

Utilización de la capacidad de calcificación y osificación de la pared arterial para conseguir regeneración ósea completa en defectos de huesos largos*

M.A. Suárez-Suárez^{a,b}, A. Murcia-Mazón^{a,b}, J.C. de Vicente-Rodríguez^{b,c}, P. Menéndez-Rodríguez^d, M.A. del Brio-León^e y P. Riera-Rovira^e

^aServicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Hospital de Cabueñes-Gijón. Gijón. ^bDepartamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas. Universidad de Oviedo. Oviedo. ^cServicio de Cirugía Oral y Máxilo-Facial. Hospital Central de Asturias. Oviedo. ^dServicio de Anatomía Patológica II. Hospital Central de Asturias. Oviedo. ^eDepartamento de Morfología y Biología Celular. Universidad de Oviedo. Oviedo.

Objetivo. Evaluar el uso de aloinjertos arteriales criopreservados como membranas de regeneración ósea guiada en defectos de hueso largo.

Material y método. Estudio experimental, prospectivo, aleatorizado y ciego. Se crearon defectos osteoperiosticos de 10 mm de longitud en el tercio medio de la diáfisis del radio de conejos de raza blanca de Nueva Zelanda. En los casos experimentales el defecto se aisló de los tejidos circundantes con un aloinjerto aórtico criopreservado, conforme a las técnicas de regeneración tisular guiada. En los controles no se colocó ningún tipo de membrana.

Resultados. No se obtuvo curación del defecto en ningún control. En 9 de los 10 defectos experimentales se observó una regeneración ósea completa, con un patrón similar al del hueso sano en los estudios con técnicas de diagnóstico por imagen, de cuantificación morfodensitométrica y de microscopía óptica y electrónica. Además, los estudios morfológicos y ultraestructurales han mostrado imágenes sugerentes de que los propios aloinjertos aórticos criopreservados pueden haber contribuido a la regeneración ósea en el defecto, por diferenciación osteoblástica de las «células calcificantes vasculares» de la pared arterial (una subpoblación de musculares lisas de la pared arterial que algunos autores consideran células madre adultas) y/o por calcificación u

osificación inducida por alteraciones en las proteínas de la matriz extracelular arterial.

Conclusiones. Es posible utilizar aloinjertos arteriales criopreservados como membranas de osteopromoción para conseguir regeneración ósea completa en defectos diafisarios de hueso largo, siendo una alternativa al uso de membranas sintéticas.

Palabras clave: regeneración ósea, regeneración tisular guiada, osteopromoción, calcificación arterial.

Use of the calcification and ossification capacity of arterial walls to achieve bone regeneration in complete defects of long bones

Aim. To assess the use of cryopreserved arterial allograft membranes in guided bone regeneration (GBR) in bone defects of long bones.

Materials and methods. Prospective randomized blind study using white New Zealand rabbits as an animal model. Bone and periosteum defects 10 mm in length were created in the middle third of the shaft of the radius of white New Zealand rabbits.

In the rabbits in the study group the bone defect was isolated from surrounding tissues with a membrane of cryopreserved aortic allograft according to guided tissue regeneration (GTR) techniques.

In the rabbits in the control group no membrane was used.

Results. The defect did not heal in any of the rabbits in the control group. In 9 out of 10 of the rabbits in the study group there was complete bone regeneration. The regenerated bone had a similar pattern to that of healthy bone in diagnostic images, in morpho-densitometric quantification studies and when seen using light and electron microscopes.

Correspondencia:

M. A. Suárez-Suárez.
Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología.
Hospital de Cabueñes-Gijón.
C/ Los Prados, 395.
33203 Gijón.
Correo electrónico: miguel.suarez@sespa.princast.es

Recibido: julio de 2004.

Aceptado: enero de 2005.

*Premio Fundación SECOT-Mapfre 2004 a trabajos relacionados con la Cirugía Ortopédica y Traumatología.

Morphological and microscopic images suggest that cryopreserved aortic allografts may have contributed to bone regeneration in the defect area by osteoblastic differentiation of calcifying vascular cells (CVC) of the arterial walls and/or by calcification or ossification induced by alterations of proteins of the arterial extracellular matrix.

Calcifying vascular cells are a sub-population of smooth muscle cells of the arterial walls that are considered to be adult stem cells by some authors.

Conclusions. It is possible to use cryopreserved arterial allografts as membranes to promote bone growth and achieve complete bone regeneration in long bone shaft defects. These membranes can be used as an alternative to synthetic membranes.

Key words: *bone regeneration, guided tissue regeneration, osteopromotion, arterial calcification.*

En la diáfisis de los huesos largos se pueden producir defectos segmentarios como consecuencia de grandes traumatismos o de una resección quirúrgica con fines terapéuticos (tumores óseos, quistes, osteomielitis, etc.) que, si no se tratan convenientemente, suelen evolucionar hacia una pseudoartrosis, con importantes consecuencias clínicas y funcionales para el paciente. Se han desarrollado diferentes técnicas para provocar la regeneración ósea a su nivel como la osteogénesis por distracción, el aporte de injerto óseo y/o materiales osteoconductores u osteoinductores, las terapias celular y génica, y la regeneración ósea guiada.

Esta última técnica se basa en rodear un defecto óseo con una membrana estrechamente adaptada a sus límites y aislándolo por completo, para evitar interferencias en el proceso de osteogénesis por invasión de los tejidos conectivos circundantes y facilitar la regeneración ósea desde los extremos del defecto. Aunque ha adquirido un gran desarrollo en el tratamiento de defectos de huesos del territorio cráneo-maxilo-facial, los estudios sobre su aplicación en defectos segmentarios de la diáfisis de huesos largos son escasos y con resultados variables. Probablemente esto se deba a que el hueso largo es diferente del plano en su embriología, histología y bioquímica¹, en su patrón de curación (osificación endocondral frente a membranosa del plano) y en su capacidad reparadora (por ser menos trabecular y con menos células osteoprogenitoras susceptibles de participar en el proceso de regeneración ósea que el plano)².

Las membranas utilizadas pueden ser de materiales sintéticos no reabsorbibles o reabsorbibles. Las primeras presentan el inconveniente de que se requiere una segunda intervención quirúrgica para retirarlas una vez conseguida la regeneración ósea. Las de polímeros reabsorbibles tienen la limitación de que, además de que no se ha determinado su cinética degradativa ideal, se han descrito fenómenos de

intensa reacción de cuerpo extraño, con osteólisis masiva y destrucción del hueso que se había regenerado^{3,4}.

Por otro lado, se ha visto que las arterias son susceptibles de desarrollar calcificación en el espesor de su pared (incluso con hueso trabecular, médula ósea y fenómenos de remodelación) en procesos como la arteriosclerosis, la esclerosis de Mönckeberg de la diabetes y la insuficiencia renal, y con el envejecimiento⁵⁻⁸. Debido a esto, se ha considerado la posibilidad de utilizar esta capacidad de calcificación y osificación de las arterias para contribuir a la regeneración de hueso en defectos.

Al haberse observado que, salvo el desprendimiento de algunas células del endotelio vascular, la integridad morfológica y la estructura histológica de las arterias criopreservadas es comparable a la de arterias sanas en fresco⁹⁻¹⁴, cabe suponer que los mecanismos implicados en la calcificación de arterias en fresco pueden desarrollarse en la pared de aloinjertos arteriales criopreservados. Por ello, se ha diseñado un estudio para evaluar el uso de aloinjertos arteriales criopreservados como membranas de regeneración tisular guiada en hueso largo: se crearon defectos segmentarios en la diáfisis del radio de conejos y se rodearon de un aloinjerto aórtico criopreservado utilizado a modo de membrana de regeneración ósea guiada (grupo experimental) o se dejaron evolucionar espontáneamente (grupo control).

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron diez conejos machos de la raza blanca de Nueva Zelanda, procedentes del mismo criadero de animales de experimentación, con un peso de $4,4 \pm 0,7$ kg, y evidencia radiográfica de cierre de la placa fisaria. Los ensayos se realizaron bajo supervisión veterinaria, previa aprobación del proyecto de investigación por la Comisión de Ética y conforme a las disposiciones legales europeas (Directiva 86/609/CEE) y españolas (Real Decreto 223/1988/BOE) para el uso de animales de experimentación. La intervención se realizó en condiciones de asepsia, bajo anestesia inducida por la administración intramuscular de 5 mg/kg de xilacina, 50 mg/kg de ketamina, 1 mg/kg de acepromacina y 1 mg/kg de diazepam. Se realizó profilaxis antibiótica con cefazolina: 50 mg/kg en dosis única vía intravenosa, 15 minutos antes del inicio de la intervención, 50 mg/kg intravenosos al final de la misma y 100 mg/kg vía intramuscular en dosis única diaria durante 48 horas más.

