están dentro de la familia de las TGF- β . Son capaces de transformar el tejido conjuntivo en tejido óseo. Son los factores más potentes de diferenciación osteoblástica.
- ★ **PDGF:** El factor de crecimiento derivado de las plaquetas estimula la síntesis proteica de los osteoblastos y también favorece la reabsorción ósea. Tiene efecto sobre la neovascularización y la síntesis del colágeno, por lo que favorece la cicatrización.
- ★ **FGF:** El factor de crecimiento fibroblástico es anabolizante óseo. Es mitógeno de los osteoblastos, de las células endoteliales vasculares y de los fibroblastos.
- ★ **EGF:** El factor de crecimiento epidérmico es un potente mitógeno de las células de origen mesodérmico y ectodérmico. Tiene doble acción formadora y destructora de hueso.
- ★ **VEGF:** El factor de crecimiento vascular endotelial induce la angiogénesis y la proliferación endotelial vascular. Produce vasodilatación y un incremento de la permeabilidad vascular. Se secreta en situaciones de hipoxia. Uno de los factores clave en el desarrollo de las primeras fases del proceso de reparación de fracturas y regeneración ósea, así como en el desarrollo tumoral.

- ★ **M-CSF:** El factor estimulador de colonias de macrófagos es producido por los osteoblastos. Es un factor principal en las primeras fases de la osteoclastogénesis, para la formación de células gigantes multinucleadas, pero no tiene efecto sobre la actividad osteoclástica.
 - ★ **TNF:** El factor de necrosis tumoral *in vitro* estimula la reabsorción.
- *Proteínas de la Matriz:* Actúan como moduladores de los factores de crecimiento, ya que están en una concentración mil veces mayor que estos. También participan en la regulación de la diferenciación celular de las células contenidas en la matriz.
 - *Citoquinas:* Son polipéptidos sintetizados en células linfocíticas y monocíticas. Tienen acción paracrina y autocrina en multitud de funciones celulares como la respuesta inmunológica, inflamación y hematopoyesis. Las más importantes en el hueso son: las prostaglandinas (PGs), Interleuquina 1 (IL-1), 6 (IL-6) y 11 (IL-11).
- **Marcadores Bioquímicos:** Son interesantes desde el punto de vista clínico.
 - Marcadores de formación ósea: Fosfatasa alcalina, osteocalcina y procolágeno I.
 - Marcadores de reabsorción: Hidroxiprolinuria y fosfatasa ácida resistente a tartrato.

2.3 REPARACIÓN ÓSEA

El hueso, a diferencia de otros tejidos, es capaz de regenerarse mayoritariamente tras una fractura sin la formación de cicatrices, con las mismas propiedades que tenía antes de la fractura y, eventualmente, es indistinguible del hueso adyacente no fracturado (14). Aunque en algunas situaciones, esta reparación se lleva de forma anómala, por ello desde hace décadas se han llevado a cabo investigaciones en modelos animales y humanos que han aportado entendimiento sobre las vías biológicas que regulan estos procesos.

Podemos distinguir principalmente dos vías de reparación ósea:

- **Reparación Indirecta:** Es la más común, implica osificación intramembranosa y endocondral, no requiere condiciones de rigidez y estabilidad anatómica (19).

- Fases:

▪ *Fase Inflamatoria Aguda:*

Inmediatamente tras la fractura se produce un hematoma, que delimita la zona de la herida para la formación posterior del callo. Está compuesto de células provenientes de sangre intramedular y periférica, así como células de la médula ósea. Tanto las plaquetas como los macrófagos van a segregar citoquinas proinflamatorias, TNF- α , IL-1 e IL-6, principalmente. Con un pico entre las 24 primeras horas y hasta 7 días después.

El TNF- α media su efecto induciendo señales inflamatorias secundarias y actuando como agente quimiotáctico. Induce la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales (MSCs), a través de la activación de los receptores TNFR1 y TNFR2, expresados ambos en osteoblastos y osteoclastos. TNFR1 se expresa siempre en el hueso, mientras que TNFR2 solamente en hueso dañado.

La IL-1 se expresa a la misma vez que el TNF- α , es segregado por los macrófagos, induce la producción de IL-6 en los osteoblastos, promueve la producción del callo cartilaginoso y la angiogénesis por activación de sus receptores IL-1RI y IL-1RII.

Por otro lado la IL-6 solo es segregada durante la fase aguda y estimula la angiogénesis, la producción de VEGF y la diferenciación de osteoblastos y osteoclastos.

▪ *Fase de Formación de Cartilago:*

Debido a la baja concentración de oxígeno que se produce en la zona fracturada, la formación de cartilago está favorecida. Las MSCs tienen la habilidad de poder diferenciarse tanto en osteoblastos como en condrocitos. La isquemia local favorece la secreción de la familia de TGF- β que promueve la diferenciación de MSCs en condrocitos. Los condrocitos van a formar inicialmente una estructura celular que aumentará con la producción de colágeno tipo II y proteoglicanos formando cartilago. Conforme el espacio de la fractura se va rellenando con cartilago, la estabilidad mecánica aumenta y los condrocitos se vuelven hipertróficos y en la matriz extracelular se empieza a acumular calcio.

Pero más importante que esto, los niveles de HIF-1 α se elevan induciendo la producción de VEGF favoreciendo la angiogénesis.

Al final de esta fase, los macrófagos y osteoclastos son atraídos a la zona y hay un incremento en la producción de BMPs, que reclutarán osteoblastos, para la degradación del cartílago y formación de hueso.

- *Fase de Callo Duro:*

TNF- α comenzará un proceso de apoptosis de los condrocitos. El mecanismo de calcificación involucra a las mitocondrias que acumulan gránulos que contienen calcio, los cuales se han creado en el ambiente hipóxico de la fractura. Estos gránulos son vertidos hacia la matriz extracelular en donde precipitan con el fosfato y forman depósitos minerales. Esto ocurre aproximadamente en el día 14 desde la fractura. Conforme la mineralización y la formación del callo duro avanzan, este se vuelve más sólido y mecánicamente rígido.

- *Remodelado:*

Aunque la estructura de callo duro posee una estructura rígida y biomecánicamente estable, no tiene las mismas propiedades que el hueso de origen, con lo cual comienza la fase de remodelado. Con una segunda fase de resorción ósea.

En esta ocasión los factores que orquestarán este proceso son la IL-1, el TNF- α y la BMPs, especialmente la BMP2. Un equilibrio entre resorción por osteoclastos y formación de hueso por osteoblastos se establece.

El proceso empieza entre las 3-4 semanas post-trauma, pero puede durar años hasta la finalización completa.

Aunque existen factores individuales para que este proceso se complete más o menos rápido, como la edad, la toma de cierto tipo de medicamentos, etc... lo que si resulta imprescindible es un adecuado flujo sanguíneo y un aumento gradual de la estabilidad mecánica para alcanzar el éxito.

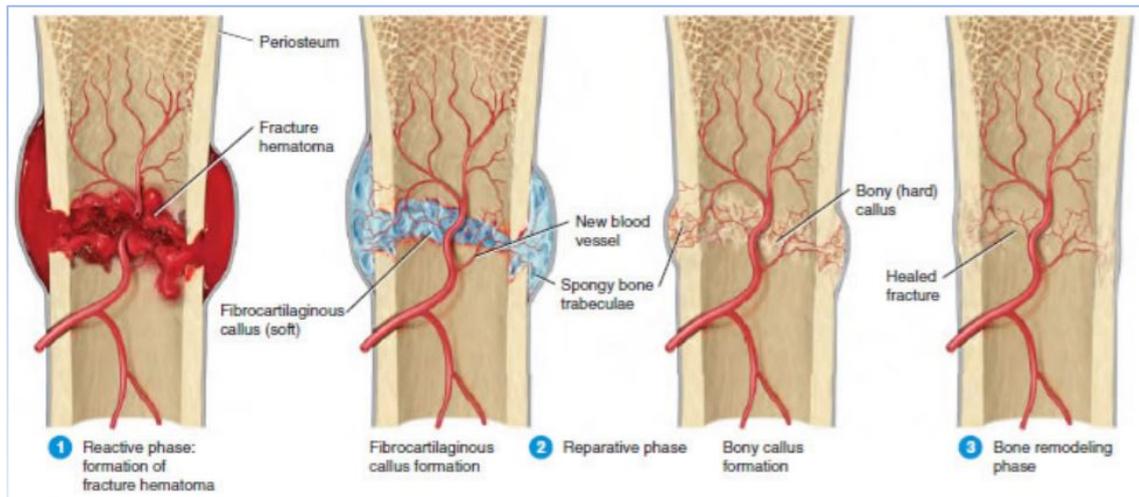


Fig.6- Fases de la reparación ósea indirecta con la formación de cartilago y posterior callo duro (<https://www.orthobullets.com/basic-science/9009/fracture-healing>).

- **Reparación Directa:** Es la menos frecuente y ocurre cuando no hay formación intermedia de callo cartilaginoso.
 - **Fases:** Inmediatamente después de la fractura se forma un hematoma con respuesta inflamatoria. Plaquetas y macrófagos acceden al lugar de la fractura y secretan citoquinas, como IL-1, IL-6, TNF- α , PGE₂, las cuales atraerán a las células progenitoras que se diferenciarán en osteoblasto, osteoclastos y células endoteliales. En este tipo de reparación, la mediación estará a cargo de los tejidos endosteales, el sistema haversiano y el periostio (19).

Otra diferencia frente a la reparación secundaria es que no existe resorción de los extremos de la fractura, si no que estos extremos son recanalizados por los sistemas haversianos. Cuando los extremos están suficientemente cerca, los canales haversianos pueden cruzar al extremo opuesto. Esto es gracias a una interacción simultánea entre osteoblastos y osteoclastos. Estos últimos forman conos o canales donde los osteoblastos forman osteones. Se producen un aumento de factores como VEGF, TGF- β y BMPs que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos por las células endoteliales y hueso por los osteoblastos.

2.4 ESTRATEGIAS ACTUALES PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA

Cuando la fractura supera un cierto tamaño (defecto crítico), el hueso no es capaz de regenerarse por sí solo. En estas situaciones, se han establecido una serie de técnicas que puedan aportar una estructura soporte sobre la que crecer el hueso, utilizando diferentes tipos de materiales que deben de cumplir al menos una de estas propiedades:

Los materiales utilizados en regeneración ósea deben de actuar a través de uno o varios de los siguientes mecanismos de acción:

- **Osteogénesis:** Implica la formación y desarrollo de hueso incluso en ausencia de MSCs locales indiferenciadas.
- **Osteoinducción:** Es la transformación de MSCs indiferenciadas en osteoblastos o condroblastos a través de factores de crecimiento existentes únicamente en hueso vivo.
- **Osteoconducción:** Es el proceso que provee un soporte bio-inerte, o una matriz física aptos para la deposición de nuevo hueso proveniente de huesos de alrededor, o para promover el crecimiento de MSCs diferenciadas a lo largo del injerto.

Las principales estrategias que se siguen hoy en día son:

○ **Regeneración Ósea Guiada:**

Es un método quirúrgico que utiliza barreras físicas en forma de membranas con o sin partículas óseas o sustitutos del hueso (22). Es una técnica ampliamente utilizada en cirugía maxilofacial e implantología.

El éxito de la GBR depende de la migración de células osteogénicas y pluripotenciales a la zona del injerto y a la exclusión de células que impidan la formación de hueso como los fibroblastos o células epiteliales. El ratio de formación de hueso en los márgenes del defecto debe superar el ratio de fibrogénesis creciendo en los tejidos blandos que lo rodean. Por ello para una buena GBR es necesario cuatro factores: Exclusión de epitelio y tejido conectivo, mantenimiento del espacio, estabilidad del hematoma y cierre de la herida primaria (23).

La secuencia de eventos en la GBR es la siguiente: En las primeras 24 horas tras el injerto, se forma un hematoma en el defecto, con la segregación de factores de crecimiento y citoquinas que atraerán a macrófagos y neutrófilos. El hematoma es absorbido y se reemplaza por un tejido granular rico en vasos sanguíneos de nueva formación. A través de estos nuevos vasos sanguíneos van llegando nutrientes y MSCs que podrán dar lugar a nuevo hueso, tal como hemos visto en los apartados anteriores.

Si una membrana de barrera se coloca en contacto directo con la superficie del hueso que rodea al defecto, solo las células óseas de los alrededores así como la de la médula ósea pueden migrar hasta el defecto, sin competir con las células tisulares de la mucosa (24).

Las membranas tienen que cumplir las siguientes características:

- Adherirse al tejido sin moverse,
- Impedir el crecimiento de tejido mucoso,
- Fácil de usar y
- Biocompatible

Tipos de membranas para GBR:

- Membranas Reabsorbibles: No será necesario una intervención posterior para eliminarlas, por lo que disminuye la morbimortalidad del paciente y tiene un mayor ratio coste-efectividad.
 - *Membranas poliméricas*: Ácido poliláctico o ácido poliglicólico.
 - *Membranas de colágeno*.
- Membranas No Reabsorbibles: Permiten el modelado creando el espacio físico y la atracción de las células osteoprogenitoras necesarias para la formación de nuevo hueso en el defecto. El mayor inconveniente es que se requieren una segunda intervención para su extracción y las probabilidades de infecciones son altas. Existen de varios tipos:
 - *Politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE)*.
 - *Politetrafluoroetileno de alta densidad*.
 - *Malla de titanio*.
 - *PTFE reforzado con titanio*.

○ **Osteodistracción:**

Es una técnica quirúrgica utilizada bastante en cirugía maxilofacial e implantología, la cual está basada en el desplazamiento gradual y controlado de una fractura ósea realizada quirúrgicamente. El espacio creado entre los segmentos va rellenándose del coágulo de fibrina (callo), para crear un puente óseo, que permita la formación de nuevo hueso.

Este método consta de 3 etapas:

- Latencia: Comienza inmediatamente tras la corticotomía y dura entre 3 y 10 días. Empieza con la respuesta inflamatoria y termina con el principio de la elongación del hueso. La respuesta molecular durante esta fase es similar a la de la osificación endocondral.
- Distracción: La angiogénesis es directamente estimulada por la fuerza mecánica que se aplica en este método. La expresión de BMP-2 y BMP-4 se eleva y los osteoblastos comienzan a formar osteoides paralelos al vector creado por la corticotomía. No existe la formación de un callo cartilaginoso. Este proceso es muy sensible a la velocidad de distracción.

- Consolidación: Los osteoides mineralizan y el hueso formado comienza el proceso de remodelación.

- **Ingeniería tisular:**

Esta nueva técnica combina células progenitoras o células maduras para la osteogénesis, sembradas en una matriz (scaffold) biocompatible, tridimensional y altamente porosa, para la osteoconducción y crecimiento vascular. También se añade factores de crecimiento para la osteoinducción. Útil sobre todo para defectos grandes. Es una técnica que compite con los autoinjertos.

- **Terapia Génica:**

Implica la transferencia de material genético en el genoma de las células diana, permitiendo la expresión de factores bioactivos en las mismas células osteogénicas durante un periodo prolongado de tiempo.

La transferencia génica se puede llevar a cabo utilizando un vector viral (transfección) o no viral (transducción) y en ambos casos *in vivo* o *ex vivo*. El método más sencillo es *in vivo*, el material genético se transfiere directamente al huésped, pero existen problemas a nivel de la seguridad. El método indirecto, *ex vivo*, requiere una recolección previa de las células y su modificación genética *in vitro* antes de transferirlas de nuevo al huésped. Técnicamente es más demandante esta técnica pero es mucho más segura, ya que se pueden elegir las células con mayor ratio de expresión génica y descartar las células anormales (14).

- **Injertos:**

Son fragmentos de tejido o material viable que se transfiere del lugar donante al receptor con el propósito de reconstruir la fractura o defecto.

Existen varios tipos de injertos, pudiendo ser utilizados de forma independiente o en conjunto:

- Autoinjertos: Es tejido transferido desde una determinada localización a otra del mismo individuo. Las zonas más frecuentes desde las que se puede obtener el material suelen ser la cresta ilíaca y la tibia. Este tipo de injertos son considerados el “estándar de oro” de los materiales injertables, pues son altamente osteogénicos, osteoconductivos y osteoinductores. Aportan proteínas, factores de crecimiento, minerales, células vitales y el substrato necesario para la generación de hueso. Es histocompatible y no inmunogénico.

Sin embargo tiene limitaciones bastante importantes:

- Se necesita un segundo acto quirúrgico para recoger el material con el aumento de la morbilidad en el paciente.

- Es un procedimiento caro.
 - La cantidad que se puede obtener es limitada.
 - Posibilidad de anquilosamiento y resorción radical.
- Aloinjertos: Es tejido transferido desde un individuo a otro, genéticamente diferente, pero de la misma especie. Se solucionan los problemas de una segunda operación, reduciendo los riesgos de morbilidad y de la limitación de cantidad de material obtenido. Sin embargo no está libre de limitaciones:
 - Propiedades osteoinductivas y osteogénicas reducidas.
 - Problemas de inmunogenicidad, de rechazo.
 - Posibilidad de infecciones.
 - Alto costo.
 - Xenoinjertos: Es tejido que se transfiere desde una especie a otra diferente. Los más representativos son la hidroxiapatita natural extraída de huesos animales
 - Materiales Aloplásticos o Biomateriales: Materiales sintéticos o naturales que promueven la migración, proliferación y diferenciación de las células óseas. Idealmente deben ser materiales firmes, maleables, osteoconductivos, osteoinductivos, reabsorbibles, inexpansivos y fáciles de usar (25). Existe una amplia gama de biomateriales con características que están resumidas en la tabla 1. Nos interesa particularmente el colágeno, utilizado como estructura de soporte para el crecimiento óseo. La mayoría de los que están disponibles comercialmente son una combinación del tipo I junto al III y su procede de los tendones, dermis, piel o pericardio bovino mayoritariamente (54). Entre las numerosas ventajas que tiene, podemos destacar la baja inmunidad, fácil manipulación y adaptación y habilidad para aumentar el espesor del tejido y su efecto directo sobre la formación de hueso (55). Es rápidamente degradado gracias a la actividad enzimática de macrófagos y leucocitos polimorfonucleados a dióxido de carbono y agua (56) lo que le confiere la característica de reabsorbibilidad.

Tipo	Composición	Origen	Aplicaciones clínicas	Propiedades
Cerámicos	Fosfatos de calcio: - Hidroxiapatita - Fosfato tricálcico - Fosfato de octacalcio	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Regeneración ósea de sitios sin carga mecánica. Relleno de defectos óseos. 	<ul style="list-style-type: none"> Adhesión de tejido óseo. Biodegradable. Tasa de degradación variable.
	Óxido de Aluminio	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Reemplazo de articulaciones. 	<ul style="list-style-type: none"> Alta resistencia a la tensión. Alta resistencia a la fatiga. Sin adhesión de tejido óseo. Baja fricción.
Biovidrios	Fosfatos de calcio con base de silicio	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Regeneración ósea de sitios sin carga mecánica. Relleno de defectos óseos. 	<ul style="list-style-type: none"> Adhesión de tejido óseo. Biodegradable.
Metálicos	Titanio y sus aleaciones	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica. Prótesis dentales. Prótesis de cadera. Prótesis vertebrales. 	<ul style="list-style-type: none"> Adhesión de tejido óseo. Resistente a la corrosión. Alta resistencia mecánica.
	Acero inoxidable Aleaciones de cobalto Cromo	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Reemplazo de hueso en sitios con carga mecánica. Prótesis dentales. Prótesis de cadera. Prótesis vertebrales. 	<ul style="list-style-type: none"> Corrosión a largo plazo.
Polímeros	Polimetilmetacrilato (PMMA)	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Reemplazo de hueso en zonas con carga mecánica. Relleno de defectos óseos. Fijación de prótesis de cadera. Vertebroplastia 	<ul style="list-style-type: none"> No biodegradable.
	Poliésteres: - Ácido poliláctico - Ácido poliglicólico - Policaprolactona - Poliuretano.	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Fijación degradable de hueso. Hilo de sutura. Relleno de defectos óseos. Regeneración tejido blando Liberación controlada de fármacos 	<ul style="list-style-type: none"> La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar variando su peso molecular.
	Tereftalato de polietileno	Sintético	<ul style="list-style-type: none"> Cemento y relleno de defectos óseos. 	<ul style="list-style-type: none"> La tasa de degradación y las propiedades mecánicas se pueden controlar variando su peso molecular. Bioactivo
Proteínas	Matriz ósea desmineralizada	Natural (humano)	<ul style="list-style-type: none"> Relleno de defectos. Regeneración de cartílago. 	<ul style="list-style-type: none"> Biodegradable. Fuente natural de proteínas osteoinductivas (BMPs)
	Colágeno	Natural (bovino)	<ul style="list-style-type: none"> Reparación de tejidos duros y blandos. Relleno de defectos óseos. 	<ul style="list-style-type: none"> Biodegradable
Minerales	Coral	Natural (animal)	<ul style="list-style-type: none"> Relleno de defectos óseos 	<ul style="list-style-type: none"> Alta interconexión. Biodegradable

Tabla.1- Resumen de algunos de los principales biomateriales utilizados en regeneración ósea en distintos campos médicos (52).

2.5 – ESTUDIO DE LA DENSIDAD ÓSEA A TRAVÉS DE LAS TÉCNICAS DE IMAGEN

La medida de la densidad ósea es fundamental para diagnosticar y tratar diversas enfermedades como la osteoporosis e igualmente, para llevar a cabo diversas cirugías, especialmente las de ámbito maxilofacial como los implantes.

Se ha demostrado que la densidad mineral ósea es el factor predictivo más importante del riesgo de fractura (26).

Por lo tanto conseguir una medida lo más exacta y fiable posible, tanto de la densidad ósea, de la calidad del hueso e incluso de la estructura es de gran relevancia. Las técnicas de imagen son, sin duda, las más utilizadas para ello. A

continuación voy a detallar las más comunes, incidiendo especialmente en la tomografía computerizada, objeto de este trabajo.

○ **Radiografía de rayos X convencional:**

La menos sensible de todas las técnicas. Solo capta disminuciones importantes de la densidad ósea, superiores al 30%. La representación de las imágenes es en 2D, con superposición de estructuras. Se puede diferenciar solamente entre aire, grasa, hueso y metal. Factores como el tiempo de exposición, el miliamperaje, el kilovoltaje, la distancia tubo-película, el tamaño del punto focal, la colimación, la filtración, el tipo de película, las pantallas intensificadores, la técnica de revelado y fijado, influyen notablemente en la sensibilidad de la imagen, lo que lo hace una técnica poco precisa y algo subjetiva.

○ **Absorciometría:**

Basadas en el principio de atenuación que sufren los rayos X o los fotones de rayos gamma al atravesar los tejidos, la cual se relaciona con el grosor y composición de los tejidos que atraviesa (26). Existen varios tipos:

- Absorciometría fotónica simple (SPA): Fue la primera que se desarrolló. Una fuente radioactiva emite un fotón que atraviesa el hueso y el densitómetro mide la atenuación de los rayos X que atraviesan el tejido óseo. No se puede separar la atenuación producida por el tejido óseo de la de los tejidos circundantes, por lo que es una técnica muy limitada y actualmente en desuso.
- Absorciometría fotónica dual (DPA): El desarrollo de la absorciometría siguió con el uso de dos fotones diferentes, en este caso el densitómetro sí puede diferenciar entre tejido óseo y tejidos blandos, pero fue sustituido por la DXA.
- Absorciometría dual de rayos X (DXA): Es el método más usado en clínica. No precisa de ninguna fuente isotópica, si no que se utiliza una de rayos X, consiguiendo así una mayor precisión. La atenuación de los tejidos blandos se corrige con el cruce de dos haces de rayos X de distinta energía.

