

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**EL EFECTO OSTOINDUCTOR DE LA MATRIZ DE LOS
ALOINJERTOS: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN
CULTIVOS DE OSTEOLASTOS HUMANOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Carlos Vicario Espinosa

Bajo la dirección de los Doctores:

Luis López-Durán Stern
Concepción de la Piedra Gordo
Fernando Marco Martínez

Madrid, 2003

ISBN: 84-669-2138-9



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

**EL EFECTO OSTEOINDUCTOR DE
LA MATRIZ DE LOS ALOINJERTOS.**

**ESTUDIO EXPERIMENTAL EN
CULTIVOS DE OSTEÓBLASTOS
HUMANOS**

TESIS DOCTORAL

CARLOS VICARIO ESPINOSA

Madrid, 2003

TESIS DOCTORAL:

**EL EFECTO OSTEOINDUCTOR DE LA MATRIZ DE LOS
ALOINJERTOS.**

**ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CULTIVOS DE
OSTEOBLASTOS HUMANOS**

Realizada por:

Carlos Vicario Espinosa

Dirigida por:

DR. LUIS LÓPEZ-DURÁN STERN

**Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de
Medicina de la Universidad Complutense de Madrid**

**Jefe de Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica Hospital
Clínico San Carlos de Madrid.**

DRA. CONCEPCIÓN DE LA PIEDRA GORDO

**Jefe Asociado del Laboratorio de Bioquímica de la Fundación
Jiménez Díaz de Madrid.**

Doctora en Ciencias Químicas.

DR. FERNANDO MARCO MARTÍNEZ

**Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de
Medicina de la Universidad Complutense de Madrid**

**Médico Adjunto del Servicio de Traumatología y Cirugía
Ortopédica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid**

A mis padres. Esto culmina tantas cosas.

A Mónica, por todo.

“En gran número de operaciones ortopédicas es necesario utilizar injertos óseos. En ocasiones no es posible extraerlos del propio enfermo (hueso autógeno o autólogo), y resulta útil el hueso de otro ser humano (homogéneo u homólogo) o de otro animal (heterogéneo o heterólogo)”

Prof. Sanchís Olmos

“Médico soy y no soldado: mis arreos son las vendas y los unguentos; mis armas el bisturí, y mi única gloria la de dejar cojos a los que debían ser cadáveres”.

Benito Pérez Galdós, Gerona.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor López-Durán por su paciencia y oportunos consejos. Sólo la perspectiva que otorga el tiempo permite comprender muchas cosas, y esta tesis es una pequeña muestra de ello.

A la Dra. De La Piedra, quizá nadie tanto como ella haya sufrido por trabajar tan de cerca con los traumatólogos. Sin embargo espero que esta tesis apenas sea el inicio de una productiva colaboración científica.

Al Profesor Marco por su constante estímulo y apoyo. Es muy fácil trabajar con un amigo.

A la Dra. Traba, sin cuyo trabajo, esta tesis ni siquiera habría comenzado.

A Kecha, Chioly, Carmen y Mar, cuyo trabajo en el laboratorio ha sido tan eficaz como elegante. Además tuvieron que soportar mi torpeza en el mismo.

A Santiago Arlandis, imprescindible compañero de tareas en la presente tesis y de residencia con el que tanto he compartido.

A Juan Carlos Rodríguez Olaverri, porque durante cinco años de residencia ha sido no sólo un compañero, sino un amigo.

A todo el Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico San Carlos por constituir ese grupo de amigos que siempre te apoyan cuando tienes un problema por pequeño que sea.

Al Dr. López-Oliva y al Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Centro de Rehabilitación FREMAP de Majadahonda, que han sido una inestimable ayuda y estímulo en las últimas fases de esta tesis.

A Ana Leiva y a Maribel Montero por su desinteresada ayuda.

A Mónica por esa paciencia y ese apoyo incondicional en los momentos malos.

A mis padres, Santiago y Carmen, y mi hermana, Mayte. Sin ellos todo esto habría resultado absurdo.

A mis abuelos. Sé que os hubiera gustado estar conmigo.

Y en general a todos aquellos que habéis tenido que soportarme hablando sobre los osteoblastos durante estos últimos años.

MOTIVACIÓN

El comienzo de la actividad quirúrgica durante la residencia en la especialidad de Traumatología y Cirugía Ortopédica supone la introducción en un conjunto de técnicas y situaciones para el residente novel, que con frecuencia previamente desconocía por completo.

Entre toda esa avalancha de nueva información, y de técnicas quirúrgicas que supone el inicio de la residencia, en mi caso, me resultó especialmente atractivo el tema de la aplicación de aloinjertos para el tratamiento de los diversos defectos óseos. Posteriormente, cuando tuve oportunidad de realizar un seguimiento más detenido y a medio plazo de los pacientes tratados con aloinjertos, la gran variabilidad en cuanto a la integración de los diversos aloinjertos era un problema que me preocupó de manera especial.

Casi de forma simultánea y por casualidad en esa época tuve la oportunidad de comenzar a colaborar con el Laboratorio de Fisiopatología Ósea de la Fundación Jiménez Díaz. En él se estaban realizando diversos experimentos que tenían en común el empleo de los cultivos de osteoblastos humanos.

Como veremos a lo largo de esta tesis, en la literatura se aportan numerosos datos sobre la incorporación clínica de los aloinjertos. Sin embargo, poco o nada se ha escrito acerca de los mecanismos celulares que llevan a la incorporación de los aloinjertos óseos. Este es el motivo fundamental, así como la disponibilidad de la técnica de cultivo de osteoblastos humanos, que nos llevó a diseñar y realizar el presente trabajo experimental.

Índice

ÍNDICE

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	17
1.A: INJERTOS ÓSEOS	18
<u>1.A.1: Funciones de los injertos óseos</u>	18
1.A.1.a: Osteogénesis.....	18
1.A.1.b: Osteoinducción.....	19
1.A.1.c: Osteoconducción.....	19
<u>1.A.2: Autoinjertos</u>	19
<u>1.A.3: Sustitutos óseos sintéticos</u>	20
<u>1.A.4: Aloinjertos óseos</u>	22
1.A.4.a: Introducción e historia.....	22
1.A.4.b: Banco de huesos.....	23
1.A.4.c: Aloinjertos en fresco.....	24
1.A.4.d: Esterilización del aloinjerto.....	24
1.A.4.d.1: Irradiación Gamma.....	25
1.A.4.d.2: Óxido de etileno.....	25
1.A.4.d.3: Autoclave.....	26
1.A.4.d.4: Otras técnicas.....	27
1.A.4.e: Conservación del aloinjerto.....	28
1.A.4.e.1: Aloinjertos congelados.....	28
1.A.4.e.2: Aloinjertos liofilizados.....	29
1.A.4.f: Seguridad del aloinjerto.....	29

1.A.4.g: Indicaciones clínicas de los aloinjertos.....	30
1.A.4.g.1: Aloinjertos en cirugía tumoral.....	31
1.A.4.g.2: Aloinjertos en cirugía reconstructiva. protésica.....	32
1.A.4.g.3: Aloinjertos en la cirugía de columna vertebral.....	33
1.A.4.g.4: Aloinjertos en el tratamiento de las fracturas y sus complicaciones.....	35
1.A.4.h: Biología de los aloinjertos.....	36
1.A.4.h.1: Injertos de esponjosa.....	36
1.A.4.h.2: Injertos corticales.....	38
1.A.4.i: Incorporación de los aloinjertos.....	39
1.B: EL HUESO. COMPOSICIÓN Y FUNCIONES.....	41
<u>1.B.1: Proteínas de la matriz ósea.....</u>	<u>42</u>
1.B.1.a: Colágeno.....	42
1.B.1.b: Osteocalcina.....	44
<u>1.B.2: Componente celular del tejido óseo.....</u>	<u>44</u>
1.B.2.a: Osteoblastos.....	44
1.B.2.b: Osteoclastos.....	46
<u>1.B.3: El remodelado óseo.....</u>	<u>46</u>
1.B.3.a: Regulación del remodelado óseo.....	47
1.B.3.a.1: Factores hormonales.....	47
1.B.3.a.2: Factores locales.....	48
1.C: EL CULTIVO DE OSTEÓBLASTOS.....	51
<u>1.C.1: Introducción.....</u>	<u>51</u>
<u>1.C.2: Modelos de cultivo de osteoblastos.....</u>	<u>51</u>
1.C.2.a: Cultivos de cráneo de rata fetal.....	52
1.C.2.b: Técnicas de enriquecimiento osteoblástico.....	52
1.C.2.c: Cultivos de células de osteosarcoma.....	52

<u>1.C.3: Técnica de cultivo de osteoblastos humanos.....</u>	53
<u>1.C.4: Caracterización bioquímica de los osteoblastos humanos en cultivo.....</u>	55
1.D: JUSTIFICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	57
<u>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</u>	59
<u>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	61
3. A: CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS.....	63
<u>3.A.1: Obtención de los osteoblastos humanos.....</u>	63
<u>3.A.2: Caracterización bioquímica de los osteoblastos.....</u>	70
3.A.2.a: Histoquímica para la fosfatasa alcalina.....	70
3.A.2.b: Cuantificación de la producción de osteocalcina	71
<u>3.A.3: Curva de proliferación celular de los osteoblastos.....</u>	73
3.B: OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS ALOINJERTOS. 74	
<u>3.B.1: Selección y procesamiento de las piezas.....</u>	74
<u>3.B.2: Preparación de los aloinjertos.....</u>	74
3. C: DISEÑO Y METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO.....	78
3.D: DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	81
<u>3.D.1: Determinación del propéptido aminoterminal de procolágeno I. (PINP).....</u>	81
<u>3.D.2: Determinación de la interleucina 6. (IL-6).....</u>	82
3.E: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	83

<u>4. RESULTADOS</u>	85
4.A: CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS A PARTIR DE EXPLANTES DE HUESO TRABECULAR	86
<u>4.A.1: Modelo celular: Puesta a punto del protocolo de cultivo</u>	86
<u>4.A.2: Caracterización celular de los osteoblastos</u>	89
4.A.2.a: Histoquímica de la fosfatasa alcalina.....	89
4.A.2.b: Determinación de la osteocalcina en el medio de cultivo.....	89
4.B: CURVA DE CRECIMIENTO	90
4.C: EFECTO DEL ALOINJERTO SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR DE LOS OSTEOLASTOS HUMANOS EN CULTIVO	91
<u>4.C.1: Efecto del aloinjerto sobre la viabilidad celular</u>	91
<u>4.C.2: Medida de la proliferación celular mediante contaje celular</u>	91
4.D: EFECTO DE LA PRESENCIA DE ALOINJERTO SOBRE LOS NIVELES DE PINP LIBERADOS AL MEDIO DE CULTIVO POR LOS OSTEOLASTOS HUMANOS	94
4.E: EFECTO DE LA PRESENCIA DE ALOINJERTO SOBRE LOS NIVELES DE IL-6 LIBERADOS AL MEDIO DE CULTIVO POR LOS OSTEOLASTOS HUMANOS	98
<u>5. DISCUSIÓN</u>	102
<u>6. CONCLUSIONES</u>	121
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	124

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.A: INJERTOS ÓSEOS

“En gran número de operaciones ortopédicas es necesario utilizar injertos óseos. En ocasiones no es posible extraerlos del propio enfermo (hueso autógeno o autólogo), y resulta útil el hueso de otro ser humano (homogéneo u homólogo) o de otro animal (heterogéneo o heterólogo)”²⁴⁸.

Casi medio siglo después de publicadas estas palabras del Profesor Sanchís Olmos, la pérdida de masa ósea continúa siendo uno de los problemas más frecuentes a los que se enfrenta el cirujano ortopédico en su práctica quirúrgica diaria, ya sea para rellenar o sustituir defectos óseos, ya sea para favorecer la consolidación tras fracturas o pseudoartrosis^{90,215,263}. Ante un defecto óseo la actitud más frecuentemente adoptada por el cirujano ortopédico continúa siendo el empleo de sustitutos óseos. La única excepción la constituyen las técnicas de transporte óseo (técnica de Ilizarov¹³⁰), indicadas en defectos traumáticos mayores de 6-7 cm^{63,209}, y discrepancias de longitud de miembros entre los 5 y 10 cm²²², y que no están exentas de graves complicaciones^{223,227}.

1.A.1: Funciones de los injertos óseos

1.A.1.a: Osteogénesis

El término osteogénesis hace referencia a la formación de nuevo hueso sin indicación del origen celular^{36,37}. Cuando se forma hueso sobre el injerto o a su alrededor, éste puede tener su origen en el propio injerto (células que sobreviven al tratamiento del injerto, y que lógicamente sólo puede suceder con los autoinjertos) o en células del huésped³⁸.

1.A.1.b: Osteoinducción

La osteoinducción es el proceso por el que algunos factores o sustancias estimulan un determinado número de células osteoprogenitoras para que se diferencien hacia células osteogénicas. Además del autoinjerto, materiales que poseen esta propiedad osteoinductiva son la matriz ósea desmineralizada y las proteínas morfogenéticas (BMP)^{27,162,166}. Según la literatura, los aloinjertos son un material que mantiene sólo de forma residual esta capacidad^{162,270}.

1.A.1.c: Osteoconducción

La osteoconducción es el proceso tridimensional de crecimiento de brotes vasculares, tejido perivascular y células osteoprogenitoras desde el lecho del receptor al interior del injerto. La osteoconducción puede ocurrir por una neoformación ósea activa por osteoinducción o puede suceder pasivamente sin la participación del propio injerto, como sucede en la mayoría de injertos de esponjosa^{270,272}.

1.A.2: Autoinjertos

En la actualidad el patrón oro para los sustitutos óseos continúa siendo el autoinjerto de esponjosa, habitualmente obtenido de la cresta ilíaca²¹⁵. Las principales ventajas de este autoinjerto de esponjosa son que es fuertemente osteogénico, que es fácilmente revascularizado y que se integra rápidamente en el huésped^{161,270}; sin embargo tiene varias limitaciones: en primer lugar, debemos tener en cuenta la morbilidad del sitio donante, que incluye la aparición de dolor postoperatorio, en ocasiones muy intenso, la posibilidad de infección, y más raramente la anestesia en el muslo, la herniación muscular, la meralgia parestésica, la subluxación de la cadera, y la consiguiente prolongación de la estancia

hospitalaria^{55,303,315}; en segundo lugar, su principal factor limitante es la escasez de volumen de injerto disponible, especialmente en niños²¹⁵; y por último, el autoinjerto de cresta ilíaca proporciona un escaso soporte mecánico, lo cual limita su empleo en situaciones en las que se precisa un injerto estructural¹⁰. Por todo esto, parece generalmente aceptado que las indicaciones ideales de este autoinjerto quedan limitadas a defectos menores de 6 cm sobre un lecho bien vascularizado y no infectado^{213,227,302}.

Con el fin de ampliar las indicaciones de los autoinjertos de esponjosa se han desarrollado diversas técnicas de autoinjertos óseos vascularizados, ya sean pediculados procedentes del peroné^{48,64}, de la cresta ilíaca^{48,65}, de tercio distal de radio¹⁵³, etc; ya sean libres, entre los que el de peroné es con diferencia el más frecuentemente usado^{227,276}. Sin embargo, aunque aportan algunas ventajas evidentes, también presentan limitaciones, especialmente derivadas de la cantidad de injerto disponible, la dificultad técnica y la morbilidad del sitio donante³¹⁴.

Debido a las limitaciones referidas en el empleo de autoinjertos se han desarrollado 2 tipos de estrategias diferentes cuando se precisa un injerto óseo: por un lado, el empleo de aloinjertos, y por otro, el de sustitutos óseos sintéticos.

1.A.3: Sustitutos óseos sintéticos

Se calcula que en Estados Unidos, el 10% aproximadamente de los injertos óseos empleados corresponden a sustitutos óseos sintéticos, y esta cifra está aumentando de manera significativa en los últimos años^{33,142}. Estos sustitutos óseos sintéticos pueden estar compuestos por hidroxiapatita, fosfato tricálcico, sulfato cálcico o una combinación de estos minerales³³.

En la actualidad se están publicando numerosísimos estudios sobre el empleo clínico de diversos compuestos de este tipo, y las indicaciones no están aún claramente establecidas, pero en muchas ocasiones parecen superponerse a las de los auto y aloinjertos^{49,59,105,142,142,254}.

Sin entrar a analizar las diferencias entre los diversos compuestos disponibles en el mercado, los sustitutos óseos sintéticos comparten diversas ventajas sobre los auto y los aloinjertos, incluyendo la ilimitada disponibilidad, la facilidad para su esterilización y su almacenaje³³. Sin embargo presentan diversas limitaciones, como la variabilidad en su carácter osteoconductor, las diferencias entre la repoblación celular de las diferentes matrices, los efectos potencialmente adversos sobre el remodelado óseo normal, los aspectos comerciales relacionados con su utilización; pero la principal limitación práctica que presentan de forma conjunta es la escasa capacidad de proporcionar soporte mecánico lo que contraindica su uso como injertos estructurales^{6;20;24;33;52;102;105;112;125;201;254;255}.

Por todas estas razones, el empleo clínico de los aloinjertos continúa siendo mayoritario, de modo que en Estados Unidos se calcula que se emplean entre 150.000 y 200.000 aloinjertos musculoesqueléticos al año^{10;270}, constituyendo el tejido más frecuentemente injertado en la práctica médica y quirúrgica^{216;301}.

1.A.4: Aloinjertos óseos

1.A.4.a: Introducción e historia

El primer antecedente histórico de trasplante de un miembro pertenece más bien al terreno de la leyenda que al de la ciencia: según la tradición, en el siglo sexto los santos Damián y Cosme realizaron un milagro que consistió en el trasplante de la pierna enferma de un sacristán por la de un moro recién fallecido. Este hecho fue objeto de numerosas representaciones artísticas en el renacimiento²³⁹.

El primer trasplante óseo dentro de un ámbito más científico del que tenemos noticia fue realizado por un cirujano holandés llamado Job van Meekeren en 1668, y transplantó con éxito el cráneo de un perro a un defecto craneal de un soldado²⁹³.

En términos estrictamente científicos, en 1881 Macewen publica el primer caso conocido de trasplante óseo en un defecto de tercio proximal de húmero¹⁷³. Lexer en 1908 publica el caso de un trasplante de una hemiarticulación¹⁶³. Resulta destacable el trabajo de Albee⁵ que usaba injertos óseos provenientes de miembros amputados para favorecer la fusión vertebral y la consolidación de pseudoartrosis. De esta misma época datan los trabajos de Tuffier^{287;288} y Bauer²¹ en Europa y de Carrell⁴⁶ en EEUU, gracias a los cuales se asientan las bases del empleo de aloinjertos provenientes de donantes fallecidos.

En los años cuarenta, se inician, con los trabajos de Inclán en La Habana¹³¹, los primeros esfuerzos eficaces en el almacenaje de aloinjertos y su empleo en cirugía programada. En 1946 Wilson³⁰⁹ comienza a emplear su propio banco de huesos conservados por congelación. En España el primer banco de huesos es creado por el Profesor Sanchís Olmos en el Hospital Provincial de Madrid²⁴⁸ en 1951 empleando huesos provenientes de amputaciones.

Es a comienzos de los sesenta, cuando empiezan a aparecer grandes series de casos de reconstrucción con aloinjertos tras la constatación empírica de que la congelación y descongelación de los mismos reducía significativamente la respuesta inmune^{61;121}. En estas primeras series^{220;224;298} ya se pudo valorar que las técnicas de reconstrucción con aloinjertos, aunque proporcionaban resultados alentadores, no estaban exentas de complicaciones frecuentes y graves, como la infección (9-15%), la fractura (29-41%) o la reabsorción del injerto (4-14%).

En la actualidad podemos afirmar que incluso, a pesar de sus potenciales riesgos, como la transmisión de enfermedades contagiosas, el uso de aloinjertos óseos conservados ha demostrado ser una buena, y en ocasiones única, alternativa para la reconstrucción de defectos óseos independientemente de su causa^{10;42;50;75;100;145;155;160;175;179;180;252;260;269;291}.

1.A.4.b: Banco de huesos

La necesidad de injertos seguros tanto biológica como bacteriológicamente hace que el desarrollo de un banco de huesos y tejidos sea un proceso complejo y sometido a rigurosos controles legales y técnicos.

Se define un banco de huesos a la institución sin ánimo de lucro encargada de la obtención, procesamiento, preservación y almacenamiento de huesos humanos con vistas a su distribución para aplicación clínica como aloinjertos²¹⁸.

En España la Organización Nacional de Trasplantes, adscrita al Ministerio de Sanidad y Consumo se encarga de todas las actividades relacionadas con la donación, extracción, distribución e intercambio de órganos y tejidos. Por otro lado, la Asociación Española de Bancos de Tejidos ha elaborado unas recomendaciones y estándares¹³ basadas entre otras en las realizadas por la American Association of Tissue Banks⁸ y la

European Association of Tissue Banks⁸⁵ con el fin de garantizar la seguridad y la calidad en la manipulación, almacenamiento y aplicación clínica de células y tejidos.

Los injertos pueden ser obtenidos en condiciones estériles y conservarse congelados a diversas temperaturas sin ninguna esterilización adicional; o bien pueden ser sometidos a diversos procesos de esterilización como la radiación gamma, el óxido de etileno o el autoclavado, para después ser conservados mediante la congelación o la liofilización, ya que los procesos de selección del donante han demostrado no ser suficientes para la exclusión de los donantes infecciosos²⁹⁰.

1.A.4.c: Aloinjertos en fresco

El empleo de aloinjertos en fresco en la actualidad está muy limitado principalmente por dos factores^{120;139}: 1º: Provocan una intensa reacción inmunológica en el huésped que puede desembocar en el rechazo del aloinjerto, y 2º: El riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas.

Estas desventajas no suelen compensar la teórica capacidad osteoinductiva, osteoconductiva y osteoogénica de este tipo de injertos, y en la actualidad su utilización clínica está limitada a los injertos osteocondrales^{58;96;182;183;198}.

1.A.4.d: Esterilización del aloinjerto

Desde que en 1992 Simonds y cols²⁵⁸ demostraron la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (VIH) desde un donante seronegativo para dicho virus en un aloinjerto óseo, se ha cuidado especialmente rigurosa la seguridad de los aloinjertos en los bancos de huesos.

Tras la selección rigurosa del donante y la obtención de la pieza ósea en condiciones estériles adecuadas^{8;13;85} se somete con frecuencia a las piezas a procesos de esterilización, que comprenden entre otros: la irradiación gamma, el óxido de etileno y el autoclavado. Todos estos procesos han demostrado que pueden interferir en las propiedades mecánicas y biológicas del injerto^{29;114;124}. Veremos algunos de estos aspectos por separado en referencia a las diferentes técnicas.

1.A.4.d.1: Irradiación Gamma

Probablemente la esterilización con rayos Gamma sea el método de esterilización más empleado en el mundo²¹⁷. Los rayos Gamma eliminan eficazmente el riesgo de contaminación bacteriana y hepatitis¹³⁹; pero son menos eficaces en la destrucción del VIH. La irradiación Gamma sobre los aloinjertos ha demostrado tener efectos deletéreos sobre las propiedades mecánicas y biológicas de los aloinjertos, y este efecto parece ser dosis-dependiente^{60;129;136;290}, de forma más significativa sobre los aloinjertos corticales que sobre los esponjosos^{28;60;115;139;316}.

1.A.4.d.2: Óxido de etileno

El mecanismo de actuación del óxido de etileno como esterilizador de aloinjertos es mediante la inactivación química de los microorganismos, incluyendo entre otros el HIV, y en general es considerado como mejor agente esterilizador que la radiación Gamma para la descontaminación superficial¹⁰.

Sin embargo, el empleo de óxido de etileno como medio para la esterilización de los injertos óseos es controvertido y en general es usado excepcionalmente por dos motivos principalmente^{124;217;270}: en primer lugar por la persistencia de gas residual en el tejido implantado que causa irritación^{134;204;281}; y por otro lado por la obstaculización de la capacidad

osteoconductor y la pérdida de capacidad osteoinductiva de los aloinjertos tratados de este modo^{14;28;74}.

1.A.4.d.3: Autoclave

Debido a las limitaciones expresadas para los métodos de esterilización mediante radiación a altas dosis o mediante óxido de etileno, se han desarrollado otras líneas de investigación¹⁵⁴, entre las que cabría destacar el autoclavado o tratamiento con calor de los aloinjertos desde los experimentos de Inokuchi y cols¹³² y Nakanishi y cols²¹⁰, en los que demostraron la capacidad de inducir la formación ósea de los aloinjertos autoclavados.

Las principales ventajas del aloinjerto autoclavado son: la alta sensibilidad del HIV y otros virus a las altas temperaturas^{191;267}; la facilidad de empleo, que no requiere de complejas instalaciones como en el caso de la radiación Gamma²⁵³; la posibilidad de mantener las inserciones tendinosas y musculares²⁷⁵; la posibilidad de emplear de forma segura piezas con riesgo de infección por HIV, VHC, etc²⁸³; y aunque en nuestro medio no es importante, sí cabe destacar que en los países asiáticos y por motivos religiosos y culturales es muy difícil la obtención y el empleo de aloinjertos frescos congelados, siendo más factible el empleo de los autoclavados^{11;253}.

Entre las limitaciones del empleo de los aloinjertos autoclavados, podríamos destacar la ausencia de consenso sobre cuál es el mejor protocolo de tratamiento a emplear. Así, la mayor parte de publicaciones hacen referencia a tratamientos de unos 135°C entre unos 10 y 30 minutos^{11;146;149;154;250;294-296}. Sin embargo otros autores prefieren el tratamiento de las piezas con temperaturas más bajas y que oscilan entre los 60 a 80°C^{124;146;147}, habiendo demostrado que estas temperaturas mantienen la capacidad osteoinductiva^{177;210} y que no se afectan seriamente ni la

revascularización ni la neoformación ósea²⁵³. No existen estudios clínicos comparativos sobre el empleo de aloinjertos tratados a diferentes rangos de temperatura.

Otra de las limitaciones para el empleo de los aloinjertos óseos autoclavados es la pérdida de propiedades mecánicas tras la esterilización^{129;295}. De hecho, cuando se han estudiado propiedades como la resistencia al máximo estrés, el módulo de compresión, la rigidez del injerto o la energía de fracaso se han recogido pérdidas de estas propiedades que oscilan entre el 25 y el 70%^{146;294;296}. Por ello, generalmente se acepta que el empleo de aloinjertos autoclavados debe estar limitado a injertos no estructurales^{129;300}. Aún así, existen casos publicados, con aceptables resultados, tras aloinjertos autoclavados masivos tras resecciones tumorales¹¹.

1.A.4.d.4: Otras técnicas

Otras técnicas de esterilización de los aloinjertos óseos han sido descritas y evaluadas, sin que ninguna de ellas haya sido usada de forma frecuente en la práctica clínica. Entre ellas cabría destacar el empleo de sustancias químicas como el ácido-etanol peracético validado recientemente y que ha demostrado ser capaz de inactivar incluso las esporas de *Aspergillus niger*²³⁴. El tetrahidrofurano también ha sido evaluado como método de esterilización químico para injertos óseos, ya que no provoca grandes cambios en el comportamiento biomecánico de los mismos²⁹⁶. Otra técnica descrita es la desmineralización y la desinfección a bajas temperaturas con plasma (DEM-LTP), que ha mostrado una buena capacidad para la estimulación de la proliferación y diferenciación ósea¹²⁴.

1.A.4.e: Conservación del aloinjerto

En la actualidad la mayor parte de bancos de huesos someten a sus piezas a alguno de los procesos de esterilización anteriormente descritos¹⁰, y tras él, las piezas deben ser conservadas. Existen 2 métodos ampliamente empleados para la conservación de los aloinjertos óseos: La congelación, ya sea en congeladores eléctricos (-60° a -80°C) o en nitrógeno líquido (-160° a -180°C); y la liofilización²¹⁸.

1.A.4.e.1: Aloinjertos congelados

La congelación mediante congeladores eléctricos (-60° a -80°C) o en nitrógeno líquido (-160° a -180°) no parece influir sobre las propiedades mecánicas o biológicas del aloinjerto^{231;268;270}. Sin embargo cada una de estas técnicas requiere el empleo de diferentes infraestructuras. Así, el uso de nitrógeno líquido requiere su renovación periódica, mientras que cuando se emplean equipos de congelación es precisa la disponibilidad de equipos de suministro energético suplementarios²⁶⁸.