Mediante un abordaje anterolateral directo se creó un defecto osteoperióstico de 10 mm en el tercio medio de la diáfisis del radio, mediante doble osteotomía con sierra mecánica oscilante de hojas paralelas, bajo irrigación continua con suero fisiológico.

En el grupo experimental (10 radios) se colocaron 4 grapas de alambre de acero inoxidable (0,4 mm de diámetro) entre cuatro orificios realizados con broca en cada ex-

tremo del defecto óseo. De esta forma se creó un andamiaje metálico que evitase el colapso de un aloinjerto de aorta criopreservada que se deslizó sobre las grapas, entre los extremos del defecto y a modo de tubo. La arteria se fijó a los extremos mediante suturas, para conseguir un sellado lo más perfecto posible del espacio del defecto óseo, aislándolo por completo de los tejidos circundantes. En el grupo control (10 radios) el defecto se creó de manera análoga, pero no se rodeó de aloinjerto arterial u otro tipo de membrana que aislase el defecto del tejido circundante. El cierre se efectuó por planos, la analgesia postoperatoria se realizó con flunixinina-meglumina 1,1 mg/kg/24 horas. No se utilizó ningún tipo de inmovilización externa de la extremidad, porque el cúbito intacto actúa como férula interna del radio (ya que en estos animales la membrana interósea está calcificada, determinando sinóstitosis entre cúbito y radio) y se permitió la libre deambulaci3n del animal.

Se utilizaron aloinjertos a3rticos procedentes de conejos donantes de la misma raza y del mismo criadero (para conseguir la mayor identidad genética posible con el receptor del aloinjerto). Se obtuvo su aorta, se fragmentó en segmentos de 20 mm de longitud, se sumergieron en una soluci3n crioprotectora de RPMI 1640 con L-glutamina, suero bovino fetal al 10% y dimetilsulf3xido (DMSO) al 10%, se congelaron y se conservaron en nitr3geno l3quido a -180°C hasta el momento en que fueron descongelados para su implantaci3n.

Se realizaron controles radiogr3ficos de todos los animales en el postoperatorio inmediato, mensuales hasta los 6 meses, a los 9, 12, 24 y 30 meses (según el seguimiento de cada animal) y antes y despu3s de la eutanasia, para valorar el grado de regeneraci3n de hueso en el defecto, conforme a la siguiente escala cualitativa ordinal: regeneraci3n completa (radiodensidad calcio homog3nea y continua entre los extremos del defecto), parcial (zonas con radiodensidad calcio pero sin continuidad entre los extremos del defecto) y no-regeneraci3n (ausencia de radiodensidad calcio en el defecto). Adem3s, en aquellos casos en los que se obtuvo regeneraci3n ósea completa se realizaron estudios con ecograf3a, tomograf3a computarizada (TC) y resonancia magn3tica (RM) tras la eutanasia del animal.

Sobre im3genes radiogr3ficas digitalizadas se realizaron estudios de cuantificaci3n morfom3trica y densitométrica mediante software espec3fico para procesamiento de im3genes (Leica Quantimet Q500 MCP® y DS 2000 4.0®) valorando: porcentaje de hueso regenerado en el defecto, densidad del tejido que rellena el defecto, índice medulocortical (grosor cortical/grosor medular) del hueso regenerado y del radio sano, porcentaje de recuperaci3n del grosor de la cortical del hueso regenerado (grosor cortical regenerada $\times 100$ /grosor cortical radio sano), porcentaje de recuperaci3n de la densidad de la cortical del hueso regenerado (densidad cortical regenerada $\times 100$ /densidad cortical cúbito sano), y porcentaje de recuperaci3n de la densidad de la medular del hueso rege-

nerado (densidad medular regenerada $\times 100$ /densidad medular cúbito sano). Tambi3n se realizaron estudios de cuantificaci3n densitométrica mediante TC (en unidades Hounsfield), valorando el porcentaje de recuperaci3n de la densidad de la cortical y de la medular del hueso regenerado.

Tras la eutanasia de los animales (sobredosis de pentobarbital s3dico intravenoso) se obtuvieron muestras de aorta fresca, aorta criopreservada y del defecto óseo. Se incluyeron en metacrilato (sin descalcificar) y/o en parafina (tras descalcificar con ácido etil3n-diamino-tetra-ac3tico) y se estudiaron con microscopio óptico (tinciones de hematoxilina-eosina, Von Kossa, tricr3mico de Masson, azul de toluidina, y orceína), inmunohistoquímica (factor VIII) y microscopio electr3nico de transmisi3n.

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó con el programa SPSS 10.0: estudio descriptivo, an3lisis de regresi3n, pruebas U de Mann-Whitney y T para muestras independientes (cuando se comparó el grupo experimental con el grupo control) y an3lisis de la variancia (ANOVA) de medidas repetidas (cuando se compararon las medidas de una misma variable en un mismo grupo en diferentes momentos temporales). El grado de significaci3n utilizado fue del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Estudio con técnicas de diagnóstico por la imagen

En el estudio radiogr3fico, en el defecto rodeado de aloinjerto a3rtico criopreservado (grupo experimental) se observó un progresivo aumento de densidad en la zona del defecto, llegando a restablecerse por completo la continuidad radiogr3fica del radio en 9 de 10 casos, con un patr3n radiogr3fico corticomedular similar al del hueso sano (fig. 1). Adem3s, se observaron im3genes de sinóstitosis entre el cúbito y el radio, al nivel de la membrana interósea. Sin embargo, en el grupo en el que el defecto no se rodeó de ningún tipo de membrana y se dejó evolucionar de forma espont3nea (control), en ningún caso se restableció la continuidad radiol3gica entre los extremos del defecto, y tan sólo se observaron im3genes de capuchones redondeados densidad «calcio» en los extremos del defecto y de sinóstitosis entre cúbito y radio (figs. 2C y D).

Comparando el porcentaje de casos con ausencia de regeneraci3n en el defecto con los de regeneraci3n parcial y regeneraci3n completa a los 6 meses, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0005$, chi cuadrado) entre el grupo experimental y el control (tabla 1).

En las extremidades con defecto rodeado de aloinjerto arterial criopreservado, en el estudio ecogr3fico, TC y RM tambi3n se observó regeneraci3n ósea completa en el defecto, con un patr3n corticomedular similar al del hueso sano (figs. 2A y B).