○ **Ultrasonografía (BUA):**

Es una técnica no invasiva y sin radiación, que aporta datos cuantitativos de densidad y también cualitativos como la estructura y la elasticidad del hueso. Miden fundamentalmente hueso trabecular. Es una técnica prometedora, limitada actualmente al campo de la investigación, especialmente de la osteoporosis.

	Radiación (mRem)	Precisión (%)	Tiempo de Exploración (minutos)	Coste
SPA	10-20	1-2	15	+
DXA	1-5	0.5-2	3-7	++
TC	60	2-5	10-15	+++
BUA	0	0.4-4	3.7	+
RX Simple	700			+

Tabla.2 - Resumen de las características principales de las distintas técnicas de medición de la masa ósea. **SPA:** Absorciometría fotónica simple, **DXA:** Absorciometría dual de rayos X, **TC:** Tomografía Computerizada, **BUA:** Ultrasonografía, **RX SIMPLE:** Radiografía de rayos X simple (26).

○ **Tomografía Computerizada (CT):**

En 1972 esta técnica fue presentada y descrita por el británico Hounsfield, lo que le valió el premio Nobel. Se pretendía resolver 3 limitaciones de la radiología convencional:

- Evitar la superposición de capas, pudiendo obtener una imagen tridimensional y exacta.
- Diferenciar los tejidos blandos del tejido óseo. Incluso se puede distinguir entre hueso cortical y trabecular.
- Cuantificar las densidades.

Se utiliza una fuente de rayos X que emite de forma rotatoria alrededor del objeto de estudio, para obtener imágenes en secciones transversales que permiten la reconstrucción de una imagen más precisa que con las radiografías clásicas. Desde 1972 la técnica ha ido evolucionando y existen actualmente tres tipos de CT: la médica, la dental o CBTC y la microCT.

Estamos hablando de un método cuantitativo, que hace uso de la escala Hounsfield, que es una escala de grises que viene dada por los grados de atenuación de los rayos X al atravesar el hueso. Esta escala está directamente correlacionada con la densidad ósea. Son valores que van de -1000 (que representaría el aire) a +1000 que sería hueso. Aunque en los aparatos de última generación el intervalo se ha ampliado a 4100 grados, con un intervalo comprendido desde el -1024 HU a +3076 HU (27).

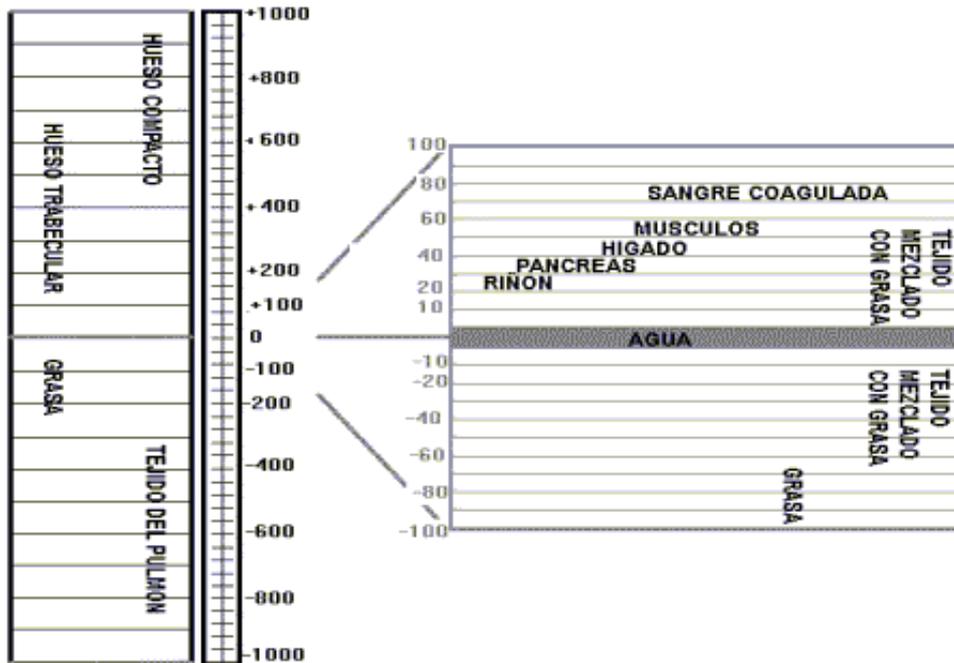


Fig.7- Escala de Hounsfield clásica medida desde -1000, que representa el aire, a +1000 que sería hueso compacto y donde 0 representa al agua (33).

De la misma forma que en la radiología clásica obtenemos imágenes planas que se constituyen en píxeles, la CT es la única técnica tridimensional volumétrica para medir densidad ósea de la que se dispone, obteniendo imágenes tridimensionales constituidas por vóxeles, mínima unidad volumétrica procesable. Cada uno de estos voxels nos aporta un valor numérico, dataraw, que podrá ser procesado matemáticamente gracias al software incluido con el tomógrafo, para después poder obtener una imagen completa y cuantificar.

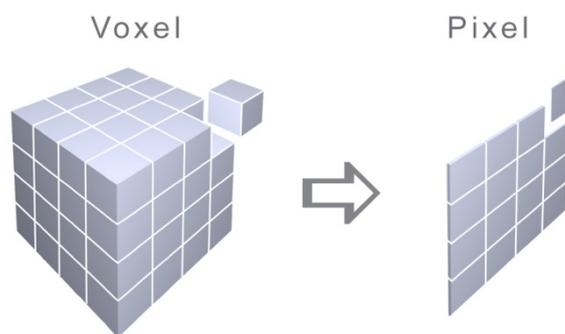


Fig.8- Diferencia entre la unidad en dos dimensiones, el pixel y el mismo concepto teniendo en cuenta el volumen, el voxel.

A lo largo del tiempo se han utilizado diferentes escalas de densidad ósea para predecir el riesgo de fractura o la probabilidad de éxito de un implante, pero estas escalas estaban basadas en el conocimiento clínico y empírico, como lo son las clasificaciones de Lekholm-Zarb y la de Misch (27), pero se necesita mayor precisión y objetividad.

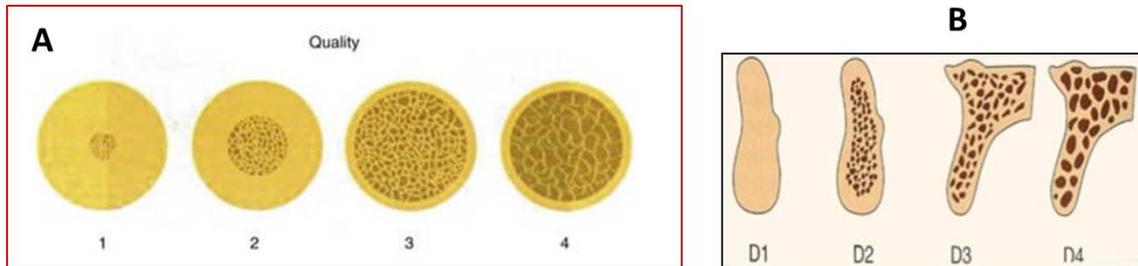


Fig.9- Clasificaciones de la calidad ósea basadas en la observación empírica. **A** – Clasificación de Lekholm-Zarb (27): 1- Hueso compacto homogéneo, 2- gruesa capa cortical rodeando al hueso trabecular denso, 3- fina capa de hueso cortical rodeando al hueso trabecular de resistencia favorable, 4- fina capa de hueso cortical rodeando un núcleo de hueso trabecular de baja densidad con volumen de médula ósea pequeño. **B** – Clasificación de Misch (29): D1- Densidad ósea cortical densa, D2- cortical porosa y trabéculas finas, D3- cortical porosa (delgada) y trabéculas finas, D4- trabéculas finas.

Se han llevado a cabo numerosos estudios posteriores, tomando como base las clasificaciones de calidad ósea vistas previamente de Lekholm-Zarb y la de Misch. Así *Kwon et al.* (30) propusieron un mapa de densidades en maxilar y mandíbula con CBCT para ayudar en el tratamiento implantológico. *Aranyarachkul et al.* (31) utilizaron la QTC y la clasificación de Lekholm-Zarb en mediciones densitométricas sobre cadáveres humanos, observando que para cada una de las 4 clases, hay un amplio rango de valores UH. *Lee et al.* (32) compararon las mediciones hechas con QTC con la clasificación de Misch y la de Lekholm-Zarb en mandíbulas de cadáveres humanos (27).

En el 2001 Norton y Gamble (34) llevaron a cabo un estudio en el que correlacionaron la clasificación llevada a cabo por Lekholm-Zarb, con las unidades Hounsfield haciendo de esta escala, y posteriormente la escala de Misch, unas herramientas mucho más útiles, precisas y objetivas.

Calidad (Lekholm and Zarb)	Rango de densidad ósea (HU) (Norton and Gamble)	Región de interés (ROI)
Calidad 1	> 850	Mandíbula Anterior
Calidad 2/3	500 - 850	Mandíbula Posterior/ Maxilar Anterior
Calidad 4	0 - 500	Maxilar Posterior
Calidad 4*	< 0	Región tuberosa

Tabla.3- Relación entre la clasificación de Lekholm-Zarb y las HU, gracias al estudio de Norton y Gamble (34).

También Misch en el 2009 correlacionó su primera clasificación de 1990 con las HU, gracias a la CT en hueso plano. Esta será la clasificación que usaremos para este trabajo. Muchos estudios de histología han corroborado el valor de la CT como técnica predictiva de la calidad ósea.

D1: > 1250 UH
D2: 850 A 1250 UH
D3: 350 A 850 UH
D4: 150 A 350 UH
D5: < 150 UH

Tabla.4- Determinación de la densidad ósea mediante TC (29).

○ **Microscopía electrónica de Barrido (SEM-EDX):**

En la microscopía electrónica de barrido un haz de electrones primarios incide sobre la superficie de una muestra provocando la emisión de electrones secundarios debido a la dispersión inelástica entre el haz de electrones incidentes y los electrones de los átomos de la superficie de la muestra. Detectores sensibles a electrones captarán estas emisiones transformándolas en imágenes. De esta forma podemos observar y caracterizar la superficie de materiales tanto orgánicos como inorgánicos con una muy alta resolución. Si se mueve el haz de electrones sobre la superficie que se quiere estudiar, se obtendrá un mapeo, o lo que es lo mismo, un barrido de dicha superficie.

También podemos llevar a cabo microanálisis de elementos, como el calcio o el fósforo en secciones determinadas gracias a la técnica de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X. En el caso del estudio de la densidad ósea y de la regeneración, nos interesan los porcentajes de calcio y fósforo, pues son indicadores de la formación ósea, de la misma forma el oxígeno indica el grado de actividad de los osteoblastos, a mayor porcentaje de oxígeno, mayor nivel de actividad osteoblástica.

B – DEFEROXAMINA

La deferoxamina (DFO), también conocida como desferrioxamina o desferal, es un ácido trihidroxámico que produce de forma natural la bacteria *Streptomyces pilosus*. Es un quelante del hierro, al que se une con gran afinidad en proporción 1:1, formando un complejo hexadentado.

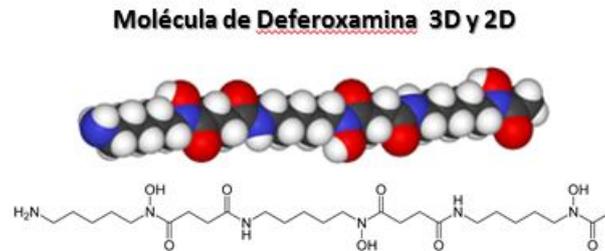


Fig.10- Imagen tridimensional y fórmula química de la Deferoxamina

1 – DESCRIPCIÓN FARMACOLÓGICA

1.1 MECANISMO DE ACCIÓN:

La deferoxamina como quelante es bien conocida. Se une al hierro libre en sangre (ión férrico Fe^{3+}), a través de sus grupos hidroxilo formando un complejo estable e inerte. Una de las mayores ventajas, además de que no forma quelatos con el calcio, es que se une al Fe^{3+} de la ferritina y siderina, formando un quelante denominado ferrioxamina que puede ser fácilmente excretado vía renal y fecal, pero no afecta al hierro de la hemoglobina, mioglobina o de los citocromos.

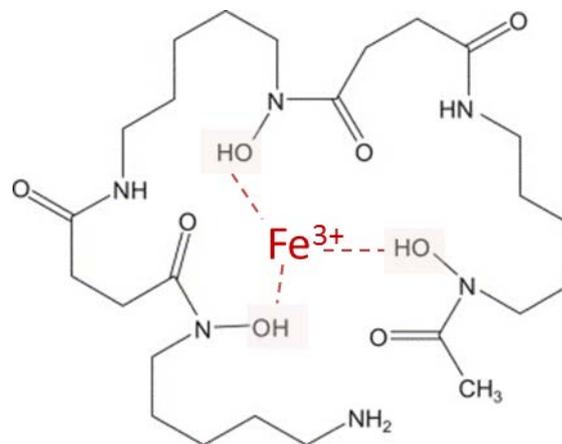


Fig.11- Quelación de la Deferoxamina a través de los grupos hidroxilo (OH^-) al ión férrico (Fe^{3+}).

1.2 FARMACOCINÉTICA:

Se absorbe mal por vía digestiva, aunque esta es mayor en intoxicaciones por hierro. La eliminación es a través de la orina, por lo tanto está contraindicada en insuficiencia renal. Solo es quelado el metal más accesible y varía de unos individuos a otros. La cantidad de hierro eliminado es máxima al principio de tratamiento (15).

1.3 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN:

- **Vía intramuscular:** Es la de elección en las intoxicaciones agudas por hierro. No se debe de usar si existe shock. También se puede usar en la sobrecarga crónica de hierro
- **Infusión intravenosa lenta:** Cuando existe shock o fallo cardiovascular en las intoxicaciones agudas, pero se debe sustituir por i.m lo antes posible.
- **Infusión subcutánea mediante bombas portátiles:** Método de elección en el tratamiento de la sobrecarga crónica por hierro.

1.4 - INDICACIONES:

Las indicaciones clásicas se dividen en dos grandes bloques:

- **Sobrecarga crónica de hierro:**
 - *Anemias hemolíticas hemoglobinopáticas:* Debidas a la aparición de hemoglobinas anormales: drepanocitosis, talasemia mayor.
 - *Hemocromatosis primaria:* Acumulación de hierro en distintos órganos, lo que provoca su alteración funcional.
- **Sin sobrecarga de hierro:**
 - *Daño tisular mediado por radicales libres:* Efecto antioxidante de la deferoxamina. Artritis reumatoide, toxicidad cardiaca de antraciclina.
 - *Quelación del aluminio por fallo renal.*
 - *Otras aplicaciones:* Efectos antiproliferativos *in vitro*, malaria, mielofibrosis y síndrome mielodisplásico, esclerosis múltiple, propiedades inmunomoduladoras, preservación de órganos para trasplantes, glomerulonefritis y anillos oxidados corneales.

1.5 – EFECTOS ADVERSOS:

Es poco tóxica. Los principales son los siguientes:

- **En inyección rápida:** Eritema, urticaria, hipotensión y shock.
- **En tratamientos crónicos:** Prurito, rash, reacción anafiláctica, molestias abdominales, diarreas, calambres musculares, taquicardias y fiebre.
- **Ocasionalmente:** toxicidad ocular y ótica
- Aumento de la susceptibilidad a la infección por *Yersinia enterocolítica*.

2 - PAPEL DE LA DEFEROXAMINA EN LA REGENERACIÓN ÓSEA

Tal como hemos visto, el hueso tiene la habilidad única de regenerarse y repararse por sí mismo. Sin embargo del total de las fracturas, alrededor de un 10% curan de forma incorrecta (16).

El acoplamiento angiogénesis-osteogénesis es vital para el inicio, mantenimiento y reparación del tejido óseo y la hipoxia es la mayor fuerza estimuladora, regulando la actividad genética (17). Sin embargo este proceso puede verse alterado tanto genéticamente como farmacológicamente.

2.1 VÍA DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA 1 α (HIF-1 α)

Es la principal vía de detección y regulación de la respuesta adaptativa local a la baja disponibilidad de oxígeno, ante las fracturas y el requerimiento principal para el normal desarrollo del esqueleto.

El HIF es un complejo proteico heterodimérico, sintetizado por múltiples células en el organismo. Está compuesto por dos subunidades:

- *Subunidad HIF- α* : Ubicación citosólica. Tiene tres variables HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α , la más conocida y estudiada es la HIF-1 α . Es sensible a la presencia de oxígeno.
- *Subunidad HIF-1 β* : Ubicación nuclear. Su regulación no depende de los niveles de oxígeno.

Es un factor de transcripción del tipo hélice-lazo-hélice básico (bHLH). Regula la transcripción de múltiples genes, siendo uno de los más importantes y que tiene relación directa con la angiogénesis el VEGF.

La regulación del HIF-1 α es enzimática y dependiente del nivel local de oxígeno. En estado de **normoxia**, las enzimas propil-hidroxilasa (tipo PHD-2) y la asparagil-hidroxilasa (FIT-1) son las encargadas de su hidroxilación, este complejo hidroxilado se une a la proteína de von Hippel-Lindau (pVHL) y es degradado proteosómicamente, disminuyendo los niveles de HIF-1 α . Tanto la PHD como la FIT necesitan para su funcionamiento de oxígeno, hierro y 2-oxoglutarato.

Sin embargo, en situaciones de **hipoxia**, tanto la PHD como la FIT se encuentran inactivadas, con lo que los niveles de HIF-1 α se elevan rápidamente. Se desplaza al núcleo donde se une a la subunidad HIF-1 β , que se expresa de forma independiente al nivel de oxígeno. Este dímero ya unido es el encargado de regular la transcripción génica (17).

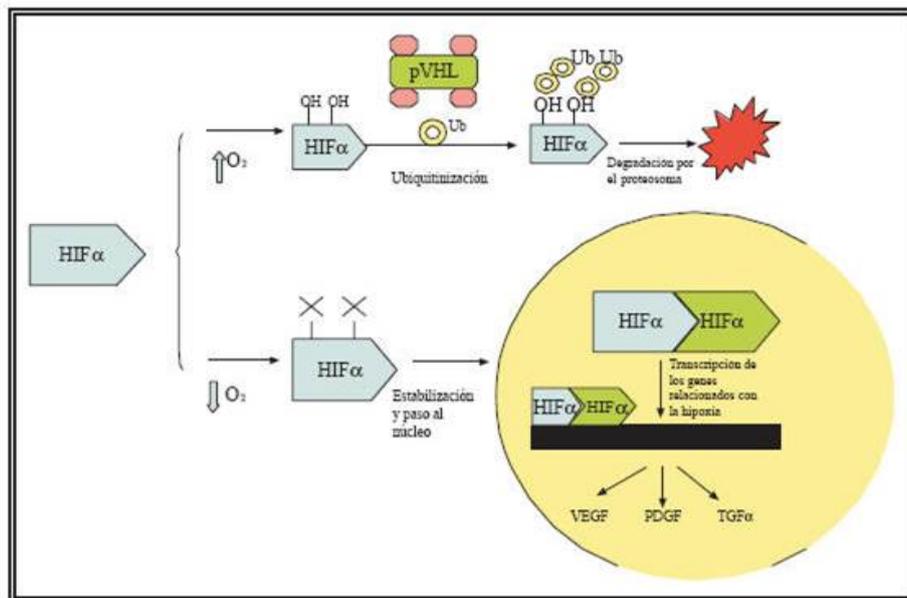


Fig.12- Regulación del HIF-1 α en función de los niveles de oxígeno (18).

Por su parte, el complejo HIF-1 va actuar sobre la estimulación de la transcripción de los siguientes genes:

- Transcripción de los genes del factor VEGF y de angiopoetinas, factores clave de la angiogénesis.
- Transcripción de los genes de transportadores de glucosa, favoreciendo el metabolismo celular.

- Promoverá el reclutamiento factores inflamatorios y células mesenquimales.
- Influirá en la diferenciación celular.

Al ser, la DFO, un quelante del hierro y este un cofactor imprescindible para la función de las PHD y FIT, inactiva estas enzimas favoreciendo la acumulación de HIF-1 y de la misma forma favoreciendo la síntesis de factores de crecimiento, como el VEGF, y el resto de moléculas que ya hemos visto. Sin embargo, algunos estudios han observado *in vitro* que este aumento de la actividad angiogénica sería únicamente inicial, de menos de 14 días, provocando una desaceleración posterior a este tiempo, debido al efecto inhibitor de la síntesis del colágeno, donde también intervienen las PHD (16).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

A - JUSTIFICACIÓN

El tejido óseo tiene la asombrosa capacidad de regeneración, con la característica de que no deja cicatriz y recupera todas las propiedades previas a la lesión. Sin embargo existen ciertos casos, debidos principalmente a traumas extensos, infecciones, tumores o problemas musculoesqueléticos congénitos en los que esta lesión supera un tamaño crítico a partir del cual la recuperación no es espontánea, es incompleta o incorrecta. En estos casos, la utilización de implantes, biomateriales y técnicas que puedan reparar el hueso dañado en condiciones de seguridad se vuelven imprescindibles.

Desde hace décadas este es un campo en expansión. Con la aparición de nuevos biomateriales y sustancias activadoras, se precisa del establecimiento de protocolos para el análisis de la eficacia y seguridad de estos. Además de los ensayos *in vitro*, el uso de modelos animales se ha mostrado como uno de los más eficaces en el estudio de la regeneración ósea, concretamente el modelo en ratas, fácilmente controlable y poco oneroso, es ampliamente utilizado.

Se han utilizado numerosas técnicas en el estudio de la densidad ósea y la neoformación ósea en defectos de tamaño crítico, pero en este trabajo hemos querido ir más allá y comparar diferentes técnicas de imagen entre si y estudiar la idoneidad al estudio del tejido óseo y la regeneración y reparación tras fractura.

Para ello, se han utilizado técnicas de imagen según su escala de precisión, empezando por la más evidente y sencilla como es la observación macroscópica. A continuación la radiografía de rayos X, técnica básica y clásica. Pero se ha pretendido explorar también técnicas que nos permitan no solamente "observar" si no cuantificar. Para ello se ha utilizado la microtomografía computerizada que aporta numerosas ventajas a las imágenes radiológicas clásicas, destacando principalmente la posibilidad de cuantificación de la densidad ósea gracias al desarrollo de software que nos permite relacionar directamente la atenuación de rayos X, expresada a través de una escala de grises (escala de unidades Hounsfield) con la densidad ósea, obteniendo resultados mucho más precisos que los usados hasta ahora. También es una técnica que se puede utilizar *in vivo* y que nos da imágenes en 3 dimensiones. Por último, la técnica más precisa es la de microscopía de barrido SEM-EDX, pudiendo llegar a la observación de estructuras imposibles de ver con otras técnicas, pero que también nos permite cuantificar y apreciar diferencias en la formación y calidad de hueso a través de parámetros tales como el ratio Ca/P o el porcentaje de oxígeno.