Se ha demostrado que la congelación empleada aisladamente conserva la mayor parte de enzimas en casi todos los tejidos humanos sin afectar las propiedades mecánicas de los mismos^{10;268;270}. Además disminuye la antigenicidad del injerto⁹⁵ y la degradación del mismo por enzimas como la colagenasa o las proteinasas¹⁰. Sin embargo, no está demostrado claramente que inactive los virus de la hepatitis o el HIV^{93;94;257}.

Un aspecto muy discutido en la literatura es el tiempo máximo de conservación de los aloinjertos congelados, y aunque existen variaciones, parece que el periodo recomendable como máximo se sitúa en torno a los 3 años^{93;94;284}.

Algunos autores han empleado temperaturas más altas, de unos -20°C, para la conservación de los aloinjertos, y en algunos casos han

publicado resultados satisfactorios con esta técnica⁴¹; sin embargo algunos estudios han demostrado que la conservación a este rango de temperatura puede provocar la liberación de factores favorecedores de la reabsorción ósea debido a la formación de cristales de hielo y a la activación de enzimas proteolíticas²⁸⁴. Además se ha visto que la conservación de las piezas a -20°C durante más de 6 meses provoca importantes cambios en la respuesta de los osteoblastos, lo cual puede provocar alteraciones en su incorporación¹⁹⁵.

1.A.4.e.2: Aloinjertos liofilizados

La liofilización consiste en la eliminación del agua de un tejido previamente congelado (-30°C) y su conservación al vacío²⁷⁰. La principal ventaja como medio de conservación es que las piezas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente por un tiempo indefinido siempre que el envase mantenga el vacío²⁶⁸. Además, como la médula ósea y la sangre son eliminadas, disminuye el riesgo teórico de transmisión de enfermedades a través de la médula ósea¹⁰.

Entre las desventajas que se describen para la conservación de los aloinjertos mediante la liofilización, cabe destacar el impacto de la misma sobre las propiedades mecánicas del injerto, provocando una disminución de la resistencia a la torsión y al doblado, pero no a las fuerzas de compresión axial^{108;228;259}.

1.A.4.f: Seguridad de los aloinjertos

Desde 1982 la principal discusión sobre el empleo de aloinjertos ha estado centrada en la posibilidad de transmisión del VIH^{7;283}, aunque otras infecciones, como la de los virus de la hepatitis B y C no deben desestimarse, ya que hay casos descritos de transmisión de los mismos a través de los aloinjertos óseos^{57;283}.

En 1989 se estimaba que el riesgo de obtener un aloinjerto de un donante HIV positivo no reconocido era de aproximadamente 1 por 1.600.000 donantes³⁵, y no parece que este riesgo haya disminuido desde entonces³⁴. La mayor parte de autores parecen coincidir en que en la actualidad el riesgo para la transmisión de enfermedades virales en aloinjertos no procesados es muy baja y se situaría en torno al uno por millón^{34;139;199;270;283}.

Un aspecto importante y que no es frecuentemente abordado, es la posibilidad de afectación del injerto por enfermedades tumorales como linfomas, plasmocitosis, etc. Pero en la actualidad es dudoso que el estudio sistemático de este tipo de piezas sea eficaz y rentable, y por ello no se hace de forma rutinaria^{43;44}.

1.A.4.g: Indicaciones clínicas de los aloinjertos

En la actualidad existen 4 grandes grupos de indicaciones para el empleo de aloinjertos óseos en cirugía ortopédica y traumatología: La reconstrucción de defectos óseos tras resecciones tumorales, la reparación de defectos óseos en cirugía de recambio protésico, especialmente en cadera y rodilla, la realización de artrodesis vertebrales, y por último las indicaciones en traumatología, ya sea en fracturas agudas o en la cirugía de sus complicaciones, como la pseudoartrosis.

Con diferencia, la causa más frecuente de su uso es la cirugía reconstructiva tumoral (58% de los aloinjertos musculoesqueléticos²⁸⁵), aunque en la actualidad, la necesidad de injerto en cirugía de rescate protésico aumenta de manera significativa según aumenta la necesidad de este tipo de intervenciones.

1.A.4.g.1: Aloinjertos en cirugía tumoral

Debido a las importantes mejoras en el tratamiento de los tumores óseos, especialmente en los de características malignas, en la actualidad la cirugía de salvamento del miembro afecto es el estándar del tratamiento, y por tanto son precisas diversas y complejas técnicas reconstructivas que en muchas ocasiones requieren el empleo de aloinjertos óseos^{50;72;179}.

Los aloinjertos en cirugía tumoral pueden ser no estructurales, para el relleno de cavidades^{50;103}, o estructurales, empleados para puentear defectos óseos tras resecciones. En este caso se pueden distinguir 3 tipos: aloinjertos osteoarticulares^{179;256}, aloinjertos intercalares^{75;219;297} y compuestos aloinjerto-prótesis^{72;119}.

En general, la principal crítica que se hace al empleo de aloinjertos en las técnicas de reconstrucción tras resecciones tumorales es la alta tasa de complicaciones publicada. Del estudio de Mankin y cols¹⁷⁹, sobre 718 aloinjertos, 156 fracasaron por fractura (19%), pseudoartrosis (17%), infección (11%) o inestabilidad (6%) principalmente durante los 3 primeros años. Estas cifras son equivalentes a las publicadas por otros autores^{23;127;247;265;278;292}.

De manera conjunta, los principales factores de riesgo para la aparición de cualquiera de estas complicaciones, que con frecuencia se asocian entre sí, son una incorrecta técnica quirúrgica, una inestabilidad mecánica, y la administración de radio y/o quimioterapia.

En la revisión de la literatura, la aparición de cualquiera de estas complicaciones se asocia una tasa de amputaciones del miembro afecto de alrededor del 30%^{72;265;292}. Aunque probablemente y de forma aislada, la infección del aloinjerto sea la complicación más temida y la que con más frecuencia obliga a la amputación^{71;72;168}.

1.A.4.g.2: Aloinjertos en cirugía reconstructiva protésica

El uso de aloinjertos en cirugía protésica primaria está raramente indicado ya que los defectos óseos suelen ser poco importantes; sin embargo, y a pesar de que en el pasado su empleo era controvertido, en la actualidad el uso de aloinjertos en cirugía de recambio protésico, sobre todo en artroplastias de cadera y de rodilla, está ampliamente aceptado¹⁰⁹. En cualquiera de estas situaciones, el uso de aloinjerto óseo persigue la restauración de la masa ósea. Analizaremos por separado alguno de los aspectos importantes en sus diferentes indicaciones.

a). Cirugía de revisión protésica de cadera. La indicación y el tipo de aloinjerto a emplear ante una pérdida de masa ósea en un recambio protésico de cadera depende de 2 factores principales: si el defecto es acetabular o femoral; y del tipo de defecto existente^{109;110}. Se han realizado numerosas clasificaciones de los defectos óseos en la artroplastia de cadera que en muchas ocasiones incluyen indicaciones sobre el tratamiento a realizar. Su descripción y discusión sobrepasa ampliamente las pretensiones de este trabajo.

b). Cirugía de revisión protésica de rodilla. En este tipo de cirugía es frecuente la pérdida intensa de masa ósea debido a la osteolisis provocada por el aflojamiento de los componentes. El empleo de aloinjertos en estas circunstancias ha dado buenos resultados a corto y medio plazo^{10;100;200}, alcanzándose tasas muy elevadas de incorporación, como en la serie de 12 revisiones de rodilla publicada por Wilde y cols³⁰⁷ en la que en 11 casos se evidenció la incorporación del aloinjerto en un tiempo medio de 23 meses.

c). Otras cirugías de revisión protésicas. Ya sea en cirugía primaria o más frecuentemente en cirugías de revisión en cualquier artroplastia

puede ser necesario el aporte de injerto óseo. Por ejemplo en revisiones de artroplastias de hombro, sobre 463 casos Neer y cols precisaron injerto en el 4,3% de los pacientes, siendo la principal y casi única indicación los defectos glenoideos masivos²¹¹. Por otro lado el empleo de aloinjertos en las artroplastias de codo es menos común, y se ha utilizado tras grandes defectos postraumáticos en los que no existen otras opciones reconstructivas⁶⁷.

En el manejo de otras artroplastias, como en muñeca o tobillo, el empleo de aloinjerto es excepcional y no hemos encontrado referencias a su utilización en la literatura.

1.A.4.g.3: Aloinjertos en cirugía de columna vertebral

Existen 2 indicaciones fundamentales para el empleo de aloinjertos en cirugía de columna vertebral. En primer lugar, cuando no se dispone de suficiente autoinjerto, por ejemplo en artrodesis toracolumbares largas con fusión de la pelvis, que excluyen la obtención de injerto de la cresta ilíaca. En segundo lugar, en técnicas de fusión en las que se requiere un elemento estructural en forma de injerto uniendo 2 o más niveles o de un injerto intersomático entre dos vértebras⁴².

Veremos a continuación y por separado los principales aspectos del uso de aloinjertos en cirugía de columna cervical, toracolumbar y lumbar.

a). Columna cervical

La utilización de aloinjerto en fusiones cervicales anteriores ha sido ampliamente usada desde que en 1958 Cloward⁵⁴ publicase sus primeros 46 casos. Posteriormente se han publicado numerosos estudios acerca del empleo de los aloinjertos de peroné, de iliaco o de cabeza femoral para la fusión intervertebral cervical con unos resultados más o menos

homogéneos, con tasas de consolidación de alrededor del 90%^{42;111;174;175;249}.

Otro aspecto que cabe destacar es el del empleo del aloinjerto en el tratamiento de fracturas de la columna cervical, ya sea como injerto estructural o asociado a dispositivos tipo cilindro o jaula. En el tratamiento de los defectos más grandes, tras corpectomías de 3 ó más niveles probablemente la opción más recomendable sea la de un aloinjerto de peroné relleno de autoinjerto u otros osteoinductores, debido a su forma y módulo de elasticidad^{9;251;291}.

b). Columna toracolumbar

El uso de aloinjerto en las cirugías de fusión posterior toracolumbar es mucho más frecuente que en la región cervical, especialmente en las cirugías de escoliosis⁴². En cirugía de fusión vertebral anterior en casos de deformidades se han empleado injertos estructurales de diversos modos. Sin embargo los anillos de cortical femoral han demostrado in vitro una mayor resistencia que otros tipos de aloinjerto²⁰². Las indicaciones pueden incluir escoliosis del adulto, escoliosis neuromusculares, cifosis postraumática o postlaminectomía, enfermedad de Schuermann, etc^{42;145} En general los resultados publicados en el tratamiento de deformidades de la columna toracolumbar tratadas con aloinjertos estructurales son satisfactorios, con tasas elevadas de incorporación y de conservación de la corrección^{31;42;78;194}.

En el tratamiento de las fracturas de la región toracolumbar también se pueden emplear aloinjertos estructurales anteriores que pueden ser anillos de diáfisis humeral en los segmentos más superiores y femorales en el resto, siempre junto a instrumentación posterior²⁹¹.

c). Columna lumbar

El uso de aloinjerto en las técnicas de fusión posterolateral está poco extendido debido a las altas tasas de pseudoartrosis comunicadas en diversos trabajos^{122;138;318}. No sucede lo mismo con los injertos estructurales para las técnicas de fusión intersomática anterior, ya que desde que en 1952 Cloward⁵³ empezó a emplear aloinjertos congelados de cresta ilíaca en este tipo de intervenciones. Otros autores la han empleado con buenos y homogéneos resultados^{26;70;197}, que pueden ser mejorados gracias a la adición de estimulación electromagnética¹⁹⁷. Por otro lado, el empleo de segmentos diafisarios femorales de aloinjerto en cuyo interior se empaqueta autoinjerto de esponjosa asociado a instrumentación posterior se ha popularizado en los últimos años debido a su elevada resistencia²⁰² y especialmente a los buenos resultados clínicos y radiológicos que proporciona^{78;126;145;152;165;229}.

1.A.4.g.4: Aloinjertos en la cirugía de las fracturas y sus complicaciones

El empleo de aloinjertos para favorecer la consolidación o para la reparación de defectos óseos postraumáticos incluye una gran variedad heterogénea de indicaciones y de posibilidades de tipo de injerto (fragmentos de esponjosa criopreservados, porciones de hueso cortical, injertos corticoesponjosos, matriz ósea desmineralizada, etc)^{1;104;188;269}. Sin embargo su uso es mucho menos común que en las patologías anteriormente descritas, y en cualquier caso, el principal factor pronóstico es una correcta relación entre la actividad biológica del injerto, las condiciones ambientales alrededor del injerto y los condicionantes mecánicos²⁶⁹.

Además de todas las indicaciones anteriormente expuestas, los aloinjertos pueden ser usados en muy diversas indicaciones, que pueden variar desde el reemplazo con un aloinjerto de una calcaneotomía total²⁰⁶, al tratamiento de la rizartrosis²⁸⁶, a la corrección de deformidades óseas postraumáticas¹⁸⁴, a la reparación de los defectos de cresta ilíaca masivos tras tomas de autoinjerto⁹⁷, etc.

1.A.4.h: Biología de los aloinjertos

La capacidad de estímulo biológico de los aloinjertos está determinada por la suma de su actividad biológica inherente (células vivas y sus productos), de su capacidad para estimular los tejidos circundantes, y de su capacidad para sostener el tejido que el huésped produce²⁷⁰. El proceso de incorporación del aloinjerto está íntimamente relacionado con estos factores, pero casi nunca va a ser independiente de los factores mecánicos que analizaremos en otro apartado.

La mejor forma de analizar la respuesta que inducen los diferentes tipos de aloinjertos en el huésped es comparándola con la que producen los autoinjertos. Como se exponía anteriormente, el autoinjerto posee capacidad osteoconductora, osteoinductora (determinada por las proteínas de la matriz: BMP, TGF- β , etc) y osteogénica; sin embargo los aloinjertos no son osteogénicos porque no poseen células vivas, y si han sido sometidos a procesamientos como el autoclavado, al menos en teoría tampoco son osteoinductores (debido a la desanturalización de las proteínas); por tanto su principal función es la osteoconducción.

1.A.4.h.1: Injertos de esponjosa

La respuesta del huésped al autoinjerto de esponjosa ocurre en varias fases que se superponen y forman un continuo²⁷⁰: tras la cirugía predominan los fenómenos de hemorragia e inflamación, muchas de las

células del injerto mueren, en especial los osteocitos de las lagunas trabeculares, pero muchos de los osteoblastos de superficie sobreviven y son capaces de producir nuevo hueso rápidamente⁴¹ Estas células son las responsables de la capacidad osteogénica del autoinjerto. Debido a la porosidad de la esponjosa, los vasos del huésped, los osteoblastos y sus precursores pueden infiltrar el injerto desde la periferia en menos de 48 horas²³⁸. Según avanza la neovascularización del injerto, los osteoblastos comienzan a producir matriz osteoide mientras que los osteoclastos comienzan a reabsorber las trabéculas muertas; es el comienzo de la remodelación del injerto, que puede durar varios meses. Finalmente el injerto se integra en la estructura de soporte mecánico del huésped aproximadamente al año de la cirugía²⁷⁰.

Los equivalentes al autoinjerto de esponjosa entre los aloinjertos, son tanto el injerto de esponjosa como el aloinjerto triturado ya sea de esponjosa o de cortical. Estos aloinjertos, además de mantener la capacidad osteoconductora, pueden ser moderadamente osteoinductores, aunque esta propiedad está íntimamente relacionada con las condiciones de procesamiento y almacenaje^{15;204;281}. En aloinjertos autoclavados cabe esperar que esta propiedad sea mínima debido a la desnaturalización de las proteínas responsables de la misma (BMP, TGF- β , etc.). El aloinjerto de esponjosa provoca en el huésped una respuesta diferente a la que despierta el autoinjerto, y se caracteriza inicialmente por fenómenos de agregación plaquetaria, formación de hematoma, inflamación y reclutamiento de polimorfonucleares en las primeras 18 horas. En los alrededores del injerto se agrupan células mesenquimales durante los 5 primeros días que posteriormente se diferencian en condrocitos que producen matriz cartilaginosa. Esta matriz se mineraliza, y en el 10^o-12^o día se inicia la invasión vascular acompañada por la colonización por células osteoblásticas a la vez que los condrocitos inician su degeneración. Según

algunos autores²⁷⁰ su reabsorción no es necesaria para su revascularización y por tanto no sufren mermas en su resistencia mecánica durante su incorporación, disminución que si ocurre durante la incorporación de los autoinjertos. Desde este momento y hasta la integración completa se inician los fenómenos de remodelación ósea²⁷⁰. Los aloinjertos de esponjosa son más débiles mecánicamente que los autoinjertos de esponjosa durante largos periodos de tiempo, aunque en condiciones de estabilidad mecánica y de carga de peso la mayor parte estos aloinjertos tienen un comportamiento mecánico y estructural similar a los autoinjertos a pesar de que mantienen más cantidad de hueso necrótico³⁹

1.A.4.h.2: Injertos corticales

Los autoinjertos no vascularizados de cortical proporcionan soporte mecánico, en cierto modo son osteogénicos y se revascularizan lentamente⁴¹. Este retraso en la revascularización puede ser explicado porque la penetración de las yemas vasculares es el resultado de la reabsorción osteoclástica periférica y de la invasión vascular de los canales de Havers y de Volkmann⁷⁹. Este tipo de injertos permanecen significativamente más débiles que el hueso normal durante muchos años dependiendo de su tamaño, a la vez que es frecuente encontrar grandes porciones de cortical muerta durante largos periodos^{41;79;270}.

En cuanto a los aloinjertos corticales o corticoesponjosos la respuesta inicial en el huésped es similar a la que despiertan otros injertos y se caracteriza por fenómenos de inflamación, de invasión vascular y migración de mediadores de la inflamación. Posteriormente, el injerto es penetrado lentamente por vasos y por hueso del huésped hasta un grado limitado⁸¹. Si esta vascularización no es suficiente, el injerto puede fracturarse^{23;81;207;278}. También el modo de procesamiento del aloinjerto parece modificar la respuesta del huésped; por ejemplo el hueso cortical

sometido a esterilización por autoclave puede ser revascularizado, aunque lentamente, casi por completo¹¹⁸.

1.A.4.i: Incorporación de los aloinjertos

Es evidente que el aspecto fundamental del empleo de cualquier injerto óseo, y por extensión de cualquier aloinjerto, es la incorporación del mismo al huésped.

Burchardt definió la incorporación del injerto óseo como el proceso de envoltura de un complejo de hueso necrótico viejo con un hueso nuevo viable³⁸. El proceso de invasión por tejido nuevo a lo largo de los canales creados por la invasión de vasos sanguíneos o a lo largo de canales preexistentes en el hueso transplantado fue inicialmente denominado “Schleichender ersatz” por Auxhausen, posteriormente este término alemán fue sustituido en la literatura anglosajona por el de “creeping substitution” para describir este proceso dinámico de reconstrucción y consolidación^{237;304}, y que nosotros traduciremos por “sustitución por invasión”. De todos modos, los criterios de incorporación de un aloinjerto van a depender también del tipo de injerto y de su función; por ejemplo para un injerto segmentario, podemos decir que está consolidado si la zona de unión huésped-injerto aparece unida y hay tolerancia a la carga de peso sin fractura o dolor²⁷¹, criterios que evidentemente no son aplicables a los aloinjertos de esponjosa.

Existen numerosísimos estudios acerca de la incorporación de los aloinjertos que abordan esta problemática desde diversos puntos de vista: estudios clínicos, estudios radiológicos, y por último los estudios histológicos de incorporación. Sin embargo su análisis y descripción supera con creces el objetivo de esta introducción.

En cualquier caso, la incorporación de un aloinjerto continúa siendo un proceso impredecible. Es el injerto más frecuentemente usado en la clínica: el congelado sin concordancia antigénica, el menos predecible en cuanto a su incorporación; sin embargo algunos factores podría ayudar a superar este problema, como la adición o eliminación de células, e indirectamente de citoquinas²⁷² o de otros factores favorecedores de la neoformación ósea^{150;269}.

1.B: EL HUESO. COMPOSICIÓN y FUNCIONES

El hueso es un tejido conectivo especializado, que junto con el cartílago, conforma el sistema esquelético¹⁹. Sus funciones mecánicas, protectoras y metabólicas derivan de su estructura.

El hueso está constituido, fundamentalmente por un componente mineral (65%), por una matriz orgánica (33%) y por un componente celular (2%).

El componente mineral está formado fundamentalmente por hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], que es la forma cristalizada del fosfato tricálcico amorfo. Existen en menor proporción, CO_3^{2-} , Mg^{2+} , citratos, Na^+ , K^+ , sulfatos, etc.;

Por su lado, la matriz orgánica está compuesta por grandes componentes proteicos que tienen la capacidad de formar agregados macromoleculares, cuya organización determina la super-estructura del hueso. Sus componentes fundamentales son el colágeno tipo I (90%) y una sustancia base rica en glicosaminoglicanos. Pequeñas proteínas que parecen actuar en la comunicación entre la matriz y las células del hueso también forman parte de la matriz orgánica⁹⁸.

El componente celular está formado principalmente por los osteoblastos o células formadoras de hueso y los osteoclastos o células destructoras de hueso. Al estar el hueso en contacto con la médula ósea e infiltrado de vasos sanguíneos, las células óseas se encuentran bajo la acción directa de un gran número de factores y de hormonas sistémicas.

A continuación analizaremos más en detalle los aspectos más destacables de estos componentes y que guardan una relación directa con el trabajo que se presenta.

1.B.1: Proteínas de la matriz ósea

1.B.1.a: Colágeno

El colágeno es el principal componente orgánico de la matriz ósea extracelular, constituye cerca del 90% de las proteínas óseas y es casi exclusivamente colágeno tipo I. La molécula de colágeno está compuesta por tres cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas $\alpha 1(I)$ y una cadena estructuralmente similar, pero genéticamente diferente, $\alpha 2^{299}$. Es sintetizada en el interior de los osteoblastos como un precursor: el procolágeno tipo I, molécula que contiene en ambos extremos extensiones adicionales proteicas, la extensión aminoterminal de aproximadamente 25.000 Da, y la extensión carboxilo terminal de 35.000 Da. La parte central de la molécula tiene aproximadamente 100.000 Da. Estas extensiones son denominadas propéptido amino terminal del procolágeno tipo I (PINP) y propéptido carboxilo terminal del procolágeno tipo I (PICP) (Figura 1). En el medio extracelular este precursor sufre el efecto de peptidasas específicas que separan los propéptidos respectivos de la molécula, liberándose tres proteínas. Una de ellas es la molécula de colágeno propiamente dicha, que se agregará formando fibras en la conformación de la matriz ósea. Las otras dos moléculas son los propéptidos amino y carboxilo terminales del colágeno tipo I (PINP y PICP) que pueden ser detectadas en la circulación sanguínea^{51:88}.

A medida que el procolágeno tipo I es procesado, se liberan cantidades estequiométricas de ambos propéptidos, PINP y PICP, en proporciones 1:1 con el colágeno formado, por lo que la concentración de estos propéptidos refleja la síntesis de colágeno tipo I. Si se tiene en cuenta que el 90% del colágeno tipo I corporal constituye la matriz orgánica del hueso, los niveles circulantes de ambos propéptidos se pueden considerar como un índice de actividad osteoblástica o formación ósea^{196:261}.

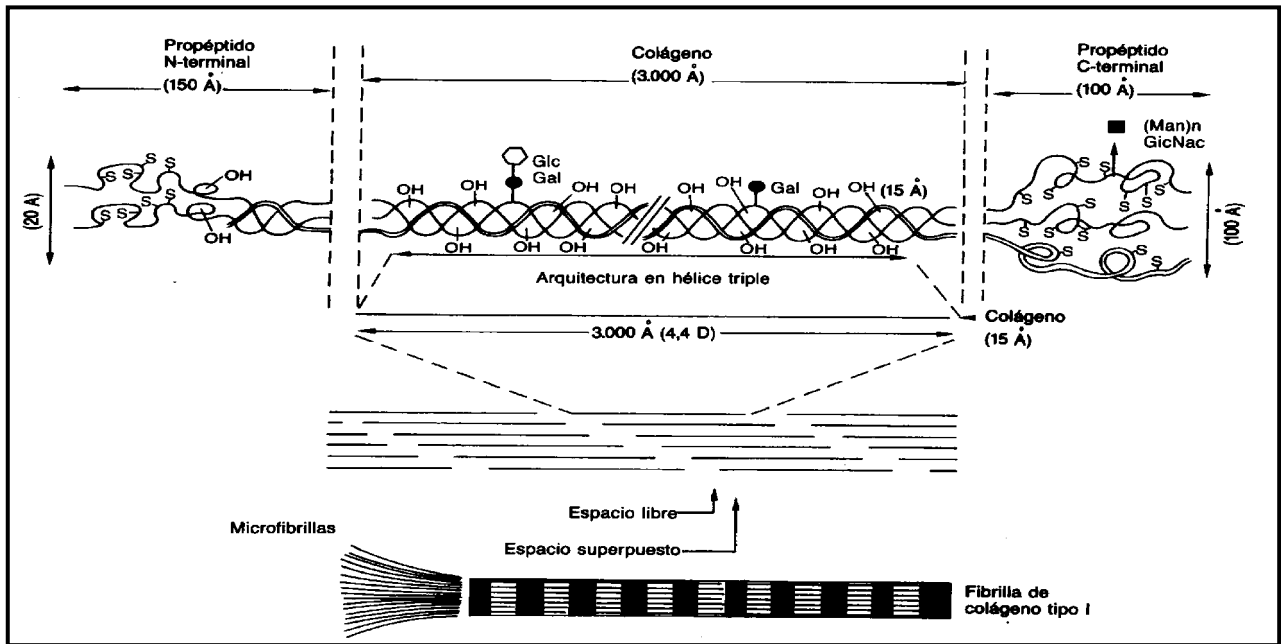


FIGURA 1: Formación de los propéptidos amino y carboxilo terminales del procolágeno I. En el espacio extracelular, y antes de que las moléculas de colágeno se agreguen formando fibras, los propéptidos amino (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) son separados de la molécula de procolágeno por acción de peptidasas específicas.

En la presente tesis se van a usar los niveles de PINP liberados por los osteoblastos al medio de cultivo como índice de formación de colágeno y por tanto de matriz ósea.

1.B.1.d: Osteocalcina

La osteocalcina o BGP constituye el 10% - 20% de las proteínas no colágenas del hueso dependiendo de la edad y la especie, y cerca del 2% de las proteínas totales del mismo. Es un polipéptido de 49 residuos de aminoácidos y un peso molecular de 5000 dalton²³². Contiene tres residuos del aminoácido γ -carboxiglutámico (Gla) en las posiciones 17, 19 y 24 de

su secuencia, que le confieren la capacidad de unirse al calcio, y de manera más específica a la hidroxiapatita del hueso, de manera que la mayor parte de la osteocalcina sintetizada por el osteoblasto permanece en el hueso, sin embargo, parte de la osteocalcina pasa al suero donde puede detectarse. Dado que su procedencia es específica del osteoblasto, los niveles de osteocalcina constituyen un marcador bioquímico muy específico de actividad osteoblástica²³³.

En la presente tesis, la calidad del cultivo de osteoblastos se ha determinado mediante la cuantificación de la producción de osteocalcina.

1.B.2: Componente celular del tejido óseo

1.B.2.a: Osteoblastos

Los osteoblastos son las células esqueléticas responsables de la síntesis y mineralización de la matriz extracelular del hueso.

Los osteoblastos nunca se encuentran ni funcionan de manera aislada, siempre se encuentran agrupados a lo largo de la superficie del hueso. Son células cuboidales, y muy activas desde el punto de vista metabólico, lo cual se traduce morfológicamente en la presencia de un retículo endoplásmico rugoso muy extenso, y de un aparato de Golgi, encargado de la secreción de proteínas, bien desarrollado²³⁵.

La membrana plasmática de los osteoblastos es rica en fosfatasa alcalina. Esta propiedad se utiliza para reconocer los osteoblastos en tinciones histológicas. La fosfatasa alcalina está directamente implicada en el proceso de mineralización, por ello su concentración en el suero se utiliza como índice de la actividad osteoblástica. De hecho, en la presente tesis la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina se ha usado para determinar la calidad del cultivo de osteoblastos humanos.

El fenotipo de osteoblasto maduro se caracteriza por la capacidad de las células para sintetizar las proteínas de la matriz ósea, incluyendo el colágeno tipo I y una variedad de proteínas no colágenas, como la osteocalcina, la sialoproteína, la osteopontina y los proteoglicanos.