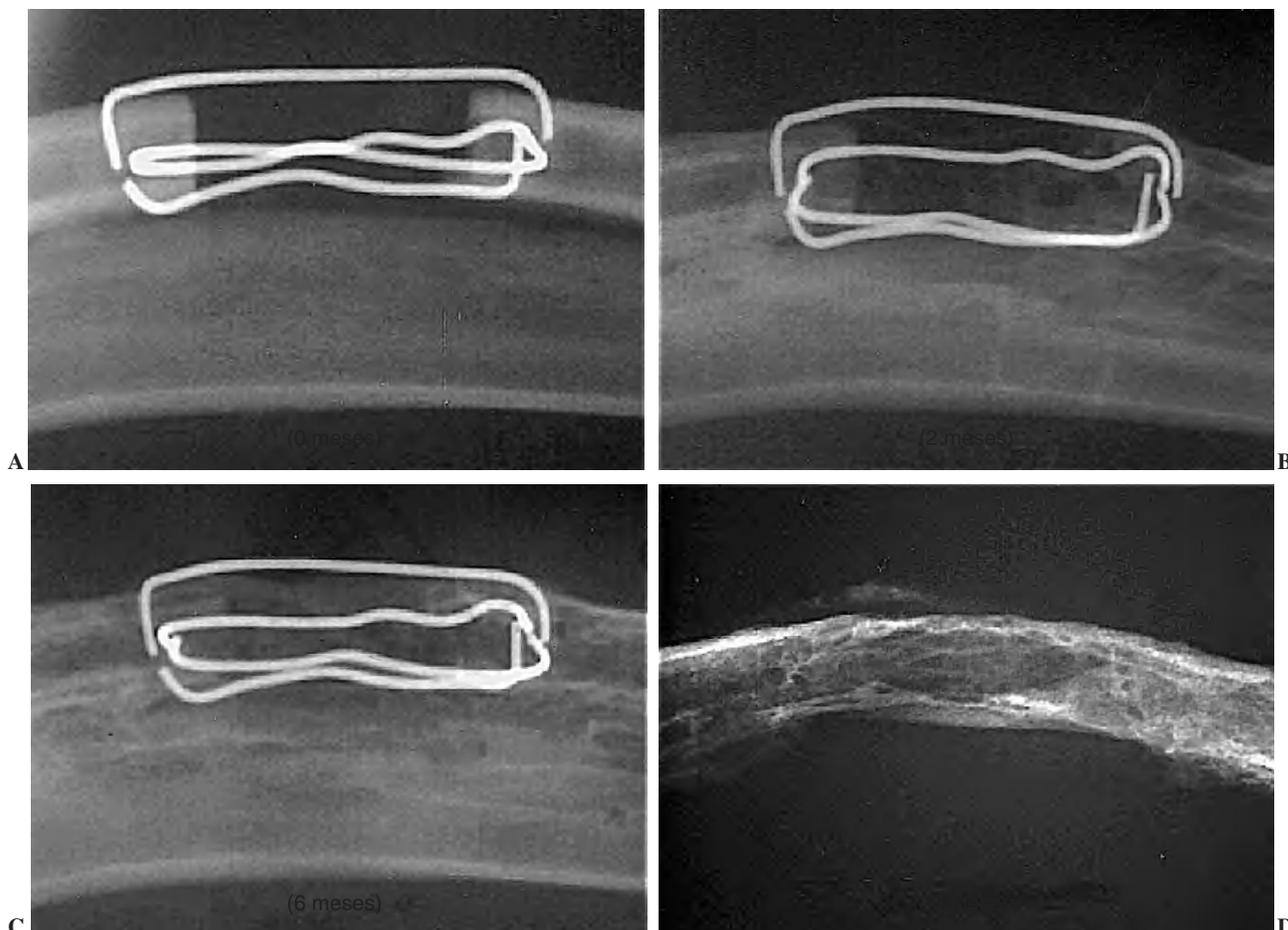


Figura 1. Radiografías en el grupo experimental en el postoperatorio inmediato (A), 2 meses (B), 6 meses (C) y 30 meses (D) con regeneración ósea completa.

Estudios de cuantificación morfométrica y densitométrica

Al comparar el porcentaje de hueso regenerado y la densidad del defecto en el grupo experimental y en el control (tabla 2) se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los momentos temporales ($p < 0,05$; U de Mann-Whitney y T para muestras independientes) excepto a los 0 meses (por ser el postoperatorio inmediato) y a los 30 meses (porque en ese momento se comparaban sólo dos casos experimentales frente a dos controles y las pruebas estadísticas utilizadas no poseen potencia suficiente para detectar diferencias significativas con muestras de tamaño tan pequeño). Además, en el grupo experimental se observó un progresivo incremento mensual del porcentaje de hueso regenerado y de la densidad del defecto hasta el tercer y cuarto mes, respectivamente ($p < 0,05$; ANOVA de medidas repetidas), para a partir de entonces estabilizarse en el tiempo (tabla 3). Sin embargo, en el grupo control no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de cada mes y el inmediatamente siguiente ($p > 0,05$; ANOVA de medidas repetidas).

Por lo que respecta al grosor y la densidad del hueso regenerado en el defecto (tabla 4), se observó una progresiva recuperación desde el postoperatorio inmediato hasta el segundo mes para la densidad de la medular, hasta el cuarto mes para la densidad de la cortical y hasta el duodécimo mes para el grosor de la cortical ($p < 0,05$; ANOVA de medidas repetidas), estabilizándose a partir de entonces en valores cercanos a los del hueso sano. Sin embargo, en el estudio de densidades mediante TC no se observaron diferencias porque, al realizarse una vez sacrificado el animal, tan sólo había 2-3 casos en cada grupo de comparación y las pruebas estadísticas utilizadas no poseían potencia suficien-

Tabla 1. Regeneración en el defecto en el grupo experimental y en el grupo control a los 6 meses y comparación entre ambos

	Número de casos	No regeneración	Regeneración parcial	Regeneración completa
Experimental	10	0%	10%	90%
Control	10	40%	60%	0%

Prueba de Chi cuadrado (corrección de Pearson): $p < 0,0005$.

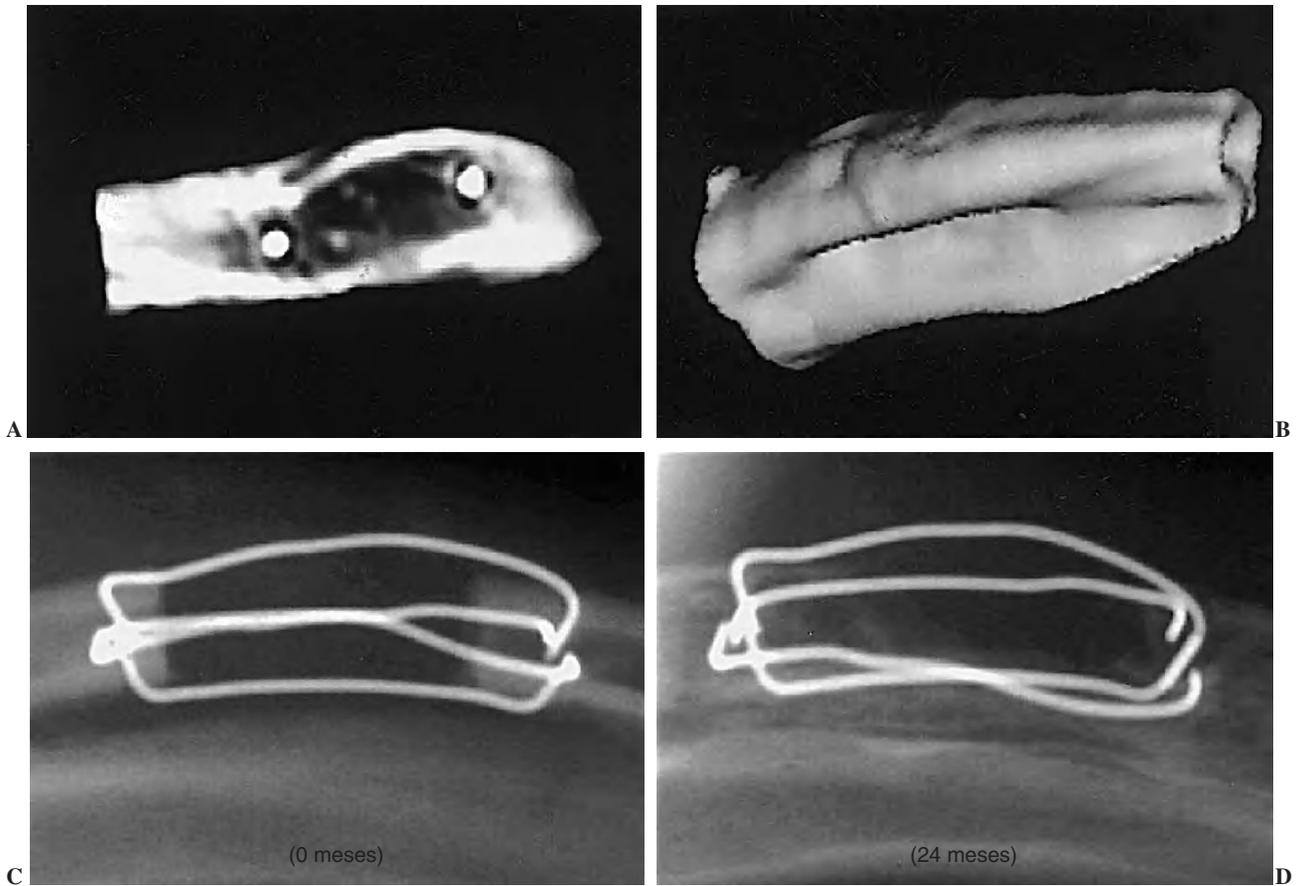


Figura 2. Imágenes de tomografía axial con regeneración ósea completa en el grupo experimental (A) y reconstrucción tridimensional del radio y la membrana interósea calcificada (B). Radiografías en el grupo control en el postoperatorio inmediato (C) y a los 24 meses (D) con ausencia de regeneración ósea.

Tabla 2. Comparación entre el grupo experimental y el grupo control en cada momento temporal (prueba T para muestras independientes) e intervalo de confianza (IC) del 95% de la diferencia

	Porcentaje de hueso regenerado			Densidad del defecto		
	Significación	IC 95% diferencia		Significación	IC 95% diferencia	
		Valor de p	Límite inferior		Límite superior	Valor de p
0 meses				0,433	-3,3	7,4
1 mes	< 0,0005	32,4	51,2	< 0,0005	12,3	31,8
2 meses	< 0,0005	52,2	73,04	< 0,0005	22,8	55,9
3 meses	< 0,0005	65,8	87,8	< 0,0005	37,1	75,8
4 meses	< 0,0005	62,6	89,6	< 0,0005	43,9	84,3
5 meses	< 0,0005	62,1	90,03	< 0,0005	46,5	86,3
6 meses	< 0,0005	58,7	89,6	< 0,0005	44,4	83,5
9 meses	< 0,0005	57,2	92,4	< 0,0005	49,1	88,9
12 meses	< 0,0005	59,2	93,7	< 0,0005	47,5	87,8
24 meses	< 0,0005	62,6	87,2	0,002	41,4	92,2
30 meses	0,085	-54,1	207,4	0,097	-42,5	176,29

te para detectar diferencias significativas con muestras de tamaño tan pequeño.