La deferoxamina es el principio activo de medicamentos ya comercializados para tratar las intoxicaciones por hierro, ya que es un quelante de este. Precisamente esta característica hace que pueda intervenir en la vía del factor inducible de hipoxia (HIF-1 α), vía que se activa en las fracturas óseas y que estimula potentemente la angiogénesis, la diferenciación osteoblástica y finalmente la

regeneración ósea. Es, por tanto, muy interesante estudiar a través de las técnicas de imagen mencionadas, cómo se comportará la DFO en un modelo animal, *in vivo*, en un defecto de tamaño crítico, que no sería posible su correcta cicatrización en condiciones fisiológicas.

Este trabajo tiene por lo tanto dos vertientes, por un lado el estudio de la sensibilidad de diferentes técnicas de imagen y su comparación entre ellas y en segundo lugar, el análisis del efecto que la DFO puede provocar en un defecto óseo de tamaño crítico.

B – OBJETIVOS

Para este trabajo se ha definido un **objetivo general** que es el estudio de la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico en un modelo *in vivo* de ratas Wistar.

Para ello se han definido los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Comparar cualitativamente diferentes técnicas de imagen (fotografía, radiografía de rayos X, microCT y SEM) y determinar la idoneidad de cada una de ellas para el estudio de la reparación y cicatrización ósea
- II. Evaluar cuantitativamente el efecto de la deferoxamina sobre la formación de nuevo hueso a través del porcentaje de hueso formado con microCT.
- III. Evaluar cuantitativamente el efecto de la deferoxamina sobre la formación de nuevo hueso a través del porcentaje de oxígeno medido con EDX.
- IV. Evaluar cuantitativamente el efecto de la deferoxamina sobre la calidad del hueso formado con microCT.
- V. Evaluar cuantitativamente el efecto de la deferoxamina sobre la calidad del hueso formado a través del ratio Ca/P con EDX.

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

A - MATERIALES

Todo lo utilizado en este trabajo se puede dividir en diferentes secciones:

VI. Animales de experimentación:

Se ha trabajado con ratas Wistar albinas macho de entre 300-500 gramos y entre 8-10 semanas de edad, cada ejemplar. Procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (SEA), con número de Registro de Explotación Ganadera (REGA) ES 300305440012).



Fig.13- Rata Wistar albina. Ejemplar de la especie animal utilizada en este estudio

(<https://www.roedores.org/rata-Wistar/>)

VII. Fármacos:

- Deferoxamina: Desferin 500mg (Novartis Farmacéutica, S.A. Barcelona. España).
- Clorhidrato de ketamina: Ketamidol 100 mg/ml (Richter Pharma AG. Wels. Austria).
- Xilacina: Xilagesic 2%. (Laboratorios Calier, S.A. Barcelona. España).
- Hidrocloruro de buprenorfina: Bupaq 0.3 mg/ml (Richter Pharma AG. Wels. Austria).

- Enrofloxacin: Syvaquinol 25 inyectable (Laboratorios Syva S.A.U. León, España).
- Formaldehído al 4% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).



Fig.14- Fármacos utilizados en este estudio.

VIII. Material quirúrgico:

- Trefina de 3 mm de diámetro.
- Bisturís, pinzas, tijeras, agujas e hilo de sutura.

IX. Aparatos:

- Cámara de fotos Canon EOS 600D (Tokio, Japón).
- Equipo de radiología intraoral Elitys® (Trophy Dental, Texas, USA) con un captador digital mediante el sistema RVG 6000 (Kodak Dental System, Madrid, España).
- Escaner multimodal SPECT/CT Albira II ARS (Oncovision/Gem Imaging S.A. Valencia. España).

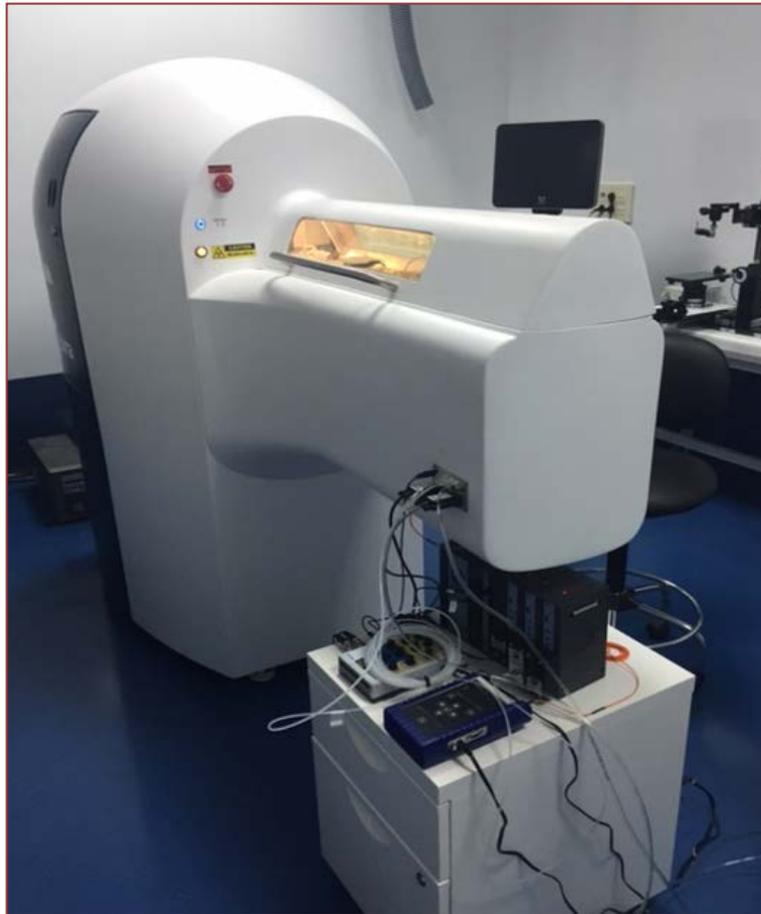


Fig.15- SPECT CT Albira II ARS (Oncovision/Gem Imaging S.A. Valencia. España)

- Evaporador de metales por emisión iónica Biorad-Polaron (Hércules, California, USA).

- Microscopio de Barrido JEOL-6100 y microanálisis por dispersión de Rayos X INCA (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido).

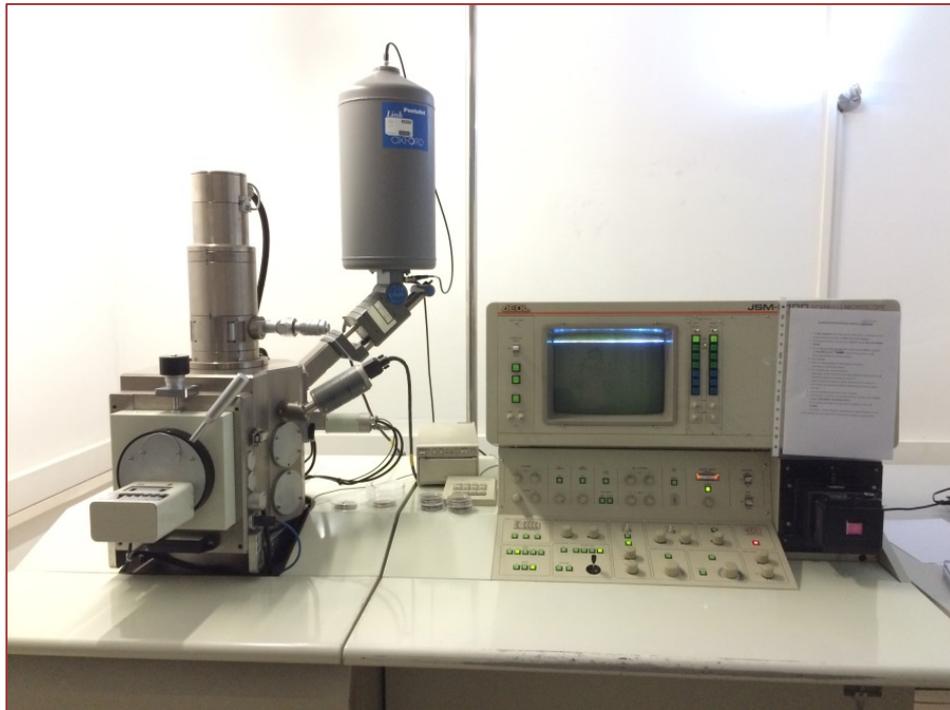


Fig.16- Microscopio JEOL-6100 (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido) del Servicio de Microscopía de la UMU.

X. Software:

- Procesador de imágenes radiológicas digitales: Trophy Windows 5.06 (Trophy Dental, Texas, USA).
- Tratamiento EDX: INCA energy software (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido).
- Tratamiento TC: Albira software suite (Oncovision/Gem Imaging S.A. Valencia. España).
- Programa de análisis de imágenes tomográficas: Amide (<http://amide.sourceforge.net/>).
- Programa de análisis de imágenes tomográficas: Volview (<http://kitware.com/opensource/volview.html>).

B - MODELO ANIMAL

En la elección del modelo animal se han tenido en cuenta factores tales como que el costo no fuera elevado, el fácil manejo y mantenimiento, el tamaño del esqueleto y el elevado metabolismo óseo que permite llevar a cabo los estudios en un breve periodo de tiempo.

Para el desarrollo del estudio se utilizaron 18 ratas Wistar, macho, de 8-10 semanas de edad al inicio del estudio, procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia (SEA), con número de Registro de Explotación Ganadera (REGA) ES 300305440012).



Fig.17- Sistema de alojamiento mediante rack ventilado

Los animales fueron alojados en mini aisladores de 48*27*20 cm, en grupo de 3-4 por jaula, situadas en racks ventilados y utilizados siguiendo las normas de la UE para la protección de animales utilizados en experimentación (EU/63/2010). Las condiciones ambientales se mantuvieron de manera constante a lo largo de todo el estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, temperatura estable entre 22-24°C, humedad constante entre 55%-10% y con acceso *ad limitum* al agua y comida comercial estándar para roedores (Panlab S.L.U. Barcelona, España).

Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético de experimentación animal (CEEA) de la UM, y la Autoridad Competente de la Región de Murcia, con el número de autorización A13150603.

B.1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los 18 animales utilizados se repartieron en 2 grupos de 9 animales cada uno, sacrificados a dos tiempos (3 y 6 semanas). En el grupo sacrificado a las 3 semanas, murió uno de ellos antes de finalizar el periodo de tratamiento, quedando la n de este grupo en 8.

En ambos grupos se valoró tanto a las 3 como a las 6 semanas de tratamiento, el crecimiento de nuevo hueso y la calidad, con las diferentes técnicas de imagen usadas en este trabajo.

La anestesia fue realizada mediante administración intramuscular de Clorhidrato de Ketamina a dosis de 0,75 mg/kg; (Ketamidol 100 mg/ml, Richter Pharma AG, Wels, Austria) junto con Xilacina; a dosis de 0,25 mg/kg (Xilagesic al 2%. Laboratorios Calier, S.A., Barcelona, España). Localmente se realizó infiltración de lidocaína en la zona de la intervención.

Como analgesia previa a la cirugía y post quirúrgica se empleó Hidrocloruro de buprenorfina 0,3mg/ml (Bupaq 0.3 mg/ml, Richter Pharma AG., Wels, Austria), 30 minutos antes de la cirugía y cada 12 horas las siguientes 48-72 horas. Se administró también antibioterapia, Enrofloxacina 25mg; (Syvaquinol 25 inyectable, Laboratorios Syva S.A.U. León. España).

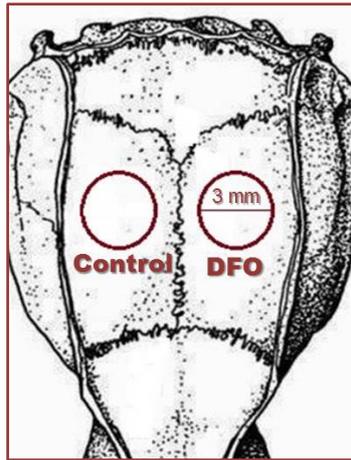


Fig.18- Esquema de la intervención en la calota de cada uno de los ejemplares. El control estaba compuesto por una esponja de colágeno y la parte test era una esponja de colágeno embebida en DFO.

Tras la anestesia y desinfección de la zona a intervenir, se realizó una incisión por planos: piel, músculo y periostio. En cada animal se realizaron dos defectos en la Calota de 1,5 mm de profundidad, mediante una trefina de 3mm.

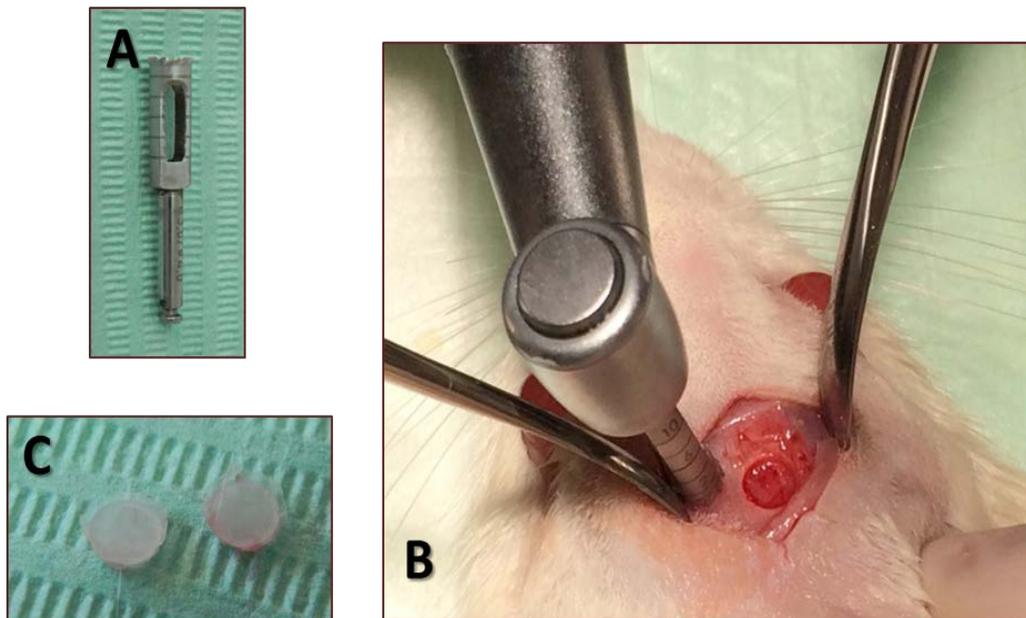


Fig.19- Procedimiento quirúrgico. **A-** Trefina de 3 mm utilizada para realizar el defecto de tamaño crítico. **B-** Realización de los dos defectos en la calota. **C-** Relleno de los defectos con la esponja de colágeno como control y con la esponja embebida en deferoxamina como test.

La derecha del animal servía para colocar el control (esponja de colágeno) y el lado izquierdo para el test (esponja de colágeno empapado en deferroxamina). Se empleó DFO: Desferin 500mg (Novartis Farmacéutica, S.A. Barcelona. España), en 2ml de agua. Se suturó a cada uno de los animales y se les trató con Enrofloxacin 25mg; (“ALSIR” 2,5%, Veterinaria – Esteve. Barcelona. España) y se puso Amoxicilina en el agua de bebida en la dosis de 10 mg/kg. Esto evitó infecciones post quirúrgicas, los animales llegaron en buen estado hasta el periodo de sacrificio.

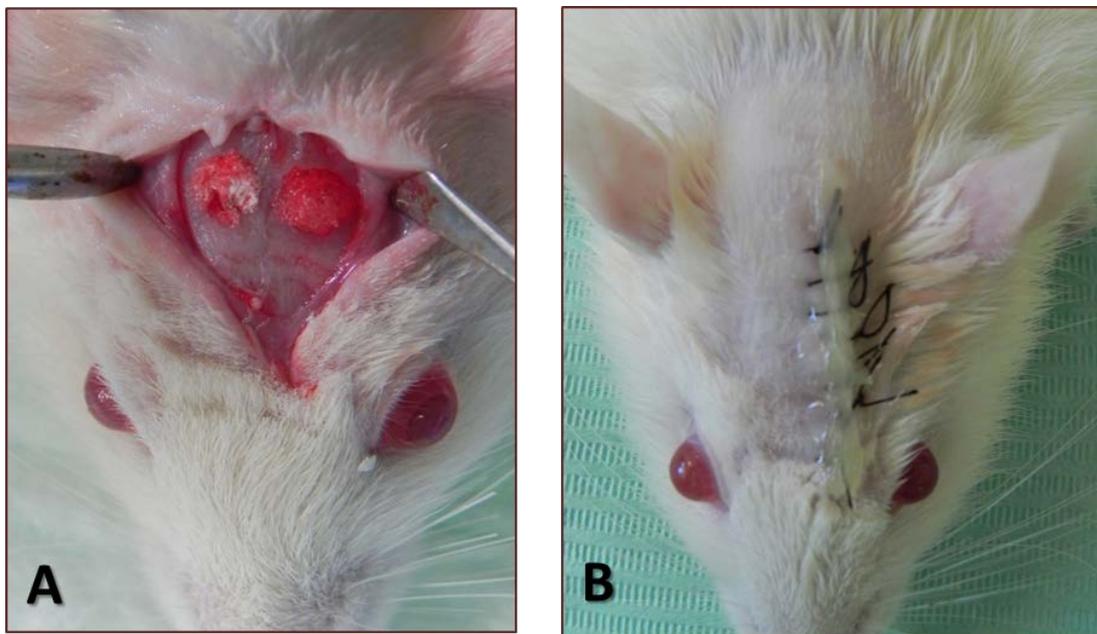


Fig.20- Pasos de la cirugía **A-** Test y control colocados en ambos defectos tal como se diseñó. **B-** Sutura de la herida y tratamiento antibiótico preventivo.

Una vez finalizados los distintos periodos de estudio (3 y 6 semanas), se procedió al protocolo de eutanasia de los animales mediante sobredosis de CO₂ liberado de forma progresiva mediante una mezcla al 70% con Oxígeno. Tras comprobar la muerte del animal, se realizaron abordajes quirúrgicos ampliados en la calota de la misma forma que los realizados para la implantación de los materiales para obtener la zona de interés.



Fig.21- Imágenes post-eutanasia. Calota extraída a las 3 o a las 6 semanas en cada uno de los ejemplares para posterior análisis.

C - RADIOGRAFÍA DE RAYOS X

El análisis radiológico se llevó a cabo con un equipo de radiología intraoral Elitys® (Trophy Dental, Texas, USA) con un captador digital mediante el sistema RVG 6000 (Kodak Dental System, Madrid, España).

Las imágenes obtenidas fueron procesadas mediante un ordenador convencional a través del software Trophy Windows 5.06 para Windows (Trophy Dental, Texas, USA).

Se utilizó esta técnica para determinar la capacidad de neoformación ósea tras tratamiento de 3 y 6 semanas respectivamente con DFO en un defecto de tamaño crítico creado en los huesos parietales. Tras el sacrificio de los animales a las 3 y 6 semanas, cada calota fue disecada y seccionada y posteriormente se realizaron las radiografías digitales para llevar a cabo el estudio morfométrico radiológico.

D - TOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA

Las muestras fueron analizadas mediante un escáner multimodal SPECT/CT Albira II ARS (Oncovision/Gem Imaging S.A, Valencia, España) perteneciente a la Universidad de Murcia. Los parametros de adquisicion fueron 45 Kv, 0,2 mA, voxel de 0.05 mm. Los cortes de adquisicion fueron axiales de 0,05 mm de espesor y de cada pieza se obtuvieron de 800 a 1000 imágenes a través de un detector digital flat panel 2400 x 2400 pixels y un FOV de 70 x 70 mm.

Con el microCT se estudiaron los cilindros de material implantado valorando su capacidad de absorción del haz de rayos X en función de su contenido en material (reabsorción y remodelación de la misma) y buscando la formación de nuevo tejido óseo.

D.1 ANALÍISIS DE IMÁGENES

Las imágenes adquiridas con el microCT fueron reconstruidas en los tres planos del espacio mediante un algoritmo FBP (Filtered Back Projection) o programa de retroproyección filtrada, y se sometieron a una reconstrucción avanzada mediante el programa de análisis de imagen Amide (<http://amide.sourceforge.net/>) y a una reconstrucción en 3D mediante el programa de análisis de imagen Volview (<http://kitware.com/opensource/volview.html>).

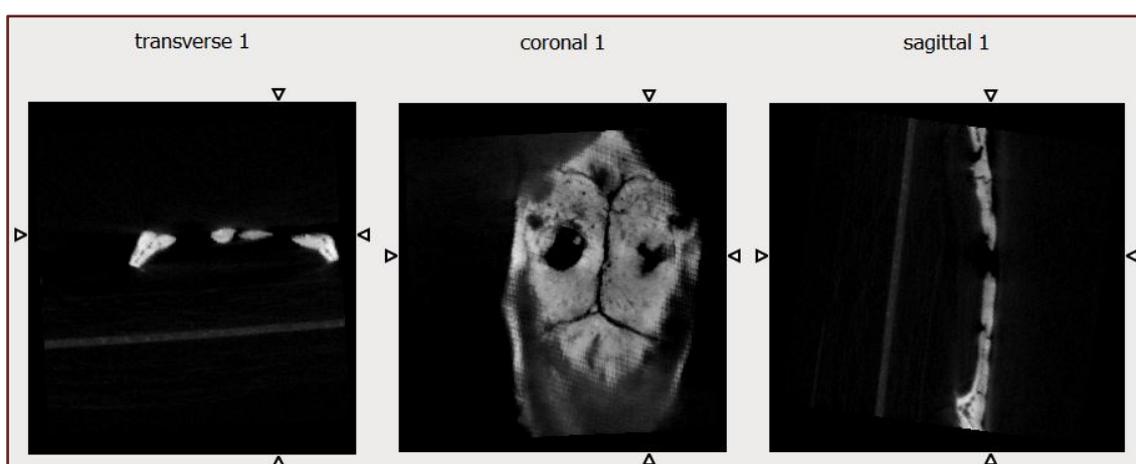


Fig.22- Imagen captada y reconstruida en los tres planos y exportada al programa de tratamiento matemático AMIDE (<http://amide.sourceforge.net/>).

ROI (región of interest) es el término utilizado para asignar a zona de la imagen captada y reconstruida en la que se va a medir cuantitativamente la atenuación de cada uno de los voxels que lo comprenden. Se pensaron en diferentes rois, como cubos o a mano alzada, según permitía el programa, la figura más próxima al defecto realizado en los animales y que permitía establecer un patrón regular y homogéneo para todos los defectos fue el de un cilindro de 3,5 mm de diámetro y 1,5 mm de profundidad.