Los osteoblastos también sintetizan factores de crecimiento que son almacenados en la matriz ósea, tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), así como diversos factores locales y citocinas, entre las que se encuentra la interleucina 6 (IL-6).

Desde un punto de vista filogenético, la estirpe de células osteoblásticas deriva de células mesenquimales y por tanto son una variedad de tejido conectivo. Debido a que estas células mesenquimales pueden originar numerosos tipos celulares, no se puede hablar de célula formadora de hueso hasta que la célula en desarrollo no se compromete en la estirpe osteoblástica⁵⁶. Previamente a este compromiso, se pasa por las fases de célula precursora pluripotencial (stem cell), de célula osteoprogenitora inducible (células del estroma), para llegar a la fase de célula osteoprogenitora determinada (Preosteoblastos endostales o periostales) que constituye el primer escalón dentro de la estirpe osteoblástica ya que se trata de células totalmente comprometidas²³⁵.

El paso final de la progresión celular a lo largo de la estirpe osteoblástica es el osteocito, que es un osteoblasto que ha quedado encerrado en hueso calcificado. Aproximadamente el 15% de los osteoblastos llega a convertirse en un osteocito. En el momento en que se produce el encierro completo del osteocito en su laguna su actividad metabólica disminuye de manera drástica, debido a la carencia de difusión de nutrientes.

1.B.2.b: Osteoclastos

Los osteoclastos son las células óseas responsables de la reabsorción o destrucción de hueso. Realizan las funciones opuestas a los osteoblastos: disolución del mineral óseo y degradación de la matriz. Estas células derivan de células mononucleares hematopoyéticas de la médula ósea²⁴³. Los precursores mononucleares de osteoclastos pueden circular en la sangre. En la superficie ósea endostal los precursores proliferan y se funden para formar células multinucleadas, que son los osteoclastos. Son células de gran tamaño (20 – 50 μ), multinucleadas, conteniendo de 4 a 20 núcleos normalmente y hasta 100 núcleos en estados patológicos.

La resorción ósea se inicia con la producción por parte de los osteoclastos de iones hidrógeno y enzimas proteolíticas. Los iones hidrógeno son producidos por la anhidrasa carbónica tipo II y luego transportados desde el citosol de los osteoclastos hacia el lugar situado bajo el borde rugoso de las células por una bomba de protones, acidificando el compartimiento²⁵. Esta acidez local produce la disolución del mineral óseo. Posteriormente las enzimas lisosomales sintetizadas por los osteoclastos son secretadas a través del borde rugoso a la zona de resorción ósea extracelular, alcanzando una alta concentración en esta zona. La unión del medio ácido con la acción enzimática da lugar a la degradación de la matriz ósea.

1.B.3: El Remodelado Óseo

La integridad estructural y anatómica del esqueleto es mantenida por la renovación constante del hueso, lo cual es posible a través de un mecanismo de recambio continuo denominado remodelado óseo, que se desarrolla en dos fases sucesivas: la resorción del hueso preexistente

seguido de la formación de hueso de novo. En la primera fase participan los osteoclastos, mientras que en la segunda lo hacen los osteoblastos⁸².

En la vida adulta, en condiciones normales, la cantidad de hueso que se destruye es similar a la que se forma, hecho que se denomina acoplamiento.

1.B.3.a: Regulación del remodelado óseo

El proceso de remodelado óseo está regulado por hormonas sistémicas y factores locales que son los que controlan el reclutamiento, la replicación, la diferenciación y la actividad tanto de las células de la línea osteoblástica como de las de la línea osteoclástica⁴⁵. También está demostrada la implicación de los estímulos mecánicos en el proceso de remodelado óseo¹⁵⁸.

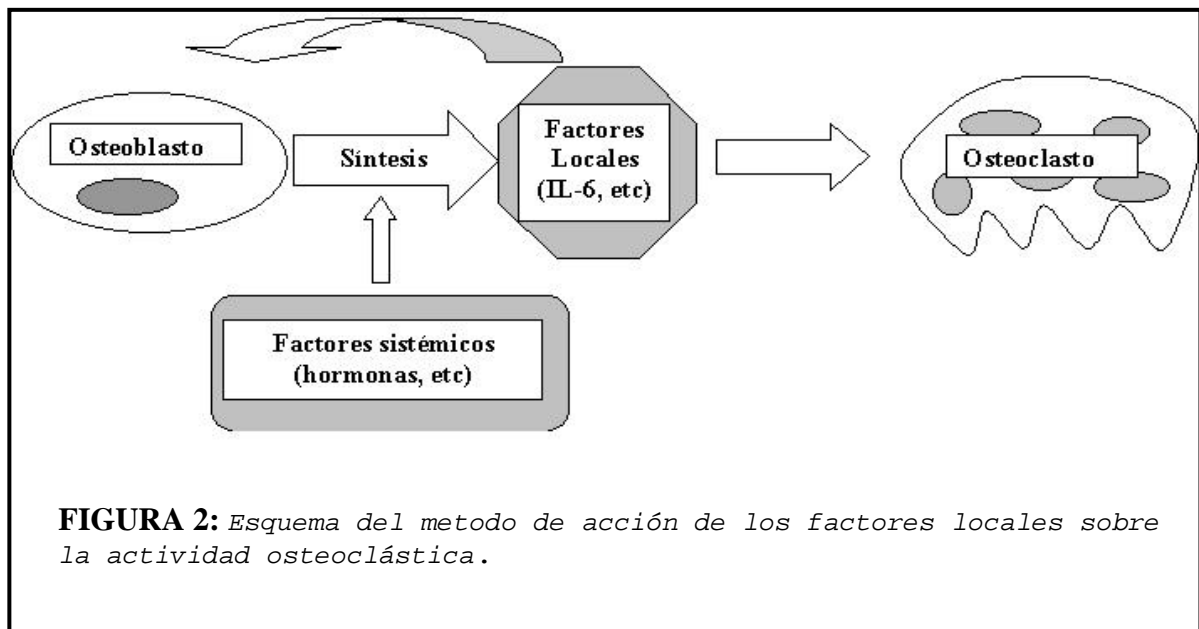
1.B.3.a.1: Factores hormonales

Las principales hormonas involucradas en la regulación del remodelado óseo son la PTH, la 1,25-dihidroxitamina D₃ y la calcitonina, reguladas fundamentalmente por las concentraciones de calcio extracelular. Otras hormonas sistémicas que influyen sobre las funciones de las células óseas, pero que no están directamente reguladas por el calcio del fluido extracelular, son los estrógenos, andrógenos, glucocorticoides, hormonas tiroideas y hormona de crecimiento.

En el modelo experimental empleado en la presente tesis se puede considerar que el aloinjerto se va a comportar como un factor sistémico que va a provocar una reacción en los osteoblastos del huésped.

1.B.3.a.2: Factores locales

Los factores locales reguladores del remodelado óseo incluyen factores de crecimiento, prostaglandinas y citocinas. Los factores locales son sintetizados en su mayor parte en el mismo ambiente óseo por los propios osteoblastos en respuesta al estímulo producido por factores sistémicos hormonales (PTH, estradiol, etc.) o fármacos como los bifosfonatos o el raloxifeno entre otros (*Figura 2*).



a). Los *factores de crecimiento* son polipéptidos que regulan la replicación y la función de las células diferenciadas. Pueden funcionar como factores autocrinos o paracrinos. Aunque pueden tener un efecto sistémico, los factores producidos localmente tienen una función más directa y posiblemente más importante en el crecimiento celular. El hueso es una rica fuente de factores de crecimiento con importantes acciones en la regulación de la formación y reabsorción ósea, entre ellos se pueden citar el

factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), el factor de crecimiento epidermoide (EGF), el TGF- β , las BMP y el PDGF.

b). *Las prostaglandinas* son los únicos reguladores locales del remodelado óseo que no tienen estructura polipeptídica. Aunque no está bien descrita su función, se les atribuye una acción reguladora de la expresión del IGF en células óseas²²⁵.

c). El tercer grupo de factores locales reguladores del remodelado óseo son las *citocinas*. Se trata de factores inmunohematopoyéticos que son producidos en el microambiente del hueso por las células de la médula ósea, por células estromales o por los osteoblastos¹⁸¹, y que actúan sobre las células esqueléticas tanto en el mecanismo de formación como en el de reabsorción. Son pequeños péptidos o glicoproteínas con pesos moleculares entre 6 y 60 kDa. Entre estos factores están la interleucina-1 α y -1 β (IL-1 α e IL-1 β), la interleucina-11 (IL-11), el factor de necrosis tumoral α y β (TNF- α y β), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y la IL-6.

Más recientemente se ha descrito un grupo de factores que regulan la diferenciación osteoclástica, que son factores relacionados con el TNF y la familia del receptor del TNF: la osteoprotegerina (OPG) y el ligando de la osteoprotegerina (OPGL), también conocida como factor de diferenciación del osteoclasto (ODF)^{157;312}.

La IL-6 es una citocina multifuncional de naturaleza glicoproteica de 184 aminoácidos, con un peso molecular de 26 kDa¹²³, producida por diferentes tipos celulares y entre otros, recientemente se ha demostrado que los osteoblastos también sintetizan IL-6¹³³. Esta citocina de múltiples funciones participa en el crecimiento y diferenciación de células B, células

T, mieloma plasmacitomas, hepatocitos, células hematopoyéticas y células nerviosas¹⁶⁹, así como en el control del remodelado óseo³¹⁷.

Actualmente la IL-6 recibe una considerable atención por sus efectos pro-osteoclastogénicos, que ejerce a través de su receptor de superficie celular situado en los osteoblastos. Una vez que se une a su receptor (IL6-r) desencadena una serie de eventos intracelulares que a través de diversos mediadores, ponen en marcha los estadios iniciales de la osteoclastogénesis¹⁷⁰. Precisamente en esta tesis, nos vamos a centrar en la producción de IL-6 por los osteoblastos humanos en cultivo como factor estimulador de la actividad osteoclástica.

1.C: EL CULTIVO DE OSTEOLASTOS

1.C.1: Introducción

El objeto de la presente tesis es el estudio de la respuesta de los osteoblastos en cultivo frente a los aloinjertos. Por ello, resulta conveniente realizar una aproximación al estudio de las técnicas y posibilidades de cultivo de las células formadoras de hueso.

La obtención de células óseas constituye hoy en día una buena herramienta y una adecuada base metodológica para la investigación de la fisiopatología ósea y de las funciones de las células formadoras de hueso^{18;186;208}.

Existen varias dificultades técnicas y metodológicas para cultivar células formadoras de hueso. En principio, el tejido óseo está constituido por una gran variedad de células, cada una de las cuales requiere un medio de cultivo específico y unos factores de crecimiento adecuados. Como la superficie ósea trabecular está en contacto con la médula ósea, de gran potencial proliferativo, es frecuente la contaminación del cultivo de osteoblastos con fibroblastos¹². Por otro lado, el tejido óseo tiene un crecimiento muy lento, por lo cual la capacidad de proliferación celular en el cultivo está limitada, y por tanto es compleja la obtención de un número suficiente de células con una supervivencia prolongada^{18;186}.

1.C.2: Modelos de cultivo de osteoblastos

Teniendo en cuenta las dificultades expresadas anteriormente, se han desarrollado tres modelos principales de cultivos de las células formadoras de hueso: cultivos provenientes de cráneo de rata fetal, cultivos de células de hueso normal enriquecidas en osteoblastos y cultivos de líneas celulares

de osteosarcomas malignos con propiedades osteoblásticas. Cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas.

1.C.2.a: Cultivos de cráneo de rata fetal

En este caso, la anatomía del tejido no se rompe y los cultivos son viables en medio sin suero. Por el contrario, contienen una mezcla de poblaciones celulares, motivo por el cual no se puede medir fielmente la función osteoblástica^{208;212;273}.

1.C.2.b: Técnicas de enriquecimiento osteoblástico

Se puede emplear la técnica de la digestión enzimática mediante colagenasa bacteriana. Esta técnica se ha utilizado en hueso de diversas especies animales, como ratas^{16;226;308}, ratones^{77;167;311}, pollos⁹⁹, conejos³¹³, y bóvidos³⁰⁶. También se ha intentado el cultivo de células osteoblásticas humanas mediante la digestión enzimática del hueso humano³⁰⁵. En este tipo de técnicas el principal inconveniente es que las enzimas utilizadas pueden provocar daños celulares²⁰⁸.

Otra técnica de enriquecimiento osteoblástico es la técnica de explantes en cultivo^{22;190}. Estas técnicas producen una población celular heterogénea que puede dar lugar a un posterior sobrecrecimiento de células fibroblásticas.

1.C.2.c: Cultivos de células de osteosarcoma

Se han obtenido líneas celulares clónicas de fenotipo osteoblástico a partir de tumores óseos sarcomatosos de rata y de humanos como modelo de estudio del comportamiento in vitro de los osteoblastos¹⁴⁸. Dentro de las derivadas de osteosarcomas de rata la más utilizada probablemente sea la conocida con las siglas MC3T3-E1. De hecho, en el primer semestre de 2002 se han publicado más de 50 artículos empleando esta línea celular en

diversos experimentos^{89;236;262;266}, pero además existen otras líneas celulares estables frecuentemente empleadas como la ROS 17/2.8, con unas 20 referencias en el mismo periodo de tiempo^{87;245} y la UMR 106-01 con 5 referencias en el mismo semestre¹⁰⁶. Con estas líneas se logra la estabilidad el cultivo, pero tienen un elevado potencial de crecimiento de células normales diferentes, por lo cual sus respuestas no siempre pueden ser aplicadas al comportamiento del tejido óseo humano.

Otras líneas celulares que también se han empleado en investigación han sido obtenidas por otros sistemas: de tumores sarcomatosos humanos se han obtenido otras líneas establecidas como la TE-85, la MG-63, y la SaOS-2, empleadas por ejemplo en estudios de eficacia y de resistencia a fármacos antitumorales (gemcitabine, etc.) en diferentes sarcomas óseos^{40;117;135;241}. Por ejemplo mediante la clonación de células humanas se han obtenido líneas celulares como la HOBIT (Human Osteoblast Immortalized Transfected)¹⁴⁰. En cualquier caso, al igual que sucede con las líneas obtenidas a partir de animales, la clonación puede provocar alteraciones en el funcionamiento celular que puede impedir que los resultados de estos experimentos sean extrapolables^{186;208}.

Otras técnicas que también se han empleado han aprovechado la capacidad de anclaje de los osteoblastos sobre varillas de cristal⁹⁹ o sobre otras superficies poliméricas³¹⁰.

1.C.3: Técnica de cultivo de osteoblastos humanos

De todo lo expuesto anteriormente acerca de las diversas técnicas de cultivo de células formadoras de hueso se puede deducir con que aquéllas que nos permitan trabajar con osteoblastos humanos no transformados permitirán extrapolar con mayor fiabilidad los resultados obtenidos al comportamiento de las células formadoras de hueso in vivo.

Dentro de todas las técnicas expuestas, las que obtienen células osteoblásticas derivadas de la superficie de fragmentos trabeculares de hueso, aprovechando la capacidad de los mismos de migrar sobre superficies poliméricas (como por ejemplo una malla de nailon) han mostrado ser eficaces y útiles en la obtención de cultivos específicos^{137;186;208}.

Se han publicado numerosos métodos para aislar y cultivar células óseas trabeculares humanas. Así Robey y Termine²⁴⁰ en 1985 consiguieron hacer crecer a una población celular derivada de fragmentos óseos carente por completo de células adherentes en su superficie. Se han hecho otros intentos para separar las células óseas adherentes de las no adherentes mediante técnicas de digestión enzimática¹⁷.

En 1989 Marie y cols¹⁸⁶ publicaron un método de cultivo de osteoblastos humanos derivados selectivamente de la superficie ósea trabecular mediante una técnica de migración celular que permitía la eliminación de las células de la médula ósea. Un proceso similar ya había sido descrito previamente empleando como fuente de osteoblastos vértebras caudales de ratones¹⁶⁷. Con este método las células se obtienen gracias a la migración desde la superficie ósea trabecular hasta una malla de nailon. Gracias a ello se evita la contaminación con células de la médula ósea y se consigue una población celular enriquecida en osteoblastos y sus inmediatos progenitores²²¹. Cuando estas células se cultivan sobre superficies plásticas tienen forma de huso. Durante la fase de crecimiento adquieren una forma más octogonal al alcanzar la confluencia¹⁷. La población celular que migra desde la superficie ósea presenta una tasa menor de proliferación celular que la descrita para las células óseas humanas¹⁷², lo cual indica que las células obtenidas de este modo son precursores inmediatos de los osteoblastos más que precursores de células madre que poseen un potencial de proliferación mucho mayor²²¹. Además

también se han observado variaciones individuales en las tasas de proliferación celular, influyendo en este aspecto circunstancias como la edad^{62;203;205}, el sexo²⁰⁵, la osteoporosis²⁴⁴ o la osteodistrofia renal¹⁸⁵.

1.C.4: Caracterización bioquímica de los osteoblastos humanos en cultivo

Los osteoblastos pueden presentar un aspecto morfológico similar al de los fibroblastos, pero en confluencia su aspecto difiere y adquieren una forma más redondeada^{77;186;241;308}. Por tanto es natural que la morfología no sea suficiente para identificar a los osteoblastos maduros en cultivo y que se deba recurrir a otras técnicas para hacerlo.

- Una de ellas es la tinción para la fosfatasa alcalina, para la que los osteoblastos presentan positividad, al contrario que los fibroblastos^{86;107;167;186;208}. Se considera la actividad de la fosfatasa alcalina como un criterio importante pero no decisivo a la hora de decidir si las células en cultivo son o no células con capacidad osteogénica^{12;208}.

- Los estudios inmunocitoquímicos para colágeno I tampoco pueden ser empleados como marcador específico de osteoblastos ya que los fibroblastos también son positivos para esta tinción^{76;208}.

- La producción de osteocalcina es un marcador de la función osteoblástica. Los cultivos tratados con vitamina D₃ muestran grandes incrementos en la producción de osteocalcina y depende de la población celular en estudio^{156;186;208}.

· Finalmente, los osteoblastos presentan un tiempo de duplicación más largo que los fibroblastos ya que al tener un grado mayor de diferenciación, tienen una menor capacidad proliferativa, especialmente después de 3 ó 4 subcultivos²⁰⁸.

1.D: JUSTIFICACIÓN DEL EXPERIMENTO

Como se ha visto en los apartados anteriores, el empleo de aloinjertos en la clínica diaria continúa siendo muy común, y evidentemente el aspecto más importante del mismo es la correcta integración del aloinjerto en el huésped. Esta integración es el resultado del juego entre los procesos de formación y resorción ósea que tienen lugar en el lugar del implante^{32;192;193;279;280}.

Se ha demostrado que la matriz ósea (la propia matriz del injerto en el caso de un injerto fresco o la matriz del hueso del huésped) contiene constituyentes que regulan el reclutamiento, el número y la actividad de los osteoblastos y de los osteoclastos^{113;116;246;289}. Sin embargo, muy poco se ha publicado acerca de la respuesta que los aloinjertos provocan sobre la célula más directamente implicada en el proceso de incorporación: el osteoblasto. Por otro lado, la mayoría de los trabajos publicados han sido realizados en diferentes modelos animales con las consiguientes dificultades para extrapolar los resultados a los modelos humanos. Sólo hemos encontrado en la literatura un trabajo de Mejdahl y cols¹⁹⁵ en el que han estudiado algunos aspectos de la respuesta que provocan los aloinjertos sobre los osteoblastos humanos en cultivo. Estos autores pretendían estudiar si la temperatura de almacenaje de los aloinjertos podía variar la respuesta de los osteoblastos en términos de proliferación celular y activación de la reabsorción ósea.

Basándonos en estas premisas, el objetivo fundamental del presente estudio ha sido estudiar la posible respuesta que pudieran provocar los aloinjertos humanos sobre los osteoblastos humanos en cultivo, y comprobar la posible capacidad osteoinductora de los mismos. Para ello se ha diseñado un modelo experimental en el que se pudiesen reproducir de la

forma más fiable posible las condiciones in vivo del empleo de aloinjertos. Se ha seleccionado una técnica de cultivo de osteoblastos humanos que permite una extrapolación más fiable que otras al comportamiento de los osteoblastos humanos in vivo. Por otro lado, se ha seleccionado un tipo de aloinjerto, el de esponjosa autoclavado y congelado, como modelo de utilización en la práctica clínica. Por último, se han seleccionado como medidores de la respuesta celular la curva de proliferación de los osteoblastos en cultivo, la determinación del PINP como factor de formación de matriz ósea y la síntesis de IL-6 como factor estimulador de la actividad osteoclástica.

2. Hipótesis y **Objetivos**

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo para la realización de la presente tesis ha sido que los aloinjertos humanos provocan una respuesta y una variación en el comportamiento funcional de las células formadoras de hueso en el huésped. Para el estudio experimental de esta respuesta se han marcado los siguientes objetivos:

- Elaborar y poner a punto un modelo experimental adecuado que permita estudiar la respuesta de las células formadoras de hueso humano tras la aplicación de un aloinjerto óseo.
- Determinar la naturaleza tanto cuantitativa como cualitativa de esta respuesta y sus posibles variaciones a lo largo del tiempo, con especial atención sobre las modificaciones en el proceso de remodelado óseo. Este objetivo se ha desarrollado a través de 3 aspectos:
 - 1º: Estudiar las variaciones que la presencia del aloinjerto induce sobre la proliferación celular de los osteoblastos.
 - 2º: Evaluar la capacidad osteoinductora del aloinjerto en términos de formación de matriz ósea a través de la medida de la síntesis del propéptido aminoterminal del procolágeno I.
 - 3º: Valorar la activación de la reabsorción ósea que provoca el aloinjerto tras su aplicación a través de la determinación de los niveles de la interleucina 6.

3. Materiales

y

métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En la *Figura 3* se recoge un esquema del protocolo experimental realizado.

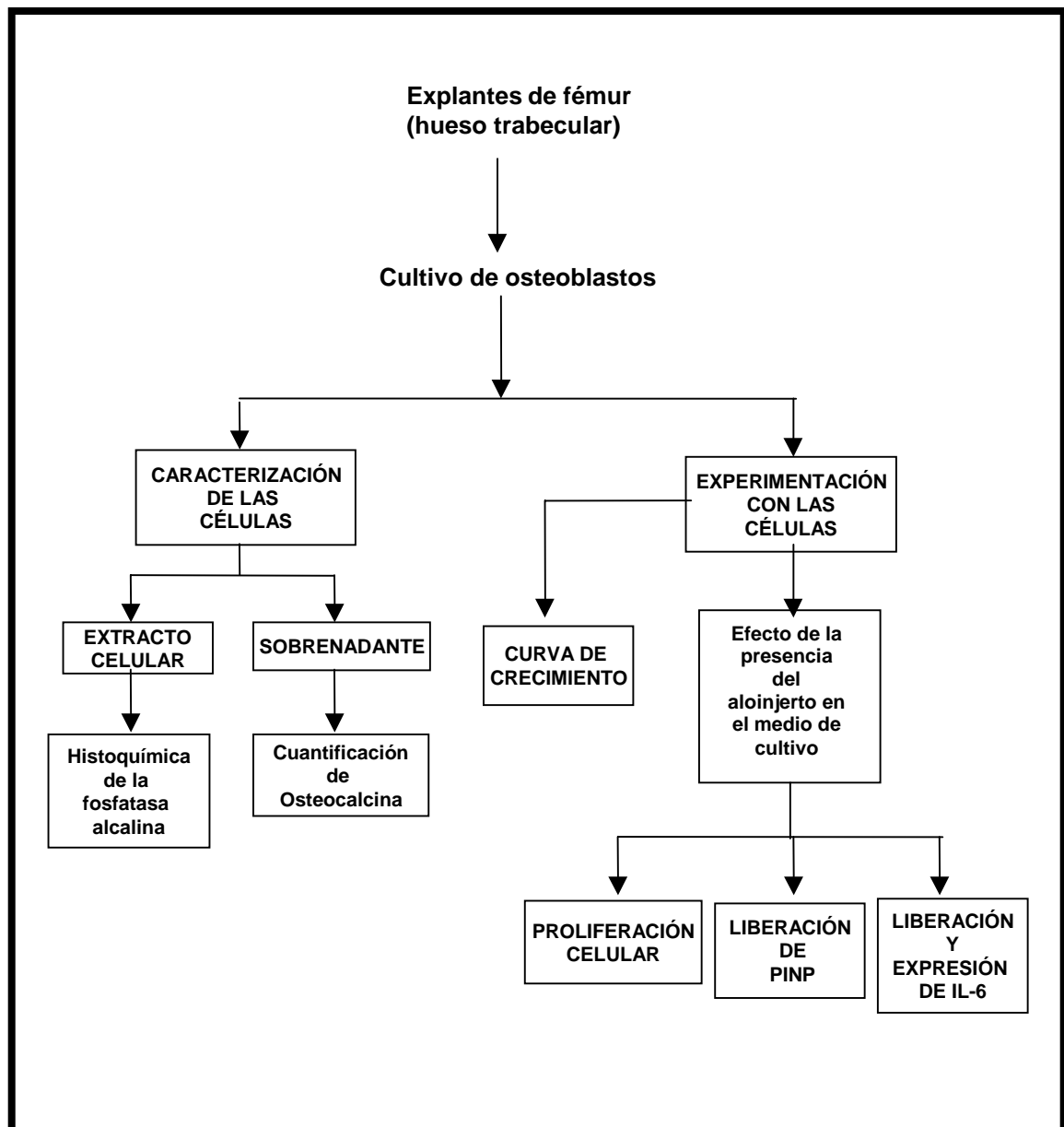


FIGURA 3: *Esquema general del procedimiento experimental seguido en esta tesis.*

El presente estudio se ha realizado con la aprobación de las comisiones de ética del Hospital Clínico San Carlos y de la Fundación Jiménez Díaz de Madrid.

3.A: CULTIVO DE OSTEOLASTOS HUMANOS

Se ha empleado la técnica de cultivo de osteoblastos humanos descrita por Nacher y cols en 1993²⁰⁸ que es una modificación de la metodología empleada por Marie y publicada en 1989¹⁸⁶.

3.A.1: Obtención de los osteoblastos humanos

Se tomaron muestras de hueso esponjoso de 6 pacientes sometidos a artroplastia de rodilla. Las edades de estos pacientes estaban comprendidas entre los 55 y los 70 años. Los pacientes no presentaban antecedentes clínicos de patologías óseas primarias o de otras que pudieran afectar al metabolismo del hueso, tales como hiperparatiroidismo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, alcoholismo, etc., ni estaban tomando drogas que pudieran afectar al mismo. Los valores séricos de creatinina, fosfatasa alcalina, urea y calcio de las pacientes se encontraban dentro del rango normal.

Las muestras tomadas en quirófano fueron depositadas en medio de cultivo estéril DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (*Gibco, Grand Island, NY*) (véanse detalles más adelante) con antibiótico, a 4°C y procesadas dentro de las 4 horas siguientes.

En la campana de flujo laminar (*Figura 4*) las muestras fueron cortadas en fragmentos de 2-3 mm de diámetro (explantes). Los explantes se lavaron repetidamente con tampón fosfato salino [PBS (*Phosphate Buffered Saline*): Na₂HPO₄ 10mM, NaCl 150 mM, pH 7.4] estéril, para

eliminar las células hematopoyéticas y adherentes de la médula ósea. De ese modo la superficie del hueso esponjoso quedaba expuesta. A continuación se cortaron en pequeños trozos de 1-2 mm³, que se lavaron varias veces con PBS, eliminando en lo posible el tejido eritropoyético y otras células de la médula ósea.



FIGURA 4: *Campana de flujo laminar.*

Los explantes se depositaron sobre una malla de nailon de 80 μm de poro (*Cedaceria Industrial, CISA, Barcelona*), sujeta entre dos anillas de vidrio, que se colocaron sobre una placa de Petri (*Figura 5*). Las anillas de vidrio (*Afora, Barcelona*) han sido específicamente diseñadas para este protocolo de cultivo y actúan como un soporte que mantiene los explantes separados del fondo de la placa. El medio de cultivo empleado fue DMEM

suplementado con aminoácidos no esenciales 1% (*GIBCO, Life Technologies*), L-glutamina 2mM (*Imperial, U.K.*), y 100 UI/ml y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina respectivamente (*Biological Industries, Kibbutz Beth Haemek, Israel*), así como con un 20% de suero de ternera fetal (FBS) (*BioWhittaker, Europe*).