El índice medulocortical del hueso regenerado disminuyó progresivamente desde el cuarto mes (momento en el que comienzan a delimitarse claramente la cortical y la me-

dular) hasta el noveno mes ($p < 0,05$; ANOVA de medidas repetidas) para, a partir de entonces, estabilizarse en el tiempo (tabla 4) en valores cercanos a los del hueso sano, aunque tampoco llegan a alcanzarse por completo a los 24 meses, persistiendo diferencias estadísticamente significati-

Tabla 3. Prueba ANOVA de medidas repetidas: comparación entre cada momento temporal y el inmediatamente siguiente en el grupo experimental

	Porcentaje de hueso regenerado	Densidad del defecto
0-1 mes	< 0,0005	< 0,0005
1-2 meses	< 0,0005	0,074
2-3 meses	0,001	0,057
3-4 meses	0,823	0,034
4-5 meses	1	1
5-6 meses	1	1
6-9 meses	1	1
9-12 meses	1	1
12-24 meses	1	1
24-30 meses	1	1

vas ($p < 0,05$; U de Mann-Whitney y T para muestras independientes) entre el hueso regenerado y el sano (tabla 5).

A pesar de que en el experimento se produjo un defecto segmentario en la diáfisis del radio, no se observaron variaciones en la densidad, ni en el grosor, ni en el índice medulocortical del cúbito o del radio de los extremos del defecto a lo largo del tiempo ($p > 0,05$; ANOVA medidas repetidas). El análisis de regresión de los resultados obtenidos en el grupo experimental determinó el modelo curvilíneo al que mejor se ajustaba la curva de evolución temporal de cada variable, así como la fórmula con la que mejor se calculaba el valor de cada variable en cada momento temporal, el coeficiente de correlación y la predecibilidad de la misma (tabla 6).

Tabla 4. Prueba ANOVA de medidas repetidas: comparación entre cada momento temporal y el inmediatamente siguiente en el grupo experimental

	Recuperación densidad medular	Recuperación densidad cortical	Recuperación grosor cortical	Índice medulocortical
0-2 meses	< 0,0005	—	—	—
2-4 meses	1	< 0,0005	< 0,0005	—
4-6 meses	1	0,591	0,071	0,023
6-9 meses	1	1	0,001	0,006
9-12 meses	1	1	0,011	0,151
12-24 meses	1	1	1	1
24-30 meses	1	1	1	1

Tabla 5. Comparación entre el hueso regenerado en el grupo experimental y el hueso sano (prueba T para muestras independientes) e intervalo de confianza del 95% de la diferencia

	Índice medulocortical		
	Significación	Intervalo de confianza del 95% diferencia	
	Valor de p	Límite inferior	Límite superior
4 meses	< 0,0005	6,32	13,29
6 meses	< 0,0005	4,08	7,95
9 meses	< 0,0005	2,34	5,08
12 meses	< 0,0005	1,51	4,02
24 meses	0,002	1,17	3,65
30 meses	0,236	9,30	14,65

Tabla 6. Análisis de regresión: fórmula para calcular el valor de cada variable en cada mes en el grupo experimental, predecibilidad y coeficiente de correlación

	Cálculo del valor en cada mes	Predecibilidad	Correlación
% hueso regenerado	$21,9 + 21,9 \text{ meses} - 1,6 \text{ meses}^2 + 0,03 \text{ meses}^3$	61,1%	0,78
Densidad defecto	$70,7 + 20,5 \text{ meses} - 1,4 \text{ meses}^2 + 0,02 \text{ meses}^3$	45,1%	0,67
Índice medulocortical	$1,2 + 4,4/\text{meses}$	35,6%	0,59
% recuperación grosor cortical	$-1,6 + 9,9 \text{ meses} - 0,4 \text{ meses}^2 + 0,005 \text{ meses}^3$	72,9%	0,85
% recuperación densidad cortical	$5,5 + 17,8 \text{ meses} - 1,1 \text{ meses}^2 + 0,02 \text{ meses}^3$	79,5%	0,89
% recuperación densidad medular	$19,5 + 15,7 \text{ meses} - 1,1 \text{ meses}^2 + 0,02 \text{ meses}^3$	42,7%	0,65
% recuperación densidad cortical (valoración TC)	$0,8 + 16,9 \text{ meses} - 0,9 \text{ meses}^2 + 0,01 \text{ meses}^3$	89,4%	0,94
% recuperación densidad medular (valoración TC)	$1,1 + 17,4 \text{ meses} - 1,01 \text{ meses}^2 + 0,01 \text{ meses}^3$	88,1%	0,93

Estudio con microscopio óptico y electrónico

En el espesor de la pared del aloinjerto aórtico criopreservado (una vez descongelado y antes de ser implantado) se observaron imágenes histológicas similares a las de las arterias sanas en fresco, con células endoteliales en la capa íntima (fig. 3A) y musculares lisas en la capa media (fig. 3B), ambas de aspecto viable.

En los defectos «control» se observó ausencia de regeneración ósea completa, con tan sólo una pequeña cantidad de hueso cortical obliterando la cavidad medular en los extremos del defecto, mientras que la zona central del defecto se encontraba ocupada por tejido fibroso y músculo que penetraban desde el tejido circundante.

En los defectos «experimentales» se observó regeneración completa de hueso entre los extremos del defecto (fig. 4A), dentro de los límites de la arteria (figs. 4B, C y D y 5A) y con imágenes sugerentes de un proceso de osificación endocondral (fig. 4B), con una capa cortical homogénea y progresivamente más gruesa según el tiempo transcurrido des-

de la intervención (figs. 4A y 5A), y que se adaptaba estrechamente a los límites y contornos de la pared arterial (figs. 4B, C y D y 5A) y un espacio medular ocupado por tejido hematopoyético (fig. 4A).

Llama la atención la íntima relación entre la cortical del hueso regenerado y la pared del aloinjerto aórtico criopreservado, con unión directa, sin ninguna capa de tejido conectivo de interposición (figs. 4C y D y 5A). Además, se observó la formación de hueso entre las láminas elásticas de la pared arterial (figs. 5A y C), incluso con fragmentos de láminas elásticas completamente osteointegradas y rodeadas de hueso regenerado (figs. 5A y D).

También se puso de manifiesto la presencia de «zonas de transición» entre la pared arterial y el hueso regenerado, en las que la matriz extracelular de la capa media arterial presentaba aspecto cartilaginoso (figs. 6C y D) o estaba calcificada (fig. 5B), con imágenes de progresiva transformación hacia hueso regenerado (figs. 6B, C y D).

En el espesor de la pared arterial y con microscopía electrónica, incluso se observaron células con fenotipo de