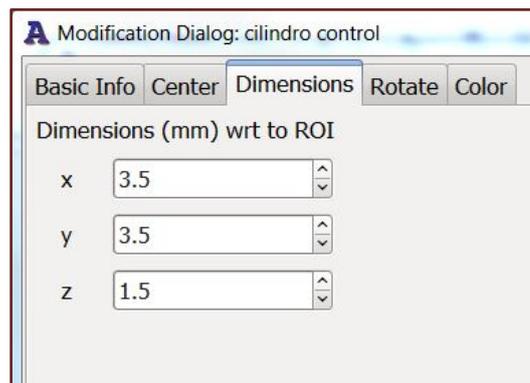


Fig.23- Medidas del ROI elegido para el estudio, en mm.

Una vez determinado el roi obtuvimos las imágenes transversal, sagital y coronaria de cada uno de los defectos tanto a las 3 como a las 6 semanas.

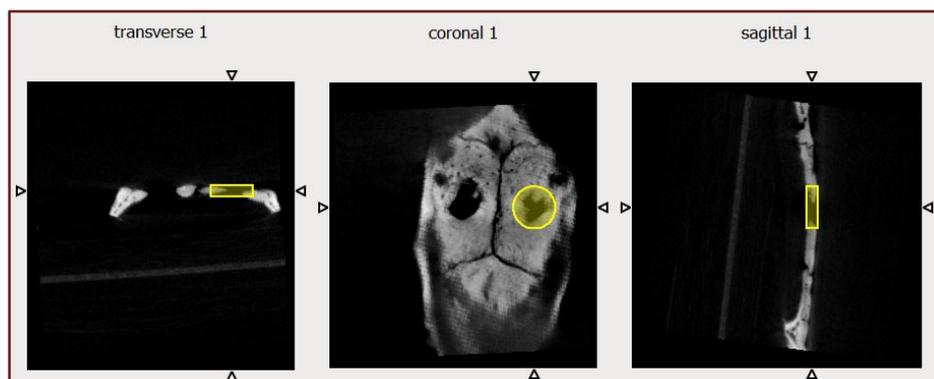


Fig.24- Roi aplicado sobre uno de los defectos, en este caso el correspondiente al que lleva la esponja de colágeno embebida en DFO y sacrificada a las 6 semanas.

Una vez posicionado el roi, el programa AMIDE nos permite obtener los datos, bien en forma de estadística, bien como dataraw, que son la totalidad de los datos de cada uno de los voxels incluidos en el roi.

En este caso hemos trabajado con los dataraw, pues de esta manera podíamos seleccionar y discriminar los datos y clasificarlos en función de la escala que ya se mencionó en la introducción, la escala de Misch actualizada con las HU (29), ya que esta escala estaba construida sobre hueso plano, que es el tipo de hueso con el que se ha trabajado en este estudio. Así se podría entender cuanto hueso de nueva formación había en cada voxel y en qué estado se encontraba, si ya totalmente consolidado o en otro estadio de la formación ósea.

Clasificación Misch	HU	Tipo de hueso
D1	> 1250	Hueso compacto
D2	850 - 1250	Hueso poroso y trabecular
D3	350 - 850	Hueso poroso y trabecular fino
D4	150 - 350	Trabéculas finas
D5	< 150	Tejido conectivo

Tabla.5- Clasificación de Misch actualizada con las HU con CT (29).

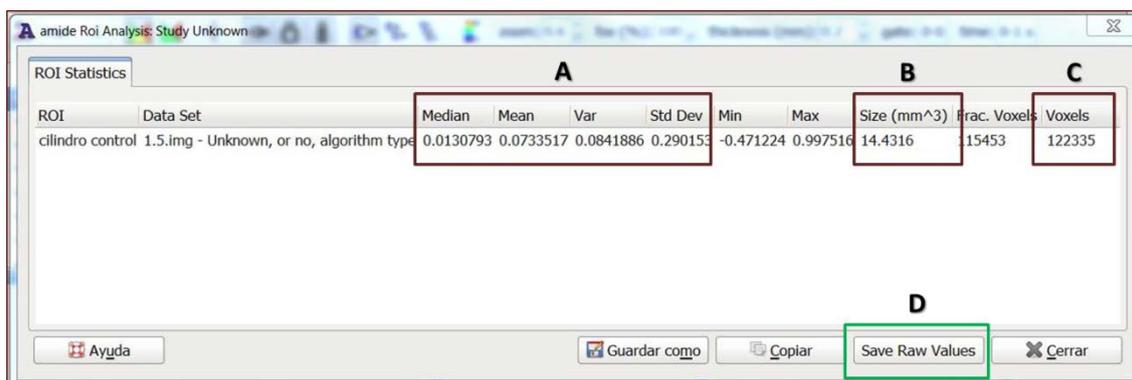


Fig.25- Datos que se obtienen con el programa Amide de cada uno de los defectos. **A-** Valores estadísticos. **B-** Tamaño del ROI, en este caso del cilindro. **C-** Número de voxels contenidos en el ROI. **D-** Comando que permite obtener los dataraw, la totalidad de valores individuales en HU.

ROI	Value	Veloc	X(mm)	Y(mm)	Z(mm)	Values	V1000v
1	146228	1	-1496	189106	-277592	184220	184220
2	146827	1	-144264	183227	-282369	184167	184167
3	153937	1	-144264	182589	-282300	183937	183937
4	153821	1	-144264	184636	-284382	183631	183631
5	153774	1	-1496	188789	-282582	18374	183740
6	153733	1	-1496	187324	-282582	183733	183733
7	153705	1	-1496	186293	-282787	183705	183705
8	153655	1	-149622	181076	-28252	183655	183655
9	153641	1	-149252	182922	-281982	183641	183641
10	153596	1	-148675	181011	-282863	183596	183596
11	153595	1	-144264	180717	-283954	183595	183595
12	15344	1	-138276	182044	-282823	18344	18344
13	153405	1	-139974	188302	-282	183405	183405
14	153370	1	-148652	182838	-282839	183370	183370
15	153241	1	-149222	180953	-283858	183241	183241
16	153195	1	-144613	180179	-282469	183195	183195
17	153127	1	-138974	184929	-284877	183127	183127
18	153068	1	-144461	180482	-282522	183068	183068
19	153028	1	-1496	18897	-247709	183028	183028
20	153024	1	-144613	180648	-282814	183024	183024
21	153012	1	-144613	186097	-287404	183012	183012
22	15297	1	-144613	187362	-287527	183017	183017
23	15295	1	-148671	177233	-282851	183015	183015
24	152906	1	-138974	182966	-284881	183006	183006
25	152875	1	-1496	188446	-287379	183002	183002
26	152875	1	-148652	182838	-282839	183002	183002
27	152833	1	-1496	188446	-287383	183002	183002
28	152822	1	-138625	180446	-287379	183002	183002
29	152816	1	-148652	182838	-282839	183002	183002
30	152812	1	-1496	188446	-287383	183002	183002
31	15279	1	-144613	180444	-282509	183002	183002
32	152812	1	-148652	182838	-282839	183002	183002
33	152819	1	-144264	184762	-284401	183002	183002
34	152875	1	-148688	186786	-287831	183002	183002
35	152897	1	-139974	189919	-289939	183002	183002

Fig.26- Dataraw exportados a hojas excel para la selección y discriminación por intervalos.

En cada ROI teníamos más de 120 000 voxels con un valor de HU en cada uno. Todos estos valores los llevamos a tablas excels, para poder clasificarlos. Se calculó el número de voxels perteneciente a cada intervalo, y se calculó el porcentaje que representaba frente al total de voxels que componían el ROI. Y por último se comparó estos porcentajes entre los defectos control y los defectos test a las 3 semanas, también a las 6 semanas, y la formación de nuevo hueso a las 3 semanas respecto de las 6 semanas, resultados que se verán en el capítulo correspondiente.

E - MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROANÁLISIS DE ELEMENTOS. SEM-EDX

El procedimiento se llevó a cabo en el Servicio universitario de microscopía de la Universidad de Murcia. Se utilizó el Microscopio de Barrido JEOL-6100 y el sistema de Microanálisis por dispersión de Rayos X INCA (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido) con detector de Rayos X y de electrones retrodispersados y un sistema de captación de imágenes digital.

Las muestras fueron fijadas por inmersión en una solución al 4% de formaldehído, deshidratadas con etanol y cubiertas con una capa de carbón con el evaporador de metales por emisión iónica Biorad-Polaron (Hercules, California, USA).



Fig.27- Muestras deshidratadas, cubiertas con carbón y etiquetadas para la observación y microanálisis de elementos.

Tanto para las muestras recogidas a las 3 semanas, como a las 6 semanas, los parámetros de trabajo fueron de una distancia de trabajo de 39 mm, un voltaje de aceleración de 20kv y una magnificación de 10X.

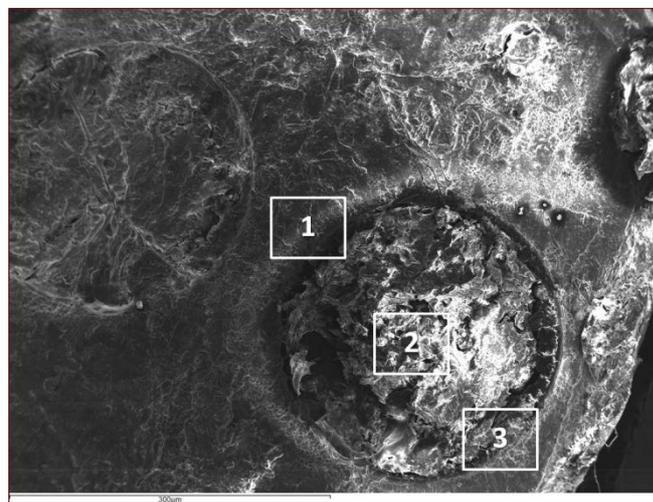


Fig.28- Imagen de la selección de las áreas, de igual tamaño, en los defectos para el posterior análisis de elementos.

Como ya he comentado previamente, a cada animal se le realizaron dos defectos, uno con la esponja de colágeno como control y otro con la esponja embebida en

deferoxamina. En cada defecto se realizaron tres medidas de análisis de elementos, gracias al espectrofotómetro con dispersión de rayos X INCA (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido) acoplado al microscopio de barrido, después se obtuvo la media en cada uno de los defectos. Los elementos analizados fueron el calcio, el fósforo y la relación entre ellos. Este proceso se llevó a cabo tanto en las muestras a las 3 semanas como a las de las 6 semanas. La neoformación ósea y su calidad serán analizadas calculando los parámetros del porcentaje de oxígeno, indicador de la actividad osteoblástica del hueso y de la vascularización y del ratio Ca/P, indicador de la calidad del hueso formado.

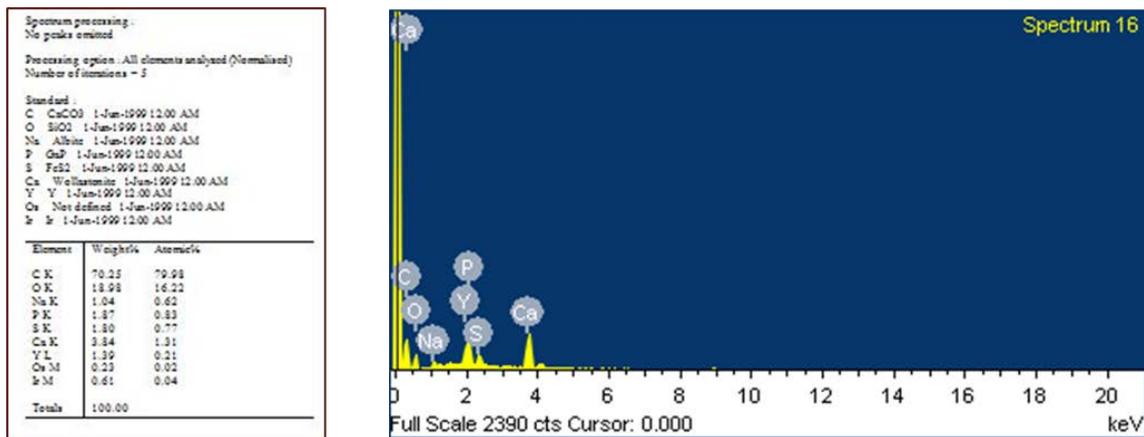


Fig.29- Obtención del porcentaje de cada elemento gracias al detector INCA X-stream (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido).

F - ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron estudiados estadísticamente utilizando la media, la desviación estándar (SD), la mediana, intervalo de confianza del 95% (CI) (SPSS, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se analizó mediante el test de la t de Student apareada considerando significativos los resultados con $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A. OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA

El primer paso en cualquier investigación, en donde se haga un análisis de imágenes, es la observación macroscópica, con el ojo desnudo, donde se observa qué aspecto tiene cada una de las muestras.

Para poder trasladar los resultados de esta observación a papel, se ha utilizado una cámara réflex, la Canon EOS 600D (Tokio, Japón).

En todas las muestras se observa hueso formado, ya que los defectos están en todos los casos más cerrados que de origen, pero también existe presencia de tejido no óseo (conjuntivo, vascular, etc...) y en algunos casos el defecto de origen es más evidente que en otros.

A.1 – OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA A LAS 3 SEMANAS

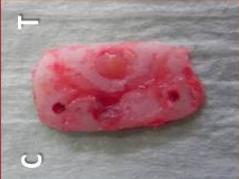
En la tabla 6, vemos las muestras tras 3 semanas de tratamiento. Todos los defectos están cerrados, tanto los controles como los tratados con DFO. Y no se puede llegar a apreciar diferencias significativas entre los defectos tratados, que son los de la derecha de cada muestra, respecto de los defectos control, los de la izquierda. De las 8 muestras, 4 aparecen bastante osificadas. Y en 5 de las 8 muestras el defecto realizado originalmente es muy evidente aún.

A.2 – OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA A LAS 6 SEMANAS

En la tabla 7 tenemos las muestras tras 6 semanas de tratamiento, clasificadas según el nivel de osificación, la presencia de tejido no óseo y la visibilidad o no del defecto original.

En este caso en casi ninguna muestra está completamente cerrado el defecto, pero en casi todas, el diámetro de este, es mucho menor que el del defecto de origen, observándose una capa muy fina, casi membranosa en el centro. Solo hay dos muestras en las que se aprecia una osificación evidente y cierre casi total de los defectos. De nuevo no es posible diferenciar grados de osificación distintos entre los defectos control y los defectos tratados con DFO.

La presencia de tejidos no óseos es también menor que en las muestras tratadas durante 3 semanas. Y la visibilidad del defecto de origen casi no es visible en ninguna muestra y en todos los casos es de diámetro menor.

MUESTRAS A LAS 3 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON DFO								
								
Número de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Grado de Osificación	++	++	++++	++++	++	++	+++	++++
Visibilidad del defecto original	+++	++++	+	+	++++	++++	++++	+
Presencia de tejido no óseo	+++	+++	+	++	++	+++	++	+

LEYENDA	
C - Defecto Control	+
T- Defecto Tratado con DFO	++
	+++
	++++
	Inexistente/Muy bajo
	Bajo
	Alto
	Muy Alto

Tabla.6- Clasificación macroscópica de las muestras tratadas durante 3 semanas con DFO en el defecto de la derecha (T) y sin tratamiento en el defecto de la izquierda (C).

MUESTRAS A LAS 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON DFO									
Número de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Grado de Osificación	+++	+	+	+	+	+	+	+	+++
Visibilidad del defecto original	+	++	++	++	++	++	++	++	+
Presencia de tejido no óseo	++	+	+	+++	+	+	+	+	+

LEYENDA	
C - Defecto Control	+ Inexistente/Muy bajo
T- Defecto Tratado con DFO	++ Bajo
	+++ Alto
	++++ Muy Alto

Tabla.7- Clasificación macroscópica de las muestras tratadas durante 6 semanas con DFO en el defecto de la derecha (T) y sin tratamiento en el defecto de la izquierda (C).

B. RADIOLOGÍA DE RAYOS X

El siguiente nivel de precisión, tras la observación visual directa, sería el de la radiología clásica de rayos X.

B.1 – RADIOGRAFÍAS A LAS 3 SEMANAS DE TRATAMIENTO

Resulta difícil apreciar diferencias significativas entre los defectos control y los defectos tratados con DFO. Aparece en todas las muestras un leve crecimiento óseo por toda la superficie del defecto creando lo que parece como una membrana que rellena el espacio total. Por otro lado, el defecto original es muy visible y no se aprecia disminución en el diámetro de este.

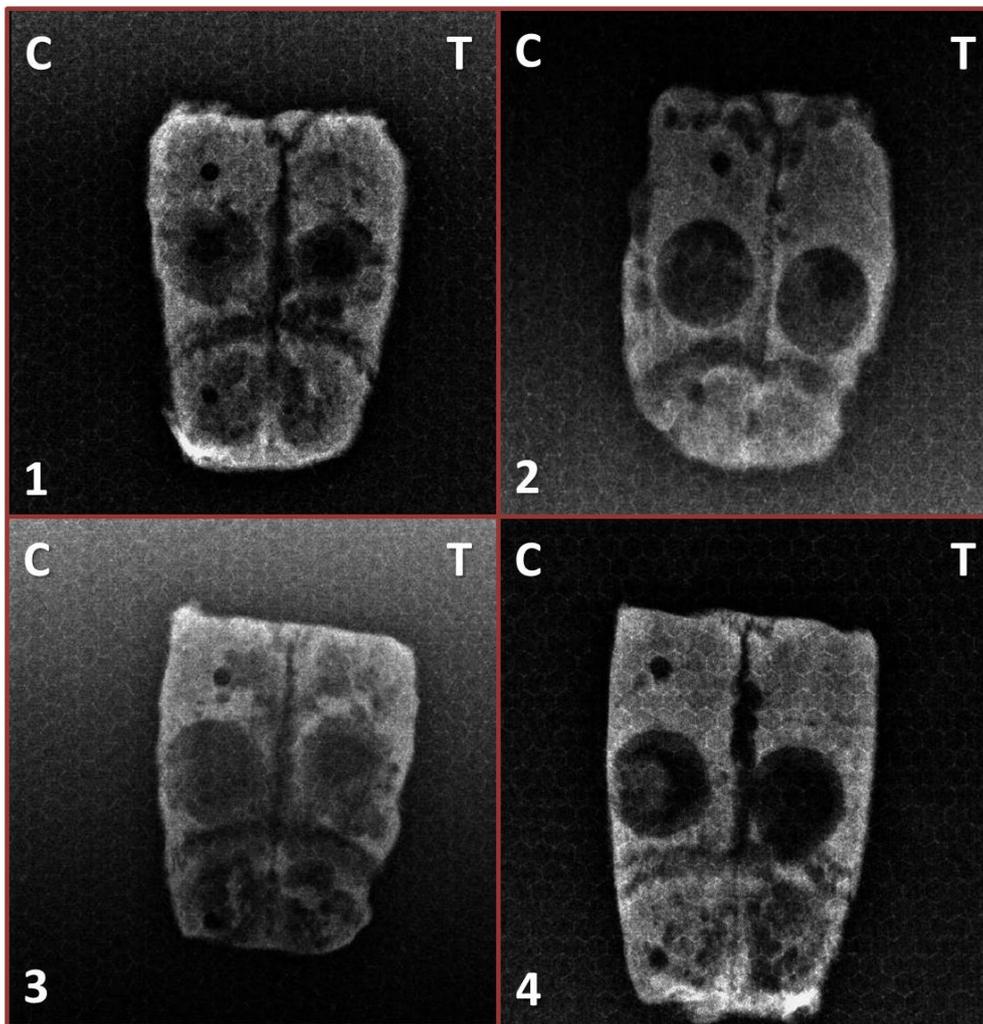


Fig.30- Radiografías tomadas a las 3 semanas de tratamiento con DFO. C – Defecto control. T- Defecto test tratado con DFO. El diámetro de los defectos originales prácticamente no se ha modificado y se observa un crecimiento desigual entre las diferentes muestras.

B.2 – RADIOGRAFÍAS A LAS 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO

Al igual que en las fotografías, lo más llamativo es que el diámetro del defecto original es menor, observándose un crecimiento óseo desde el borde hacia el interior, pero existe un espacio central completamente sin hueso a diferencia de lo que ocurre a las 3 semanas, donde observábamos como una especie de membrana ósea. Tampoco se pueden apreciar diferencias muy importantes entre las muestras control y las muestras tratadas.

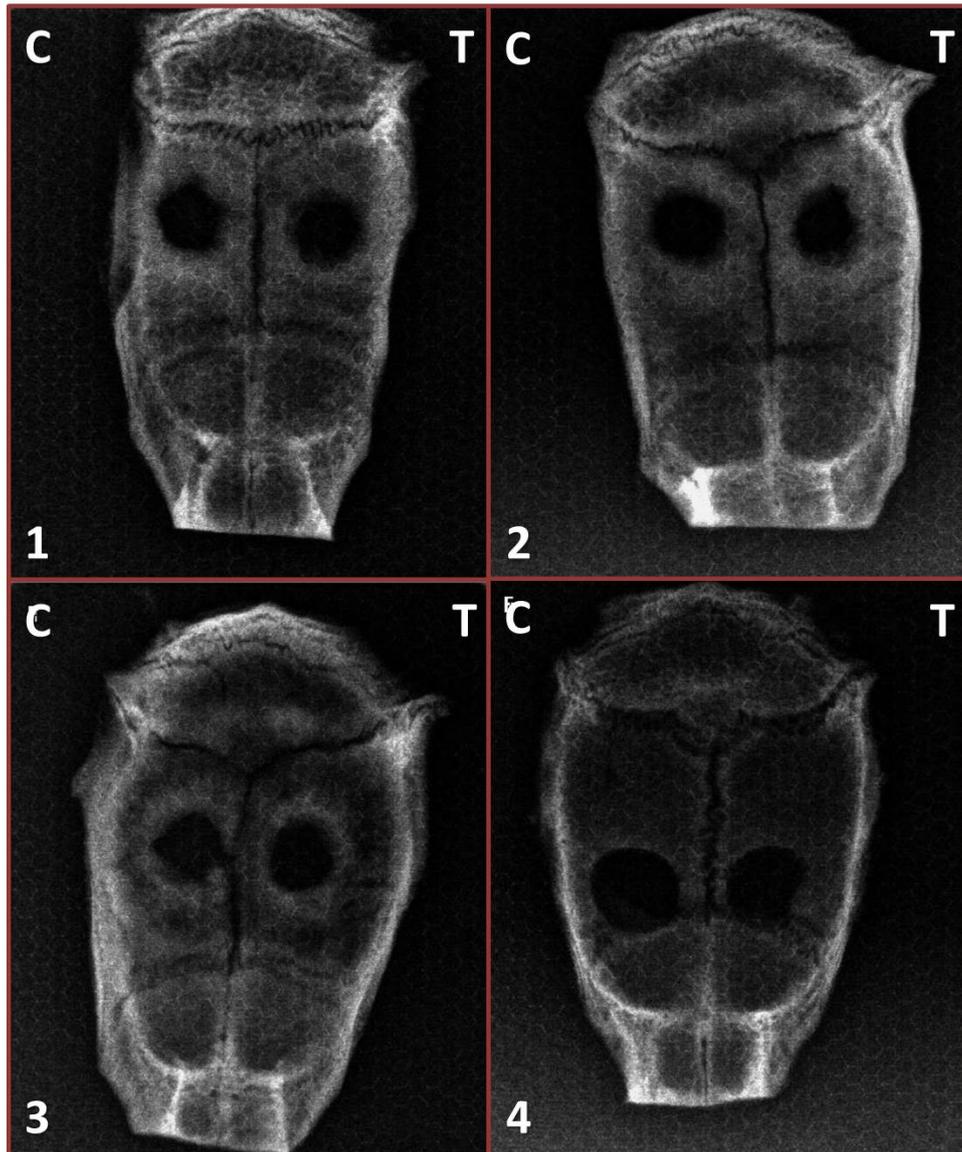


Fig.31- Radiografías tomadas a las 6 semanas de tratamiento con DFO. C – Defecto control. T- Defecto test tratado con DFO. El diámetro de los defectos originales ha disminuido significativamente. No se pueden apreciar diferencias entre los defectos control y los tratados.