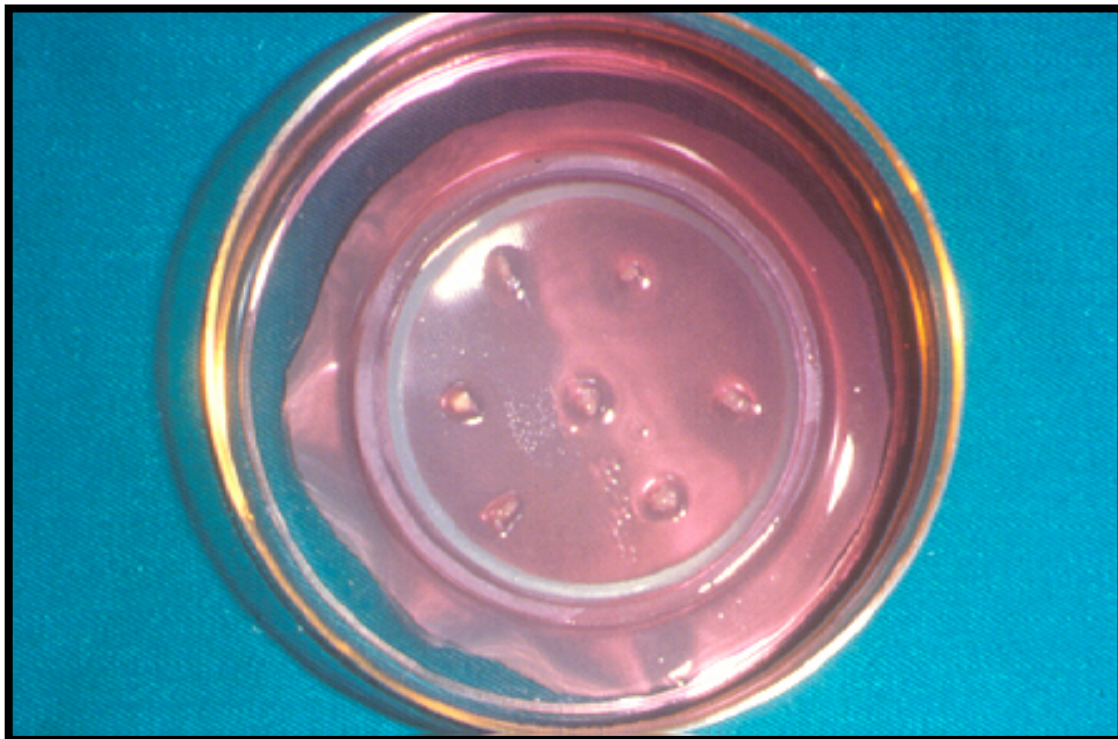


FIGURA 5: *Explantes en la placa de Petri.*

Los explantes depositados en las mallas de nailon sostenidas en las anillas de vidrio junto al medio de cultivo fueron incubados a 37°C en un 5% de CO₂ y atmósfera húmeda (95%) (*Figura 6*). De ahora en adelante, en el texto, al DMEM con aminoácidos no esenciales, glutamina y antibióticos lo denominaremos DMEM suplementado. Se indicará aparte en cada caso, la concentración de suero fetal o de otra sustancia añadida.



FIGURA 6: Estufa empleada para la incubación a $37^{\circ} C$ en atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO_2 .

Las células que no poseían capacidad de adhesión cayeron a través de los poros de la malla y se eliminaron en los sucesivos cambios del medio de cultivo. Una vez iniciada la incubación, no es preciso cambiar el medio de cultivo hasta que transcurre una semana, tiempo que tardan las células osteoblásticas humanas del explante en comenzar a migrar a la malla (*Figura 7*). A partir de este momento, el medio de cultivo se cambia 2 veces por semana en condiciones estériles, en la campana de flujo laminar.

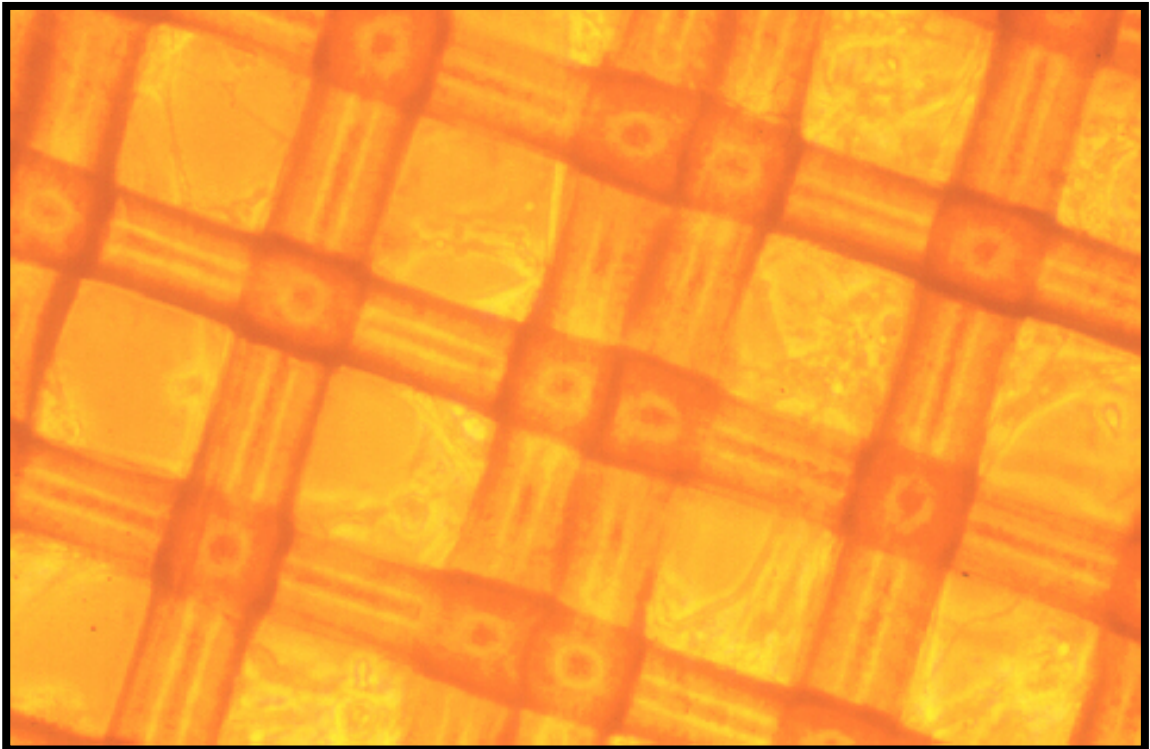


FIGURA 7: Los osteoblastos comienzan a migrar hacia la malla.

Cuando las células han tapizado completamente la malla de nailon en forma de una monocapa confluyente, lo cual tarda aproximadamente unos 45 días, ésta se separa cuidadosamente de los soportes de vidrio y se lava abundantemente con PBS estéril para posteriormente ser tratada con tripsina/EDTA (0,25% de tripsina, 0,2% EDTA sin calcio ni magnesio) (*Imperial, U.K.*) durante 5 minutos a 37°C. Las células obtenidas directamente del soporte de nailon se subcultivaron en un frasco F75 (*Figura 8*) y se incubaron con DMEM suplementado con antibióticos y FBS al 20% (como proponen Nacher y cols²⁰⁸ ya que esta concentración mayor de suero fetal se asocia a un crecimiento significativamente mayor que cuando se emplean menores proporciones). La malla se lavó

cuidadosamente con PBS estéril y las células se separaron de la malla por digestión enzimática con tripsina/EDTA a 37°C durante 5 minutos. La actividad de la tripsina se detuvo con la adición de DMEM suplementado con FBS al 10%. La tripsina de la suspensión celular se eliminó centrifugando 4 minutos a 1200 rpm a 4°C. El precipitado formado por las células se resuspendió en un volumen conocido de DMEM para determinar el número de células obtenidas.

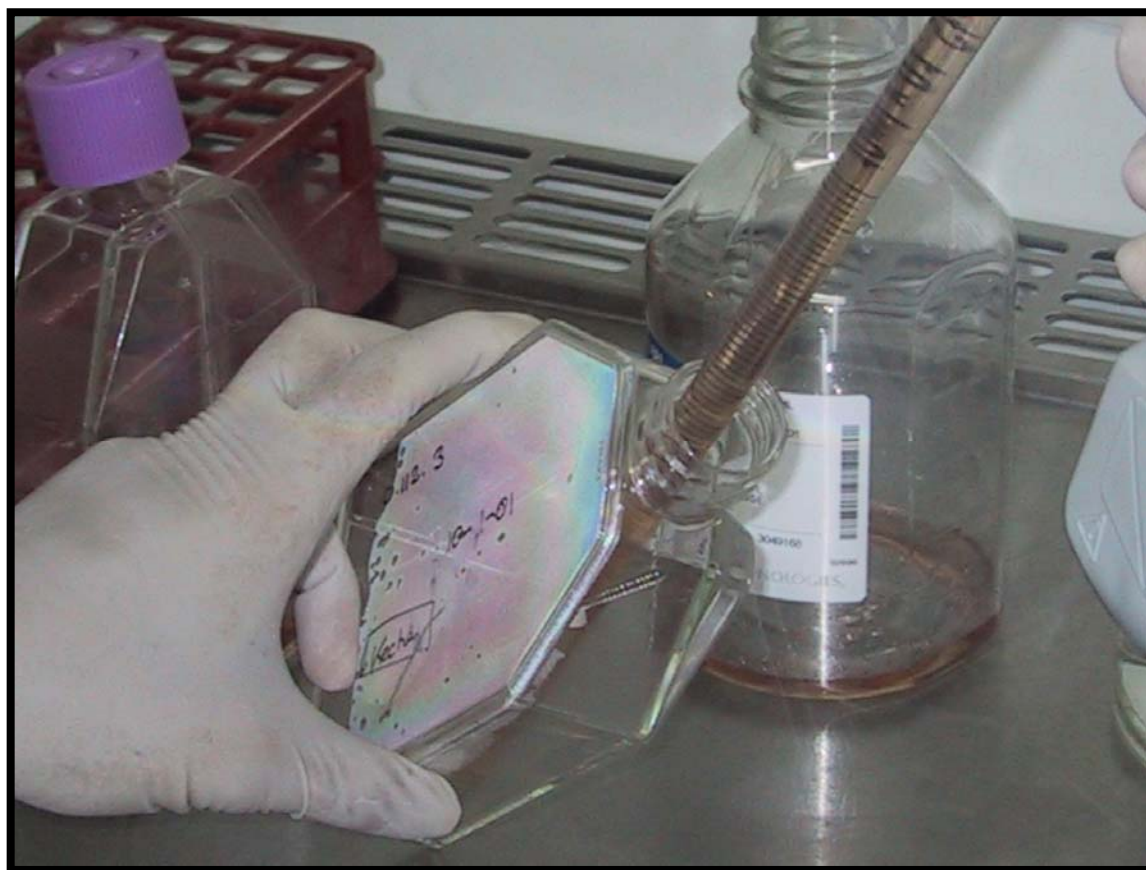


FIGURA 8: *Subcultivo en frasco F-75.*

La cuantificación se realizó mediante el test de exclusión de colorante, que está basado en que las células muertas son permeables al mismo. Para esto, se tomó una pequeña muestra muy homogénea de la suspensión celular y se preparó una dilución 1:2 con la solución azul Tripán (*Sigma*) al 0,4% en PBS, se mezcló bien y se introdujo en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) (*Figura 9*) por capilaridad. Las células no teñidas (viables) fueron distinguidas de las teñidas (muertas) por microscopía óptica.



FIGURA 9: Cámara de Neubauer con la solución azul Tripán incluida, y lista para el conteo celular en el microscopio óptico.

Inmediatamente las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 cm² (F-75, Afora), 400.000 células/frasco y se incubaron con DMEM suplementado y FBS al 20%, en las mismas condiciones descritas anteriormente. Este es el denominado primer pase celular. Cuando el cultivo llegó a confluencia, las células fueron despegadas del frasco con tripsina al 0,25% y nuevamente subcultivadas en F-75, constituyendo el segundo pase, y así sucesivamente. A partir del segundo pase, una parte de los osteoblastos obtenidos se utilizó para realizar la caracterización celular de los mismos, y la otra para los correspondientes experimentos, que siempre fueron realizados entre el 2° y el 5° pase.

3.A.2: Caracterización bioquímica de los osteoblastos

Como se ha mencionado anteriormente, los osteoblastos pueden presentar un aspecto morfológico similar al de los fibroblastos^{77;186;241;308}, y por tanto la morfología no es un criterio suficiente para identificar a los osteoblastos maduros en cultivo y se debe recurrir a otras técnicas para hacerlo.

En el presente trabajo se realizaron la cuantificación de la producción de osteocalcina y de la actividad de la fosfatasa alcalina en el medio de cultivo para la caracterización bioquímica de los osteoblastos humanos.

3.A.2.a: Histoquímica para la fosfatasa alcalina

Las células fueron repartidas sobre cubreobjetos depositados sobre placas (*Cel Cult*) con DMEM suplementado con un 20% de FBS y antibióticos durante 24 horas. Después se cambió el medio de cultivo y se añadió medio suplementado con antibióticos, ácido ascórbico (100µg/ml) y vitamina K (10⁻⁸ M), y se incubó de este modo durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo, se lavó el medio de cultivo 2 veces con PBS y a continuación se fijaron las células con etanol al 96% frío (*Merck*) a 4°C durante cinco minutos. Se preparó una disolución de ácido alfa naftilfosfato al 0,1% en buffer Tris HCl pH=10 (*Sigma, St. Louis, USA*) y un 0,1% de Fast Blue RR (*Sigma, St. Louis, USA*). Las células fijadas se incubaron en esta solución entre 30 minutos y 4 horas a temperatura ambiente¹⁶⁷.

Cuando el color viró a marrón, se retiró la tinción y los cubreobjetos se lavaron con agua destilada, eliminando al final el exceso de agua. Utilizando líquido de montaje, se observaron en el microscopio óptico. Las células que contienen fosfatasa alcalina (FA) se tiñen de color negro al contrario de lo que sucede con otros tipos celulares como podrían ser los fibroblastos, que quedan teñidos de color amarillento. El número de células positivas para fosfatasa alcalina (FA⁺) fue cuantificado y expresado en porcentaje relativo al número total de células.

Los resultados se expresaron de acuerdo con el siguiente criterio:

- +++: aproximadamente un 90% de células positivas para fosfatasa alcalina
- ++: aproximadamente un 50% de células positivas
- +: < 50%

Se considera que un cultivo de osteoblastos debe presentar una positividad a la FA al menos del 50%.

3.A.2.b: Cuantificación de la producción de osteocalcina

La osteocalcina es una proteína sintetizada específicamente por los osteoblastos. Por ello, la producción de dicha proteína se utiliza en la caracterización de estas células^{156;186;208}.

Para cuantificar la cantidad de osteocalcina liberada al medio por los osteoblastos en cultivo, se sembraron 100.000 células/pocillo en placas p-24, que se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10% durante 24 horas. El medio fue retirado y los pocillos lavados con PBS. Se añadieron 500 μ l de DMEM base (DMEM libre de rojo de fenol, Sigma). Suplementado con aminoácidos no esenciales, glutamina y antibiótico como se explicó en el apartado 3.A.1. sin FBS, con 0.1% de BSA, conteniendo vitamina D₃ (10^{-8} M), ácido ascórbico (100 μ g/ml) y vitamina K (10^{-8} M). Después de 72 horas se determinó el contenido de osteocalcina en el medio de cultivo mediante un método inmunoradiométrico (IRMA, ELSA-OSTEO, Cis Bio International, Francia). Este ensayo se utiliza para la determinación en suero de osteocalcina intacta y del fragmento aminoterminal-medio, 1-43⁷³, y utiliza dos anticuerpos monoclonales frente a osteocalcina humana. El primer anticuerpo marcado con ¹²⁵I (trazador), está dirigido contra la parte NH₂-terminal de la molécula (aminoácidos 5-13). El segundo, que recubre la fase sólida, está dirigido contra la parte media de la molécula (aminoácidos 25-39). La curva estándar contiene concentraciones de osteocalcina humana intacta en el rango 5,5 – 280 ng/ml.

El protocolo para la determinación de esta proteína se detalla a continuación:

A los tubos que contienen el segundo anticuerpo se añaden las muestras que contienen osteocalcina problema y el trazador. Tras un

período de incubación, la osteocalcina intacta y el fragmento NH₂ terminal quedan unidos por un extremo a la fase sólida y por el otro al primer anticuerpo marcado con ¹²⁵I. Posteriormente se realizan una serie de lavados para eliminar el exceso de radiactividad y se mide la radiactividad remanente en el tubo, en un contador gamma. La cantidad de radiactividad medida es directamente proporcional a la cantidad de osteocalcina presente en la muestra.

La sensibilidad del método es de 1,2 ng/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron del 3,5% y del 4,1% respectivamente⁷³.

3.A.3: Curva de proliferación celular de los osteoblastos

Las células fueron sembradas a una densidad de 10.000 células/cm² en placas p-24, y se incubaron con 1 ml/pocillo de DMEM suplementado con FBS al 10% durante 24 horas. Entonces, el medio fue cambiado por DMEM suplementado con FBS al 20%, considerándose este momento como tiempo cero. Las células viables fueron contadas desde el primer día hasta que las células se encontraban en la fase de confluencia, cambiando el medio de cultivo dos veces por semana. Los contajes celulares se realizaron tras el lavado de los correspondientes pocillos con PBS y la subsecuente tripsinización. Las células viables se determinaron utilizando la tinción con azul tripan como se explica en el apartado 3.A.1. Los contajes se hicieron por triplicado en cada tiempo, y se expresaron como la media del contaje ± desviación estándar (DE).

3.B: OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE ALOINJERTOS

3.B.1: Selección y procesamiento de las piezas

Los aloinjertos provenían del Banco de Huesos del Servicio de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid²³⁰. En el presente trabajo se han empleado tres piezas provenientes de donantes multiorgánicos que no sufrían ninguna alteración metabólica ósea.

Las piezas fueron mesetas tibiales, y se ha seleccionado este origen debido a la abundancia de hueso esponjoso. En dos casos se trataba de donantes en la tercera década de la vida, un varón y una hembra; y la tercera provenía de un donante varón de 58 años. En todos los casos las piezas fueron extraídas en condiciones estériles en quirófano, en el curso de una donación multiorgánica. Una vez recogida la pieza, se esterilizó mediante autoclave durante 30 minutos a 130° C, dentro de las primeras 24 horas tras la extracción, y se congeló a -80°C hasta el momento de su utilización en el experimento. Este protocolo de tratamiento es el mismo que el seguido para las piezas destinadas a ser empleadas en la clínica como aloinjertos no estructurales^{230;300}.

3.B.2: Preparación de los aloinjertos

Una vez que los osteoblastos en cultivo habían llegado a la confluencia, y se calculaba que su número era suficiente, se preparaban los aloinjertos, en ningún caso después de tres meses tras su extracción del donante.

Las piezas fueron descongeladas sumergiéndolas en suero fisiológico, y en condiciones estériles. En la campana de flujo laminar eran

lavadas abundantemente con PBS. Posteriormente se extraían cilindros de hueso esponjoso de 0,5 cm de diámetro y de una longitud lo mayor posible mediante una trefina (*Figura 10*), los cuales eran cortados en secciones homogéneas de aproximadamente 3 mm de altura con la ayuda de una hoja de bisturí (*Figura 11*) y a continuación, cada una de estas secciones era dividida en cuartos (*Figura 12*). De esta manera se obtuvieron una gran cantidad de fragmentos de aloinjerto de tamaño y forma homogénea que eran lavados abundantemente en PBS para eliminar los restos de médula ósea y que permitían su empleo en los pocillos de cultivo de las placas P-24.

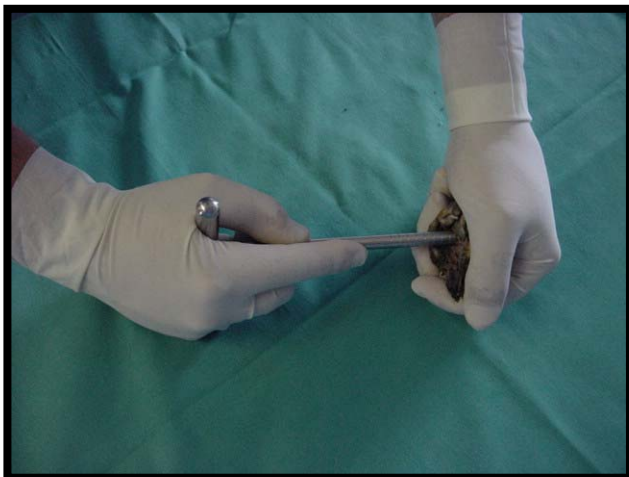


FIGURA 10: De la pieza de aloinjerto se obtuvieron cilindros homogéneos con la ayuda de una trefina.

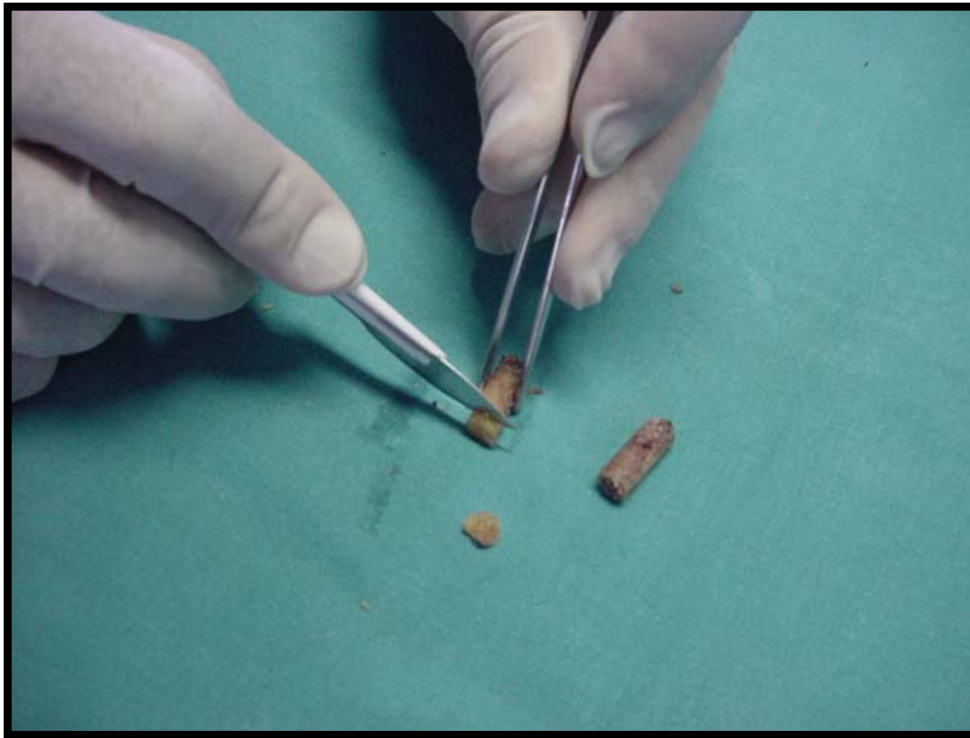


FIGURA 11: *Los cilindros se subdividieron en secciones de unos 2-3 mm de grosor aproximadamente con la ayuda de un bisturí.*



FIGURA 12: Finalmente las secciones se dividen en cuartos. De este modo se obtienen fragmentos homogéneos de aloinjerto que pueden ser incluidos en los pocillos de las placas P24.

3.C: DISEÑO Y METODOLOGÍA DEL EXPERIMENTO

Todos los experimentos se han hecho por cuadruplicado y se han empleado como control pocillos sin aloinjerto. Las determinaciones se hicieron a los 2, 4, 6, 8, 10 y 13 días, y para cada uno de ellos se prepararon 8 pocillos por línea celular, 4 con aloinjerto (problema) y otros 4 sin él (control).

En pocillos de placas P24 (*Figura 13*) se sembraron 20.000 células provenientes de cada una de las 7 líneas de osteoblastos humanos cultivadas.

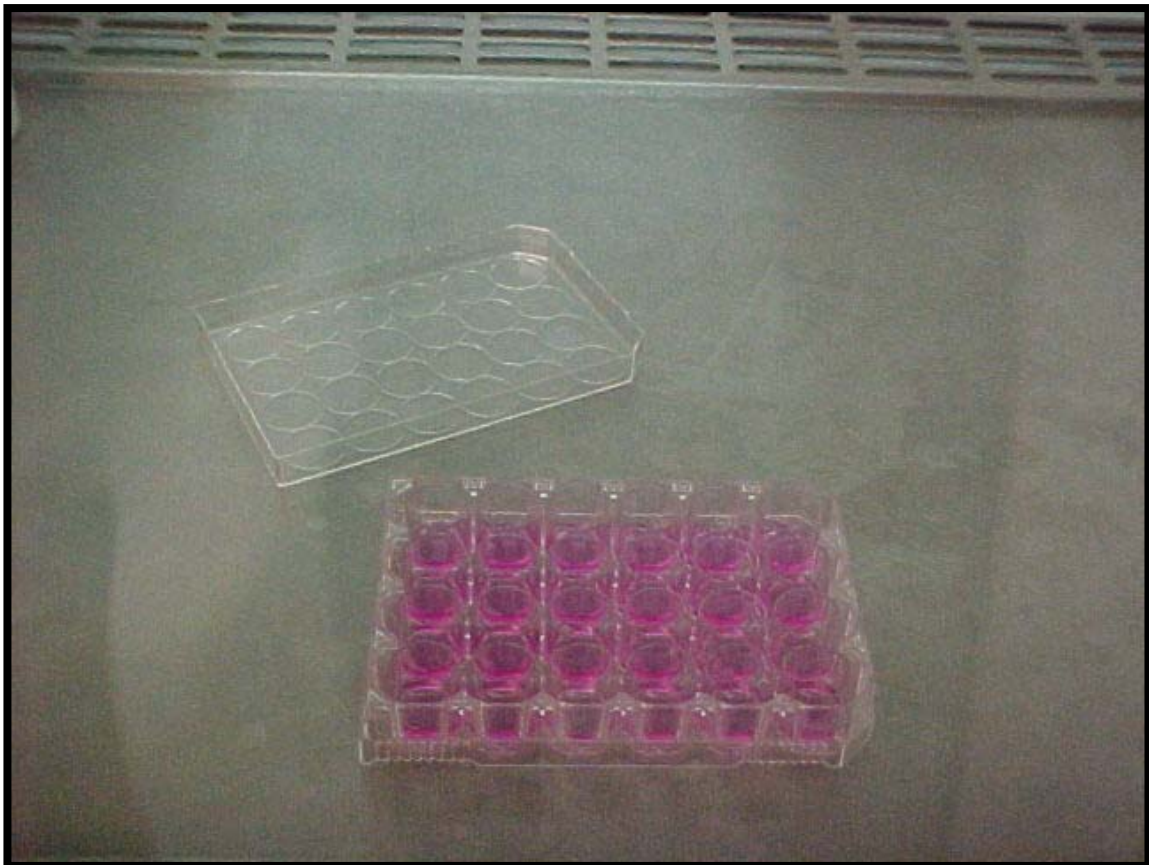


FIGURA 13: *Los experimentos se realizaron en placas P 24.*

Al día siguiente de haber sembrado las 20.000 células en cada pocillo, se comprobó por microscopía óptica que la mayor parte de los osteoblastos se habían adherido al fondo del mismo. Éste fue considerado el día 0 del experimento.

En este momento, en 4 de los pocillos problema de cada día se añadía un fragmento de aloinjerto, mientras que los otros cuatro eran empleados como control. Para facilitar el trabajo y evitar complicaciones se empleó una placa P24 diferente para cada día en el que se iban a realizar las determinaciones (*Figura 14*). Los osteoblastos de todas las placas fueron incubados en DMEM libre de rojo fenol suplementado con FBS al 20% en estufa a 37°C con un 5% de CO₂ en atmósfera húmeda (95%).



FIGURA 14: Para cada día en el que se iban a tomar las determinaciones se empleó una placa P 24 diferente.