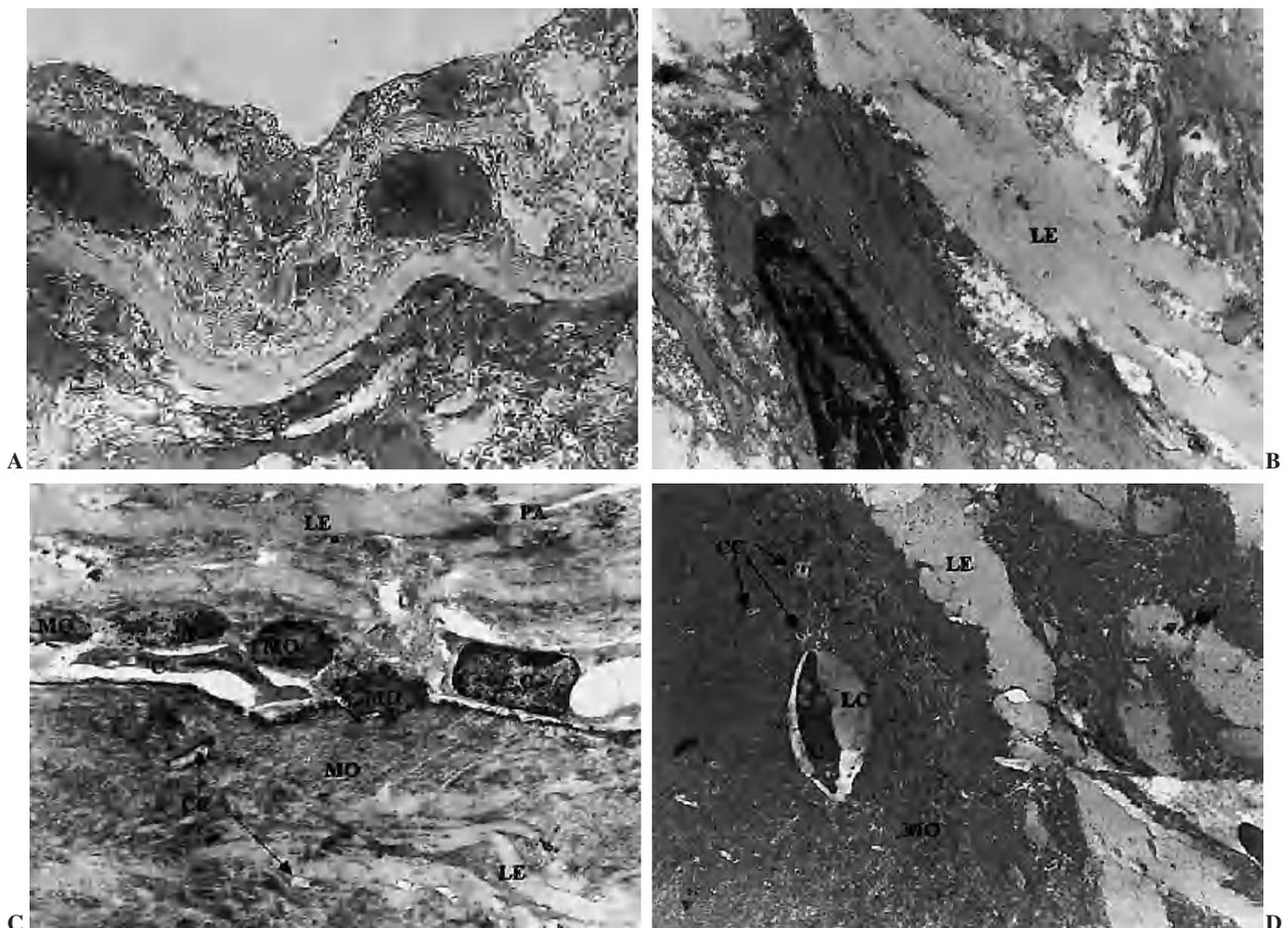


Figura 3. Imágenes ultraestructurales de la íntima (A) y la capa media (B) de un aloinjerto aórtico criopreservado antes de ser implantado y del frente de osificación que se desarrolla en el espesor de su pared una vez implantado (C y D). LE: lámina elástica; MO: matriz ósea; C: célula; CC: canaliculo calcóforo; LC: laguna celular; PA: pared arterial.

células musculares lisas vasculares, en estrecha relación con distintas cantidades de sustancia osteoide que parecen estar produciendo (fig. 3C), así como de imágenes de osteocitos y matriz ósea en íntima relación con las láminas elásticas de la capa media (fig. 3D). No se hizo evidente la presencia de ningún tipo de infiltrado inflamatorio o células gigantes de cuerpo extraño que pudiesen sugerir un proceso de respuesta inmune de rechazo al aloinjerto aórtico criopreservado.

DISCUSIÓN

Clásicamente se atribuye la regeneración ósea guiada a la capacidad de la membrana para aislar el defecto, aceptándose que el hueso que se forma en el espacio delimitado por la membrana se regenera a expensas de células osteoprogenitoras y factores de crecimiento de la médula ósea, del endostio, de los restos de periostio de los extremos de la osteotomía y de los sistemas de Havers y de Volkman de los extremos óseos¹⁵⁻¹⁹.

Se especula con que las células tendrían diferente velocidad de migración para rellenar un defecto óseo, de tal forma que las células del tejido conectivo circundante invadirían el defecto, interfiriendo con la regeneración ósea, al tener una velocidad de migración superior a la de las células capaces de diferenciarse hacia osteoblastos^{2,20,21}. Por tanto, la membrana facilitaría la osteogénesis, porque aislaría el defecto del tejido blando circundante, evitaría su invasión por células que competirían con las células osteoprogenitoras por ocupar el espacio vacío y que podrían interferir en la diferenciación celular hacia líneas osteoprogenitoras, y aumentaría la concentración de factores osteoinductores^{18,21,22}.

Algunos autores han sugerido que la propia estructura de la membrana también podría influir, sobre todo en las de polímeros sintéticos, al comportarse como un material osteoconductor que guiaría las células osteogénicas y facilitaría el crecimiento óseo²². Incluso se ha llegado a afirmar que la composición química de la membrana podría facilitar la osteogénesis *per se* y/o por generar una cierta reacción infla-

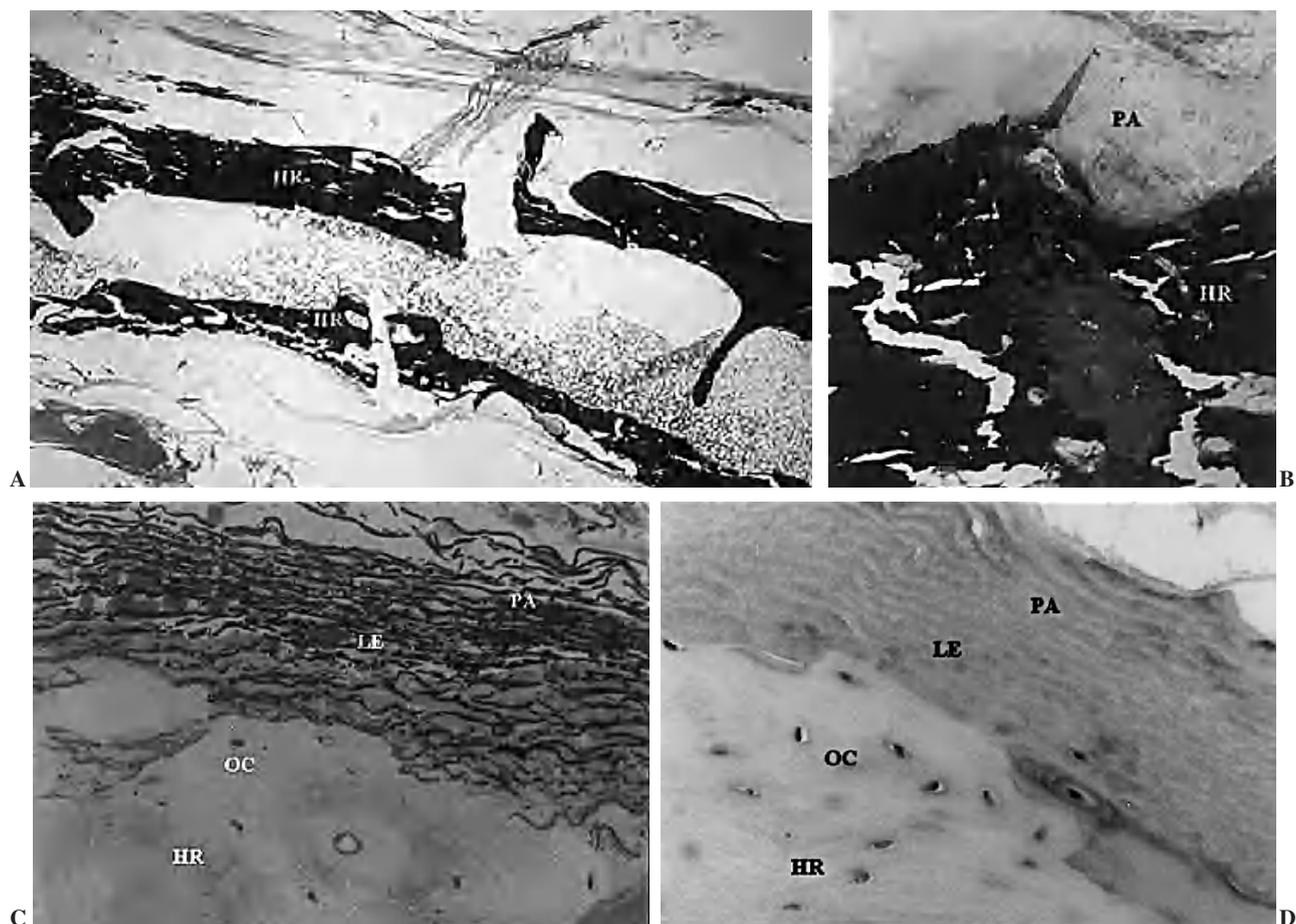


Figura 4. Imágenes histológicas de tinciones de Von Kossa (A y B), azul de toluidina (C) y hematoxilina-eosina (D) del hueso regenerado en el defecto y de la zona de unión con la pared del aloinjerto arterial. HR: hueso regenerado; PA: pared arterial; LE: lámina elástica; OC: osteocito.