C. MICROTOMOGRAFÍA COMPUTERIZADA

A continuación vamos a presentar los resultados encontrados utilizando la técnica de microtomografía computerizada, comparando el efecto de la deferoxamina expresado en porcentaje de hueso formado a las 3 semanas entre defecto control y defecto tratado. Se hizo una comparativa también a las 6 semanas y una última comparando las medias de los porcentajes de crecimiento óseo de las 3 y las 6 semanas entre sí.

También se ha estudiado la calidad del hueso formado calculando los porcentajes de cada tipo de hueso formado, utilizando la escala de Misch actualizada con las unidades Hounsfield.

C.1- RESULTADOS A LAS 3 SEMANAS DE TRATAMIENTO

La tomografía computerizada nos permite, a nivel de imagen, observar con mucha más precisión que a simple vista o con radiografías, podemos observar diferentes planos del hueso (transversal, sagital y coronal), además nos muestra una escala o bien de grises o bien de color relacionada directamente con la densidad ósea, lo que nos llevará a poder cuantificar la cantidad de hueso formado, gran diferencia con ambas técnicas utilizadas previamente.

Otra característica de las imágenes tomográficas es la posibilidad de ver la imagen en 3 dimensiones.

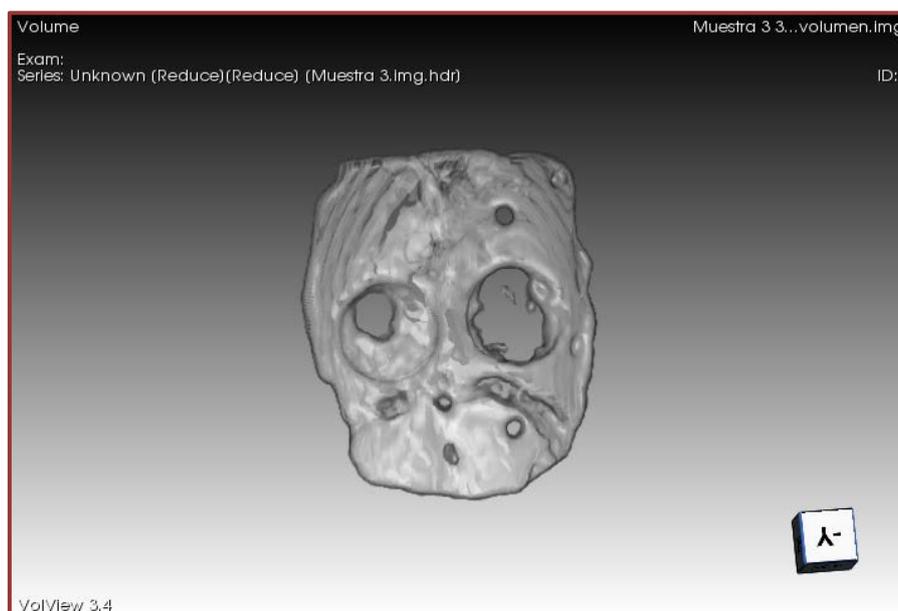


Fig.32- Imagen en 3 dimensiones de una muestra a las 3 semanas de tratamiento. En esta imagen el defecto control es el de la derecha y el defecto tratado con DFO es el de la izquierda. Imagen obtenida con el software volview.

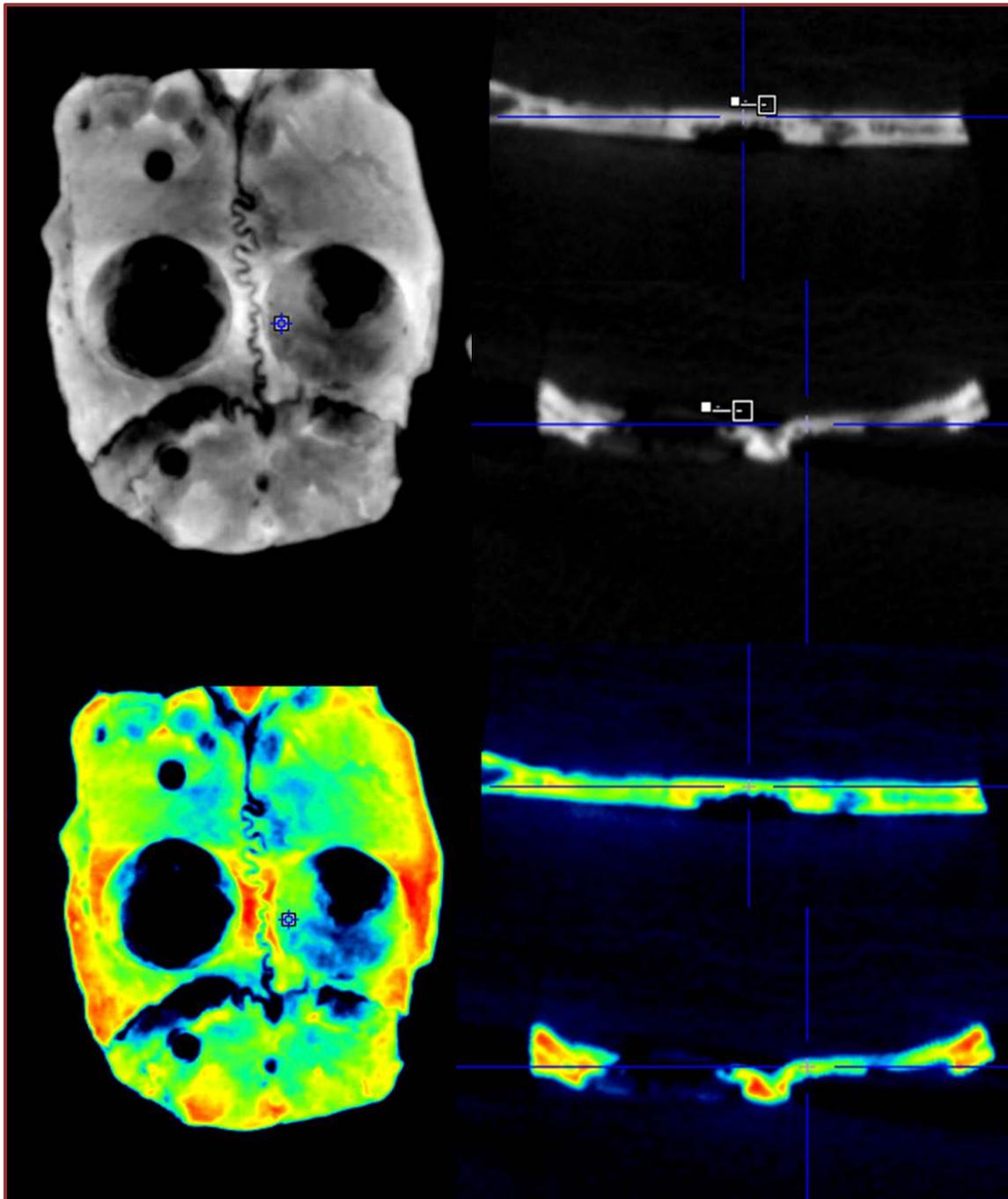


Fig.33- Imagen de una muestra a las 3 semanas de tratamiento y los diferentes planos en los que la podemos observar, coronal, sagital y transversal. En esta muestra el defecto control se sitúa a la izquierda y el tratado con DFO a la derecha. La densidad ósea se ve representada como una escala de grises en la primera imagen y como una escala de colores en la segunda, donde cuanto más se acerca al rojo, mayor es la densidad ósea.

Visualmente se aprecia mayor crecimiento en la mayoría de defectos tratados con DFO que en los defectos control. Y el diámetro original de los defectos sigue estando muy presente. Pero esta técnica, nos permite además cuantificar y confirmar lo que nos muestran las imágenes.

El porcentaje de hueso nuevo que se ha formado en todos los defectos tratados con DFO durante 3 semanas es superior y, en algunos casos, muy superior llegando a diferencias del 33,95%, respecto al porcentaje de hueso que se ha formado en el defecto control como podemos ver en la tabla 8, donde además del porcentaje de hueso formado aparece la diferencia de ambos porcentajes (test menos control). El estudio estadístico dio una t de Student con $p < 0.05$.

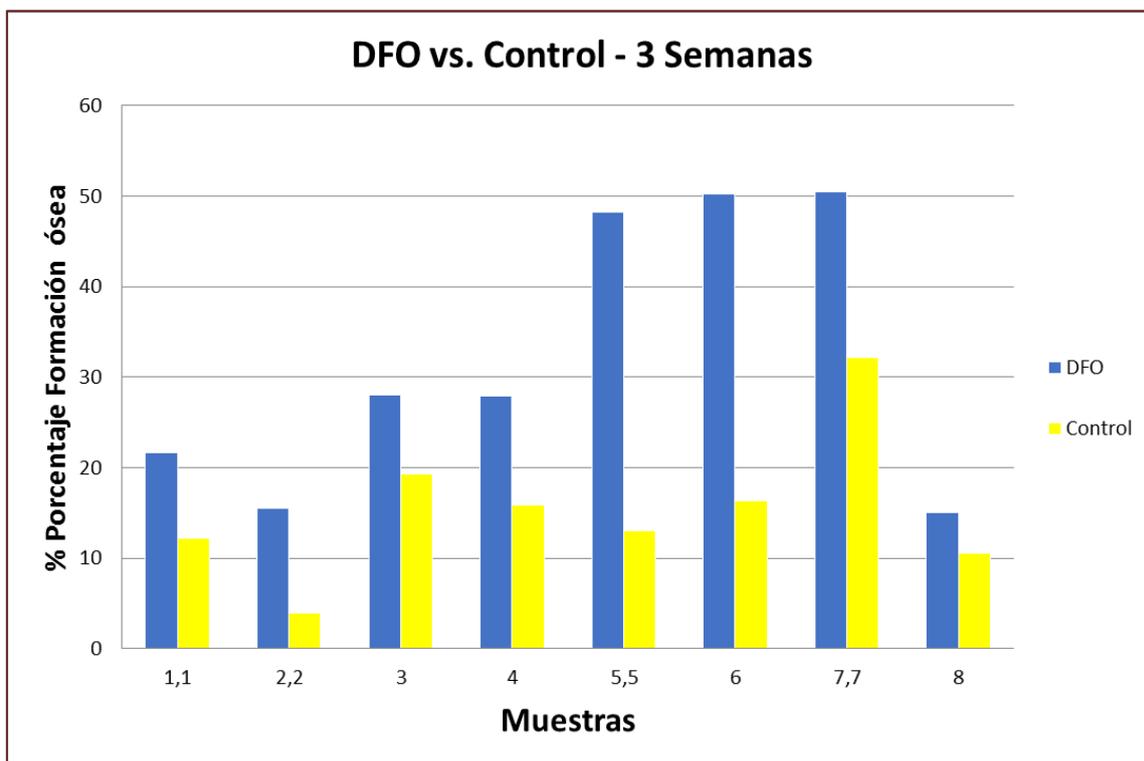


Fig.34- Comparativa del porcentaje de hueso formado en cada uno de los defectos de cada muestra a las 3 semanas, tanto en el tratado con DFO como en el control.

Muestras	1,1	2,2	3	4	5,5	6	7,7	8
Test %	21,64	15,47	27,99	27,92	48,22	50,26	50,48	15,06
Control %	12,22	3,89	19,33	15,83	13,07	16,32	32,16	10,51
Diferencia %	9,42	11,58	8,65	12,10	35,15	33,95	18,31	4,55

Tabla.8- Porcentajes de crecimiento en los defectos tratados con DFO, en los defectos control y la diferencia entre ambos en cada una de las muestras.

Organizando los dataraw siguiendo la clasificación de Misch (tabla 5) podemos obtener los porcentajes de cada etapa de formación del hueso en cada uno de los defectos tanto en el control como en el tratado con DFO, resultados que podemos ver en la fig.35. Observamos que el mayoritario tanto en el grupo tratado con DFO como en el control es el D5 que corresponde a tejido conjuntivo, llegando a superar en algunas muestras el 75% del tejido formado y siendo inexistente la presencia de hueso compacto (D1).

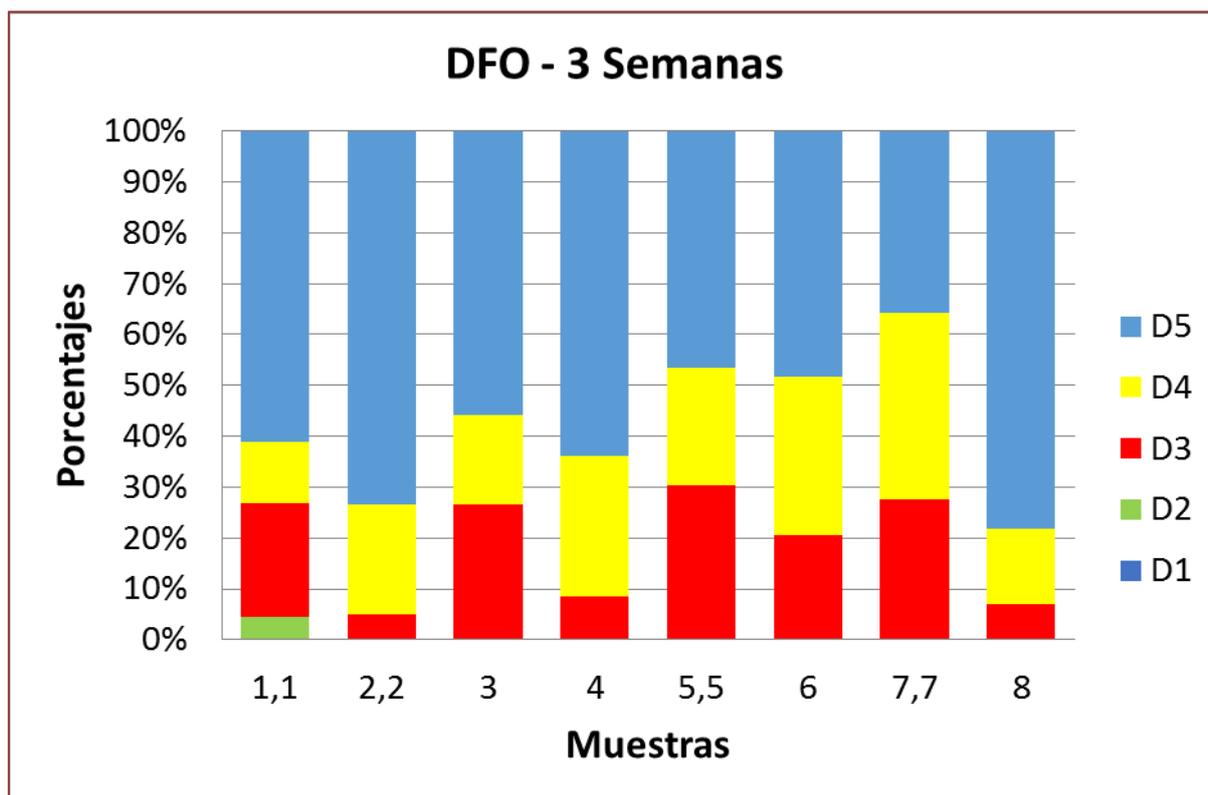


Fig.35- Gráfica de porcentajes del tipo de tejido formado, según la clasificación de Misch, encontrado en los defectos tratados durante 3 semanas con DFO. D1 corresponde a hueso compacto, D2 es hueso poroso y trabecular, D3 es hueso poroso con trabéculas finas, D4 representa hueso trabecular y D5 es tejido conjuntivo.

En la gráfica que representa los defectos control (Fig.36) encontramos resultados similares, aunque con mayor presencia aún de tejido conectivo con muestras con un porcentaje de este tejido conectivo (D5) superando el 90% del tejido formado. También es importante señalar que además de que la formación de hueso compacto (D1) es inexistente, también lo es el hueso poroso y trabecular (D2).

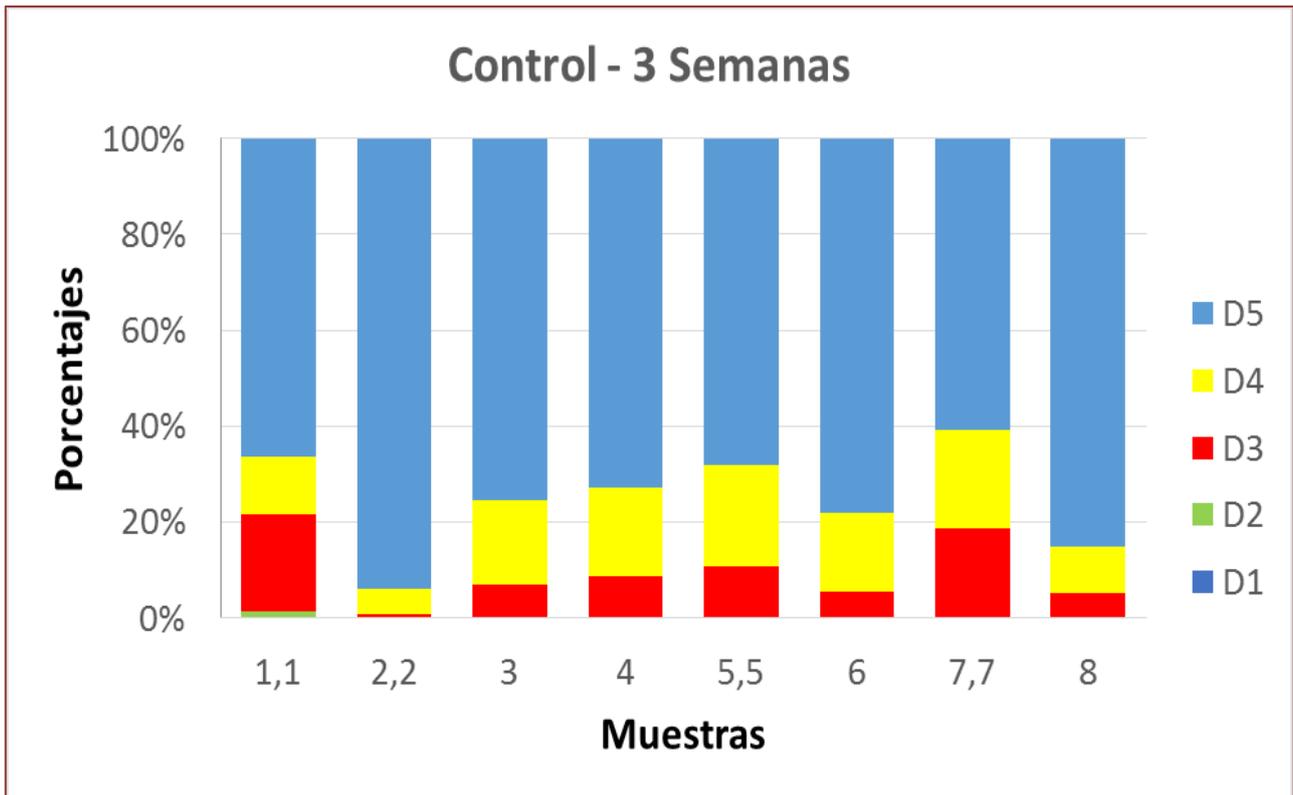


Fig.36- Gráfica de porcentajes del tipo de tejido formado, según la clasificación de Misch, encontrado en los defectos control sin tratar durante 3 semanas. D1 corresponde a hueso compacto, D2 es hueso poroso y trabecular, D3 es hueso poroso con trabéculas finas, D4 representa hueso trabecular y D5 es tejido conjuntivo.

C.2 - RESULTADOS A LAS 6 SEMANAS DE TRATAMIENTO

Tal como habíamos visto en las fotografías y en las radiografías, parece que a las 6 semanas existe un retroceso en la formación de hueso, ya que, aunque los diámetros son algo menores que a las 3 semanas, el hueco central tanto del defecto control como del defecto tratado están en la casi totalidad de las muestras, vacío. En este caso sí se puede apreciar un ligero aumento de la masa ósea en los defectos tratados con DFO respecto de los defectos control. Queda confirmar o no con la cuantificación.



Fig.37- Imagen en 3D de una muestra tras 6 semanas de tratamiento. No se observan grandes diferencias entre el defecto control (izquierda) y el defecto tratado con DFO (derecha). Y se aprecia un gran hueco vacío en ambos defectos.

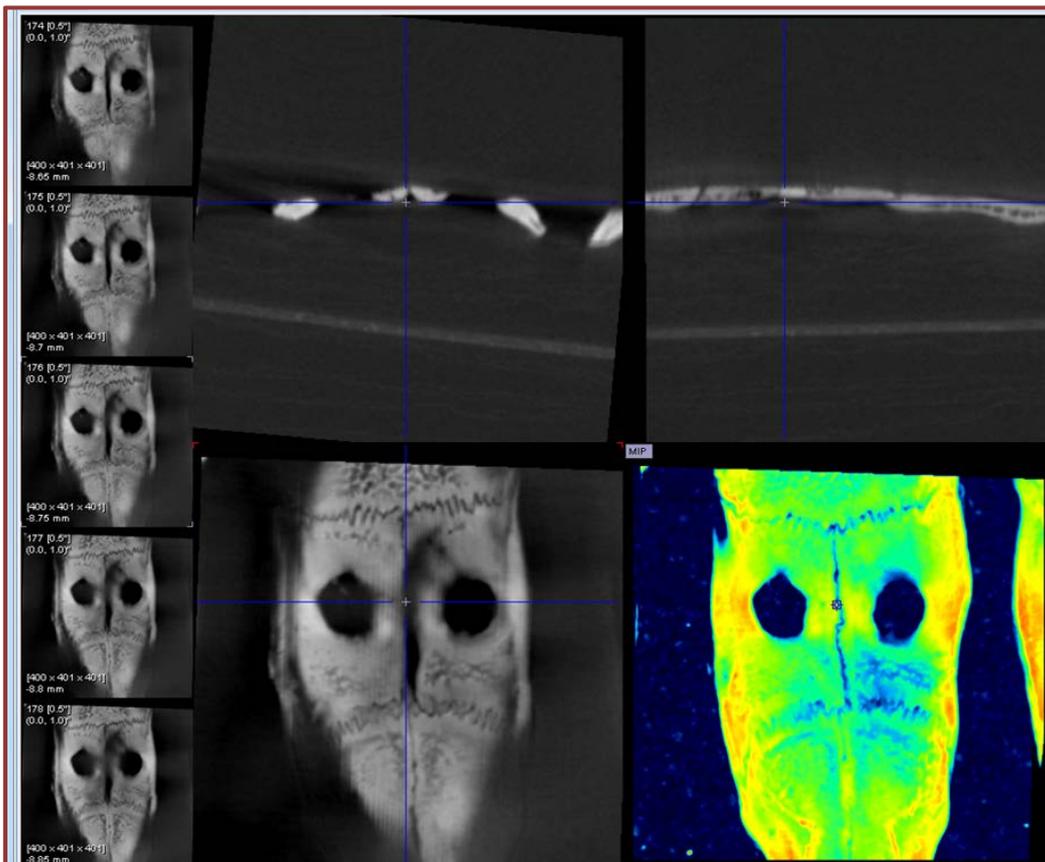


Fig.38- Imagen tomográfica de una muestra a las 6 semanas de tratamiento, donde se pueden observar los diferentes planos y la escala de densidades óseas tanto en grises como en color.