Cada 2 días se cambió el medio de cultivo en condiciones estériles, en campana de flujo laminar, y se procesaron los pocillos correspondientes. En primer lugar se extrajo el sobrenadante, que fue posteriormente congelado a -80°C en alícuotas para las determinaciones bioquímicas. Después se lavó cada pocillo dos veces con $50\ \mu\text{l}$ de PBS y se añadieron $200\ \mu\text{l}$ de tripsina al $0,25\%$ en cada uno durante 5 minutos a 37°C . Tras esto, se resuspendió cada uno de los pocillos, comprobándose la homogeneidad de la suspensión mediante microscopía óptica, y después se tomaron $15\ \mu\text{l}$ de esta preparación que fueron diluidos en proporción 1:2 con azul Tripan al $0,4\%$ en PBS, realizándose el contaje celular mediante una cámara de Neubauer de igual forma a la descrita anteriormente.

3.D: DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Los sobrenadantes obtenidos en los diferentes días del experimento fueron descongelados, y en ellos se determinaron los niveles de Propéptido Aminoterminal del Procolágeno I y de Interleucina-6 liberados al medio de cultivo por los osteoblastos humanos:

3.D.1: Determinación del Propéptido Aminoterminal del Procolágeno I (PINP)

Se recogieron alícuotas de los sobrenadantes del medio de cultivo en las condiciones descritas en el apartado 3.C. y fueron descongeladas y empleadas para la determinación del PINP. Los niveles de PINP se midieron mediante el radioinmunoensayo TYPE I PROCOLLAGEN INTACT PINP [^{125}I] (*Orion Diagnostica, Finlandia*). Este ensayo se utiliza para medir la concentración del PINP en suero y otros fluidos biológicos¹⁹⁶. El PINP contenido en las muestras problema se pone en contacto con el trazador (PINP marcado con ^{125}I). Ambas sustancias compiten por los puntos de unión a un anticuerpo anti-PINP de conejo. La cantidad de PINP marcado con ^{125}I presente en el complejo antígeno-anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de PINP sin marcar presente en la muestra. Se añade entonces un anti-anticuerpo de conejo para separar la fracción de PINP libre y la ligada (unida al anticuerpo). Tras una centrifugación y la eliminación del sobrenadante (fracción libre), se mide la radiactividad ligada en un contador gamma. La concentración de PINP se calcula refiriéndola a una curva estándar con un rango de concentración entre 0 y 250 $\mu\text{g/l}$.

La sensibilidad del método es de 2 $\mu\text{g/l}$ y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo son de 5% y 8,75% respectivamente.

3.D.2: Determinación de la Interleucina 6 (IL-6)

Se recogieron alícuotas de los sobrenadantes del medio de cultivo en las condiciones descritas en el apartado 3.C. y fueron descongeladas y utilizadas para la determinación de la IL-6. Se determinaron los niveles de IL-6 utilizando un ensayo inmunoradiométrico específico (*IRMA*, *BIOSOURCE, Europe S.A.*). Este ensayo es utilizado para la determinación de IL-6 en suero, en otros fluidos biológicos o en sobrenadantes de cultivos celulares *in vitro*. Es un ensayo en dos etapas, que utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos a epítomos distintos de la IL-6; el primer anticuerpo recubre el fondo del tubo (fase sólida) y el segundo anticuerpo está marcado con ^{125}I . Para ello, se añaden las muestras problema a los tubos que contienen el primer anticuerpo. Tras una incubación, la IL-6 queda unida a la fase sólida. Se hace un lavado para eliminar restos no unidos al anticuerpo. Se añade entonces el anticuerpo marcado con ^{125}I . Después de una incubación y de un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo, se mide la radiactividad remanente en el tubo en un contador gamma. La cantidad de radiactividad medida es proporcional a la concentración de IL-6 en la muestra en estudio.

La curva estándar presenta un rango de concentraciones entre 0-5000 pg/ml.

La sensibilidad del método es de 6 pg/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo son de 5,03% y 5,43%, respectivamente.

3.E: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las determinaciones fueron realizadas en seis líneas celulares diferentes, según se señala en el correspondiente apartado de resultados. Cada línea celular procedía de un paciente distinto. Cada punto experimental de cada línea fue realizado por cuadruplicado.

Con objeto de poder tratar los resultados correspondientes a las diferentes líneas en conjunto, los datos obtenidos con los diferentes huesos, cuyos niveles basales muestran una gran variación, se han estandarizado, tomando como 100% las condiciones del control (sin la adición de aloinjerto) en cada línea celular.

Los datos se han introducido en una hoja de cálculo tipo Excel V 5.0 para Windows 98. Se ha revisado la fiabilidad de los datos mediante el tecleo doble de los mismos.

Los estadísticos descriptivos empleados en el texto para datos cuantitativos continuos han sido los parámetros habituales de media y desviación típica (DE).

La normalidad de los datos se ha comprobado mediante el test estadístico de Kolmogorov- Smirnov, utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows V 9.0 (SPSS Inc, Chicago, Il). Aunque las variables demostraron ser compatibles con la distribución normal (test de Kolmogorv-Smirnov no significativo), debido al pequeño tamaño muestral manejado en este trabajo se ha optado por emplear pruebas no paramétricas al estar basadas en el rango de los datos y no en los parámetros (media y desviación típica) que se emplean en la estadística paramétrica convencional (test t, por ejemplo). De esta manera, se reducen las consecuencias que pueden tener un valor extremo sobre un pequeño conjunto de medidas y se aproxima de una manera más correcta al valor de probabilidad que estiman los test de hipótesis. Los tests de hipótesis

utilizados en este trabajo han sido los de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos independientes, al ser más potente que la prueba de la mediana para detectar diferencias entre dos grupos.

El nivel de significación estadística se ha establecido con un error tipo I igual o inferior a 0,05.

4. Resultados

4. RESULTADOS

4.A: CULTIVO DE OSTEÓBLASTOS A PARTIR DE EXPLANTES DE HUESO TRABECULAR HUMANO

4.A.1: Modelo celular: puesta a punto del protocolo de cultivo

Una vez colocados los explantes óseos sobre la malla de nailon las células comenzaron a visualizarse alrededor del hueso a partir de los 5-8 días de cultivo. El tiempo medio transcurrido para que se tapizara por completo la superficie de la malla fue de 45 días (*Figura 15*). A partir de este momento se procedió al subcultivo celular y a la caracterización de las células como osteoblastos, según se ha descrito en el apartado de materiales y métodos.

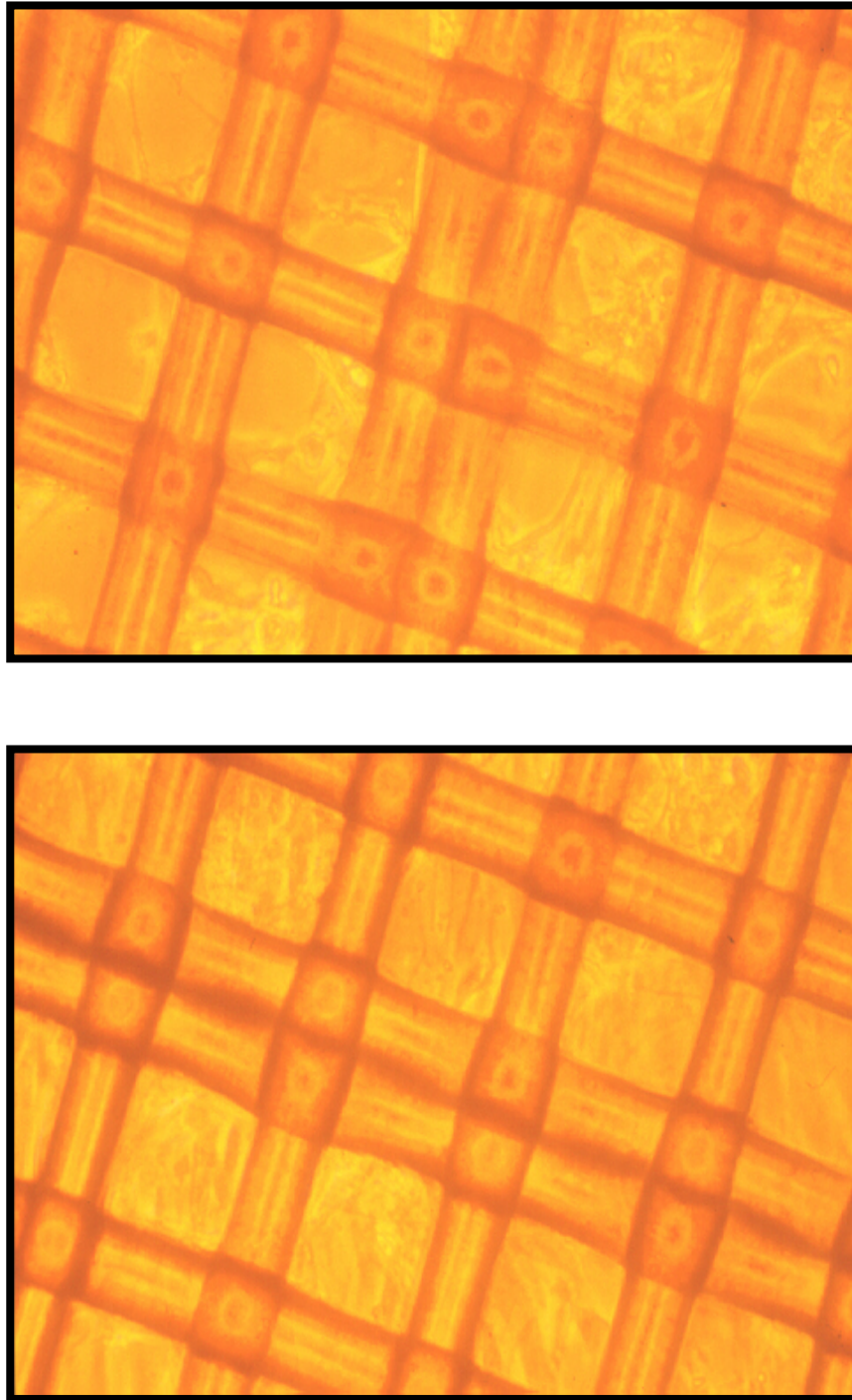


FIGURA 15: *La superficie de la malla se tapiza por completo de células, lo cual tardó un tiempo medio de 45 días. En la figura se puede comparar el estado inicial, en el que las células comienzan su migración y el final en el que cubren por completo la malla.*

La *Figura 16* se puede comparar el aspecto del subcultivo de osteoblastos a los 2-3 días de su siembra y se puede comparar con el aspecto típico del cultivo de osteoblastos en confluencia (8-10 días). Además, también cabe destacar que se puede observar la forma cuboidal característica de los osteoblastos.

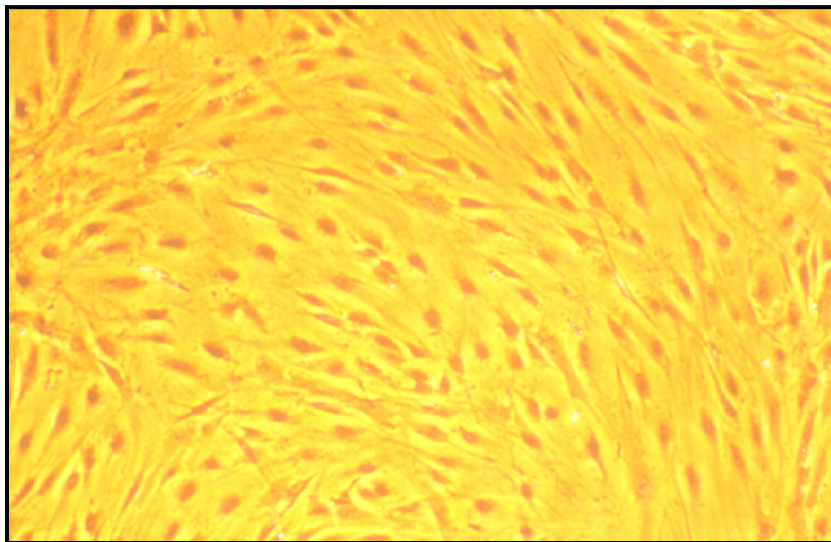
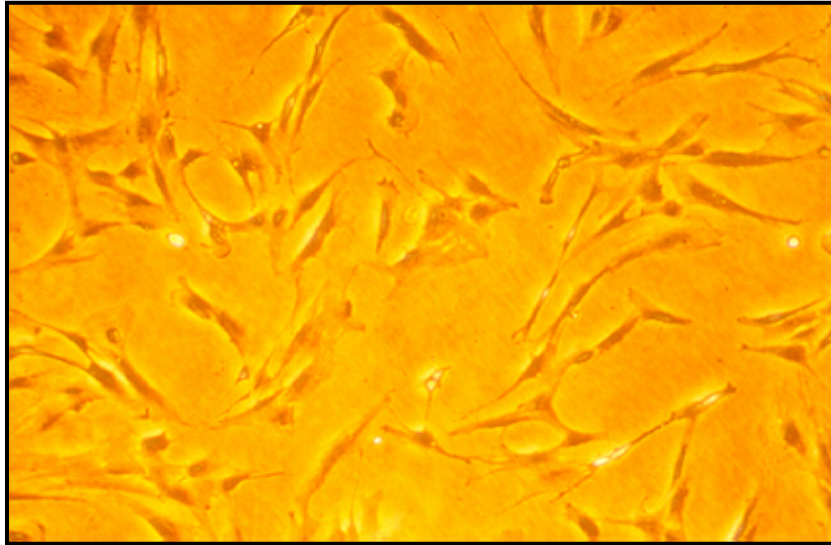


FIGURA 16: *Tras 8-10 días los osteoblastos en cultivo aumentan su número y alcanzan la confluencia.*

4.A.2: Caracterización celular de osteoblastos

4.A.2.a: Histoquímica de la Fosfatasa Alcalina

Todas las líneas celulares caracterizadas mostraron reacción positiva a la tinción de fosfatasa alcalina. Aunque la positividad entre las líneas fue con mayor o menor intensidad, siempre más del 50% de las células de cada línea presentaron histoquímica positiva para la fosfatasa alcalina.

4.A.2.b: Determinación de Osteocalcina en el medio de cultivo

En todos los casos, las células óseas en cultivo liberaron osteocalcina en presencia de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Los niveles de osteocalcina cuantificados en el medio de cultivo fueron muy variables entre las diferentes líneas estudiadas. El rango osciló entre 5,8 y 34.1 ng de osteocalcina/mg proteína.

Tanto las observaciones morfológicas como las propiedades funcionales expresadas por las células humanas en estudio, han permitido identificarlas como osteoblastos.

4.2: CURVA DE CRECIMIENTO

La *Figura 17* muestra la curva de crecimiento típica de los osteoblastos, expresada como media \pm DE.

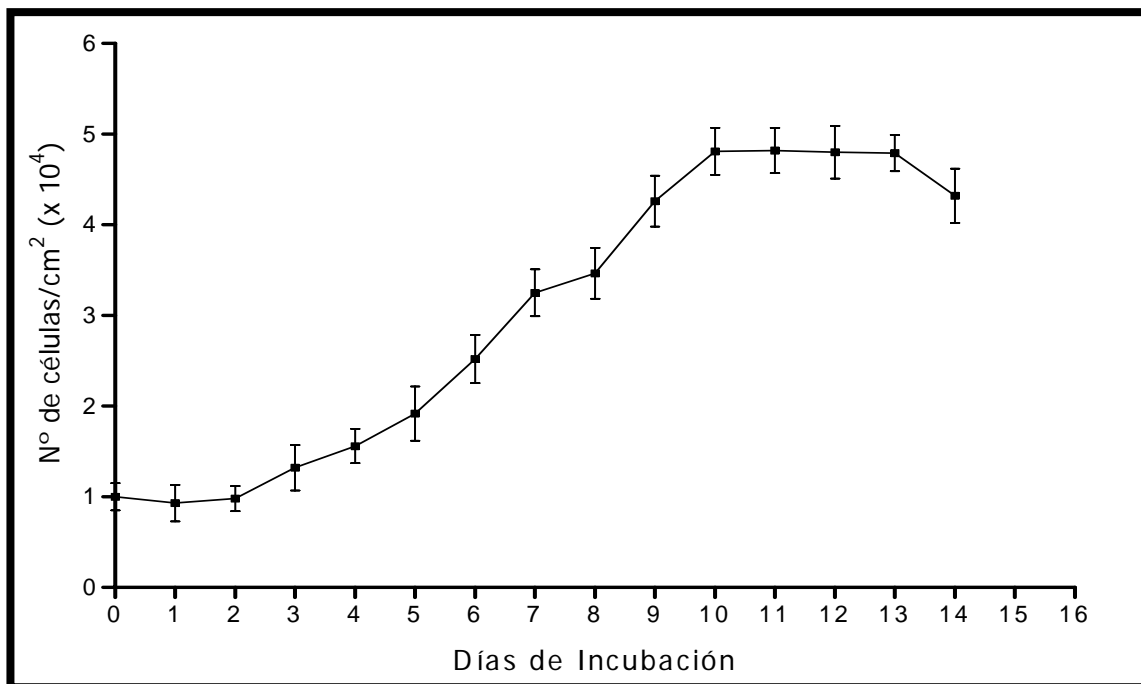


FIGURA 17: Curva de crecimiento de osteoblastos humanos. Esta curva se obtuvo tras sembrar a los osteoblastos en placas P-24 a una densidad de 10 000 células/cm² y después se incubaron con DMEM suplementado con FBS al 20%. Se incubaron durante 14 días, cambiando el medio de cultivo dos veces por semana. Cada punto en el gráfico es la media \pm desviación estándar de tres pocillos de una línea celular representativa

El perfil de proliferación fue muy similar en todas las líneas estudiadas, por lo que en la figura se muestra un experimento representativo. En cada una de las curvas de crecimiento se observó un aumento exponencial que alcanzó una monocapa de células confluentes aproximadamente a partir de los 10 días de cultivo.

4.C: EFECTO DEL ALOINJERTO SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LOS OSTEOLASTOS HUMANOS EN CULTIVO

4.C.1: Efecto del aloinjerto sobre la viabilidad celular

Después de la incubación de las células con el aloinjerto, la viabilidad celular medida por exclusión con azul Tripán siempre fue superior al 95 %, lo que descartaba efectos desfavorables del aloinjerto sobre la viabilidad celular.

4.C.2: Medida de la proliferación mediante conteo celular

En la *Figura 18* se muestra la densidad celular de los osteoblastos en cultivo, en presencia y ausencia (control) de aloinjerto a los 2,4,6, 8,10 y 13 días desde la introducción del fragmento de aloinjerto en el pocillo de cultivo.

Con el fin de homogeneizar las diferencias debidas al diverso grado de proliferación de las distintas líneas celulares correspondientes a los diferentes pacientes, se ha tomado el número de células del grupo control como el 100% cada uno de los días, para facilitar la comparación con el grupo problema en presencia del aloinjerto.

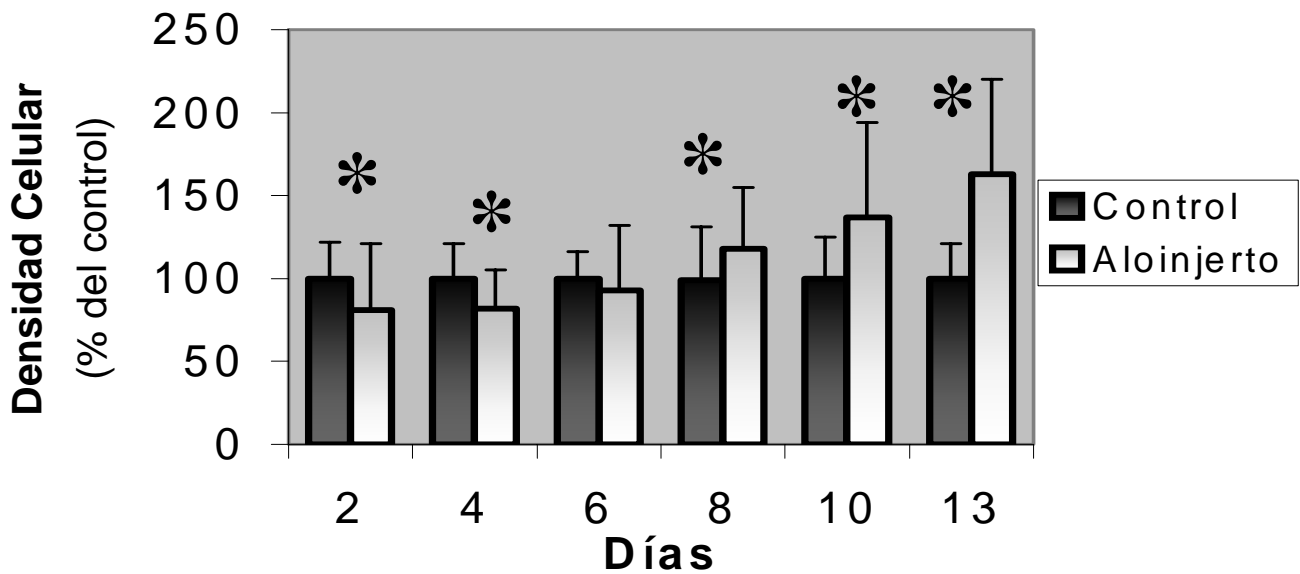


FIGURA 18: Efecto de la presencia de aloinjerto sobre la proliferación de los osteoblastos humanos en cultivo. Sobre las columnas en que se ha observado una diferencia estadísticamente respecto al control (en ausencia de aloinjerto) significativa se ha colocado un asterisco.

Como puede observarse, el número de osteoblastos en el grupo con aloinjerto fue significativamente menor ($p < 0,05$) los días 2 y 4; mientras que fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los días 8, 10 y 13. Las significaciones estadísticas de las diferencias encontradas entre el grupo control y el del aloinjerto se reflejan en la *Figura 19*.

DÍA	Significación Estadística
Día 2	p= 0,0256
Día 4	p= 0,0169
Día 8	p= 0,0305
Ida 10	p= 0,0001
Día 13	p= 0,000

FIGURA 19: Niveles de significación estadística de la Figura 18 obtenidos mediante el Test de Mann-Whitney. N° de líneas celulares =6. Dentro de cada línea celular cada punto se ha procesado por cuadruplicado.

4.D: EFECTO DE LA PRESENCIA DEL ALOINJERTO SOBRE LOS NIVELES DE PINP LIBERADO AL MEDIO DE CULTIVO POR LOS OSTEOLASTOS HUMANOS

En la *Figura 20* se muestra la concentración en ng/ml del PINP en el cultivo, tanto en presencia como en ausencia (control) del aloinjerto a los 2, 4, 6, 8 y 13 días desde la introducción del fragmento de aloinjerto en el pocillo de cultivo. Las concentraciones de PINP producidas por los osteoblastos en cultivo presentaron un amplio rango de variación dependiendo de la línea celular estudiada (entre 52 y 799 ng PINP/ml). Debido a la diferencia en la producción de PINP de cada una de las líneas celulares, y para homogeneizar los resultados, se ha tomado el número de células del grupo control como el 100% cada uno de los días, para facilitar la comparación con el grupo problema en presencia del aloinjerto.

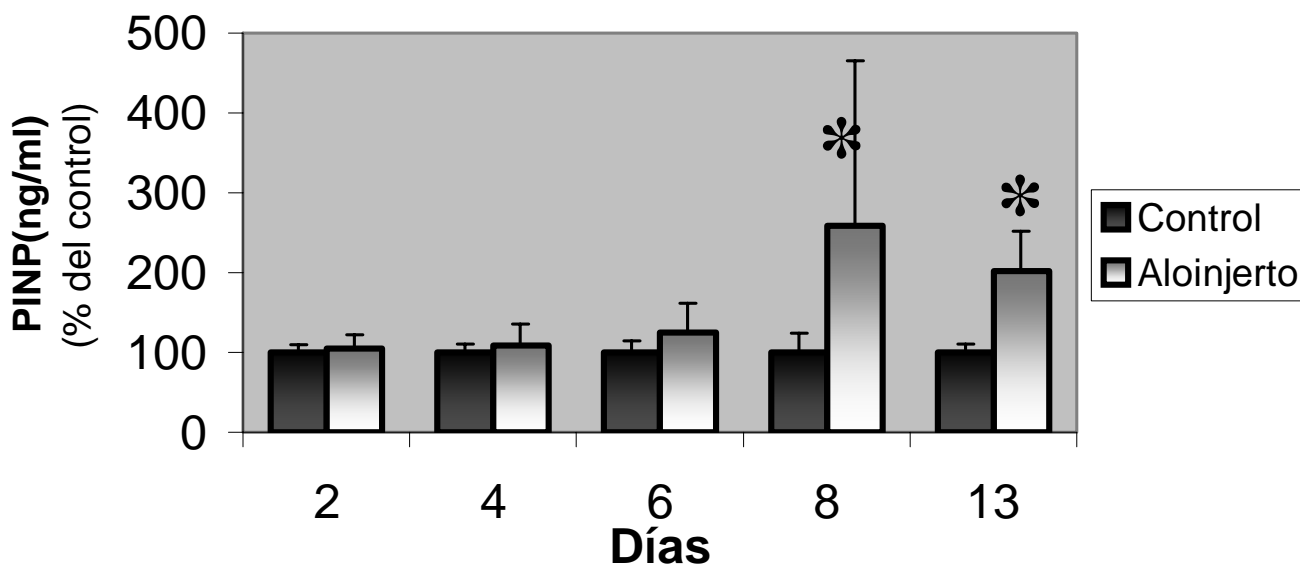


FIGURA 20: Efecto de la presencia de aloinjerto sobre la concentración de PINP expresada por ml. en el medio de cultivo de los osteoblastos humanos. Sobre las columnas en que se ha observado una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (en ausencia de aloinjerto) se ha colocado un asterisco

Se observó un aumento significativo en la segunda semana del experimento, mientras que en la primera semana no se aprecian diferencias significativas entre el grupo control con el tratado con aloinjerto. En la *Figura 21* se indican los niveles de significación estadística encontrados al comparar el grupo problema y el control sólo cuando fueron estadísticamente significativos.

DÍA	Significación Estadística
Día 8	P= 0,0305
Día 13	P= 0,000

FIGURA 21: *Niveles de significación estadística de la Figura 20 obtenidos mediante el Test de Mann-Whitney. N° de líneas celulares =6. Dentro de cada línea celular cada punto se ha procesado por cuadruplicado.*

Con el fin de comprobar que este aumento de la concentración de PINP en el medio de cultivo producido por la presencia de los aloinjertos no se debía exclusivamente al aumento de la proliferación celular, se calculó la concentración de PINP por célula. En la *Figura 22* se muestra la cantidad de PINP en el cultivo por millón de células ($\text{ng}/10^6$ células) tanto en presencia como en ausencia (control) del aloinjerto a los 2, 4, 6, 8 y 13 días desde la introducción del fragmento de aloinjerto en el pocillo de cultivo. Para su diseño también se ha tomado la concentración de PINP del

grupo control como el 100% cada uno de los días, para facilitar la comparación con el grupo problema en presencia del aloinjerto.

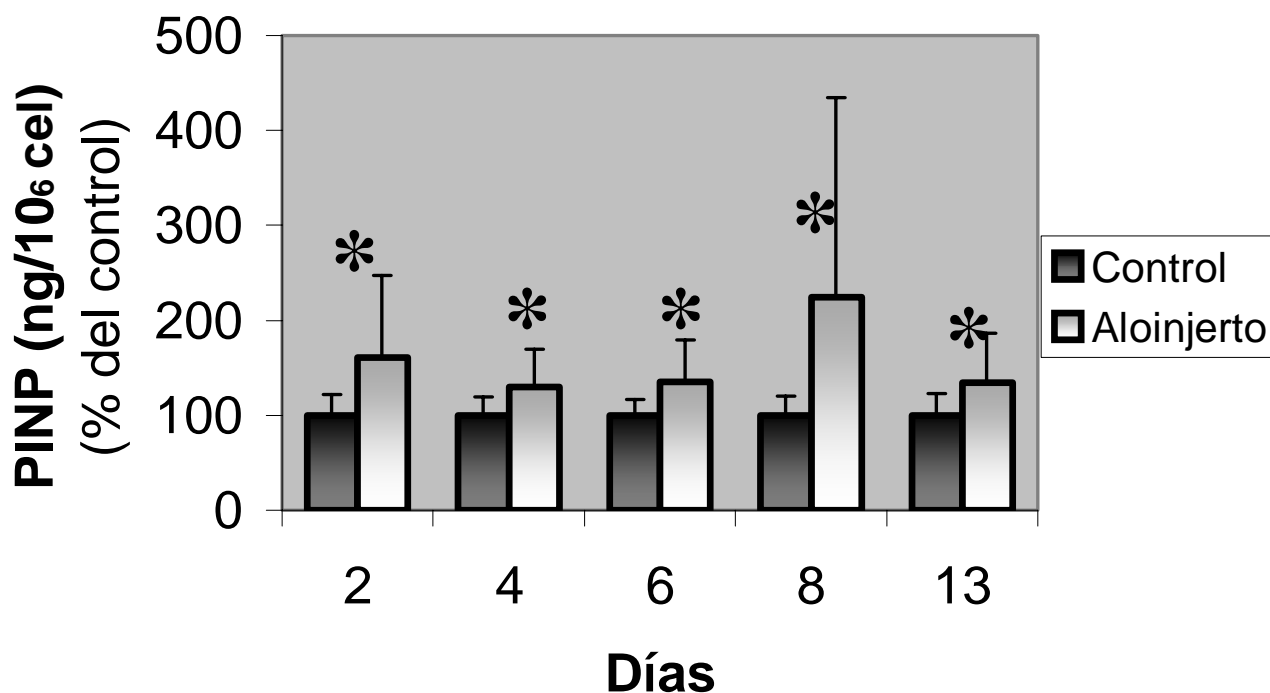


FIGURA 22: Efecto de la presencia de aloinjerto sobre la cantidad de PINP en el medio de cultivo de los osteoblastos humanos expresada por millón de células. Sobre las columnas en que se ha observado una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (en ausencia de aloinjerto) se ha colocado un asterisco.