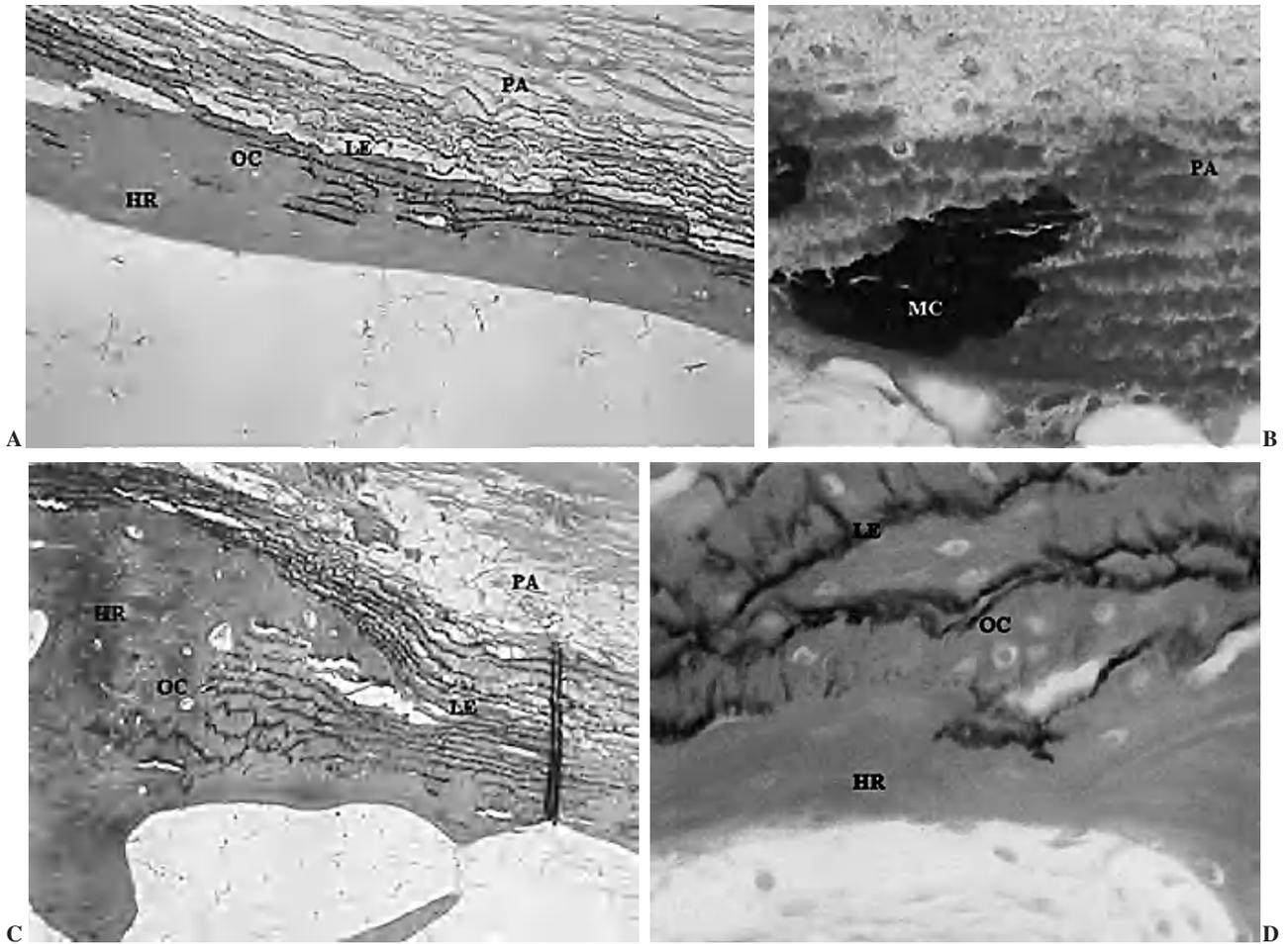


Figura 5. Imágenes histológicas de tinciones de orceína (A, C y D) y Von Kossa (B) y tricrómico de Masson (D) de la pared del aloinjerto arterial y de su unión con el hueso regenerado. HR: hueso regenerado; PA: pared arterial; LE: lámina elástica; OC: osteocito; MC: matriz calcificada.

matoria local, ya que las células inflamatorias son capaces de producir citocinas que podrían estimular a las células de linaje osteoblástico por un mecanismo paracrino²².

Al revisar la literatura, los resultados publicados con diferentes membranas de regeneración ósea guiada en defectos segmentarios de hueso largo varían desde poco satisfactorios²³ a muy buenos^{18,19,21,22}, a pesar de tener diseños experimentales bastante homogéneos. Coincidimos con Giardino et al¹⁸ en que esta aparente disparidad de resultados puede ser debida a que la evaluación de los mismos se realiza con diferentes tiempos de seguimiento, y a que se han utilizado membranas de diferentes materiales, con distintas características físico-químicas y, por tanto, diferente cinética degradativa y porosidad, habiéndose constatado que la regeneración ósea se ve influida por todas ellas.

En los defectos «control» nuestros hallazgos coinciden con los de otros autores que emplean modelos experimentales similares en defectos de 10 mm de radio de conejos^{2,15,16,18,22,23}: ausencia de unión completa, regeneración ósea limitada a una pequeña cantidad neoformada en los ex-

tremos de la osteotomía (en forma de capuchón y obliterando la cavidad medular) y zona central del defecto ocupada por tejido fibroso y muscular que penetran desde el tejido circundante (al no existir ningún tipo de barrera de membrana que lo impida).

Sin embargo, en los defectos rodeados de aloinjerto arterial criopreservado se ha observado regeneración ósea completa en el 90% de los casos, con un patrón corticomedular establecido y en continuidad con los extremos del defecto. Estos resultados son comparables a los mejores de diseños experimentales similares con otros tipos de membranas^{18,19,21,22}. Tan sólo se presentó un caso de ausencia de unión ósea completa, con calcificación parcial en el defecto, y coincidimos con la opinión de Meining et al¹⁶ en que podría atribuirse no a un fracaso de la técnica de membrana como tal, sino a una mal unión entre el hueso y la membrana en la zona en que ésta sobrepasa los extremos de la osteotomía. Si el sellado a este nivel es deficiente se produciría la invasión por tejido fibroso que se interpondría entre el hueso que crece desde los extremos, interfiriendo con la regeneración ósea y evitando la unión ósea completa. Ade-