A las 6 semanas de tratamiento sigue siendo el grupo tratado con DFO el que presenta mayores porcentajes de crecimiento óseo, pero las diferencias son menores respecto del control como podemos ver en la tabla. Encontramos muestras donde no hay diferencia entre defecto tratado con DFO y defecto control, e incluso en la muestra 1,2, en el control hay ligeramente mayor crecimiento óseo que en el tratado con DFO. El estudio estadístico dio una t de Student con $p < 0.05$.

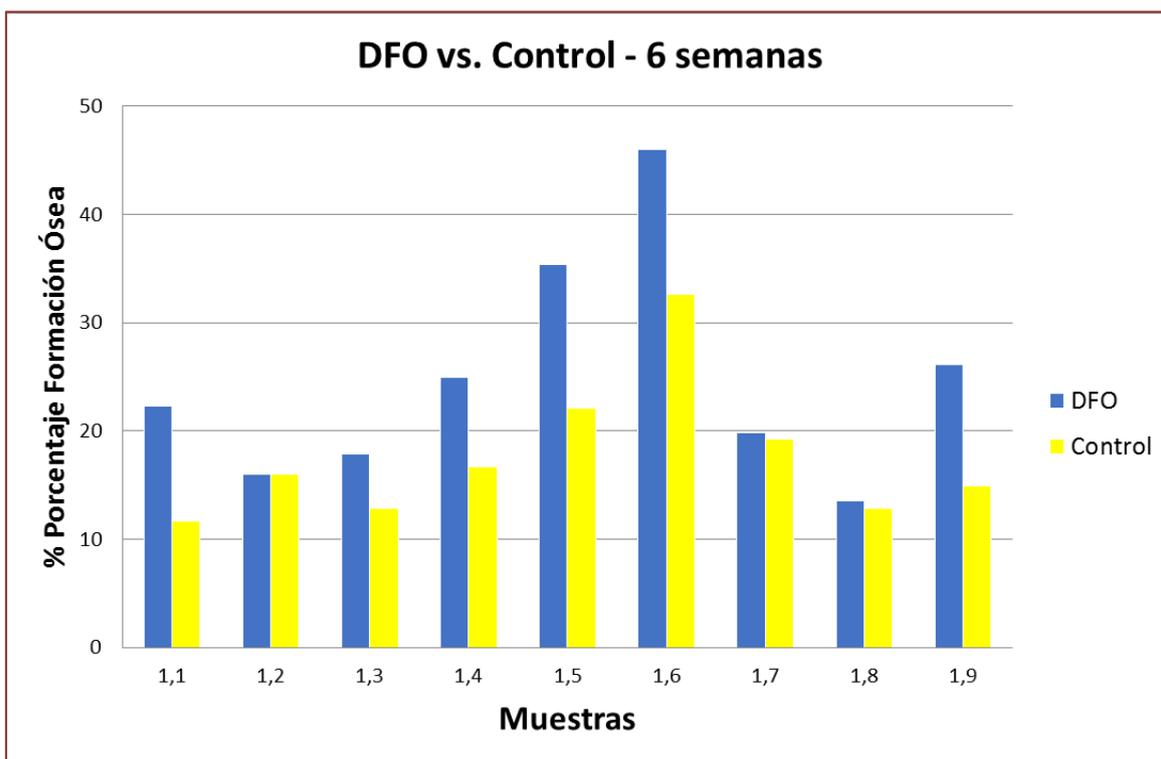


Fig.39- Comparativa del porcentaje de hueso formado en cada uno de los defectos de cada muestra a las 6 semanas, tanto en el tratado con DFO como en el control.

Muestras	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9
Test %	22,27	16,01	17,88	24,91	35,41	45,96	19,79	13,51	26,13
Control %	11,69	16,04	12,84	16,73	22,07	32,66	19,23	12,89	14,87
Diferencia %	10,58	-0,03	5,03	8,17	13,34	13,30	0,56	0,62	11,26

Tabla.9- Porcentajes de crecimiento en los defectos tratados con DFO, en los defectos control y la diferencia entre ambos en cada una de las muestras, a las 6 semanas.

A las 6 semanas de tratamiento, en los defectos tratados con DFO la configuración del tipo de tejido formado y sus porcentajes cambia mucho respecto de las 3 semanas. Observamos que aunque el tejido conjuntivo (D5) sigue siendo mayoritario, ahora no supera en ninguna muestra el 60%, la presencia de hueso trabecular (D4) y hueso poroso con trabéculas finas (D3) también aumenta significativamente y hace su aparición de forma importante en todas las muestras el hueso poroso y trabecular (D2). Sigue, sin embargo, sin haber presencia de hueso compacto (D1).

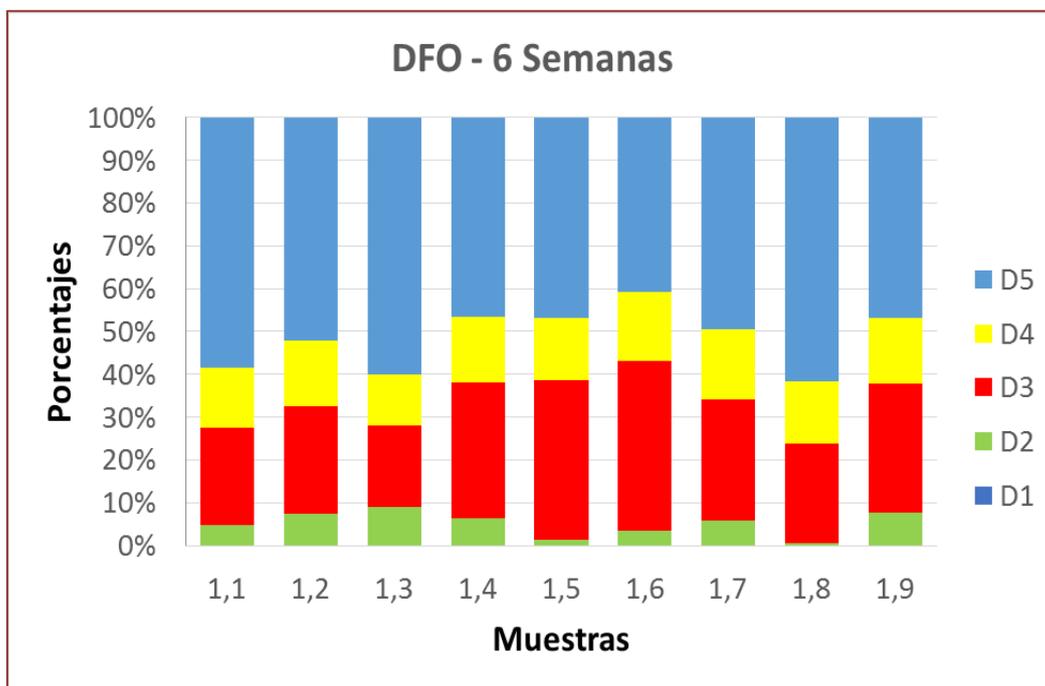


Fig.40- Gráfica de porcentajes del tipo de tejido formado, según la clasificación de Misch, encontrado en los defectos tratados durante 6 semanas con DFO. D1 corresponde a hueso compacto, D2 es hueso poroso y trabecular, D3 es hueso poroso con trabéculas finas, D4 representa hueso trabecular y D5 es tejido conjuntivo.

En el grupo control ocurre lo mismo pero de forma menos marcada que en el grupo tratado con DFO durante 6 semanas. Aquí los porcentajes de tejido conjuntivo (D5) están ligeramente por debajo del 70% y el hueso poroso y trabecular (D2) tiene porcentajes menores que en el grupo tratado.

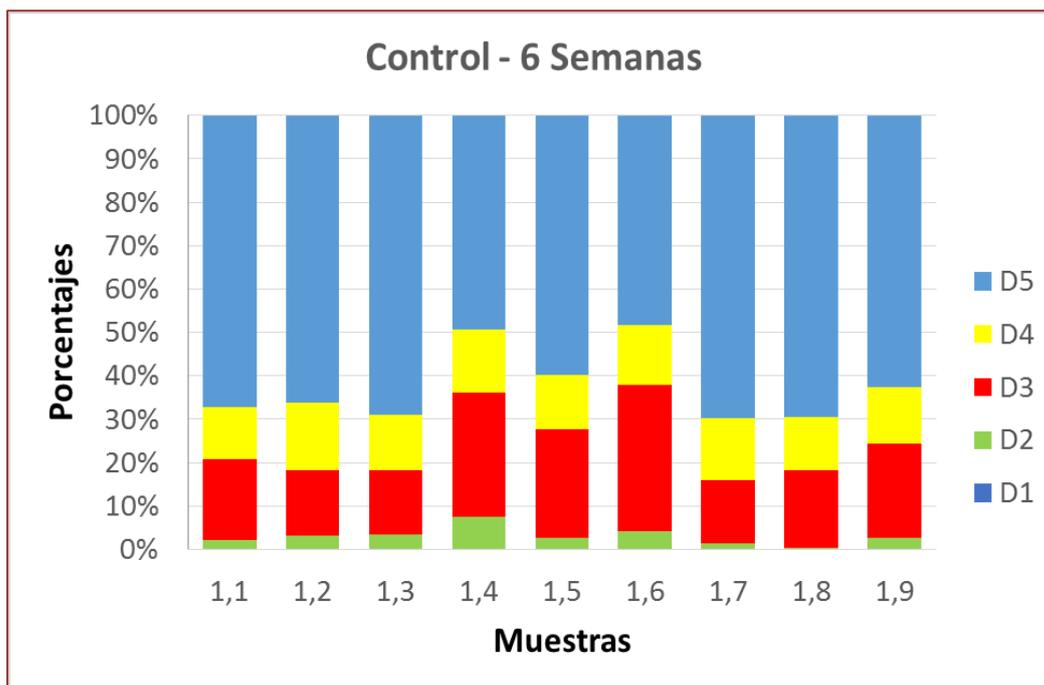


Fig.41- Gráfica de porcentajes del tipo de tejido formado, según la clasificación de Misch, encontrado en los defectos tratados durante 3 semanas con DFO. D1 corresponde a hueso compacto, D2 es hueso poroso y trabecular, D3 es hueso poroso con trabéculas finas, D4 representa hueso trabecular y D5 es tejido conjuntivo.

C.3 - COMPARACIÓN DE LA REGENERACIÓN ÓSEA A LAS 3 SEMANAS FRENTE A LAS 6 SEMANAS.

Sacando las medias de todas las muestras, tanto control como tratadas con DFO, podemos ver la diferencia de crecimiento óseo a las 3 semanas frente a las 6 semanas. Comparando por una parte los grupos tratados con DFO y por el otro los grupos control entre sí.

En el grupo tratado existe mayor crecimiento óseo durante las primeras 3 semanas con una diferencia del 16,71%, diferencia estadísticamente significativa, gracias a la prueba t de Student que nos arroja una $p < 0,05$. Lo que es justamente lo contrario en el grupo control con un crecimiento del 6,98% mayor a las 6 semanas, con una diferencia estadísticamente significativa con una t de Student $p < 0,05$. Las desviaciones estándar nos muestran una amplia dispersión de datos.

También vemos una mayor diferencia del porcentaje de crecimiento óseo entre el grupo tratado con DFO frente a su control a las 3 semanas, diferencia, que también es estadísticamente significativa con $p < 0,05$, que entre el grupo tratado con DFO y su grupo control a las 6 semanas, cuya t de Student también es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

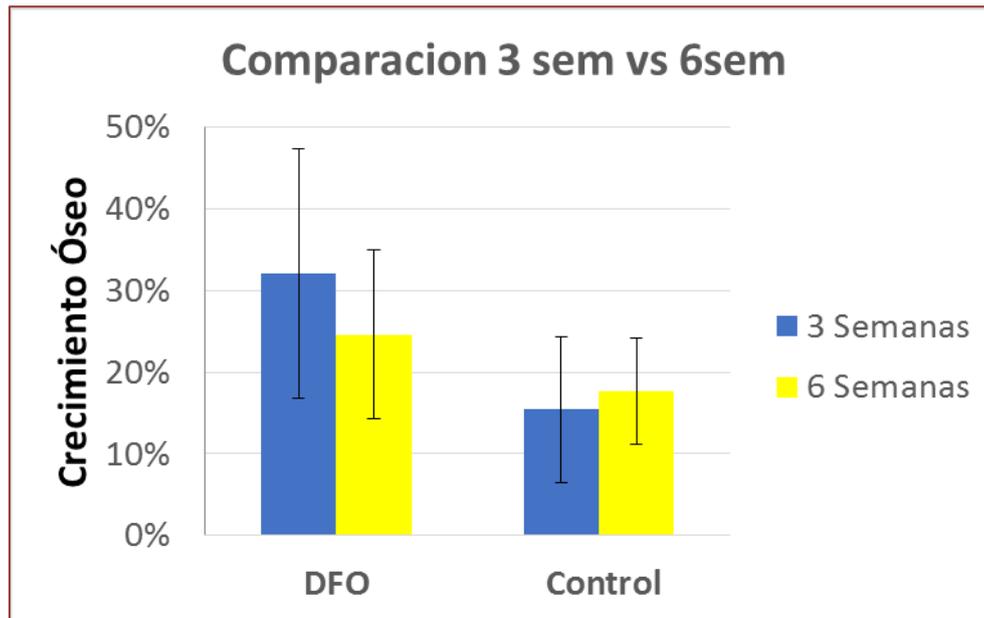


Fig.42- Comparativa de las medias de crecimiento óseo entre las 3 y las 6 semanas de tratamiento. Las desviaciones estándar muestran una amplia dispersión de datos. Y las diferencias observadas en esta gráfica son estadísticamente significativas, pues en todos los casos tenemos una $p < 0.05$.

D. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROANÁLISIS DE ELEMENTOS. SEM-EDX

En este apartado se va a comparar la calidad con la que va formándose el hueso en cada uno de los defectos de cada rata a través del cálculo y comparación del ratio Ca/P a las 3 semanas de tratamiento con deferoxamina, a las 6 semanas y finalmente una comparativa entre el efecto de la deferoxamina a las 3 frente a las 6 semanas. A través del porcentaje de oxígeno estudiaremos la actividad celular de todos los defectos.

D.1- COMPARATIVA ENTRE EL GRUPO TRATADO CON DFO Y EL GRUPO CONTROL A LAS 3 SEMANAS.

Con el SEM hemos podido hacer una observación microscópica de los defectos. A las 3 semanas ambos se ven perfectamente, con los bordes muy definidos. En ambos defectos hay crecimiento, pero se aprecia que no es total.

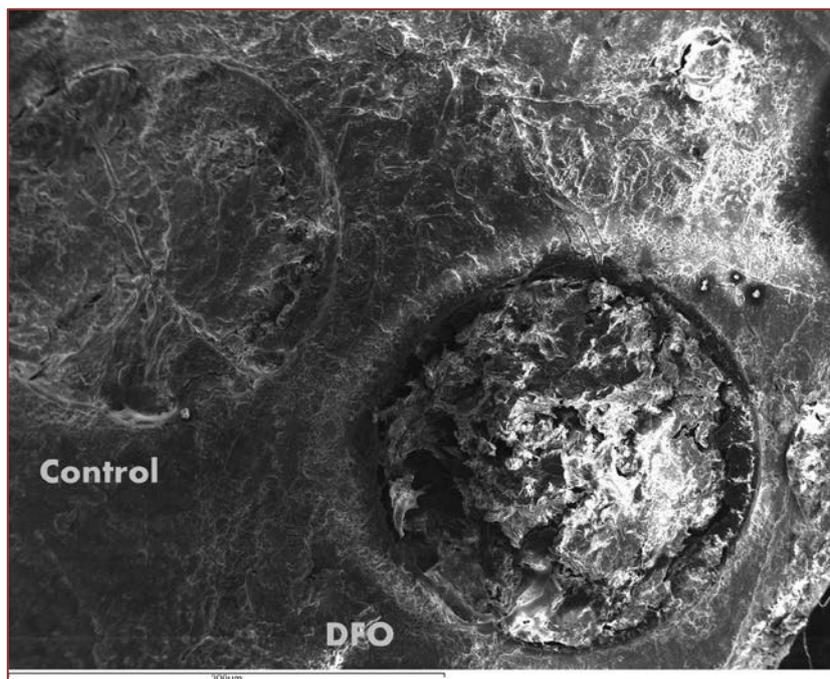


Fig.43- Imagen captada por el SEM JEOL-6100 (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido). De los defectos, tanto control como del tratado con DFO, de una de las muestras a las 3 semanas, con un aumento de 10X.

Cuando vemos la muestra con mayor aumento (2500X), podemos observar además de láminas, ya que es hueso plano, un incipiente sistema trabecular.

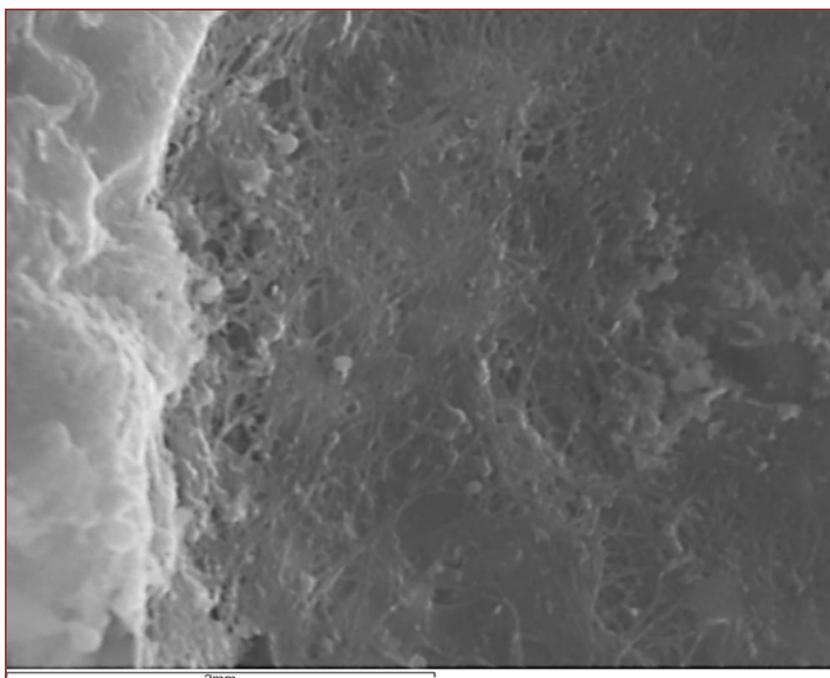


Fig.44- Imagen captada en uno de los defectos a 3 semanas de tratamiento con un aumento de 2500X, con el JEOL-6100 (Oxford Instrument, Abingdon-on-Thames, Reino Unido).

En la fig.45 se compara la calidad del hueso a través del ratio Ca/P de cada una de las muestras en el defecto que fue tratado con DFO y su control a las 3 semanas. Aunque los valores fueron mayores en todas las muestras tratadas con DFO que en las muestras control, cuando se utilizó la prueba estadística t de Student ($p < 0.05$), no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las muestras. También se puede observar que la dispersión de datos es bastante importante.

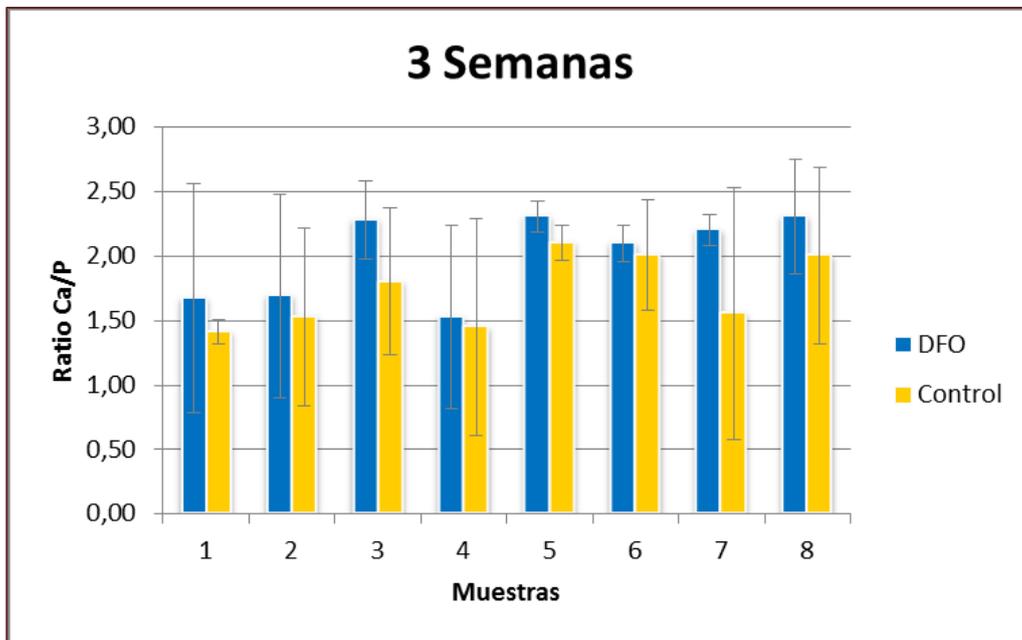


Fig.45- Comparativa del ratio Ca/P entre cada una de las muestras tratadas con DFO y su control a las 3 semanas de tratamiento. Se han indicado las desviaciones estándar de cada muestra con las barras de error.

Para el estudio de la actividad celular se utilizó el porcentaje de oxígeno encontrado en el grupo tratado con DFO frente a su control a las 3 semanas. Los valores encontrados fueron mayores en la casi totalidad de las muestras tratadas con DFO, salvo en una de ellas. Pero al realizar la prueba t de Student ($p < 0.05$) volvemos a encontrar que no existen diferencias estadísticamente significativas. La dispersión de datos es bastante menor que en la gráfica del ratio Ca/P.