Cuando se estudió la síntesis de PINP por millón de células se observó un aumento significativo en todos y cada uno de los días del experimento. En la *Figura 23* se reflejan los niveles de significación estadística encontrados al comparar el grupo problema y el control.

DÍA	Significación Estadística
Día 2	p= 0,0138
Día 4	p= 0,0052
Día 6	p= 0,0038
Día 8	p= 0,0501
Día 13	p= 0,0525

FIGURA 23: *Niveles de significación estadística de la Figura 22 obtenidos mediante el Test de Mann-Whitney. N° de líneas celulares =6. Dentro de cada línea celular cada punto se ha procesado por cuadruplicado.*

4.E: EFECTO DE LA PRESENCIA DEL ALOINJERTO SOBRE LOS NIVELES DE IL-6 LIBERADA AL MEDIO DE CULTIVO POR LOS OSTEÓBLASTOS HUMANOS

En la *Figura 24* se muestra la concentración de IL-6 en el cultivo tanto en presencia como en ausencia (control) del aloinjerto a los 2, 4, 6, 8 y 13 días desde la introducción del fragmento de aloinjerto en el pocillo del cultivo de osteoblastos. Debido a que los niveles de IL-6 producidos por los osteoblastos humanos presentaron un amplio rango de variación dependiendo de la línea celular estudiada a confluencia (entre 1.012 y 52.038 pg IL-6/ml), no se han expresado las concentraciones de IL-6 en valor absoluto, sino como porcentajes con respecto al experimento control, sin adición de aloinjerto.

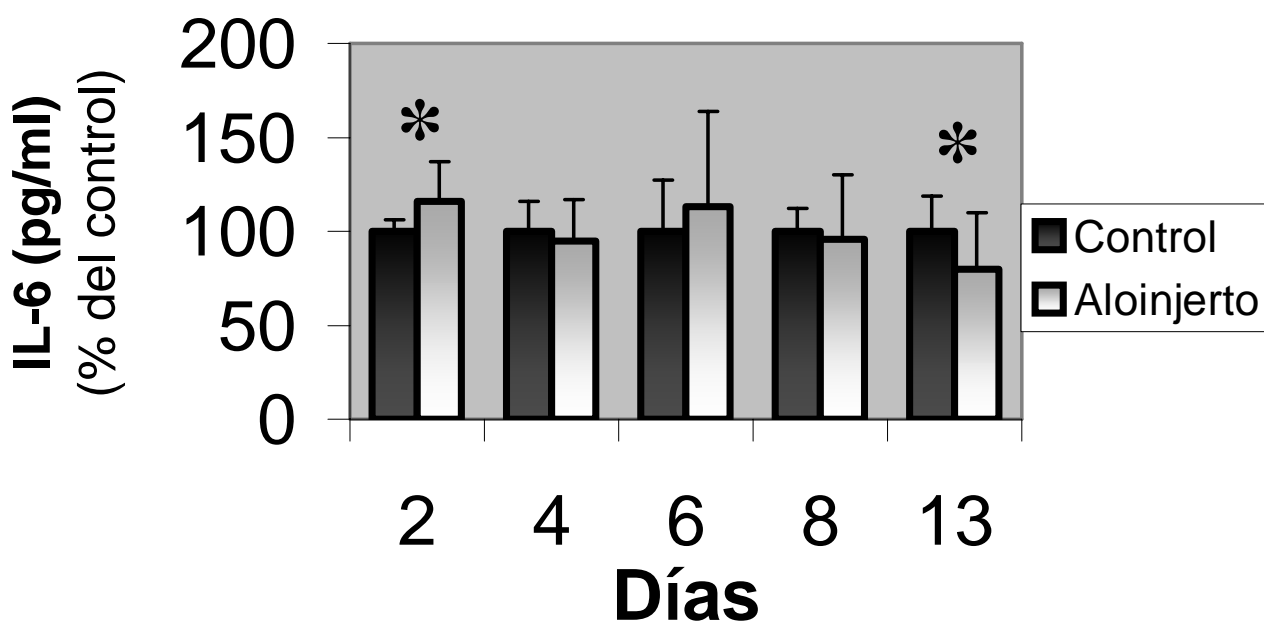


FIGURA 24: Efecto de la presencia de aloinjerto sobre la cantidad de PINP en el medio de cultivo por ml de medio de cultivo. Sobre las columnas en que se ha observado una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (en ausencia de aloinjerto) se ha colocado un asterisco.

En esta Figura se ha representado la cantidad de IL-6 por unidad de volumen de medio de cultivo. Se observa un aumento significativo en el segundo día del experimento, mientras que en el decimotercer día se observó una disminución significativa de la misma. En los días intermedios las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas

En la *Figura 25* se resumen los niveles de significación estadística encontrados al comparar el grupo problema y el control en los días 2 y 13

DÍA	Significación Estadística
Día 2	p= 0,0144
Día 13	p= 0,0229

FIGURA 25: *Niveles de significación estadística de la Figura 22 obtenidos mediante el Test de Mann-Whitney. N° de líneas celulares =6. Dentro de cada línea celular cada punto se ha procesado por cuadruplicado.*

Al igual que en el caso del PINP interesaba estudiar también las variaciones producidas en los niveles de IL-6 por célula. Para ello se realizó el cálculo de la concentración de IL-6 por millón de células recogido en la *Figura 26*. En ella se muestra la cantidad de IL-6 en el cultivo por millón de células (pg/10⁶ células) tanto en presencia como en ausencia (control) del aloinjerto a los 2, 4, 6, 8 y 13 días desde la

introducción del fragmento de aloinjerto en el pocillo de cultivo. Para su diseño también se ha tomado el número de células del grupo control como el 100% cada uno de los días, para facilitar la comparación con el grupo problema en presencia del aloinjerto.

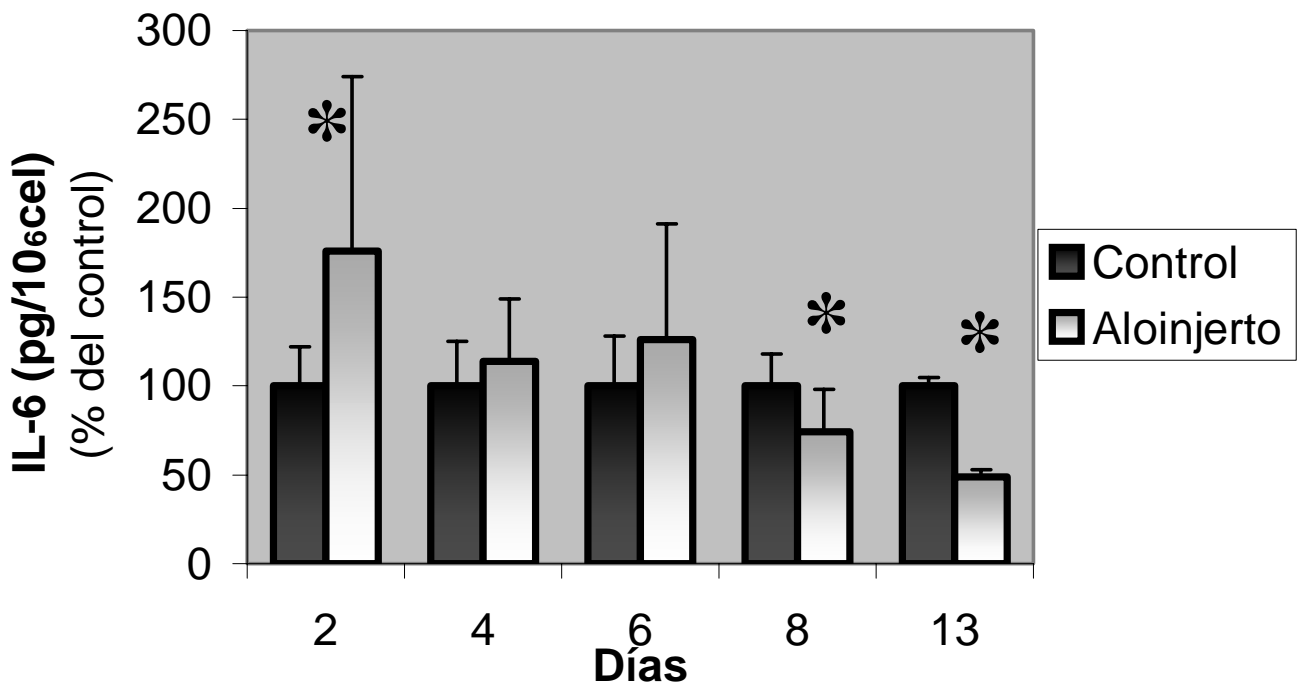


FIGURA 26: Efecto de la presencia de aloinjerto sobre la concentración de IL-6 en el medio de cultivo expresada por millón de células. Sobre las columnas en que se ha observado una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (en ausencia de aloinjerto) se ha colocado un asterisco.

Cuando se estudió la liberación de IL-6 al medio de cultivo por millón de células se observó un aumento significativo en el 2º día del experimento, mientras que en los días 8 y 13 esta tendencia se invertía y se pudo observar cómo los osteoblastos del grupo problema producían de

forma significativa menos cantidad de IL- 6 por millón de células. En este caso, las diferencias son cuantitativamente más importantes cuando se estudia la producción por número de células que cuando se estudia la concentración de forma global en el medio de cultivo. En la *Figura 27* se reflejan los niveles de significación estadística encontrados al comparar el grupo problema y el control.

DÍA	Significación Estadística
Día 2	p= 0,0144
Día 8	p= 0,0011
Día 13	p= 0,000

FIGURA 27: *Niveles de significación estadística de la Figura 22 obtenidos mediante el Test de Mann-Whitney. N° de líneas celulares =6. Dentro de cada línea celular cada punto se ha procesado por cuadruplicado.*

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

Tal y como se ha expuesto ampliamente a lo largo de la introducción, el empleo de aloinjertos es una técnica de uso común y aceptada en una gran variedad de indicaciones en la práctica ortopédica, siendo el aspecto clave para su éxito clínico la adecuada incorporación del aloinjerto óseo al huésped^{10;20;30;42;50;75;81;128;160;164;178;179;282}. A pesar de ello, apenas se han publicado estudios acerca de la respuesta bioquímica que provocan los aloinjertos autoclavados y crioconservados sobre los osteoblastos. Esta respuesta es responsable, en última instancia, de la incorporación del aloinjerto. Estas razones han sido las que nos han llevado a realizar el presente trabajo.

Probablemente una de las principales dificultades para el estudio de la respuesta que provocan los aloinjertos en los osteoblastos humanos sea la carencia de modelos experimentales útiles en la literatura. En este sentido, es de capital importancia el establecimiento de un modelo experimental adecuado.

El cultivo de células formadoras de hueso u osteoblastos presenta diversas dificultades técnicas y metodológicas que condicionan los diferentes modelos de cultivo disponibles. Dentro de estas dificultades, 3 factores son de singular importancia:

1. El tejido óseo está constituido por una gran variedad de células, y como la superficie trabecular está en contacto con la médula ósea, estructura de gran potencial proliferativo, es frecuente la contaminación del cultivo de osteoblastos con fibroblastos¹². Por ello y antes de realizar ningún experimento con las células obtenidas en cultivo, éstas deben ser caracterizadas.

2. El tejido óseo tiene un crecimiento muy lento por lo que la capacidad de proliferación celular en cultivo está muy limitada^{18;186}. Por ello resulta complicada la obtención de un número suficiente de células con una supervivencia prolongada. Aspecto que evidentemente es clave en el diseño de cualquier experimento que implique el empleo de estas células.
3. In vivo los osteoblastos en fase replicativa (preosteoblastos) poseen pocos caracteres fenotípicos de osteoblasto maduro; y las células menos proliferativas son las que más funciones específicas expresan^{187;235}. Por tanto, la funcionalidad y la proliferación son características casi exclusivas de los cultivos de osteoblastos^{18;186}.

Es posible que no todos los modelos sean funcionalmente adecuados para investigar patologías humanas. Por ejemplo, el uso de células neonatales o fetales no siempre es representativo de la fisiología adulta. Los cultivos de células formadoras de hueso primarios o transformados procedentes de roedores^{83;151;264} pueden tener como inconveniente la imposibilidad de extrapolar los resultados al modelo humano. También es muy frecuente el uso de líneas celulares de tipo osteoblástico derivadas de osteosarcoma humano^{84;151}, pero hay que tener en cuenta que estas líneas tumorales no muestran el fenotipo normal de los osteoblastos y han perdido la relación proliferación/diferenciación. Igualmente sucede con la línea osteoblástica humana transformada HOBIT, ya que son células que no muestran la regulación normal entre la proliferación y la diferenciación¹⁴¹.

Buscando corregir estas deficiencias, otros investigadores han desarrollado líneas celulares clónicas de roedores y de humanos. La más utilizada probablemente sea la conocida con las siglas MC3T3-E1^{89;236;262;266}, pero además existen otras líneas celulares estables

frecuentemente empleadas como la ROS 17/2.8^{87;245}, la UMR 106-01¹⁰⁶, etc. Con estas líneas se logra la estabilidad el cultivo pero sus respuestas en muchas ocasiones no pueden ser aplicadas al comportamiento del tejido óseo humano.

Los aspectos descritos anteriormente limitan el uso de estos tipos celulares para estudios bioquímicos o moleculares en las células osteoblásticas. Teniendo en cuenta estos hechos, se ha querido plantear la realización de esta tesis en un modelo que pudiera ser, dentro de las limitaciones de la experimentación *in vitro*, lo más cercano posible a la situación real, y por ello se ha elegido como modelo experimental el cultivo de osteoblastos humanos. Al derivar de tejido normal y no haber sufrido ninguna modificación, estas células conservan las restricciones normales de crecimiento y podrían llevar a cabo funciones normales en relación con las condiciones *in vivo*, como la producción de proteínas.

Para ello, se ha puesto a punto en el laboratorio la técnica de cultivo utilizada por Marie y cols¹⁸⁶, y modificada posteriormente por Nacher y cols.²⁰⁸, con el fin de obtener una población celular homogénea, donde las respuestas obtenidas fueran trasladables a la fisiología humana. Se utilizó hueso trabecular proveniente de pacientes sometidos a artroplastia de cadera de pacientes entre 55 - 75 años de edad. El uso exclusivo del origen femoral elimina las posibles diferencias debido a los distintos sitios del esqueleto de donde procede la línea celular, ya que en estudios sobre factores de regulación del metabolismo óseo *in vitro* se han obtenido diferencias dependientes del lugar del esqueleto de donde proviene la muestra, sugiriendo que la regulación del metabolismo óseo puede variar en los diversos sitios del esqueleto¹⁷⁶.

La técnica de cultivo utilizada en la presente tesis se fundamenta en el hecho de que las células migran de la superficie del hueso trabecular hacia

una malla de nailon que hace de análogo de la matriz ósea. Se ha logrado en estas condiciones obtener un cultivo celular que respondió positivamente a la síntesis de osteocalcina y de fosfatasa alcalina, marcadores que permiten identificar las células como osteoblastos humanos.

Este es un aspecto de gran importancia metodológica, ya que las células obtenidas en el cultivo han de ser caracterizadas como osteoblastos. Existen varias técnicas posibles para la caracterización bioquímica de los osteoblastos humanos en cultivo:

- Una de ellas es la tinción para la fosfatasa alcalina, para la que los osteoblastos presentan positividad, al contrario que los fibroblastos. No parece claro el efecto de la estimulación con vitamina D₃ sobre la actividad de la fosfatasa alcalina, hay autores que han encontrado que puede inducir una estimulación^{86;107}, una inhibición¹⁶⁷, o permanecer indiferente^{186;208}. Esto puede interpretarse como que los efectos de la vitamina D₃ sobre la actividad fosfatasa alcalina dependen del estado de diferenciación de las células del cultivo. Se ha demostrado que existen subpoblaciones de osteoblastos en diferentes grados de diferenciación en un mismo cultivo, y que por tanto es previsible una variabilidad para la tinción con fosfatasa alcalina^{12;189;277}. Por tanto, se considera la actividad de la fosfatasa alcalina como un criterio importante pero no decisivo a la hora de decidir si las células en cultivo son o no células con capacidad osteogénica^{12;208}.
- Los estudios inmunocitoquímicos para colágeno I tampoco pueden ser empleados como marcador específico de osteoblastos ya que los fibroblastos también son positivos para esta tinción^{76;208}.

- La producción de osteocalcina es un marcador específico de la función osteoblástica. Los cultivos tratados con vitamina D₃ muestran grandes incrementos en la producción de osteocalcina y depende de la población celular en estudio^{156;186;208}. En cultivos basales no se ha encontrado producción de osteocalcina¹⁸⁹. El expresar la concentración de osteocalcina con respecto a la proteína total celular puede resultar ventajoso ya que de ese modo las diferencias encontradas son debidas a un aumento de específico en la síntesis celular de osteocalcina y no a un incremento en el número de células que producen dicha proteína²⁰⁸.
- Finalmente, los osteoblastos presentan un tiempo de duplicación más largo que los fibroblastos ya que al tener un grado mayor de diferenciación, tienen una menor capacidad proliferativa, especialmente después de 3 ó 4 subcultivos²⁰⁸.

Por estos motivos, en la presente tesis se ha optado por la utilización de la tinción para la fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina como marcadores bioquímicos de los osteoblastos humanos en cultivo.

Al realizar la curva de crecimiento de las líneas celulares, se encontró que éstas llegaban a la confluencia aproximadamente el día 11 de la curva, resultado comparable con los datos originales mostrados por Marie y cols¹⁸⁶.

Un hecho muy importante a tener en cuenta en este tipo de estudios es que las células en cultivo retienen su actividad intrínseca al menos durante 15 pases después de ser sacadas de su localización original¹⁰¹. Esto permite que los resultados obtenidos con ellas puedan ser extrapolados a las

condiciones in vivo. En el presente trabajo se han realizado siempre los experimentos entre el 2º y el 5º pase.

En consecuencia, las observaciones morfológicas y propiedades funcionales expresadas por las células humanas en estudio permiten identificarlas como osteoblastos, por lo que el cultivo primario de osteoblastos humanos procedente de hueso trabecular, podría constituir un modelo experimental útil y reproducible para el estudio del efecto de los aloinjertos humanos sobre las células formadoras de hueso como hemos podido demostrar a lo largo de la realización del presente trabajo.

Otro aspecto destacable en el diseño experimental es la elección del modelo de aloinjerto a emplear y la manera en que debía ser procesado. Tal y como se ha visto a lo largo de la introducción existen diversos tipos de aloinjertos óseos que pueden ser tratados de diferentes maneras: pueden ser o no esterilizados mediante diversas técnicas, pueden ser conservados congelados a temperaturas variables, o mediante liofilización, etc. A continuación serán analizados los aspectos más destacables de esta cuestión.

El empleo de técnicas de esterilización de los aloinjertos está plenamente justificada por el riesgo, entre otros, de transmisión de enfermedades virales contagiosas como por ejemplo el SIDA^{257;258}. Dentro de las diversas técnicas de esterilización de aloinjertos, el empleo del autoclave, o esterilización por calor, ha demostrado su eficacia en la inducción de la formación ósea^{132;210}. Este es el método de elección en el tratamiento de los aloinjertos que se emplean habitualmente en el Servicio de Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico San Carlos²³⁰, y por lo cual ha sido el empleado en el presente estudio; ello es debido a que presenta varias ventajas entre las que cabe destacar la elevada sensibilidad de los virus, incluyendo el HIV, a las temperaturas elevadas^{191;267} lo que permite, al

menos en teoría, la posibilidad de emplear de forma segura piezas con riesgo de infección por HIV, VHC, etc²⁸³. Sin embargo las piezas con riesgo potencial de infección por estos y otros tipos de gérmenes son desechadas sistemáticamente en el Banco de Huesos del Hospital Clínico San Carlos²³⁰. Uno de los aspectos más importante que nos llevó a optar por este método de esterilización de los aloinjertos óseos fue que no precisa el empleo de instalaciones ni infraestructuras complejas, como es el caso de otras técnicas como la radiación Gamma²⁵³. Otra ventaja interesante de este método de esterilización es que permite mantener las inserciones musculares y tendinosas de la pieza²⁷⁵. Aunque en nuestro medio no es importante, si cabe destacar que en los países asiáticos y por motivos religiosos y culturales es muy difícil la obtención y el empleo de aloinjertos frescos congelados, siendo más factible el empleo de los autoclavados^{11,253}.

Entre las limitaciones del empleo de los aloinjertos autoclavados, podríamos destacar en primer lugar, la ausencia de consenso sobre cuál es el mejor protocolo de tratamiento a emplear, así, la mayor parte de publicaciones hacen referencia a tratamientos de unos 135°C entre unos 10 y 30 minutos^{11,146,149,154,250,294,295,296}, sin embargo otros autores prefieren el tratamiento de las piezas con temperaturas más bajas y que oscilan entre los 60 a 80°C^{124,146,147}, habiendo demostrado que estas temperaturas mantienen la capacidad osteoinductiva^{177,210} y que no se afectan seriamente ni la revascularización ni la neoformación ósea²⁵³. Incluso se ha visto que piezas de hueso cortical de vaca tratadas a 350° C podrían constituir un excelente sustituto óseo para la carga de peso gracias al buen mantenimiento de sus propiedades mecánicas, cosa que no sucede cuando la temperatura se eleva hasta 700°C⁴⁷. No existen estudios clínicos comparativos sobre el empleo de aloinjertos tratados a diferentes rangos de temperatura. Por ello, y debido a que es el protocolo más frecuentemente empleado en la literatura,

se ha optado por el tratamiento de las piezas mediante un periodo de 30 minutos a 130°C.

Otra de las limitaciones, y probablemente la más importante, para el empleo de los aloinjertos óseos autoclavados es la pérdida de propiedades mecánicas tras la esterilización. Diversos estudios experimentales han demostrado, entre otros, alteraciones estructurales microscópicas que pueden provocar una pérdida de las mismas²⁹⁴. De hecho, cuando se han estudiado propiedades como la resistencia al máximo estrés, el módulo de compresión, la rigidez del injerto o la energía de fracaso se han recogido pérdidas de estas propiedades que oscilan entre el 25 y el 70%^{129,146,294,296}. Por ello, generalmente se acepta que el empleo de aloinjertos autoclavados debe estar limitado a injertos no estructurales, habiéndose recogido excelentes resultados, por ejemplo en la cirugía protésica de cadera³⁰⁰. Aún así, existen casos publicados con aceptables resultados tras aloinjertos autoclavados masivos tras resecciones tumorales¹¹. En la presente tesis se han empleado piezas de aloinjerto provenientes de mesetas tibiales como muestra de aloinjerto no estructural.

Otros métodos de esterilización, como el empleo de radiación Gamma, que probablemente es el más empleado en el mundo²¹⁷, han demostrado tener efectos deletéreos sobre las propiedades mecánicas y biológicas de los aloinjertos, y este efecto parece ser dosis-dependiente^{60;129;136;290}, de forma más significativa sobre los aloinjertos corticales que sobre los esponjosos^{28;60;115;139;316}. Otros métodos de esterilización como el óxido de etileno es usado excepcionalmente por dos motivos principalmente^{124;217;270}: en primer lugar por la persistencia de gas residual en el tejido implantado que causa irritación^{134;204;281}; y por otro lado por la obstaculización de la capacidad osteoconductora y la pérdida de capacidad osteoinductiva de los aloinjertos tratados de este modo^{14;28;74}.

En la presente tesis se han empleado pequeños fragmentos de esponjosa lo más homogéneos posible; de ahí el utilizar el sistema descrito de cortes con trefina, en secciones y cuartos; que previamente habían sido sometidos a esterilización por autoclave, como modelo de los aloinjertos de esponjosa que habitualmente se emplean en la práctica quirúrgica. El emplear como pieza de elección mesetas tibiales provenientes de donantes multiorgánicos fue debido a la abundancia y disponibilidad de hueso esponjoso en las mismas.

En cuanto al método de conservación, al igual que las piezas destinadas a su empleo clínico las 3 mesetas tibiales empleadas en este estudio fueron sometidas a un periodo variable de conservación, que en ninguna de ellas superó los 3 meses, mediante congelación a -80°C en congelador eléctrico, procedimiento que en la literatura se ha demostrado que no modifica las condiciones mecánicas o biológicas de la pieza tratada si se compara con la congelación en nitrógeno líquido entre -160 y -180°C ^{231;268;270}. La conservación de las piezas durante 3 meses, tal y como se ha hecho en la presente tesis, es un periodo mucho menor que el establecido por las recomendaciones en cuanto al tiempo máximo de conservación de las piezas sometidas a este procedimiento, y que la mayor parte de autores sitúan alrededor de 3 años^{91;94;284}. Por otro lado, se ha demostrado que la congelación ya sea mediante congeladores eléctricos (entre -60 y -80°C) o mediante el empleo de nitrógeno líquido (entre -160 y -180°) permite la conservación de la mayor parte de enzimas en casi todos los tejidos humanos sin afectar a sus propiedades mecánicas^{10;268;270}, aunque en lo aplicable a esta tesis, éste no es un aspecto importante ya que la esterilización de las piezas mediante autoclave, al menos en teoría, desactiva todas las proteínas del aloinjerto.

Otro aspecto importante en cuanto a la metodología del experimento es la elección de la temperatura de congelación del aloinjerto. Algunos autores han empleado temperaturas más altas, de unos -20°C , para la conservación de los aloinjertos, y en algunos casos han publicado resultados satisfactorios con esta técnica⁴¹; sin embargo otros estudios han demostrado como la conservación a este rango de temperatura puede provocar la liberación de factores favorecedores de la reabsorción ósea debido a la formación de cristales de hielo y a la activación de enzimas proteolíticas debida a la pérdida de los mecanismos reguladores de la proliferación celular²⁸⁴. En un estudio realizado con cultivo de osteoblastos, Mejdahl y cols¹⁹⁵ encontraron que la conservación de las piezas a -20°C durante más de 6 meses provoca importantes cambios en la respuesta de los osteoblastos, lo cual puede provocar alteraciones en su incorporación, y por tanto estos autores no recomiendan su utilización.

El otro método importante en la actualidad para la conservación de aloinjertos es la liofilización, sin embargo presenta varias desventajas con respecto a la congelación. La liofilización produce un gran impacto sobre las propiedades mecánicas del injerto, provocando una disminución de la resistencia a la torsión y al doblado, pero no a las fuerzas de compresión axial^{108;228;259}. Además precisa de una infraestructura más compleja, y aunque los aloinjertos pueden ser conservados a temperatura ambiente, deben ser rehidratados antes de su utilización durante varias horas¹⁰⁸.

Por los motivos anteriormente expuesto se ha considerado que los aloinjertos empleados constituyen un modelo óptimo para el estudio de la reacción que provocan en los osteoblastos humanos en cultivo, y que la congelación de los mismos a -80°C es un procedimiento válido para su conservación.