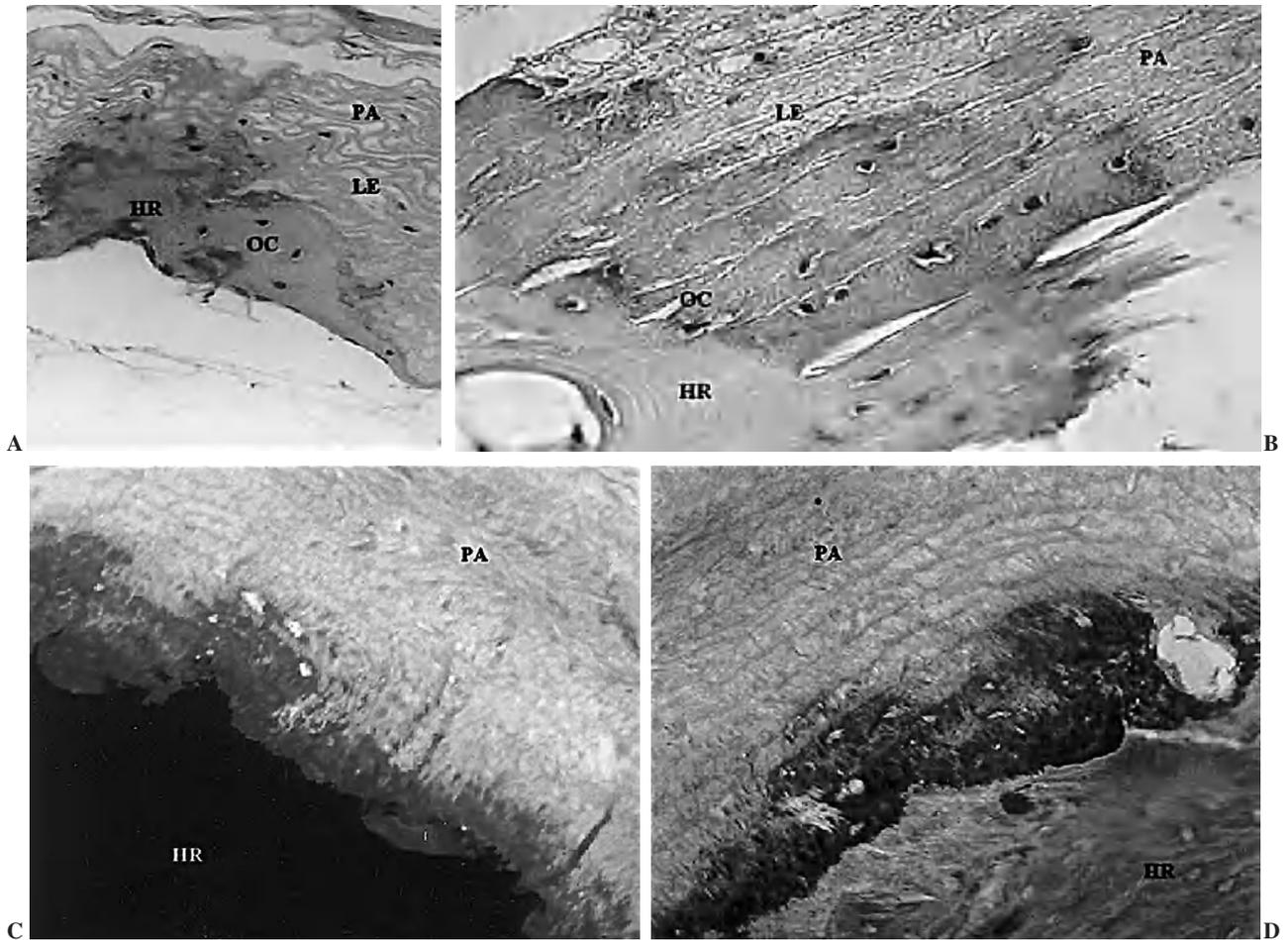


Figura 6. Imágenes histológicas de tinciones de hematoxilina-eosina (A y B), Von Kossa (C) y tricrómico de Masson (D) de la unión entre el hueso regenerado y la pared del aloinjerto arterial. HR: hueso regenerado; PA: pared arterial; LE: lámina elástica; OC: osteocito.

más, podría influir el hecho de que la estabilidad mecánica en el defecto óseo durante la regeneración está determinada sólo por la sinóstosis entre radio y cúbito, sin que se hayan utilizados sistemas de fijación interna o externa. Tal vez esta estabilidad no sea suficiente en situaciones de importante demanda funcional en algún animal, lo que podría haber contribuido a la ausencia de unión ósea completa observada en un caso experimental.

El estudio con técnicas de cuantificación ha puesto de manifiesto que, cuando el defecto se rodea de aloinjerto arterial criopreservado, tanto el porcentaje de hueso regenerado, como la densidad del defecto aumentan progresivamente desde el postoperatorio inmediato hasta el tercer y cuarto mes, respectivamente. A partir de ese momento los incrementos dejan de ser estadísticamente significativos, y sus valores se estabilizan a lo largo del tiempo. Coincidimos con otros autores^{16,19} en que estos hallazgos se podrían explicar sobre la base de la posible secuencia de formación de hueso en el defecto: la luz del tubo que forma la aorta se rellenaría de un hematoma de fractura, progresivamente se organizaría, sufriría invasión celular y, a partir de los extre-

mos de la osteotomía y de forma centrípeta, se rellenaría de hueso inmaduro continuo. Posteriormente tendrían lugar procesos de remodelación ósea, con lo que el tejido laminar se orientaría y el hueso adquiriría un patrón corticomodular claramente identificable en torno al cuarto mes. Sin embargo, en los casos en los que el defecto no se rodea de aloinjerto arterial criopreservado y se deja evolucionar espontáneamente (control), el hematoma se reemplazaría rápidamente por tejido conectivo y muscular que invaden el defecto desde los tejidos circundantes, lo que interferiría en la regeneración ósea que, de esta forma, se vería limitada a los extremos de la osteotomía y al borde del cúbito^{18,19}.

En el hueso regenerado en el defecto, mientras que la medular alcanza valores de densidad cercanos a los del hueso sano en el segundo mes postoperatorio, merced a procesos de remodelación la cortical continúa aumentando su densidad hasta el cuarto mes y su grosor hasta el duodécimo. A partir de entonces, se estabiliza en valores cercanos a los del hueso sano, aunque sin llegar a alcanzarlos por completo. Estos hallazgos coinciden con los de otros autores^{2,18} que, con 12 meses de seguimiento, obtienen hue-

so regenerado con un grosor cortical en torno al 75% del hueso sano. Tal vez la sinóstosis radio-cubital que se forma por calcificación de la membrana interósea condicione el que se deriven tensiones de carga desde el cúbito hacia el radio, con lo que el hueso regenerado podría verse privado del estímulo mecánico necesario para remodelar y adquirir la morfología, grosor cortical y densidad propias del hueso sano.

El hallazgo más característico de nuestro estudio lo constituye el hecho de que, en defectos de hueso largo, mientras que con membranas de poliuretano²³, poli-tetrafluoro-etileno expandido^{2,15}, ácido poli-L-láctico^{16,17}, poli-DL-láctico^{18,21}, poli-D-láctico y poli-L/D-láctico²² se presentó una capa de tejido conectivo entre el hueso regenerado y la membrana, en nuestro trabajo se observó una unión directa entre el hueso regenerado y la pared del aloinjerto aórtico criopreservado, sin ninguna capa de tejido de interposición, lo que, coincidiendo con la opinión de otros autores^{22,24} sería una señal de su excelente biocompatibilidad. Sólo se había observado unión directa entre la membrana y el hueso regenerado al utilizar membranas de ácido poli-L/DL-láctico, y sólo en algunas zonas, lo que se podría explicar por fenómenos de erosión no homogénea de la superficie de la membrana: en esas zonas se expondrían grupos químicos con una afinidad proteica tal que permitiría el anclaje y crecimiento de células osteogénicas en contacto directo con la membrana²⁴.

En todo caso, las imágenes más impactantes se han obtenido en el espesor de la pared arterial: se han observado células con una morfología similar a la de las células musculares lisas vasculares rodeadas de matriz ósea que ellas mismas parecen estar produciendo, así como imágenes sugerentes de progresiva transformación de la matriz extracelular arterial, primero hacia la matriz calcificada y posteriormente hacia el hueso de aspecto sano, con tejido óseo entre las láminas elásticas de la pared arterial y fragmentos de láminas elásticas completamente osteointegradas y rodeadas de hueso.

Todo ello hace suponer que al usar aloinjertos arteriales criopreservados como membranas de regeneración ósea guiada, se pueden desencadenar procesos de calcificación y osificación adicionales a los que se presentan con las membranas sintéticas, a expensas de la diferenciación de células de la pared arterial hacia células osteoblásticas capaces de producir hueso y a la osificación inducida por alteraciones en las proteínas de la matriz extracelular arterial.

De hecho, se ha visto que las arterias son susceptibles de desarrollar calcificación y osificación en el espesor de su pared (incluso con hueso trabecular, médula ósea y fenómenos de remodelación) en procesos como la arteriosclerosis, la esclerosis de Mönckeberg de la diabetes y la insuficiencia renal y con el envejecimiento^{5,6}.

Este proceso de calcificación y osificación arterial se considera que se debe a la diferenciación osteoblástica de

una subpoblación de las células musculares lisas de la capa media denominadas células calcificantes vasculares (CVC) y que se han identificado en cultivos de células musculares lisas de la pared arterial, porque crecen en forma de agregados celulares formando nódulos capaces de calcificar⁷. Su estirpe muscular lisa vascular se ha comprobado porque expresan marcadores propios de éstas, como son la alfa-actina muscular lisa, la vimentina y la calponina⁸ y su fenotipo osteoblástico mediante un marcador de función tan propio de los osteoblastos como es la fosfatasa alcalina⁸. Incluso se ha demostrado que expresan marcadores propios de las células madre como son el 3G5 y el CD44, por lo que algunos trabajos recientes sugieren que se trata de células madre adultas de la pared arterial que, ante determinados estímulos, son capaces de diferenciarse hacia osteoblastos⁷.

También se ha sugerido la posible implicación de alteraciones de proteínas de la matriz extracelular arterial que, en condiciones normales, actúan inhibiendo la mineralización de la misma (osteopontina, osteonectina, osteoglicina, fibrilina-1, péptido relacionado con la parathormona, proteína Gla de matriz, proteoglicanos), la formación de partículas de membrana (por daño, apoptosis o muerte de células de la pared arterial) que se comportarían como «vesículas de matriz» para servir de lugar de inicio de la calcificación de la matriz extracelular arterial y que, además de las células musculares lisas, las células del endotelio vascular serían capaces de «trans-diferenciarse» y adquirir un fenotipo osteoblástico ante ciertos estímulos⁵⁻⁸.

Coincidiendo con otros autores⁹⁻¹⁴ hemos observado que, salvo el desprendimiento de algunas células del endotelio vascular, la integridad morfológica y la estructura histológica de los aloinjertos arteriales criopreservados es comparable a la de arterias sanas en fresco. Por ello que cabe suponer que los mismos mecanismos implicados en la calcificación de arterias en fresco, también pueden determinar calcificación y osificación de aloinjertos arteriales criopreservados utilizados como membranas de regeneración ósea guiada. De hecho, ya se había observado calcificación y osificación en la pared de aloinjertos arteriales criopreservados trasplantados en intervenciones de cirugía vascular^{9-11,25-27}.