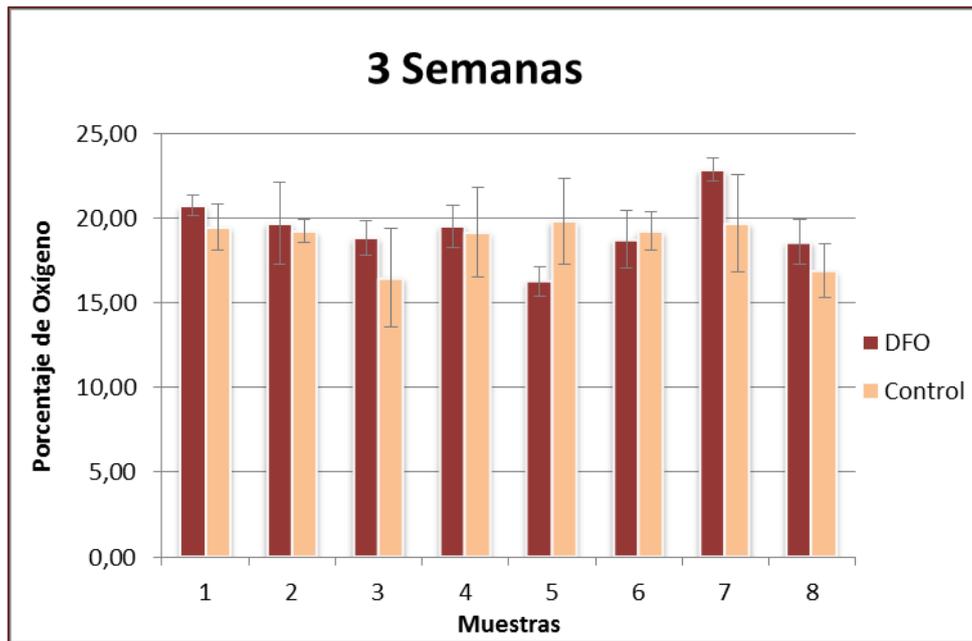


Fig.46- Comparativa de los porcentajes de oxígeno entre cada una de las muestras tratadas con DFO y su control a las 3 semanas de tratamiento. Se han indicado las desviaciones estándar de cada muestra con las barras de error.

D2 - COMPARATIVA ENTRE EL GRUPO TRATADO CON DFO Y EL GRUPO CONTROL A LAS 6 SEMANAS.

A las 6 semanas, los bordes y los defectos son mucho más difíciles de diferenciar del resto del hueso de la calota, tal como podemos ver en la figura 47. En todas las muestras menos 2, los defectos están incompletos, aunque con los bordes menos marcados como se puede ver en la tabla 7.

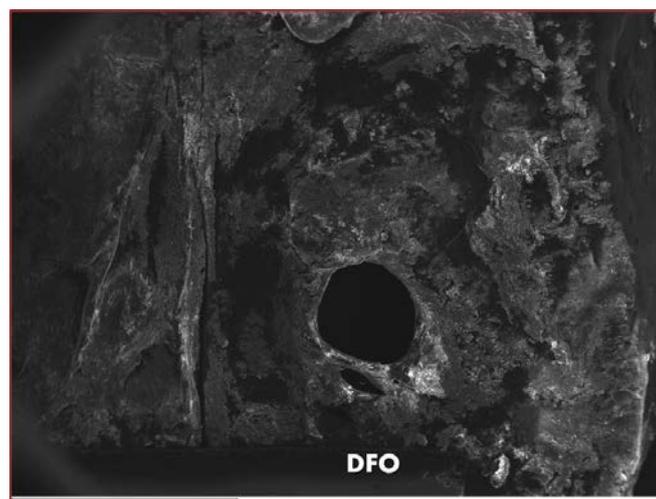


Fig.47- Imagen de uno de los defectos tratados con DFO durante 6 semanas, en el que se ve claramente el centro sin osificar, como en la mayoría de las muestras.

Aunque en todas las muestras salvo dos, aparece el centro sin osificar, existen dos muestras totalmente osificadas y donde parece observarse una mejor calidad del hueso, ya que es prácticamente indistinguible del resto de hueso que lo rodea, este caso lo podemos ver en la figura 48.

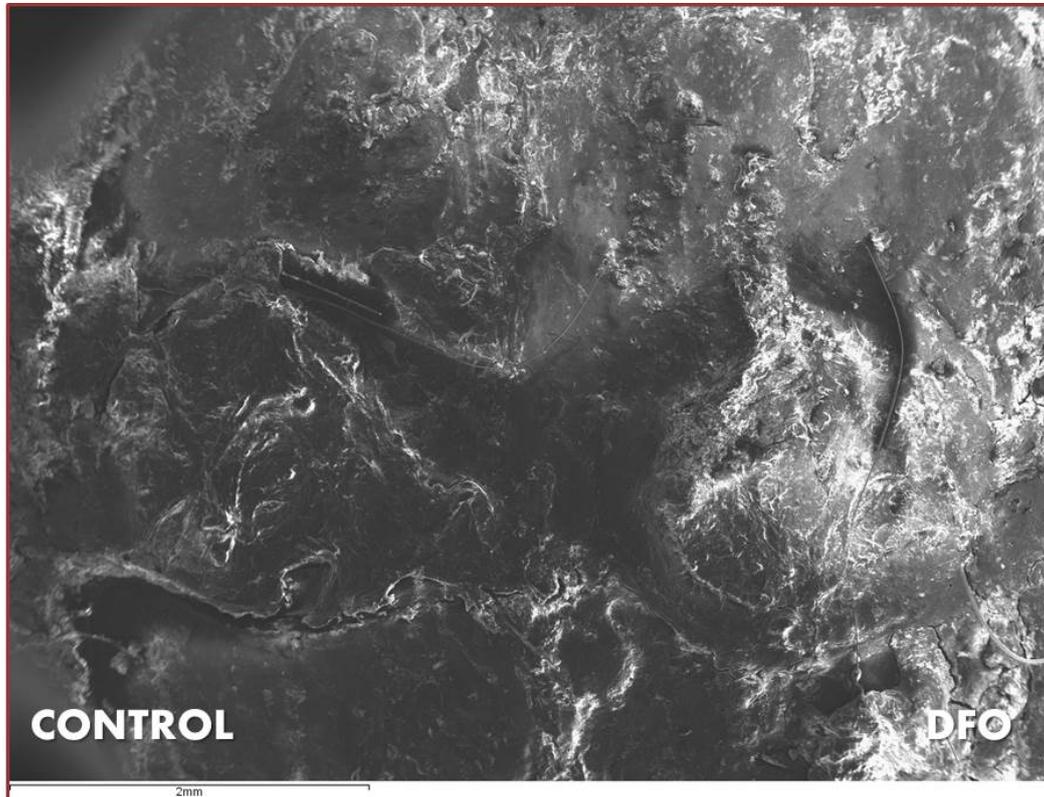


Fig.48- Imagen de una de las dos muestras osificadas casi por completo, con un aumento 10X, donde es difícil diferenciar los defectos y podemos pensar que la calidad del hueso es similar al circundante.

En la gráfica 49 podemos ver que el valor numérico del ratio Ca/P es mayor en todas las muestras tratadas con DFO frente a las muestras control, analizadas a las 6 semanas. Al hacer la prueba estadística t de Student ($p < 0.05$), encontramos diferencias estadísticamente significativas tan solo en dos muestras, la número 3 y la número 5, no encontrando más diferencias estadísticamente significativas en el resto de muestras.

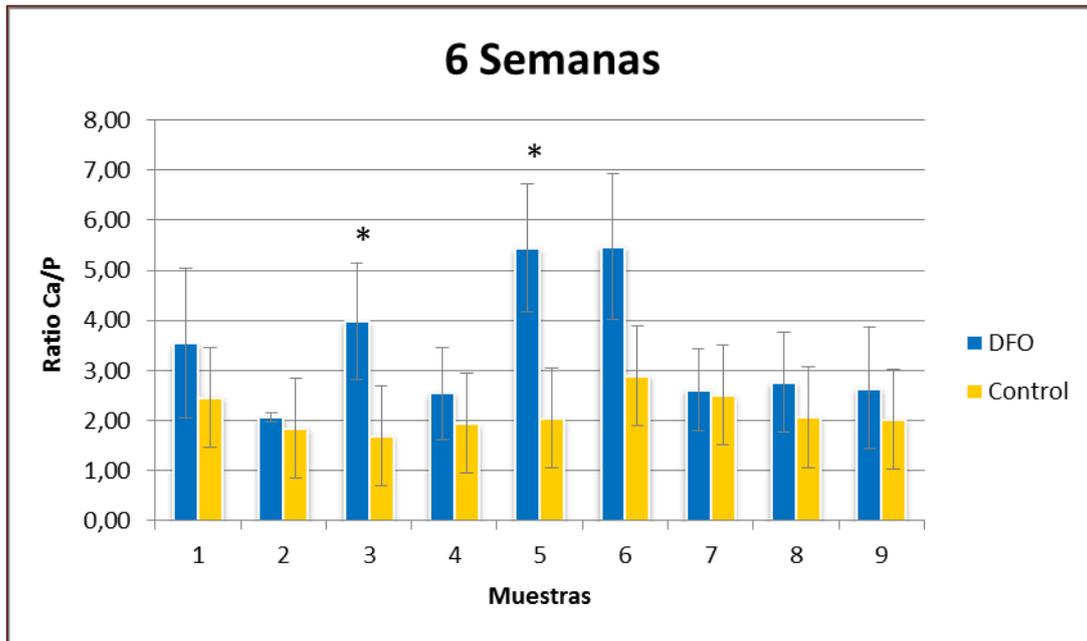


Fig.49- Comparativa del ratio Ca/P entre cada una de las muestras tratadas con DFO y su control a las 6 semanas de tratamiento. Se han indicado las desviaciones estándar de cada muestra con las barras de error. El asterisco indica las muestras en las que se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

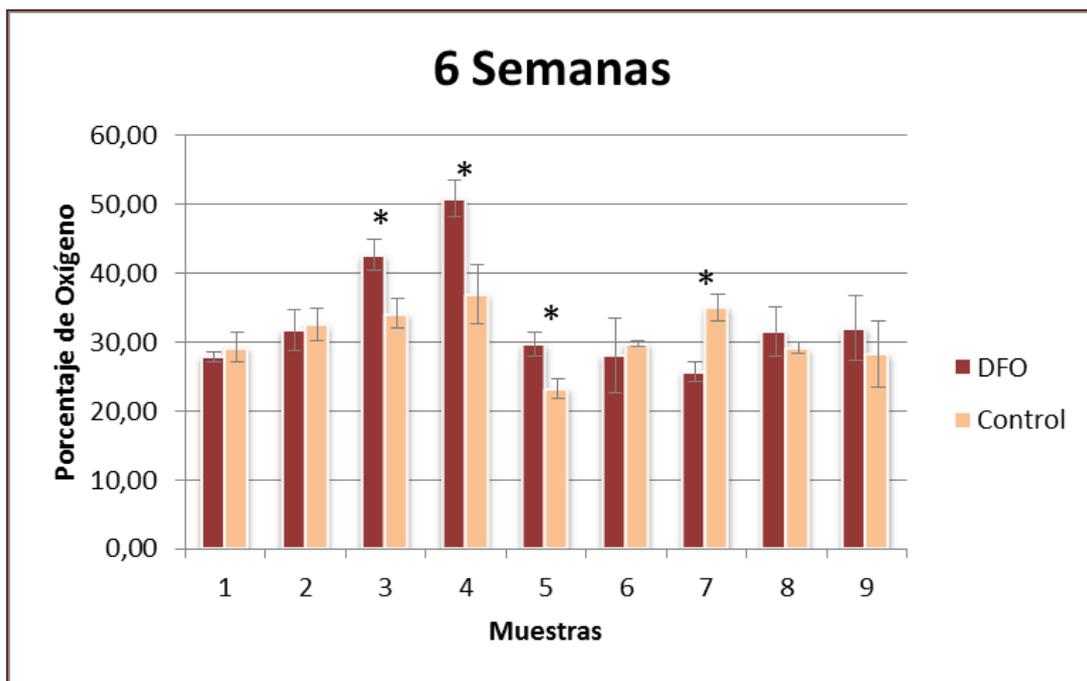


Fig.50- Comparativa de los porcentajes de oxígeno entre cada una de las muestras tratadas con DFO y su control a las 3 semanas de tratamiento. Se han indicado las desviaciones estándar de cada muestra con las barras de error. El asterisco indica las muestras en las que se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En la gráfica comparativa del porcentaje de oxígeno entre los defectos tratados con DFO y su control (fig.50), encontramos que los valores numéricos son mayores en

el test frente al control en 5 muestras, lo que representa algo más de la mitad de las muestras. Sin embargo, al realizar la prueba t de Student ($p < 0.05$) hay 3 muestras, la 3, la 4 y la 5, donde existen diferencias estadísticamente significativas a favor de los defectos tratados con DFO, sin embargo en la muestra 7 esta diferencia de $p < 0.05$ es a favor del control. La dispersión de datos es mucho menor que en las gráficas.

D.3 - COMPARATIVA DEL EFECTO DE LA DFO A LAS 3 SEMANAS FRENTE A LAS 6 SEMANAS.

La primera comparativa fue entre los ratios Ca/P. El valor numérico de la media del ratio Ca/P del grupo tratado con DFO frente al grupo control a las 3 semanas es mayor en el grupo tratado con DFO, lo que se confirma al realizarle la prueba t de Student ($p < 0.05$). También existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a favor del grupo tratado con DFO y el grupo control a las 6 semanas.

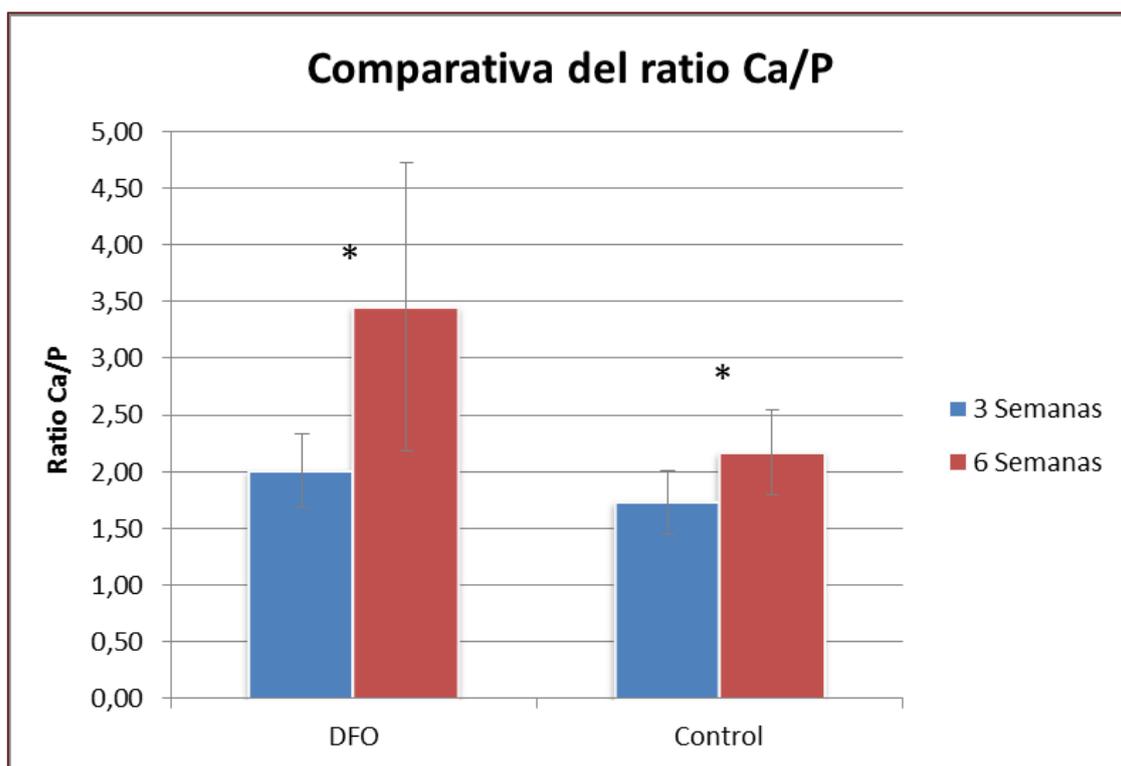


Fig.51- Comparativa de las medias de los ratios Ca/P de las muestras tratadas con DFO a las 3 y 6 semanas y de las muestras control a los mismos periodos. Se han indicado las desviaciones estándar de cada muestra con las barras de error. El asterisco indica que se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se aprecia claramente que los valores numéricos, respaldados por la t de Student ($p < 0.05$) son mayores y tienen significado estadístico a las 6 semanas tanto en el grupo tratado con DFO, como en el grupo control, frente a dichos grupos a las 3

semanas. La dispersión de datos es bastante amplia en el grupo DFO a las 6 semanas, en el resto es moderada.

A continuación se compararon las medias de los porcentajes de oxígeno. Dentro del periodo de las 3 semanas no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con DFO y el grupo control (en azul en la fig.52), ni tampoco entre ambos grupos a las 6 semanas (barras en rojo en la fig.52). Sin embargo se han encontrado valores mayores con t de Student ($p < 0.05$) a las 6 semanas frente a las 3, en los dos tipos de defecto, el tratado con DFO y el control. En este caso la dispersión de datos es muy pequeña.

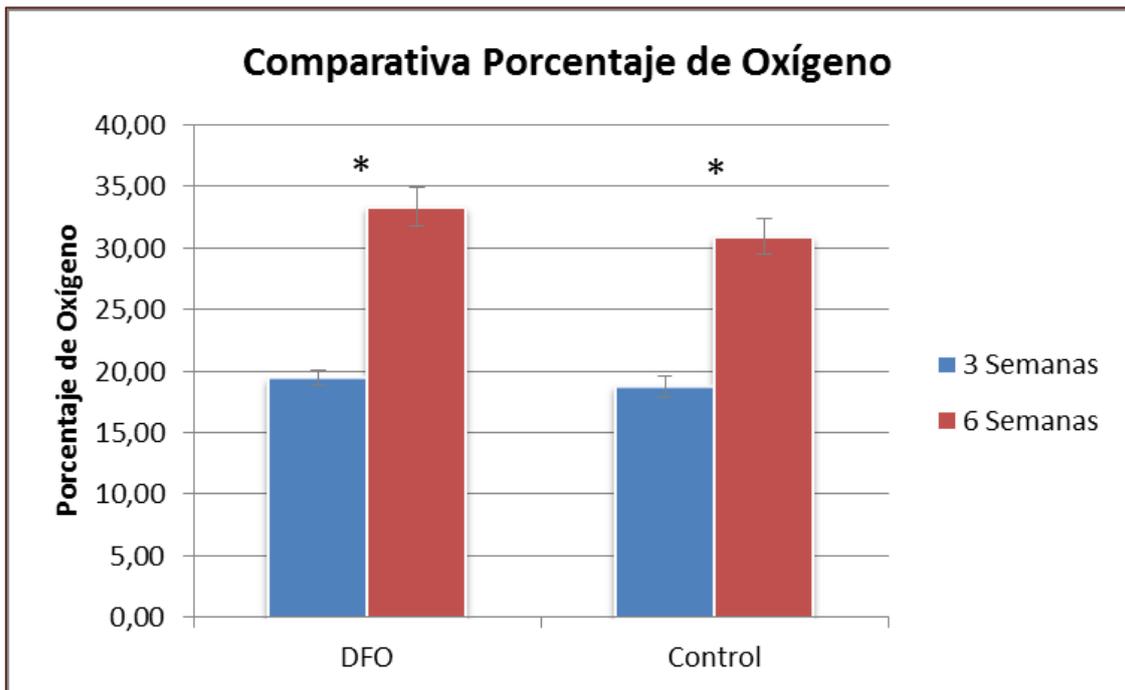


Fig.52- Comparativa de las medias de los porcentajes de oxígeno de las muestras tratadas con DFO a las 3 y 6 semanas y de las muestras control a los mismos periodos. Se han indicado las desviaciones estándar de cada muestra con las barras de error. El asterisco indica que se ha encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este estudio tiene una doble vertiente, una de ellas es la comparación cualitativa de diferentes técnicas de imagen y la determinación de su idoneidad como métodos diagnósticos y predictivos en los procesos de reparación y regeneración ósea y, por otro lado, el estudio cuantitativo del efecto de un fármaco determinado *in vivo*, la DFO, en este mismo proceso. Para ello usamos un modelo animal.

La elección del modelo animal se debe principalmente a que las ratas albinas Wistar son de fácil manejo, económicas y tienen un metabolismo adecuado para el estudio del tejido óseo. Al mismo tiempo se tuvo en cuenta que fueran macho para que los estrógenos no alteraran los resultados, pues estos influyen en el remodelado óseo (35).

Una de las posibles aplicaciones de la DFO sería en el campo de la odontología, por lo tanto estudiar hueso plano se ha revelado como interesante. En las ratas Wistar, la mandíbula es de un tamaño demasiado pequeño que hace difícil trabajar sobre él, por eso se ha llevado a cabo la elección de la calota como lugar donde realizar los defectos, pues también se trata de hueso plano y podemos esperar un comportamiento similar al de la mandíbula.

Se han usado diferentes técnicas de imagen en este trabajo. Se ha comenzado por utilizar las menos precisas, en este caso la fotografía y la radiografía de rayos X, que nos permiten hacer una clasificación macroscópica. A continuación la microCT, con los tamaños de vóxels tan pequeños, nos ha ofrecido una visión mucho más precisa. Pero sin duda alguna, la técnica con mayor resolución y precisión es el de la microscopía de barrido, llegando a ver la estructura del hueso.

Tanto en la observación visual directa, como en las radiografías, no es posible diferenciar cambios importantes entre las muestras control y las muestras tratadas con DFO, y esto ocurre tanto a las 3 como a las 6 semanas. Ambos defectos parecen similares en todos los casos. No son, por tanto, técnicas que por sí solas puedan aportar suficiente información. Son útiles como primer contacto con los resultados, pero requieren de técnicas de mayor precisión.

Sin embargo esto es completamente diferente si comparamos en el tiempo. A las 3 semanas se aprecia crecimiento en todas las muestras en mayor o menor medida. Mientras que a las 6 semanas es lo contrario, apreciándose que mientras que el borde de las muestras se difumina y se ve más consolidado, el centro está recubierto por una muy fina membrana o directamente hueco, dando a pensar que ha habido un retroceso en la formación de hueso e incluso destrucción de parte del tejido óseo, resultado inesperado y que se confirmará con el resto de técnicas utilizadas.

Además de poder hacer estudios *in vivo*, la microCT tiene la ventaja de poder llevar a cabo la reconstrucción de la imagen en 3D, lo que nos permite una mayor comprensión de las estructuras estudiadas. También se observa cada una de las muestras desde tres planos diferentes: transversal, coronal y sagital. Nos permite

también poder distinguir las diferencias de forma mucho más precisa. De esta forma vemos que tanto a las 3 como a las 6 semanas, se observa mayor nivel de osificación en las muestras test frente a las muestras control. Es la primera, de las técnicas usadas hasta ahora, que nos permite percibir esta diferencia. También confirma lo ya observado tanto en fotografía como en radiografía, que hay un aparente retroceso y destrucción del tejido óseo en las muestras a las 6 semanas frente a las de 3 semanas.

Encontramos resultados muy interesantes en las imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido, SEM. A las 3 semanas los bordes de los defectos están muy marcados, apreciándose claramente donde fueron realizados. La totalidad de las muestras se ven osificadas, aunque no completamente, pero no se aprecian huecos. Cuando se elevan los aumentos a 2500X (Fig.44) se observa una estructura trabecular incipiente. A las 6 semanas los bordes de los defectos están mucho más difuminados y ya nos es imposible ver la misma estructura trabecular, que podemos pensar que ha quedado oculta tras el hueso compacto laminar que se está formando en este tipo de hueso, que recordamos es hueso plano. Sin embargo en la casi totalidad de las muestras el centro está hueco, el tejido óseo que se ha visto a las 3 semanas, desaparece, lo que confirma lo visto con las técnicas de imagen anteriores, la existencia de un posible proceso osteoclástico.