Una cuestión importante en el diseño del experimento fue el modo de obtención de pequeños fragmentos de esponjosa homogéneos y de un tamaño adecuado para añadir a los pocillos de cultivo. En la literatura poco se aclara con respecto al modo de conseguir estos fragmentos. Mejdahl y cols¹⁹⁵ únicamente refieren que a sus cultivos de osteoblastos añadieron fragmentos de hueso de 3 X 3 X 3 mm sin especificar como los obtuvieron. Antes de decidirnos por el método de obtener primero cilindros con la ayuda de una trefina para después y con la ayuda de un bisturí obtener secciones de unos 3 mm de altura que posteriormente eran divididas en cuartos, probamos con diversas trituradoras de hueso esponjoso, pero además del traumatismo que sobre la pieza supone el triturado, los fragmentos obtenidos de este modo no eran lo suficientemente homogéneos, y por tanto decidimos rechazarlo. Finalmente y para eliminar los posibles restos de médula ósea, los pequeños fragmentos obtenidos eran lavados abundantemente con PBS.

No se realizó ningún estudio histológico de las piezas de aloinjerto para descartar la afectación del injerto por enfermedades tumorales como linfomas o plasmocitosis por dos motivos. Primero porque no es un estudio que se realice de manera específica y sistemática en el Banco de Huesos del Hospital Clínico San Carlos debido a que se trata de piezas obtenidas de donantes multiorgánicos entre los que por sistema se desechan los donantes que sufren este tipo de enfermedades; y segundo porque aunque algunos autores han detectado tasas de hasta el 3,6% de afectación en cabezas femorales por este tipo de enfermedades²⁷⁴ otros autores han encontrado tasas netamente inferiores (entre el 0,7 y el 1,3%) y no consideran ni eficaz ni rentable su realización sistemática^{43;44}.

Durante el proceso de selección de las piezas de los aloinjertos tampoco se ha tenido en cuenta la posibilidad de la histocompatibilidad con los osteoblastos en cultivo por dos motivos fundamentales. Primero: al tratarse de aloinjertos carentes de árbol vascular y de células vivas, que son el objetivo habitual de la respuesta de rechazo a los trasplantes, la posible respuesta inmunológica que despiertan en las células huésped puede ser muy variable²⁷¹; y en segundo lugar, en la actualidad el ajuste de los complejos de histocompatibilidad no es una práctica habitual en los Bancos de Huesos debido tanto a la gran variabilidad en las respuestas humoral y celular que provocan los antígenos del donante en el receptor como a la variable respuesta observada con respecto a la repercusión del ajuste de la histocompatibilidad sobre la incorporación de los aloinjertos^{3;92;159;171;214;242;270}. En cualquier caso parece que la tendencia actual se perfila hacia una mejor interconexión de los diferentes bancos de huesos con el fin de mejorar las condiciones de histocompatibilidad de las piezas injertadas^{218;282}, a pesar de los resultados satisfactorios observados con la implantación de aloinjertos no histocompatibles.

Tras la elaboración y establecimiento del modelo experimental por el que se han puesto en contacto las células formadoras de hueso humanas y el aloinjerto el siguiente paso fue la elección de los parámetros a analizar en este estudio.

Como es natural, el primer aspecto a estudiar fue la curva de proliferación celular de los osteoblastos humanos en cultivo y comparar las curvas obtenidas en el grupo control (sin aloinjerto) y el grupo problema (con aloinjerto).

Para que la técnica quirúrgica de reconstrucción del defecto óseo mediante el empleo de aloinjerto concluya con éxito, el resultado del

balance entre la formación ósea y la reabsorción del hueso en la zona de la implantación es crítico. En la presente tesis, hemos querido profundizar en el estudio del efecto que la presencia del aloinjerto produce sobre ambas etapas del remodelado óseo.

Para el estudio de la estimulación de formación ósea, concretamente de la matriz ósea, se optó por la determinación del PINP en el medio de cultivo. El colágeno es el principal componente orgánico de la matriz ósea extracelular, constituye cerca del 90% de las proteínas óseas y es casi exclusivamente colágeno tipo I (*Figura 1*)^{51;88}. A medida que el procolágeno tipo I es procesado, se liberan cantidades estequiométricas de ambos propéptidos, PINP y PICP, en proporciones 1:1 con el colágeno formado, por lo que la concentración de estos propéptidos refleja la síntesis de colágeno tipo I. Si se tiene en cuenta que el 90% del colágeno tipo I corporal constituye la matriz orgánica del hueso, los niveles circulantes de ambos propéptidos se pueden considerar como un índice de actividad osteoblástica o formación ósea^{196;261}.

Por su parte, para el estudio de la activación de la reabsorción ósea el factor que se analizó fue la liberación de IL-6 al medio de cultivo. La IL-6 es una citocina multifuncional de naturaleza glicoproteica de 184 aminoácidos, con un peso molecular de 26 kDa¹²³, producida entre otros tipos celulares por los osteoblastos¹³³. Esta citocina de múltiples funciones participa en el control del remodelado óseo³¹⁷. Actualmente la IL-6 recibe una considerable atención por sus efectos pro-osteoclastogénicos, que ejerce a través de su receptor de superficie celular situado en los osteoblastos. Una vez que se une a su receptor (IL6-r) desencadena la producción de una cascada de eventos intracelulares que terminan por activar los estadios iniciales de la osteoclastogénesis¹⁷⁰.

Por tanto, el establecimiento de la curva de proliferación celular, y la determinación de los niveles de PINP y de IL-6 liberados al medio de cultivo puede considerarse como un modelo válido para el estudio de la naturaleza de la respuesta que provoca la presencia del aloinjerto sobre las células humanas formadoras de hueso en cultivo. Además, y hasta donde llega nuestro conocimiento, en la literatura no existe ningún estudio en el que se emplee la medición de la IL-6 y del PINP como modelo para la evaluación del efecto de los aloinjertos sobre los osteoblastos del huésped, y sólo la curva de proliferación celular se ha empleado en algún estudio¹⁹⁵.

Desde hace tiempo se sabe que las fases iniciales de incorporación de un aloinjerto se asocian a una actividad resortiva ósea que permite la invasión de yemas vasculares y de osteoblastos desde la periferia^{143;238;270}. Este hecho se ha confirmado recientemente mediante estudios histológicos de aloinjertos que han sido extirpados por diversos motivos⁸⁰. Además, el hecho de que las perforaciones en los aloinjertos facilitan su incorporación⁶⁸ apoya aún más este aspecto. Este fenómeno está mediado por los osteoclastos del huésped, cuyo reclutamiento parece depender de la presencia del implante.

Prácticamente el único trabajo del que tenemos conocimiento que estudia el comportamiento de los osteoblastos humanos en contacto con piezas de aloinjerto es el que realizaron Mejdahl y cols¹⁹⁵; en él estudiaron la actividad reabsortiva y la proliferación celular en osteoblastos humanos cultivados junto a aloinjerto para evaluar si la temperatura de almacenaje de los aloinjertos tenía alguna influencia sobre esos factores, y encontraron que los aloinjertos estimulaban la liberación de factores inductores de la resorción ósea (medidos como la relación entre el calcio liberado al medio de cultivo en cultivos con aloinjerto y en los controles) dentro de las primeras 72 horas, alcanzando un máximo a los 6 días, y siendo aún

detectable a las 3 semanas. Esta respuesta dependía, entre otros, del contacto de las células con el injerto, y era mediada por la síntesis de prostaglandinas. Así mismo, la presencia de aloinjerto inhibía la replicación osteoblástica, medida según la incorporación de timidina, especialmente durante la primera semana.

El análisis detallado de los resultados obtenidos en nuestro experimento coincide y complementa los aspectos anteriormente comentados.

En primer lugar, queda claro que, al menos desde los puntos de vista bioquímico y de la proliferación celular, los osteoblastos humanos en cultivo no permanecen indiferentes a la presencia de aloinjerto en su medio de cultivo. El contacto del aloinjerto con los osteoblastos desencadena una variación en el comportamiento bioquímico y en la curva de proliferación de los osteoblastos humanos cultivados.

Un aspecto muy destacable e interesante de nuestros resultados es que el procesamiento de las piezas de aloinjerto mediante la congelación y especialmente mediante el autoclavado no ha impedido que el aloinjerto mantenga sus propiedades osteoinductoras.

La esterilización de las piezas mediante el tratamiento con un protocolo de 30 minutos a 130°C, y la posterior congelación a -80°C provoca la pérdida de la capacidad osteogénica del aloinjerto porque elimina todas las células vivas del hueso. Por otro lado, es de suponer que además este tratamiento puede provocar una pérdida de la capacidad osteoinductora debido a la desnaturalización de las proteínas del interior de la matriz ósea. Por tanto, a priori la única propiedad de estos aloinjertos sería la de un material de sostén u osteoconductor. Sin embargo, como se ha demostrado, el contacto de un fragmento de aloinjerto procesado mediante el protocolo anteriormente detallado, carente por completo de

células y con las proteínas de la matriz ósea probablemente desnaturalizadas, induce en los osteoblastos adyacentes (que corresponderían en el modelo in vivo a los del huésped) la síntesis de factores locales y de proteínas encaminadas a facilitar la formación de nuevo hueso. Es decir, nuestro modelo de aloinjerto no es sólo osteoconductor sino, sin lugar a dudas, osteoinductor. Por tanto, no parecen estar justificados los protocolos de esterilización que emplean rangos de temperatura más bajos (entre 60 y 80°C) para evitar la pérdida de capacidad osteoinductiva del aloinjerto^{177,210,253}.

Por otra parte, existe una importante diferencia cualitativa entre el comportamiento observado durante la primera semana del experimento y el de la segunda semana con respecto a la que se observa en los osteoblastos cultivados en ausencia de aloinjerto.

Durante la primera semana del experimento predominan los fenómenos de activación de la resorción ósea, caracterizados por:

1º) Una disminución del número de osteoblastos “huésped”.

2º) Aumento de la síntesis de IL-6, conocido factor activador de la actividad osteoclástica^{2,133}. A pesar de existir menor número de osteoblastos por cm² en el medio de cultivo, el aumento de síntesis de IL-6 por cada célula llega a producir un aumento neto de la concentración de IL-6 en el medio de cultivo. Este efecto, en realidad, constituye el efecto fisiológico neto.

3º) Inhibición de la síntesis de matriz ósea, caracterizada bioquímicamente por la disminución en el medio de cultivo de PINP^{66,69} en este periodo de tiempo. Sin embargo, cuando se determina la liberación de PINP por millón de células, se ha observado un aumento homogéneo de la misma durante todo el experimento. Por tanto durante la primera semana, la

disminución de síntesis de matriz ósea se debe solamente a la reducción en el número de osteoblastos en el medio de cultivo.

En la segunda semana del experimento, la tendencia se invierte, y predominan los fenómenos de neoformación ósea (osteoinducción). Lo observado en este periodo se puede resumir como:

1º) Un aumento importante del número de osteoblastos en el medio de cultivo cuando se compara con el grupo control.

2º) Un aumento de la síntesis de matriz ósea caracterizada por el aumento de liberación al medio de cultivo de PINP, tanto de forma global como por unidad celular.

3º) Una reducción de la síntesis de IL-6, factor activador de los osteoclastos, tanto de forma global como por unidad celular.

Nuestros resultados coinciden con los publicado por otros autores^{4;68;80;143;195}, cuando afirman que la incorporación del aloinjerto requiere una fase inicial en la que predominen la activación de los fenómenos que se asocian a la reabsorción ósea, lo cual se interpreta como un acontecimiento favorecedor de la invasión del injerto por yemas vasculares, las cuales resultan imprescindibles para lograr la incorporación del mismo^{80;270}. De hecho en un amplio estudio histológico de 73 aloinjertos que fueron retirados de los huéspedes por diversos motivos, Enneking y Campanacci⁸⁰ han demostrado que en los aloinjertos incorporados es precisa una fase inicial de reabsorción ósea que favorece la penetración de yemas vasculares en la pieza injertada. Este fenómeno es similar tanto en las uniones cortical-cortical como en las esponjosa-esponjosa.

En este sentido, resulta atractiva la hipótesis de la inversión de esta tendencia en la segunda semana del experimento, momento en el que tras la

creación de un espacio, debido a la actividad osteoclástica predominante durante la primera semana, por el que las nuevas yemas vasculares y los osteoblastos pueden llegar con facilidad y penetrar en la zona de contacto del aloinjerto con el huésped. A partir de ese momento lo que imperan son los acontecimientos favorecedores de la neoformación ósea, caracterizados por un aumento del número de osteoblastos y de la síntesis de matriz ósea, y por una reducción del reclutamiento de los osteoclastos. Este fenómeno finalmente conduce a la integración del injerto gracias a la colonización de su matriz por células osteoblásticas provenientes del huésped.

Todo este proceso está desencadenado por la presencia de un aloinjerto carente de células vivas y con las proteínas de su matriz ósea probablemente desmineralizadas, y que a pesar de ello, mantiene su capacidad osteoinductora.

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. El modelo experimental diseñado, piezas de aloinjerto en contacto con cultivo primario de osteoblastos humanos, es válido para el estudio de la respuesta que los aloinjertos óseos despiertan en las células formadoras de hueso en el humano.

2. La presencia del aloinjerto en el medio de cultivo modifica el comportamiento biológico y bioquímico de los osteoblastos humanos en cultivo. Esta modificación no sólo es cuantitativa y cualitativa, sino que varía en el transcurso del tiempo.

3. Durante la primera semana de contacto entre el aloinjerto y los osteoblastos humanos cultivados predominan los fenómenos de resorción ósea caracterizados por:
 - Una disminución de la proliferación celular de las células formadoras de hueso en cultivo.
 - Una disminución global de la síntesis de matriz ósea.
 - Una estimulación de la producción de factores como la IL-6, promotores de la actividad osteoclástica.

4. Durante la segunda semana de contacto entre el aloinjerto y los osteoblastos humanos en cultivo predominan los fenómenos de formación ósea, caracterizados por:
 - Un aumento de la proliferación celular de las células formadoras de hueso en cultivo.
 - Una estimulación de la síntesis de matriz ósea.
 - Una disminución de la producción de factores promotores de la activación osteoclástica, como la IL-6.

5. El aloinjerto óseo sometido a esterilización mediante autoclave y conservado mediante congelación, no sólo se comporta como un material osteoconductor, sino que mantiene la capacidad osteoinductora.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aaron, A. D. and Weidel, J. D.** Allograft use in orthopaedic surgery. *Orthopedics* 17, 41-48. 1994.
2. **Abe, E. Y., Ishimi, Y., Takahashi, T., Akatsu, T., Ozawa, H., Yamana, S., Yoshiki, S., and Suda, T.** A differentiation-inducing factor produced by the osteoblastic cell line MC3T3-E1 stimulates bone resorption by promoting osteoclast formation. *J Bone Miner Res* 3, 635. 1988.
3. **Aho, A.J., Eskola, J., Ekfors, T., Manner, I., Kouri, T., and Hollmen, T.** Immune responses and clinical outcome of massive human osteoarticular allografts. *Clin Orthop* 346, 196-206. 1998.
4. **Akamine, A., Kimura, R., and Maeda, K.** Implanted Bone Particles Induce Osteoclast Development in the Presence of Osteoblast Lineage Cells. *Bone* 15, 343-349. 1994.
5. **Albee, F. H.** The fundamental principles involved in the use of the bone graft in surgery. *Am J Med Sci* 149, 313-325. 1915.
6. **Albee, F. H. and Morrison H.F.** Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg* 71, 32-36. 1920.
7. **American Academy of Orthopaedic Surgeons. Task Force on AIDS and Orthopaedic Surgery.** Recommendations for the prevention of human immunodeficiency virus (HIV) transmission in the practice of orthopaedic surgery. (American Academy of Orthopaedic Surgeons). 1989. Park Ridge, Illinois.
8. **American Association of Tissue Banks.** Standards for tissue banking, 2001.
9. **An, H. S., Simpson, J. M., Glover, J. M., and Stephany, J.** Comparison between allograft plus demineralized bone matrix versus autograft in anterior cervical fusion: A prospective multicenter study. *Spine* 20, 2211-2216. 1995.
10. **Aro, H.T. and Aho, A.J.** Clinical use of bone allografts. *Ann Med Aug*; 25, 403-412. 1993.

11. **Asada, N., Tsuchiya, H., Kitaoka, K., Mori, Y, and Tomita, K.** Massive autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery. *Acta Orthop Scand* 68, 392-395. 1997.
12. **Ashton, B.A., Abdullah, F., Cave, J., Williamson, M., Sykes, B.C., Couch, M., and Poser, J.W.** Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: preliminary assessment of their osteogenicity. *Bone* 6, 313-319. 1985.
13. **Asociación Española de Bancos de Tejidos.** Estándares Tejido Musculoesquelético; VII: 111-124. 1999.
14. **Aspenberg, P., and Lindqvist, S.B.** Ethene oxide and bone induction. Controversy remains. *Acta Orthop Scand* 69, 173-178. 1998.
15. **Aspenberg, P., Johnson, E., and Thorngren, K. G.** Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *J Bone Joint Surg Br.* 72 B, 1036-1037. 1990.
16. **Aubin, J.E., Tertinegg, I., and Ver, R., Heersche, J.N.** Consistent patterns of changing hormone responsiveness during continuous culture of cloned rat calvaria cells. *J Bone Miner Res* 3, 333-339. 1988.
17. **Auf'mkolk, B., Hauschka, P.V., and Schwartz, E.R.** Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int* 37, 228-235. 1985.
18. **Ballester Soleda, J., Monllau García, J. C., Cebamanos Celma, J., y García Moreno, C.** Cultivos celulares en ortopedia. *Actualizaciones en Cirugía Ortopédica y Traumatología*, 7-9. 2000. Barcelona, Masson.
19. **Baron, R.** Anatomy and ultrastructure of bone. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* Third Edition, 3-10. 1996. New York, Favus MJ et al. Lippincot-Raven.
20. **Bauer, T.W. and Muschler, G.F.** Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop* 371, 10-27. 2000.
21. **Bauer, H.** Ueber knochentransplantation. *Zentrabl Chir* 37, 20-21. 1910.
22. **Beresford, J.N., Gallagher, J.A., Poser, J.W., and Russell, R.G.** Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of

- 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Relat Res* 5, 229-234. 1984.
23. **Berrey, B. H., Lord, C. F., Gebhardt, m. C., and Mankin, H. J.** Fractures of allografts. Frequency, treatment and end-results. *J Bone Joint Surg Am* 72 A, 825-833. 1990.
 24. **Blaha, D.** Calcium sulfate bone-void filler. *Orthopedics* 21, 1017-1019. 1998.
 25. **Blair, H.C., Teitelbaum, S.L., and Ghiselli, R.** Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 245, 855-857. 1989.
 26. **Blumenthal, S.L., Baker, J., Dossett, A., and Selby, D.K.** The role of anterior lumbar fusion for internal disc disruption. *Spine* 13, 566-569. 1988.
 27. **Bolander, M. E. and Balian, G.** The use of demineralized bone in the repair of segmental defects. *J Bone Joint Surg Am* 68 A, 1264-1274. 1986.
 28. **Boyce, T., Edwards, J., and Scarborough, N.** Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 30, 571-581. 1999.
 29. **Boyne, P. J.** Review of the literature on cryopreservation of bone. *Cryobiology* 4, 341-357. 1968.
 30. **Bradley, G. W.** Artroplastia total de rodilla de revisión con impactación de injerto óseo. *Clin Orthop* (Selección artículos en español) 2, 197-202. 2000.
 31. **Bridwell, K.H., Lenke, L.G., McEnery, K.W., Baldus, C., and Blanke, K.** Anterior fresh frozen structural allografts in the thoracic and lumbar spine. Do they work if combined with posterior fusion and instrumentation in adult patients with kyphosis or anterior column defects? *Spine* 20, 1410-1418. 1995.
 32. **Britto, J. M., Fenton, A. J., Holloway, W. R., and Nicholson, O.** Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 134, 169-176. 1994.
 33. **Bucholz, R. W.** Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop* 395, 44-52. 2002.

34. **Buck, B.E. and Malinin, T.I.** Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clin Orthop* 303, 8-17. 1994.
35. **Buck, B.E., Malinin, T.I., and Brown, M. D.** Bone transplantation and human immunodeficiency virus: An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop* 240, 129. 1989.
36. **Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., and Recker, R.** Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 45, 371-386. 1996.
37. **Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R., and Recker, R.** Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 45, 387-399. 1996.
38. **Burchardt, H.** The biology of bone graft repair. *Clin Orthop* 174, 28-42. 1983.
39. **Burchardt, H., Jones, H., and Glowczewskie F.** Freeze-dried allogenic segmental cortical-bone in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 60 A, 1082-1090. 1978.
40. **Burns, B.S., Edin, M.L., Lester, G.E., Tuttle, H.G., Wall, M.E., Wani, M.C., and Bos, G.D.** Selective drug resistant human osteosarcoma cell lines. *Clin Orthop* 383, 259-267. 2001.
41. **Burwell, R. G.** The fate of bone grafts. *Recent advances in Orthopaedics*, 115-207. 1969. London, Churchill, Livingstone, Apley AG (ed).
42. **Buttermann, G. R., Glazer, P. A., and Bradford, D. S.** The use of bone allografts in the Spine. *Clin Orthop* 324, 75-85. 1996.
43. **Campbell, D. G. and Oakeshott, R. D.** Bone allograft banking in South Australia. *Aust NZ J Surg* 65, 865-869. 1995.
44. **Campbell, M. L., Gregory, A. M., and Mauerhan, D. R.** Collection of surgical specimens in total joint arthroplasty: Is routine pathology cost effective? *J Arthroplasty* 12, 60-63. 1997.
45. **Canalis, E.** Systemic and local factors and the maintenance of bone quality. *Calcif Tissue Int* 53 (Suppl 1), S90-S92. 1993.
46. **Carrel, A.** The preservation of tissues and its application in surgery. *JAMA* 59, 523-527. 1912.

47. **Catanese, J. 3rd, Featherstone, J. D., and Keaveny, T. M.** Characterization of the mechanical and ultrastructural properties of heat-treated cortical bone for use as a bone substitute. *J Biomed Mater Res Jun*; 15, 327-336. 1999.
48. **Chacha, P. B.** Vascularized pedicular bone grafts. *Int Orthop* 8, 117-138. 1984.
49. **Chapman, M., Bucholz, R. W., and Cornell, C.** Treatment of acute fractures with a collagen calcium phosphate graft material: A randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* 79-A, 495-502. 1997.
50. **Choong, P.F.** The role of allografts in tumour surgery. *Acta Orthop Scand Suppl Feb*; 273, 89-94. 1997.
51. **Clark, C.C.** The distribution and initial characterization of oligosaccharide units on the COOH-terminal propeptide extensions of the pro-alpha 1 and pro-alpha 2 chains of type I procollagen. *J Biol Chem* 254, 10798-10802. 1979.
52. **Clark, A. E., Hench, L. L., and Paschal, H. A.** The influence of surface chemistry on implant interface histology: A theoretical basis for implant material selection. *J Biomed Mater Res* 10, 161-174. 1976.
53. **Cloward, R. B.** The treatment of ruptured of lumbar intervertebral disc by vertebral body fusion: Method of use of banked bone. *Ann Surg*, 987-992. 1952.
54. **Cloward, R. B.** The anterior approach for removal of an ruptured cervical disks. *J Neurosurg* 15, 602-617. 1958.
55. **Cockin, J.** Autologous bone grafting: complications at the donor site. *J Bone Joint Surg Br.* 53, 153. 1971.
56. **Connolly, J. F.** Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop* 355S, S257-S266. 1998.
57. **Conrad, E. U., Gretch, D. R., and Obermeyer, K. R.** Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 77 A, 214-224. 1993.
58. **Convery, F. R., Meyers, M. H., and Akeson, W. H.** Fresh osteochondral allografting of the femoral condyle. *Clin Orthop* 273, 139-145. 1991.

59. **Cornell, C.N., Lane, J.M., Chapman, M., Merkow, R., Seligson, D., Henry, S., Gustilo, R., and Vincent, K.** Multicenter trial of Collagraft as bone graft substitute. *J Orthop Trauma* 5, 1-8. 1991.
60. **Currey, J.D., Foreman, J., Laketic, I., Mitchell, J., Pegg, D.E., and Reilly, G.C.** Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone. *J Orthop Res* 15, 111-117. 1997.
61. **Curtis, P. H., Powell, A. E., and Herndon, C. H.** Immunological factors in homogeneous bone transplantation. The inability of homogeneous rabbit bone to induce circulating antibodies in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 41-A, 1482-1488. 1959.
62. **D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A., and Howard, G.A.** Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14, 1115-1122. 1999.
63. **Dagher, F. and Roukoz, S.** Compound tibia fractures with bone loss treated by the Ilizarov technique. *J Bone Joint Surg Br.* 73-B, 316-321. 1991.
64. **Davis, A. G.** Fibular substitution for tibial defects. *J Bone Joint Surg Am* 25-A, 229-237. 1944.
65. **Davis, J. B.** The muscle-pedicle bone graft in hip fusion. *J Bone Joint Surg Am* 36-A, 790-799. 1954.
66. **De la Piedra, C.** Marcadores Bioquímicos de remodelado Óseo. *Manual Práctico de Osteoporosis en Atención Primaria*, 45-60. 1996. Madrid, FHOEMO; Jarpyo Editores.
67. **Dean, G.S., Holliger, E.H. 4th, and Urbaniak, J.R.** Elbow allograft for reconstruction of the elbow with massive bone loss. Long term results. *Clin Orthop* 341, 12-22. 1997.
68. **Delloye, C., Simon, P., Nysse-Behets, C, Banse, X., Bresler, F., and Schmitt, D.** Perforations of cortical bone allografts improve their incorporation. *Clin Orthop* 396, 241-247. 2002.
69. **Delmas, P. D.** Clinical Use of Biochemical Markers of Bone Remodeling in Osteoporosis. *Bone* 13, 517-521. 1992.
70. **Dennis, S., Watkins, R., Landaker, S., Dillin, W., and Springer, D.** Comparison of disc space heights after anterior lumbar interbody fusion. *Spine* 14, 876-878. 1989.

71. **Dick, H. M. and Strauch, R. J.** Infection of massive bone allografts. *Clin Orthop* 306, 46-53. 1994.
72. **Dion, N. and Sim, F. H.** The use of allografts in musculoskeletal oncology. *J Bone Joint Surg Am* 84 A, 644-654. 2002.
73. **Díaz, E.M., Guerrero, R., and De la Piedra, C.** Six osteocalcin assays compared. *Clin Chem* 40, 2071-2077. 1994.
74. **Doherty, M.J., Mollan, R.A., and Wilson, D.J.** Effect of ethylene oxide sterilization on human demineralized bone. *Biomaterials* 14, 994-998. 1993.
75. **Donati, D., Di Liddo, M., Zavatta, M., Manfrini, M., Bacci, G., Picci, P., Capanna, R., and Mercuri, M.** Reconstrucción con aloinjerto óseo masivo en el osteosarcoma de alto grado. *Clin Orthop* (Selección artículos en español) 3, 46-54. 2001.
76. **Duksin, D., Maoz, A., Fuchs, S.** Differential cytotoxic activity of anticollagen serum on rat osteoblasts and fibroblasts in tissue culture. *Cell* 5, 83-86. 1975.
77. **Ecarot-Charrier, B., Glorieux, F.H., van der Rest, M., and Pereira, G.** Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 96, 639-643. 1983.
78. **Ehrler, D.M. and Vaccaro, A.R.** The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop* 371, 38-45. 2000.
79. **Enneking, W.F., Burchardt, H., and Puhl, J. J.** Physical and biological repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg Am* 57 A, 237-252. 1975.
80. **Enneking, W.F., and Campanacci, D. A.** Retrieved human allografts. A clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* 83, 971-986. 2001.
81. **Enneking, W.F., and Mindell, E.R.** Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am* 73, 1123-1142. 1991.
82. **Eriksen, E. F.** Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocrinol Rev* 7, 379-408. 1986.