Por tanto, cuando se utilizan aloinjertos aórticos criopreservados como membranas de regeneración ósea guiada en defectos de hueso largo, como consecuencia de la criopreservación, de la localización ectópica del aloinjerto o de un posible mecanismo de respuesta inmune de rechazo, es posible que se produzca diferenciación osteoblástica de células vasculares y alteración de proteínas de la matriz extracelular, que podrían determinar calcificación y osificación de la pared arterial y, por tanto, influir y participar en el proceso de regeneración ósea guiada, contribuyendo a la formación de hueso en el defecto. De esta forma, y por primera vez en la literatura científica, se establece la posibilidad de que un proceso biológico no deseable por sus efectos

perjudiciales para la salud (la calcificación y osificación de la pared arterial) pueda utilizarse para contribuir a implementar la regeneración en defectos óseos.

Los inconvenientes potenciales del uso de aloinjertos aórticos criopreservados como membranas de regeneración ósea guiada estarían relacionados con una posible respuesta inmune de rechazo al aloinjerto, la posibilidad de transmitir enfermedades infecciosas, así como las dificultades propias de la obtención, procesamiento y almacenaje de aloinjertos criopreservados. Sin embargo, según la experiencia clínica con el uso de aloinjertos musculoesqueléticos, a los actuales protocolos de funcionamiento de los bancos de tejidos y a las modernas pruebas serológicas, se puede considerar que el riesgo de transmitir enfermedades infecciosas virtualmente se ha eliminado^{28,29}.

Por lo que respecta a una posible respuesta inmune de rechazo al aloinjerto aórtico criopreservado, en nuestro estudio no se han observado imágenes histológicas de infiltrados inflamatorios o células gigantes de cuerpo extraño que pudiesen sugerirla, tal vez porque la criopreservación hace que disminuya la antigenicidad del aloinjerto arterial^{9-11,30} y/o porque el conejo donante y el receptor procedían del mismo criadero de animales de experimentación y, por tanto, tendrían un grado de identidad genética bastante alto.

En conclusión, sobre la base de los resultados obtenidos, conforme a la hipótesis de trabajo y en el contexto de nuestro modelo experimental, se puede afirmar que, utilizando aloinjertos aórticos criopreservados como membranas de regeneración ósea guiada en defectos segmentarios en la diáfisis de huesos largos se puede obtener regeneración ósea completa del defecto, con hueso similar al sano, y con imágenes morfológicas y ultraestructurales que sugieren la posibilidad de que células vasculares viables del aloinjerto se diferencien hacia células productoras de hueso para, junto con alteraciones en proteínas de la matriz extracelular de la pared arterial, contribuir a la calcificación y osificación de la misma y a la regeneración ósea en el defecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. *Nature*. 1997;386:78-81.
- Nyman R, Magnusson M, Sennerby L, Nyman S, Lundgren D. Membrane-guided bone regeneration. Segmental radius defects studied in the rabbit. *Acta Orthop Scand*. 1995;66:169-73.
- Böstman OM, Pihlajamäki HK. Adverse tissue reactions to bioabsorbable fixation devices. *Clin Orthop*. 2000;371:216-27.
- Schmitz JP, Lemke RR, Zardeneta G, Hollinger JO, Milam SB. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a guidor membrane for guided bone regeneration: case report. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58:888-93.
- Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev*. 2001;21:274-301.
- Watson KE. Pathophysiology of coronary calcification. *J Cardiovasc Risk*. 2000;7:93-7.
- Tintut Y, Alfonso Z, Saine T, Radcliff K, Watson K, Boström K, et al. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation*. 2003;108:2505-10.
- Steitz S, Speer M, Curinga G, Yang H, Haynes P, Aebersold R, et al. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification. *Circ Res*. 2001;89:1147-54.
- Motomura N, Imakita M, Yutani C, Kitoh Y, Kawashima Y, Oka T. Histological change in cryopreserved rat aortic allograft. *J Cardiovasc Surg*. 1995;36:53-60.
- Motomura N, Imakita M, Yutani C, Takamoto S, Kitoh Y, Tsuji T, et al. Histologic modification by cryopreservation in rat aortic allografts. *Ann Thorac Surg*. 1995;60 Suppl 1:168-71.
- Neves JP, Gulbenkian S, Ramos T, Martins AP, Caldas MC, Mascarenhas R, et al. Mechanism underlying degeneration of cryopreserved vascular homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1997;113:1014-21.
- Arnaud F. Endothelial and smooth muscle changes of the thoracic and abdominal aorta with various types of cryopreservation. *J Surg Res*. 2000;89:147-54.
- Langerak SE, Groenink M, van der Wall EE, Wassenaar C, Vanbavel E, van Baal MC, et al. Impact of current cryopreservation procedures on mechanical and functional properties of human aortic homografts. *Transpl Int*. 2001;14:248-55.
- Osako M, Otani H, Yamamura T, Nakao Y, Hattori R, Omiya H, et al. Alloimmune response may be involved in neointimal hyperplasia in cryopreserved aortic allografts. *Transplant Proc*. 2001;33:2566-70.
- Zellin G, Linde A. Treatment of segmental defects in long bones using osteopromotive membranes and recombinant human bone morphogenetic protein-2. An experimental study in rabbits. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1997;31:97-104.
- Meining RP, Rahn B, Perren SM, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes: treatment of diaphyseal bone defects in the rabbit radius with poly(L-lactide) membrane. A pilot study. *J Orthop Trauma*. 1996;10:178-90.
- Pineda L, Büsing M, Meining R, Gogolewski S. Bone regeneration with resorbable polymeric membranes. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone healing process in large defects. *J Biomed Mater Res*. 1996;31:385-94.
- Giardino R, Fini M, Aldini NN, Giavaresi G, Rocca M, Martini L, et al. A resorbable tubular chamber for the treatment of large diaphyseal bone defects. Experimental study in rabbits. *Int J Artif Organs*. 1998;21:473-82.
- Meining RP, Büsing CM, Helm J, Gogolewski S. regeneration of diaphyseal bone defects using resorbable poly(L/DL-lactide) and poly(D-lactide) membranes in yucatan pig model. *J Orthop Trauma*. 1997;11:551-8.
- Lu S, Zhang Z, Wang J. Guided bone regeneration in long bone. An experimental study. *Chin Med J (Engl)*. 1996;109:551-4.
- Giardino R, Fini M, Aldini NN, Giavaresi G, Rocca M. Polylactide bioabsorbable polymers for guided tissue regeneration. *J Trauma*. 1999;47:303-8.
- Gogolewski S, Pineda L, Büsing CM. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV.

- Does the polymer chemical composition affect the healing process? *Biomaterials*. 2000;21:2513-20.
23. Nielsen FF, Karring T, Gogolewski S. Biodegradable guide for bone regeneration. Polyurethane membranes tested in rabbit radius defects. *Acta Orthop Scand*. 1992;63:66-9.
 24. Gugala Z, Gogolewski S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes. A preliminary study. *J Orthop Trauma*. 1999;13:187-95.
 25. Rossmann P, Lácha J, Lodererová A. Morphology and immunohistochemistry of rat aortic grafts. *Folia Microbiol*. 1999;44:339-53.
 26. Bojakowski K, Religa P, Bojakowska M, Hedin U, Gaciong Z, Thiberg J. Arteriosclerosis in rat aortic allografts: early changes in endothelial integrity and smooth muscle phenotype. *Transplantation*. 2000;70:65-72.
 27. Légaré JF, Issekutz T, Lee TDG, Hirsch G. CD8+ T lymphocytes mediate destruction of the vascular media in a model of chronic rejection. *Am J Pathol*. 2000;157:859-65.
 28. Greenwald A, Doden S, Golgberg V, Khan Y, Laurencin C, Rosier R. Bone-graft substitutes: facts, fictions and applications. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2002.
 29. Joyce M, Greenwald A, Mowe J, Kennedy J, Heim C, Rosier R. Musculoskeletal allograft tissue safety. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2002.
 30. Saito S, Fukushima N, Kobayashi Y, Tori N, Tsukamoto Y, Shirakura R. Effects of cryopreservation of aortic xenografts on graft patency and immunogenicity. *Transplant Proc*. 2000;32:2398-400.

Conflicto de intereses. Los autores hemos recibido ayuda económica para la realización de este trabajo del Fondo de Investigación Sanitaria (proyecto FIS PI-03-1005, Instituto de la Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo) dentro del Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y en Ciencias de la Salud, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) 2000-2003, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Por otra parte, ninguna entidad comercial ha pagado ni pagará a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.