Todas las técnicas de imagen son concordantes entre sí y lo más significativo es la aparente destrucción de hueso a las 6 semanas. Algo que se aprecia ya con el uso de la técnica menos precisa, la fotografía. Sin embargo, ninguna de las técnicas es capaz de marcar la diferencia entre los defectos control y los tratados con DFO, salvo la microCT. Teniendo todo esto en cuenta nos encontramos dos técnicas, la fotografía y la radiografía de rayos X, que son de fácil acceso, baratas y no operador dependientes, que aportan una información válida pero insuficiente. Mientras que el SEM es una técnica de acceso más difícil, operador dependiente y mucho más cara, que a nivel cualitativo tampoco nos aporta suficiente información. Sin embargo, la microCT sí que nos aporta información cualitativa más útil, al ser posible observar las estructuras en 3 dimensiones y desde diferentes planos (coronal, sagital y transversal). Con microCT no sólo se ven diferencias significativas a lo largo del tiempo, entre las muestras a las 3 semanas, frente a las muestras a las 6 semanas. Si no que se pueden ver diferencias entre los defectos control y test dentro de una misma muestra. A pesar de ser una técnica cara, de difícil acceso y que necesita de personal cualificado para su uso, es la técnica de imagen más completa, y por lo tanto la más adecuada en el estudio cualitativo de la regeneración ósea a través de defectos críticos en un modelo animal de roedores *in vivo*. El resto de técnicas utilizadas en este estudio pueden utilizarse de forma complementaria a la microCT, pero no de forma exclusiva.

Hasta ahora, todo lo comentado sobre las técnicas de imagen reviste de un carácter cualitativo. Pero hay que tener en cuenta que de todas ellas, dos nos aportan no sólo información cualitativa, sino que es posible cuantificar en qué medida se ha producido la reparación y regeneración ósea de los defectos. Y también cuantificar la calidad del hueso formado. Estas dos técnicas son la microCT y el EDX. Para ello

se han utilizado diferentes parámetros e indicadores en función de la técnica aplicada.

En el caso de la microCT, se ha utilizado el parámetro del porcentaje de hueso formado en el ROI para cuantificar el crecimiento óseo. Los resultados observados nos arrojan un claro efecto de la DFO sobre los defectos no tratados, tanto a las 3 como a las 6 semanas. En ambos casos hay mayor crecimiento óseo que en los defectos control en todas las muestras.

Sin embargo se observa en la fig.42 un efecto inesperado y es que a las 3 semanas, el crecimiento óseo es mayor que a las 6 semanas, existiendo incluso un retroceso en el porcentaje de hueso formado a las 6 semanas, lo que nos indica que ha habido un proceso de resorción ósea. Teniendo en cuenta que este efecto se está viendo confirmado por el resto de técnicas, nos puede llevar a pensar en una hipótesis. Parece que conforme avanza el tiempo se activa una vía osteoclástica, lo cual si estudiamos más a fondo la vía del HIF-1 α , nos damos cuenta que es una hipótesis razonable.

Tal como se había visto en la introducción, la vía del HIF-1 α activa la angiogénesis, la diferenciación y la activación de osteoblastos, lo que lleva a la osteogénesis. Sin embargo, tal como demuestra en su trabajo, *Chen D et al* (2013) (46), también activa la expresión del gen SOST en osteoblastos, aumentando los niveles de esclerostina, la cual inhibe la formación de hueso (45). Esta proteína juega un papel fundamental en la homeostasis del hueso, ya que es un potente antagonista de la vía de señalización wnt, vía que regula la diferenciación de células madre mesenquimales (MSC), restringiendo la diferenciación de condrocitos y adipocitos y favoreciendo la de los osteoblastos. También favorece su maduración y supervivencia e inhibe a los osteoclastos (44). En condiciones normales la esclerostina sólo es secretada a partir de osteocitos maduros (47), pero *Chen D et al*.(2013) (46), demuestra que el HIF-1 α es capaz de estimular los osteoblastos para que la secreten.

Aunque los mecanismos por los cuales el HIF-1 α activa la expresión del gen SOST y por tanto la producción de esclerostina no son aún bien conocidos, lo que sí está claro es que la sobreexpresión de esta proteína inhibe potentemente la formación de hueso (46, 48) y estimula la resorción ósea disminuyendo la osteoprotegerina, proteína inhibidora de la resorción ósea (49), e incrementando la diferenciación osteoclástica (50). Sería posible pensar que estos procesos son los que tomarían el rol principal pasadas las primeras semanas en los defectos realizados en la calota de las ratas Wistar que se han utilizado en este trabajo.

El parámetro utilizado en EDX para medir la neoformación ósea, es un parámetro indirecto, el porcentaje de oxígeno, que mide la actividad celular en los defectos y vascularización, pues tal como se ha visto en la introducción y está ampliamente estudiado (42), el papel del oxígeno, para la diferenciación de los osteoblastos y su actividad formadora de hueso, es imprescindible. La técnica de EDX nos permite medir el porcentaje de oxígeno en diferentes puntos de todas las muestras.

En la fig.46, de las 3 semanas de tratamiento, no se observa diferencias entre los defectos tratados y los defectos control en ninguna muestra, se puede entender que la DFO no ha tenido ningún efecto remarcable sobre la vascularización o activación osteoblástica.

Sin embargo a las 6 semanas hay algunas muestras donde vemos un valor más alto del porcentaje de oxígeno en los defectos tratados, podríamos pensar que se empieza, por tanto a ver el efecto de la DFO. Pero cuando observamos la gráfica resumen (fig.52), a las 6 semanas no existen diferencias significativas entre la media del porcentaje de oxígeno en los defectos control respecto de la de los defectos tratados. Sí existiendo una gran diferencia en ambos defectos relacionada con el tiempo, mayor porcentaje de oxígeno a las 6 semanas frente a las 3 semanas. A priori podemos pensar que la DFO no tiene efecto sobre la vascularización y actividad osteoblástica y la diferencia debida al tiempo es debido al proceso natural de cicatrización del hueso, pero tras lo observado gracias a la microCT, este significativo aumento del porcentaje de oxígeno a las 6 semanas podría estar indicándonos una alta vascularización y alta actividad celular, pero no osteoblástica como podríamos haber esperado, si no osteoclástica. Al no poder dilucidar claramente este aspecto nos hace cuestionarnos si la técnica y este marcador concretamente, es el adecuado para medir crecimiento óseo.

Tanto la microCT como el EDX nos permiten no solo cuantificar el crecimiento óseo, si no también qué tipo de hueso se está formando, es decir, la calidad del mismo.

En microCT el total del porcentaje de hueso formado se ha clasificado según las unidades Hounsfield, siguiendo la clasificación de Misch (tabla.5), lo que nos ha dado el porcentaje de cada tipo de hueso formado.

Si comparamos los defectos control frente a los tratados con DFO, vemos que tanto a las 3 como a las 6 semanas, la calidad del hueso es mejor en los defectos tratados. Ya que el porcentaje de tejido conjuntivo no óseo (D5) es menor en estos defectos y el porcentaje del hueso de mayor complejidad aparecido, en este trabajo el D2 (hueso poroso y trabecular) y D3 (hueso poroso y trabecular fino) es mayor en los defectos tratados.

Comparando en el tiempo mientras que a las 3 semanas solo hay una muestra que tenga hueso D2, a las 6 semanas esto ocurre en todas las muestras, al igual que el porcentaje de tejido no óseo es mucho menor a las 6 semanas. Por lo tanto se puede decir que aunque tal como hemos visto en la cantidad de hueso formada, a las 6 semanas se produce un retroceso, el hueso que se forma es de mejor calidad.

Es ampliamente conocido el papel del Ca y del P en el metabolismo óseo y su importancia en la formación de este tejido en cualquier estadio, bien sea por neoformación, por reparación de una fractura, como por remodelado. La codependencia de estos dos elementos entre sí (36) ha llevado a numerosos investigadores a utilizar el valor del ratio Ca/P como indicador de la calidad del hueso formado (37, 38, 39, 40), es por tanto el parámetro que se ha utilizado para medir la calidad del hueso con EDX.

En este caso sí son claramente coincidentes ambas técnicas y se ve claramente que la calidad del hueso es más alta en las muestras tratadas con DFO frente a las muestras control tanto a las 3 como a las 6 semanas. Y también es mejor la calidad de este hueso a las 6 semanas frente a las 3, de forma estadísticamente significativa. Apoya pues el resultado ya anunciado de que aunque a las 6 semanas se ha destruido hueso y hay menos, la calidad de este es mayor. También se podía intuir en las fotografías y radiografías, donde a pesar de ver la parte centrales huecas a las 6 semanas, los bordes eran prácticamente indistinguibles del tejido óseo circundante. Hace pensar en un remodelado óseo que va desde la periferia hacia el centro.

Aunque lleva años siendo estudiada, la importancia de la hipoxia (36) y de la vía del factor inducido por hipoxia 1α (HIF- 1α) en el proceso de reparación ósea, es poco conocida y muy compleja (37), así como de qué forma pueden afectar modificaciones farmacológicas sobre esta vía y finalmente qué efecto puede tener sobre la formación de nuevo tejido óseo. De ahí la importancia de este estudio donde pretendemos observar cómo afecta el uso de la DFO en esta vía y cómo se ve reflejado a través de distintas técnicas de imagen con distinta precisión conocida.

En cuanto a las limitaciones del estudio, la principal ha sido el pequeño número de muestras utilizadas, lo que en técnicas como el EDX nos ha llevado a una dispersión de datos bastante elevada. Sin embargo este es un factor que en microCT se ha compensado gracias al sistema de vóxeles que utiliza esta técnica, pudiendo considerar cada uno de ellos como una n y por lo tanto elevar este parámetro a valores que superan los cien mil por muestra.

También se ha podido observar que la maduración del hueso no ha sido completa, no encontrando ningún defecto con hueso consolidado en él, que tuviera valores de HU superiores a 1250, lo que indicaría maduración total del hueso.

La gran mayoría de estudios que se llevan a cabo sobre regeneración ósea en modelos animales utilizan la histología como metodología de base, sin embargo, tal como hemos podido ver en este estudio y tal como *Del Rosario et al* (2015) (43), dice en su estudio, la microCT es una alternativa completa y suficiente para evaluar la formación ósea en defectos de tamaño crítico.

Estas limitaciones nos llevan a pensar en posibles direcciones a las que se pueden dirigir estudios futuros. Sería muy interesante llevar a cabo un estudio longitudinal de mayor duración donde pudieran estudiarse en un mismo individuo *in vivo* a lo largo del tiempo cómo se produce dicha reparación ósea utilizando esta característica de la microCT.

Explorar nuevas vías de administración de la DFO, para que se produzca de forma controlada en el tiempo como puede ser a través de andamios vascularizados impresos en 3D (58), en nanoesferas (59) u otro tipo de estructuras que aseguren una liberación prolongada.

Finalmente de manifiesto la vía osteoclástica desencadenada por la DFO a través de la esclerostina se revela sumamente interesante, así pues, habría que planificar

estudios en esa dirección que pudieran confirmarla así como dilucidar los mecanismos que la dirigen.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Tras el estudio sobre la regeneración ósea con diferentes técnicas de imagen y del efecto de la DFO en defectos de tamaño crítico realizados en un modelo *in vivo* de ratas Wistar, las conclusiones que se han obtenido son las siguientes:

- I. Desde el punto de vista cualitativo, la microCT es la técnica de imagen más adecuada al estudio de la reparación y cicatrización del tejido óseo. La fotografía, radiografía de rayos X y el SEM-EDX se pueden usar de forma complementaria.
- II. Evaluando cuantitativamente el porcentaje de hueso formado con microCT, la deferoxamina tiene un efecto positivo sobre la formación de nuevo hueso a las 3 semanas y un efecto inhibitorio a las 6 semanas.
- III. Evaluando cuantitativamente la formación de hueso con el porcentaje de oxígeno medido en los defectos con EDX, se concluye que no es un parámetro adecuado para el estudio de la regeneración ósea.
- IV. Tanto el parámetro de los porcentajes por tipos de tejido formados medidos con microCT, como el ratio Ca/P medido con EDX confirman el efecto positivo tiempo-dependiente de la deferoxamina sobre la calidad del hueso formado en los defectos.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Standring S. **Musculoskeletal system. Grays's Anatomy.** 39 Ed. *New York, Elsevier.* 2004; 83-135.
2. Clarke B. **Normal Bone Anatomy and Physiology.** *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3: S131-S139.
3. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. **Bone biology I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization.** *Instr Course Lect.* 1996; 45:371-86.
4. Gartner LP, Hiatt JL. **Atlas color de histología.** 4ª ed. Madrid: Médica panamericana; 2006.
5. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. **Bone Histomorphometry.** *New York, Raven Press.* 1994; pp 1-12.
6. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. **Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4.** *J Biol Chem.* 2002; 277: 8648-8657.
7. Brodsky B, Persikov AV. **Molecular structure of collagen triple helix.** *Adv Protein Chem.* 2005; 70: 301-339.
8. Landis WJ. **The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystal in their organic matrix.** *Bone.* 1995; 16: 533-544.
9. Gayoso-Rodriguez M, Iñiguez-Lobeto C, Al-Majdalawi-Mohammad A, Díaz-Flores-Feo L. **Histología general. Tratado de odontología 1ª ed.** Madrid. *Smithkline Beecham, SA.* 1999; Tomo 1: 333-351.
10. Fernandez-Tresguerres, Hernandez-Gil I; Alobera-Gracia MA; Canto Pingarron M; Blanco Jerez, L. **Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado.** *Med. oral patol. oral cir.bucal.* 2006; 11-2: 151-157.
11. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I, Alobera García MA, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. **Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue.** *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11: 147-151.

12. Raisz LG. **Bone cell biology: New approaches and unanswered question.** *J Bone Miner Res.* 1993; 8: 457-65.
13. Lukert BP, Kream BE. **Clinical and basic aspects of glucocorticoid action in bone.** *Principles of bone biology. San diego, California: Academic Press.* 1996; 533-48.
14. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis P. **Bone regeneration: current concepts and future directions.** *BMC Medicine.* 2011; 9:66.
15. Heras-Ballesteros MC, García-Martín MA, García González F. **Quelantes del hierro: Situación actual y perspectivas terapéuticas.** *FFarm Hosp.* 1995; 19 (6): 323-329.
16. Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, shen X, Ramaswamy G, Jacobsen KA, Alaql ZS, Eberhardt AW, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Deng L, Clemens TL. **Activation of the hypoxia-inducible factor-1 pathway accelerates bone regeneration.** *PNAS.* 2008; 105 (2): 686-691.
17. Aguirre-Siancas E. **Influencia de la hypoxia sobre el metabolism óseo. Rol central del factor inducible por hipoxia.** *An Fac med.* 2013; 74(4): 321-325.
18. Grande-Pulido E, Martín-Centeno A, Maroto-Rey P, Solsona-Narbón E. **Biología molecular del carcinoma de células claras renales principios para un tratamiento selectivo.** *Actas Urol Esp .* 2007;
19. Sathyendra V, Darowish M. **Basic science of bone healing.** *Hand Clin.* 2013; 29: 473-481.
20. Marsell R, Einhorn T. **The Biology of fracture healing.** *Injury.* 2011; 42(6): 551-555.
21. Kocchiu-Cam L, Mattos-Vela MA. **Distracción osteogénica: una revisión de la literatura.** *KIRU.* 2013; 10(2):166-72.
22. Liu J, Kerns G. **Mechanism of guided bone regeneration: A review.** *The Open Dentistry Journal.* 2014; 8:56-65.
23. Wang HL, Boyapati L. **“PASS” principles for predictable bone regeneration.** *Implant Dent.* 2006; 15:8-17.
24. Dahlin C. **Scientific background of guided bone regeneration.** Guided Bone regeneration in implant dentistry. *Quintessence Publ.* 1994.

25. Oporto VG, Fuentes FR, Alvarez CH, Borie EE. **Recuperación de la morfología y fisiología maxilomandibular: Biomateriales en regeneración ósea.** *Int. J. Morphol.* 2008; 26(4): 853-859
26. Ibañez R. **Técnicas de medida de densidad de masa ósea.** *An Sist. Navar.* 2003; 26 (3): 19-27.
27. Merchán-Morales S, Ortega-Aranegui R, Barona-Dorado C, Rubio-Alonso L, Martínez-González JM. **Evaluación de la densidad ósea: técnicas densitométricas.** *Cient. Dent.* 2015; 12 (3): 179-186.
28. Lindhe, K. Karring, T. Lang, L. **Periodontología clínica e implantología odontológica.** *Medica Panamericana.* Madrid. 5ª Ed. 2009; p.53.
29. Misch, C. **Implantología Contemporánea.** *Elsevier Mosby.* España. 3ª ed. 2009; p 135.
30. Kwon K, Kang D, Shin B. **Multiple texture mapping of alveolar bone area for implant treatment in prosthetic dentistry.** *Comput Biol Med.* 2015; 56: 89-96.
31. Aranyarachkul P, Caruso J, Gantes B, Schulz E, Riggs M, Dus I, Yamada JM, Crigger M. **Bone density assessments of dental implant sites: 2. Quantitative cone-beam computerized tomography.** *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 20 (3): 416-424.
32. Lee S, Gantes B, Riggs M, Crigger M. **Bone density assessments of dental implants sites: 3. Bone quality evaluation during osteotomy and implant placement.** *Int J OralMaxillofac Implants.* 2007; 22 (2): 208-12
33. Muller-Karger CM, Cerrolaza M. **Un nuevo método para la simulación de la estructura ósea mediante la versión p de elementos finitos.** *IMME.* 2001; 39 (3): 23-54.
34. Norton RM, Gamble C. **Bone classification: an objective scale of bone density using the computerized tomography scan.** *Clin. Oral Impl. Res.* 2001; 12: 79-84.
35. Mondelo E. **Evaluación experimental de bisfosfonatos: aspectos básicos y regulatorios.** *Actualiz Osteología.* 2006; 2: 93-103.

36. Shapiro R, Heaney RP. **Co-dependence of calcium and phosphorus for growth and bone development under conditions of varying deficiency.** *Bone.* 2003; 32: 532-540.
37. Maté Sánchez de Val JE, Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Martínez CP-A, Mazón P, De Aza PN. **Influence of hydroxyapatite granule size, porosity and crystallinity on tissue reaction *in vivo*. Part A: Synthesis, characterization of the materials and SEM analysis.** *Clin. Oral Impl. Res.* 2015; 00: 1-8.
38. Liu H, Yazici H, Ergun C, Webster TJ, Bermek H. **An *in vitro* evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration.** *Acta Biomaterialia.* 2008; 4: 1472-1479.
39. Kourkoumelis N, Balatsoukas I, Tzaphlidou M. **Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy.** *J Biol Phys.* 2012; 38: 279-291.
40. Sotiropoulou P, Fountos G, Martini N, Michail C, Kandarakis I, Nikiforidis G. **Bone calcium/phosphorus ratio determination using dual energy X- ray method.** *Phys. Med.* 2015; 31(3): 307-313.
41. Aguirre-Siancas EE. **Influencia de la hypoxia sobre el metabolismo óseo. Rol central del factor inducible por hipoxia.** *An. Fac. Med.* 2013; 74 (4): 321-325.
42. Marenzana M, Arnett TR. **The key role of the blood supply to bone.** *Bone Research.* 2013; 3: 203-215.
43. Del Rosario C, Rodríguez-Évora M, Reyes R, González-Orive A, Hernández-Creus A, Shakesheff KM, White LJ, Delgado A, Evora C. **Evaluation of nano and micro-structure of bone regeneration by BMP-2-porous scaffolds.** *J Biomed Mater Res A.* 2015; 103 (9): 2998-3011.
44. Delgado-Calle J, Sato AT, Bellido T. **Role and mechanism of action of sclerostine in bone.** *Bone.* 2017; 96: 29-37.
45. Ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Löwik CW, van Bezooijen RL. **Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling.** *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90(1): 31-35.

46. Chen D, Li Y, Zhou Z, Wu C, Xing Y, Zou X, Tian W, Zhang C. **HIF-1 α inhibits Wnt signaling pathway by activating Sost expression in osteoblast.** *PLoS ONE*. 2013; 8(6):e65940.
47. Poole KE, Van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Löwik CW, Reeve J. **Sclerostine is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation.** *FASEB J*. 2005; 19(13): 1842-1844.
48. Rhee Y, Allen MR, Condon K, Lezcano V, Ronda AC, Galli C, Olivos N, Passeri G, O'Brien CA, Bivi N, Plotkin LI, Bellido T. **PTH receptor signaling in osteocytes governs periosteal bone formation and intra-cortical remodeling.** *J Bone Miner Res*. 2011; 26(5): 1035-1046.
49. Baron R, Kneissel M. **Wnt signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatment.** *Nat Med*. 03; 19(2): 179-192.
50. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. **Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblast controls osteoclast differentiation.** *Dev. Cell*. 2005; 8(5): 751-764.
51. Sepúlveda-Saavedra J. **Atlas de Histología. Biología tisular y celular.** 2ª Ed. *McGraw-Hill Education*. New York. 2014.
52. Ikada DE. **Challenges in tissue engineering.** *J. R. Soc. Interface*. 2006; 3(10): 589-601.
53. Bernaldes DM, Caride F, Lewis A, Martin L. **Membranas de colágeno polimerizado: Consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas.** *Rev. Cubana Invest Biomed*. 2004; 23(2): 65-74.
54. Bunyaratavej P, Wang HL. **Collagen membranes: a review.** *J. Periodontol*. 2001; 72: 215-229.
55. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Hertzen M, Scherbaum W, Becker J. **Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells.** *Clin. Oral Implants Res*. 2004; 15: 443-449.
56. Miller N, Penaud J, Foliguet B, Membre H, Ambrosini P, Plombas M. **Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable**

membranes: a histomorphometric study in a rabbit model. *J. Clin. Periodontol.* 1996; 23: 1051-1059.

57. Urlau KM, Lynn JV, Carey EG, Nelson NS, Polyatskaya Y, Donneys A, Mazzoli AC, Buchman SR. **Histologic improvements in irradiated bone through pharmaceutical intervention in mandibular distraction osteogenesis.** *J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 76(12): 2660-2668.
58. Yan Y, Chen Z, Zhang H, Guo C, Yang K, Chen K, Cheng R, Qian N, Sandler N, Zhang YS, Shen H, Qi J, Cui W, Deng L. **Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration.** *Biomaterials.* 2019; 190-191: 97-110.
59. Qiu M, Wang C, Chen D, Shen C, Zhao H, He Y. **Angiogenic and osteogenic coupling effects of deferoxamine-loaded poly(lactide-co-glycolide)-poly(ethyleneglycol)-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles.** *Appl. Sci.* 2016; 6: 290.
60. Zhen S, Du Z, Huang X, Zhuang J, Lin G, Yang Y, Ding X, Zan T. **Experimental study on the effect of desferrioxamina on targeted homing and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells.** 2019 Jan 1;33(1):85-92. doi: 10.7507/1002-1892.201809065.