83. **Ernst, M., Heat, J.K. and Rodan, G.A.** Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cell from calvariae and long bones. *Endocrinology* 125, 825-833. 1989.
84. **Etienne, M.C., Fischel, J.L., Milano, G., Formento, P., Formento, J.L., Francoual, M., Frenay, M., and Namer, M.** Steroid receptors in human osteoblast-like cells. *Eur J Cancer* 26, 807-810. 1990.
85. **European Association of Tissue Banks and European Association of Musculo Skeletal Transpalntation.** Common Standards for Muskulo Skeletal Tissue Banking. 1999.
86. **Evans, D. B., Tharavajah, M., and Kanis, J. A.** The effects of 24,25(OH)D₃ and 25(OH)D₃ on proliferation and synthesis of osteocalcin and alkaline phosphatase by human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 46 (S2), A18. 1990.
87. **Filmon, R., Basle, M.F., Atmani, H., and Chappard, D.** Adherence of osteoblast-like cells on calcospherites developed on a biomaterial combining poly(2-hydroxyethyl) methacrylate and alkaline phosphatase. *Bone* 30, 152-158. 2002.
88. **Fleischmajer, R., Perlish, J.S., Burgeson, R.E., Shaikh-Bahai, F., and Timpl, R.** Type I, type III collagen interactions durin fibrillogenesis. *Ann NY Acad Sci* 580, 161-175. 1990.
89. **Freitas, F., Jeschke, M., Majstorovic, I., Mueller, D.R., Schindler, P., Voshol, H., Van Oostrum, J., and Susa, M.** Fluoroaluminate stimulates phosphorylation of p130 Cas and Fak and increases attachment and spreading of preosteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 30, 99-108. 2002.
90. **Friedlander, G. E.** Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 69, 786-790. 1987.
91. **Friedlander, G. E.** Current concepts review: Bone grafts. *J Bone Joint Surg Am* 69 A, 786-790. 1987.
92. **Friedlander, G. E.** Biological and immunological aspects of allogenic bone transplntation. *New Trends in Bone Grafting*, 169-175. 1992. Tampere, University of Tampere, Lindhom S (ed).

93. **Friedlander, G. E. and Mankin, H. J.** Bone banking: Current methods and suggested guidelines. *AAOS Instr Course Lect* 30, 36-55. 1979.
94. **Friedlander, G. E. and Mankin, H. J.** Guidelines for the banking of musculoskeletal tissues. *AATB Newsletter* 3, 2-4. 1979.
95. **Friedlander, G. E., Strong, D. M., and Sell, K. W.** Studies on the antigenicity of bone I. Freeze-dried and deep-frozen allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 58-A, 854-858. 1976.
96. **Garrett, J. C.** Fresh osteochondral allografts for treatment of articular defects in osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle in adults. *Clin Orthop* 303, 33-37. 1994.
97. **Gasch Blasi, J., Ribas Fernández, M., y Vilarrubias Guilamet, J. M.** Reconstrucción de los defectos de la cresta iliaca mediante aloinjerto congelado. *Revista de Ortopedia y Traumatología* 46, 149-153. 2002.
98. **Gehron, R.P., and Boskey, A.L.** The biochemistry of bone. *Osteoporosis*, 95-184. 1996. New York, Marcus, R., Feldman D. Raven Press.
99. **Gerstenfeld, L.C., Chipman, S.D., Kelly, C.M., Hodgens, K.J., Lee, D.D., and Landis, W.J.** Collagen expression, ultrastructural assembly, and mineralization in cultures of chicken embryo osteoblasts. *J Cell Biol* 106, 979-989. 1988.
100. **Ghazavi, M.T., Stockley, I., Yee, G., Davis, A., and Gross, A.E.** Reconstruction of massive bone defects with allograft in revision total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 79, 17-25. 1997.
101. **Giannini, S., Mohan, S., Kasuya, J., Galli, G., Rotella, C.M., and LeBon, T.R.** Characterization of insulin-like growth factor-binding proteins produced by cultured fibroblasts from patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus, insulin-dependent diabetes mellitus, or obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 1824-1830. 1994.
102. **Gitelis, S.** Use of calcium sulfate-based bone graft substitute for benign bone lesions. *Orthopedics* 24, 244-258. 2001.
103. **Glancy, G. L., Brugioni, D. J., Eilert, R. E., and Chang, F. M.** Autograft versus allograft for benign lesions in children. *Clin Orthop* 262, 28-33. 1991.

104. **Goldberg, V.M. and Stevenson, S.** Bone transplantation. *Surgery of the muscuolskeletal system* Vol 1, Ed. 2, 115-150. 1989. New York, McCollister Evarts, C (ed). Churchill Livingstone.
105. **Goldberg V.M., and Stevenson, S.** Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop* 225, 7-16. 1987.
106. **Gonzalez, E.A., McConkey, C.L., and Martin, K.J.** Mechanism of Retinoic Acid Induced Attenuation of PTH Action in UMR 106-01 Cells. *Calcif Tissue Int* 23. 2002.
107. **Gray, C., Colston, K. W., and Arnett, T. R.** Interaction of 1,25 dihydroxyvitamin D3 and testosterone effects on primary bone rat cells. *Calcif Tissue Int* 46 (S2), A 20. 1990.
108. **Gray, J. C. and Elves, M. W.** Early osteogenesis in compact bone isografts; A quantitative study of the contributions of the different graft cells. *Calcif Tissue Int* 29, 225-237. 1979.
109. **Gross, A. E., Blackey, H., Wong, P., Saleh, K., and Woodgate, I.** The role of allografts in revision arthroplasty of the hip. *J Bone Joint Surg Am* 84 A, 655-667. 2002.
110. **Gross, A. E., Duncan, C. P., Garbuz, D., and Mohamed, E. M.** Revision arthroplasty of the acetabulum in association with loss of bone stock. *Instr Course Lect* 48, 48-57. 1999.
111. **Grossman, W. C., Peppelman, W. C., Baum, J. A., and Kraus, D. R.** The use of freeze-dried fibular allograft in anterior cervical fusion. *Spine* 17, 565-569. 1992.
112. **Grundel, R., Chapman, M., Yee, T., and Moore, D.** Autogenic bone marrow and porous biphasic calcium phosphate ceramic for segmented defects in the canine ulna. *Clin Orthop* 266, 244-258. 1991.
113. **Guo, M. Z., Xia, Z., and Lin, L. B.** The mechanical and biological properties of demineralized cortical bone allografts in animals. *J Bone Joint Surg Br.* 73-B, 791-794. 1991.
114. **Hallfeldt, K. K., Kessler, S., Puhlmann, M., Mandelkow, H., and Schweirberer, L.** The effect of various sterilization procedures on the osteoinductive properties of demineralized bone matrix. *Unfallchirurg* 95, 313-318. 1992.

115. **Hamer A.J., Strachan, J.R., Black, M.M., Ibbotson, C.J., Stockley, I., and Elson, R.A.** Biochemical properties of cortical allograft bone using a new method of bone strength measurement. A comparison of fresh, fresh-frozen and irradiated bone. *J Bone Joint Surg Br.* 78-B, 363-368. 1996.
116. **Hauschka, P. V., Mavrakos, A. E., Iafrati, M. D., Doleman, S. E., and Klagsbrun, M.** Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography heparine-epharose. *J Biol Chem* 261, 12665-12672. 1986.
117. **Haydon, R.C., Zhou, L., Feng, T., Breyer, B., Cheng, H., Jiang, W., Ishikawa, A., Peabody, T., Montag, A., Simon, M.A., and He, T.C.** Nuclear receptor agonists as potential differentiation therapy agents for human osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 8, 1288-1294. 2002.
118. **Heiple, K. G., Chase, S. W., and Herndon, C. H.** A comparative study of the healing process following different types of bone transpalmntation. *J Bone Joint Surg Am* 45 A, 1593-1616. 1963.
119. **Hejna, M. J. and Gitelis, S.** Allograft prosthetic composite repalcement for bone tumors. *Semin Surg Oncol* 13, 13-18. 1997.
120. **Hendrich, C., Nöth, U., Stahl, U., Merklein, F., Rader, C. P., Schütze, N., Thull, R., Tuan, R. S., and Eulert, J.** Testing of skeletal implant surfaces with human fetal osteoblasts. *Clin Orthop* 394, 278-289. 2002.
121. **Herndon, C. H. and Chase, S. W.** The fate of massive autogenous and homogenous bone graft including articular surfaces. *Surg Gynec Obstet* 98, 273-290. 1954.
122. **Herron, L. D. and Newman, M. A.** The failure of ethylene oxyde gas-sterilized freeze-dried bone graft for thoracic and lumbar spine fusion. *Spine* 14, 496-500. 1989.
123. **Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., and Matsuda, T.** Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324, 73-76. 1986.
124. **Hoffman, A., Hoffman, C., and Gotzen, L.** Effect of various bone disinfection and sterilization methods on osteoblast function. A comparative in vitro study. *Unfallchirurg* May; 103, 380-388. 2000.

125. **Holmes, R., Bucholz, R. W., and Mooney, V.** Porous hydroxiapatite as a bone graft substitute in metaphyseal defects: A histometric study. *J Bone Joint Surg Am* 68-A, 904-911. 1986.
126. **Holte, D.C., O'Brien, J.P., and Renton, P.** Anterior lumbar fusion using a hybrid interbody graft. A preliminary radiographic report. *Eur Spine* 3, 32-38. 1994.
127. **Hornicek, F.J., Gebhardt, M.C., Tomford, W.W., Sorger, J.I., Zavatta, M., Menzner, J.P., and Mankin HJ.** Factors affecting nonunion of the allograft-host junction. *Clin Orthop* 382, 87-98. 2001.
128. **Hornicek, F. J., Mnaymneh, W., Lackman, R. D., Exner, G. U., and Malinin, T. I.** Rescate del miembro con aloinjertos osteoarticulares después de la resección de tumores óseos del segmento proximal de la tibia. *Clin Orthop* (Selección artículos en español) 1, 58-66. 1999.
129. **Ibáñez Tomé, J. M., Calleja Juncal, P., Sánchez Sanz, J. L., Cebrián Parra, J. L., Moro Rodríguez, E., Marco Martínez, F., y López-Durán Stern, L.** Modificaciones en las propiedades de los aloinjertos según el proceso de esterilización. Modelo experimental en cerdos. *Libro de Resúmenes IV Congreso Nacional Invescot*, 80. 2003. Oviedo, INVESCOT.
130. **Ilizarov, G. A. and Ledyayev, V. I.** The classic: The replacement of long tubular bone defects by lengthening distraction osteotomy of one of the fragments. *Clin Orthop* 280, 7-10. 1992.
131. **Inclan, A.** The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am* 24-A, 81-92. 1942.
132. **Inokuchi, T., Ninomiya, H., Hironaka, R., Yoshida, S., Araki, M., and Sano, K.** Studies on heat treatment for immediate reimplantation of resected bone. *J Craniomaxillofac Surg* 19, 31-39. 1991
133. **Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, CH., Akatsu, T., Abe, T., Nakamura, Y., Yamaguchi, A., Yoshiki, S., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T., and Suda, T.** IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J. Immunol.* 145, 3297-3303. 1990.
134. **Jackson, D. W., Windler, G. E., and Simon, T. M.** Intraarticular reaction associated with the use of freeze -dried, ethylene oxide-sterilized bonapatella tendon-bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med* 18, 1-11. 1990.

135. **Jia, S.F., Worth, L.L., Turan, M., Duan X.P., and Kleinerman, E.S.** Eradication of osteosarcoma lung metastasis using intranasal gemcitabine. *Anticancer Drugs* 13, 155-161. 2002.
136. **Jinno, T., Miric, A., Feighan, J., Kirk, S.K., Davy, D.T., and Stevenson, S.** The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. *Clin Orthop* 375, 275-285. 2000.
137. **Jonsson, K.B., Frost, A., Nilsson, O., Ljunghall, S., and Ljunggren, O.** Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison. *Acta Orthop Scand* 70, 365-373. 1999.
138. **Jorgenson, S. S., Lowe, T. G., France, J., and Sabin, J.** A prospective analysis of autograft versus allograft in posterolateral lumbar fusion in the same patient: A minimum of 1-year followup in 144 patients. *Spine* 19, 2048-2053. 1994.
139. **Kasser, J. R.** Reparación e injertos óseos. *Actualizaciones en Cirugía Ortopédica y Traumatología* (Orthopaedic Knowledge Update 5), 24-27. 1997. Barcelona, Masson
140. **Keeting, P.E., Rifas, L., Harris, S.A., Colvard, D.S., Spelsberg, T.C., Peck, W.A., and Riggs, B.L.** Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 6, 827-833. 1991.
141. **Keeting, P.E., Scott, R.E., Colvard, D.S., Anderson, M.A., Oursler, M.J., Spelsberg, T.C. and Riggs B.L.** Development and characterization of a rapidly proliferating, well-differentiated cell line derived from normal adult human osteoblast-like cells transfected with SV40 large T antigen. *J Bone Miner Res* 7, 127-136. 1992.
142. **Kelly, C.M., Wilkins, R.M., Gitelis, S., Hartjen, C., Watson, J.T., and Kim, P.T.** The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop* 382, 42-50. 2001.
143. **Kirkeby, O. J.** Revascularization of Bone Grafts in Rats. *J Bone Joint Surg Br.* 73, 791-794. 1991.
144. **Kitazawa, R., Kimble, R.B., Vannice, J.L., Kung, V.T., and Pacifici, R.** Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J Clin Invest* 94, 2397-2406. 1994.

145. **Kleinstueck, F. S., Hu, S. S., and Bradford, D. S.** Use of allograft femoral rings for spinal deformity in adults. *Clin Orthop* , 84-91. 2002.
146. **Knaepler, H., Haas, H., and Puschel, H. U.** Biomechanical properties of heat and irradiation treated spongiosa. *Unfallchirurg* 17, 194-199. 1991.
147. **Knaepler, H., Von Garrel, T., Seipp, H. M., and Ascherl, R.** Experimental studies of thermal disinfection and serilization of allogenic bone transpalnts and their effects on biological viability. *Unfallchirurg* 95, 477-484. 1992.
148. **Kodama, H.A., Amagai, Y., Koyama, H., and Kasai, S.** A new preadipose cell line derived from newborn mouse calvaria can promote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 112, 89-95. 1982.
149. **Kohler, P., Ehrnberg, A., and Kreicbergs, A.** Osteogenic enhancement of diaphyseal reconstruction. Comparison of bone grafts in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 61, 42-45. 1990.
150. **Kohler, P., Glas, J. E., Larsson, S., and Kreicbergs, A.** Incorporation of nonviable bone grafts. Autoclaved autogenic and frozen allogenic bone grafts compared in the rabbit. *Acta Orthop Scand* 58, 54-60. 1987.
151. **Komm, B.S., Terpening, C.M., Benz, D.J., Graeme, K.A., Gallegos, A., Korc, M., Greene, G.L., O'Malley, B.W., and Haussler, M.R.** Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 241, 81-84. 1988.
152. **Kozak, J.A., Heilman, A.E., and O'Brien, J.P.** Anterior lumbar fusion options. Technique and graft materials. *Clin Orthop* 300, 45-51. 1994.
153. **Kuhlmann, J.N., Mimoun, M., Boabighi, A. and Baux, S.** Vascularized bone graft pedicled on the volar carpal artery for non-union of the scaphoid. *J Hand Surg [Br]* 12, 203-210. 1987.
154. **Kuner, E. H., Schlickewei, W., Huber-Lang, M., Schaefer, D. J., and Laubenbereger, J.** Using autoclaved spongiosa. *Unfallchirurg* 101, 870-876. 1998.

155. **Kuokkanen, H., Raty, S., Korkala, O., Niskanen, R., and Syrjanen, K.J.** Osteosynthesis and allogeneic bone grafting in complex osteoporotic fractures. *Orthopedics* 24, 249-252. 2001.
156. **Kurose, H., Seino, Y., Yamaoka, K., Tanaka, H., Shima, M., and Yabuuchi, H.** Cooperation of synthetic insulin-like growth factor I/somatomedin C and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on regulation of function in clonal osteoblastic cells. *Bone Miner* 5, 335-345. 1989.
157. **Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., and Burgess, T.** Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176. 1998.
158. **Lean, J.M., Jagger, C.J., Chambers, T.J., and Chow, J.W.** Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 268, E318-E327. 1995.
159. **Lee, E. H., Langer, F., Halloran, P., Gross, A. E., and Ziv, I.** The effect of major and minor histocompatibility differences on bone transplant healing in inbred mice. *Trans Orthop Res Soc* 4, 60. 1979.
160. **Leopold, S. S., Jacobs, J. J., and Rosenberg, A. G.** Cancellous allograft in revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop* 371, 86-97. 2000.
161. **Leunig, M., Yuan, F., and Berk, D. A.** Angiogenesis and growth of isografted bone: quantitative in vivo assay in nude mice. *Lab Invest* 71, 300-307. 1994.
162. **Lewandrowski, K.U., Tomford, W.W., Schomacker, K.T., Deutsch, T.F., and Mankin, H.J.** Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser perforation and partial demineralization. *J Orthop Res* 15, 748-756. 1997.
163. **Lexer, E.** Die verwendung der freien knochenplastik nebst versuchen uber gelenkversteifung & gelenk-transplantation. *Art.Klin.Chir.* 86, 939-954. 1908.
164. **Lietman, S.A., Tomford, W.W., Gebhardt, M.C., Springfield, D.S., and Mankin, H.J.** Complications of irradiated allografts in orthopaedic tumor surgery. *Clin Orthop* 375, 214-217. 2000.
165. **Liljenqvist, U., O'Brien, J.P., and Renton, P.** Simultaneous combined anterior and posterior lumbar fusion with femoral cortical allograft. *Eur Spine J* 7, 125-131. 1998.

166. **Lin, K.Y., Bartlett, S.P., Yaremchuk, M.J., Fallon, M., Grossman, R.F., and Whitaker, L.A.** The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* 86, 449-456. 1990.
167. **Lomri, A., Marie, P.J., Tran, P.V., and Hott, M.** Characterization of endosteal osteoblastic cells isolated from mouse caudal vertebrae. *Bone* 9, 165-175. 1988.
168. **Lord, C. F., Gebhardt, m. C., Tomford, W. W., and Mankin, H. J.** Infection in bone allografts: Incidence, nature and treatment. *J Bone Joint Surg Am* 70 A, 369-376. 1988.
169. **Löwik, C.W.** Differentiation inducing factors: leukemia inhibitory factor and interleukin-6 In: *Cytokines and bone metabolism*. Edited by Gowen M. CRC Press Boca Raton Ann Arbor, London, pp 299-324. Cytokines and bone metabolism, 299-324. 1992. London, Gowen, M. CRC Press Boca Raton Ann Arbor.
170. **Löwik, C.W., van der Pluijm, G., Bloys, H., Hoekman, K., Bijvoet, O.L.M., Aarden, L.A., and Papapoulos, S.E.** Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (PLP) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells: a possible role of interleukin 6 in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 162, 1546-1552. 1989.
171. **Lundgren, G., Moller, E., and Thorsby, E.** In vitro cytotoxicity by human lymphocytes from individuals immunized against histocompatibility antigens. II. Relation to HL-A incompatibility between effector and target cells. *Clin Exp Immunol* 6, 671-680. 1970.
172. **MacDonald, B.R., Gallagher, J.A., and Russell, R.G.** Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. *Endocrinology* 118, 2445-2449. 1986.
173. **Macewen, W.** Observations concerning transplantation of bones: Illustrated by a case of inter-human osseus transplantation, whereby over two thirds of the shaft of the humerus was restored. *Proc Royal Soc London* 32, 232-234. 1881.
174. **Malinin, T. I., Rosomoff, H. L., and Sutton, C. H.** Humeral cadaver femoral head homografts for anterior cervical spine fusions. *Surg Neurol* 7, 249-251. 1977.

175. **Malloy, K. M., and Hilibrand A. S.** Autograft versus allograft in degenerative cervical disease. *Clin Orthop* 394, 27-38. 2002.
176. **Malpe, R., Baylink, D.J., Linkhart, T.A., Wergedal, J.E., and Mohan, S.** Insulin-like growth factor (IGF)-I, -II, IGF binding proteins (IGFBP)-3, -4, and -5 levels in the conditioned media of normal human bone cells are skeletal site-dependent. *J Bone Miner Res* 12, 423-430. 1997.
177. **Manabe, J.** Experimental studies on pasteurized autogenous bone graft. *J Jpn Orthop Assoc* 67, 255-266. 1993.
178. **Mankin, H.J., Doppelt, S., and Tomford, W.W.** Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop* 174, 69-86. 1983.
179. **Mankin, H.J., Gebhardt, M.C., Jennings, L.C., Springfield, D.S., and Tomford W.W.** Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop* 324, 86-97. 1996.
180. **Mankin, H. J., Ortiz-Cruz, E. J., y Bibiloni, J.** Resultados a largo plazo y futuro de los trasplantes con aloinjertos óseos. *Revista de Ortopedia y Traumatología* 40, 556-561. 1996.
181. **Manolagas, S.C, and Iljka, R.L.** Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. *N Engl J Med* 332, 305-311. 1995.
182. **Marco, F., León, C., López-Oliva, F., Pérez, A. J., Sánchez-Barba, A., and López-Durán, L.** Intact articular cartilage cryopreservation. In vivo evaluation. *Clin Orthop* 283, 11-20. 1992.
183. **Marco, F., López-Oliva, F., Fernández Fernández-Arroyo, J. M., de Pedro, J. A, Pérez, A. J., León, C., and López-Durán, L.** Osteochondral allografts for osteochondritis dissecans and osteonecrosis of the femoral condyles. *Int Orthop* 17, 104-108. 1993.
184. **Marczynski, W., Komender, J., Baranski, M., and Krauze, K.** Frozen and radiation-sterilized bone allografts in the treatment of post-traumatic malformation of bones. *Ann Transplant* 4, 36-40. 1996.
185. **Marie, P. J., Lomri, A., and de Vernejoul, M. C.** Responsiveness of osteoblastic cells isolated from uremic patients on CAPD to parathyroid hormone and 1,25(OH)₂D. *Kidney Int* 31, 354. 1987.

186. **Marie, P. J., Lomri, A., Sabbagh, A., and Basle, M.** Culture Behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces. *In Vitro Cell & Developm Biol* 25, 373-380. 1989.
187. **Marks, S.C. Jr., and Popoff, S.N.** Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 183, 1-44. 1988.
188. **Mathur, K., Gill, S.S., Dhillon, M.S., and Nagi, O.N.** Role of formalin-preserved allograft in fresh fractures with comminution. *Contemp Orthop* 28, 338-345. 1994.
189. **Matsuyama. T., Lau, K.H., and Wergedal, J.E.** Monolayer cultures of normal human bone cells contain multiple subpopulations of alkaline phosphatase positive cells. *Calcif Tissue Int* 47, 276-283. 1990.
190. **Maurizi, M., Binaglia, L., Donti, E., Ottaviani, F., Paludetti, G., and Venti Donti, G.:** Morphological and functional characteristics of human temporal-bone cell cultures. *Cell Tissue Res* 229, 505-513. 1983.
191. **McDougal, J.S., Martin, L.S., Cort, S.P., Mozen, M. Heldebrant, C.M. and Evatt, B.L.** Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency syndrome virus, human T lymphotropic virus-III/lymphadenopathy-associated virus, with special reference to antihemophilic factor. *J Clin Invest* 76, 875-877. 1985.
192. **McSeehy, P. M. J. and Chambers, T. J.** 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates rat osteoblastic cells to release a soluble factor that increases osteoclastic bone resorption. *J Clin Invest* 80, 425-429. 1987.
193. **McSeehy, P. M. J. and Chambers, T. J.** Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118, 824-828. 1987.
194. **Meding, J. B. and Stambough, J. L.** Critical analysis of strut grafts in anterior spinal fusions. *J Spinal Disord* 6, 166-175. 1993.
195. **Mejdahl, S., Hansen, C. A., Skjodt, H., and Reimann, I.** Human bone bank allografts stimulate bone resorption and inhibit proliferation in cultures of human osteoblast-like cells. *Acta Orthop Scand* 69, 63-68. 1998.

196. **Melkko, J., Kauppila, S., Niemi, S., Risteli, L., Haukipuro, K., Jukkola, A., and Risteli, J.** Immunoassay for the intact aminoterminal propeptide of human type I procollagen (PINP). *Clin Chem* 42, 947-954. 1996.
197. **Meril, A.J.** Direct current stimulation of allograft in anterior and posterior lumbar interbody fusions. *Spine* 19, 2393-2398. 1994.
198. **Meyers, M. H., Akeson, W. H., and Convery, F. R.** Resurfacing of the knee with fresh osteochondral allograft. *J Bone Joint Surg Am* 71-A, 704-713. 1989.
199. **Michaud, R.J., and Drabu, K.J.** Bone allograft banking in the United Kingdom. *J Bone Joint Surg Br.* 76, 350-351. 1994.
200. **Mnaymneh, W., Emerson, R. H., Borja, F., Head, W. C., and Malinin, T. I.** Massive allografts in salvage revisions of failed total knee arthroplasties. *Clin Orthop* 260, 144-153. 1990.
201. **Moore, D., Chapman, M., and Marske, D.** The evaluation of a biphasic calcium phosphate ceramic for use in grafting long bone defects. *J Orthop Res* 5, 356-365. 1987.
202. **Morales, D. O., Pettine, K. A., and Salib, R. N.** A biomechanical study of bone allografts. *Orthop Trans* 17, 12. 1993.
203. **Mueller, S.M., and Glowacki, J.** Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 82, 583-590. 2001.
204. **Munting, E., Wilmart, J.F., Wijne, A., Hennebert, P., and Delloye, C.** Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand* 59, 34-38. 1988.
205. **Muschler, G.F., Nitto, H., Boehm, C.A., and Easley, K.A.** Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res* 19, 117-125. 2001.
206. **Muscolo, D.L., Ayerza, M.A., and Aponte-Tinao, L.A.** Long-term results of allograft replacement after total calcaneotomy. A report of two cases. *J Bone Joint Surg Am* 82 A, 109-112. 2000.

207. **Muscolo, D. L. Petrachi L. J., and Ayerza M. A.** Massive femoral allografts followed for 22 to 36 years. *J Bone Joint Surg Br.* 74 B, 887-892. 1992.
208. **Nacher, M., Aubia, J., Bosch, J., Mariñoso, M. L., Hernández, J., y Serrano, S.** Caracterización de cultivos de osteoblastos humanos. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas* 2, 3-8. 1993.
209. **Naggar, L., Chevalley, F., Blanc, C. H., and Livio, J. J.** Treatment of large bone defects with the Ilizarov technique. *J Trauma* 34, 390-393. 1993.
210. **Nakanishi, K., Sato, K., Sato, T., Takahashi, M., Fukaya, N., and Miura, T.** Preservation of bone morphogenetic protein in heat-treated bone. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 66, 949-955. 1992.
211. **Neer, C.S., 2nd, and Morrison, D.S.** Glenoid bone-grafting in total shoulder arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 70 A, 1154-1162. 1988.
212. **Nefussi, J.R., Boy-Lefevre, M.L., Boulekbache, H. and Forest, N.** Mineralization in vitro of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation* 29, 160-168. 1985.
213. **Nicoll, E. A.** The treatment of gaps in long bones by cancellous insert grafts. *J Bone Joint Surg Br.* 38-B, 70-82. 1956.
214. **Nilsonne, U.** Homologous joint-transplantation in man. *Acta Orthop Scand* 40, 429-447. 1969.
215. **Nolan, P. C.** Living bone grafts. *BMJ* 304, 1520-1521. 1992.
216. **Norman-Taylor, F.H., Santori, N., and Villar, R.N.** The trouble with bone allograft. *BMJ* 315, 498. 1997.
217. **Norman-Taylor, F.H., and Villar, R.N.** Bone allograft: a cause for concern? *J Bone Joint Surg Br.* 79, 178-180. 1997.
218. **Ortiz-Cruz, E. J., Campo Loarte, J., Martínez Martín, J., y Canosa Sevillano, R.** Estructura y organización de un banco de huesos y tejidos. *Revista de Ortopedia y Traumatología* 44, 127-138. 2000.
219. **Ortiz-Cruz, E. J., Gebhardt, M. C., Jennings, L. C., Springfield, D. S., and Mankin, H. J.** The results of transplantation of intercalary

- allografts after resection of bone tumors. A long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Am* 79 A, 97-106. 1997.
220. **Ottolenghi, C. E.** Massive osteoarticular bone grafts. *J Bone Joint Surg Br.* 48-B, 646-659. 1966.
221. **Owen, M. E.** Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system. *Bone and Mineral Reserch.* Vol. 3, 1-26. 1985. Amsterdam, Peck W.A. ed. Elsevier Science Publishers.
222. **Paley, D.** Current techniques of limb lengthening. *J Pediatr Orthop* 8, 73-92. 1988.
223. **Paley, D.** Problems, obstacles and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop* 250, 81-104. 1990.
224. **Parrish, F. F.** Allograft replacement of part of the end of a long bone following excision of a tumor. *J Bone Joint Surg Am* 55-A, 1-22. 1973.
225. **Pash, J.M., Delany, A.M., Adamo, M.L., Roberts, C.T., LeRoith, D. and Canalis, E.** Regulation of insulin-like growth factor I transcription by prostaglandin E2 in osteoblast cells. *Endocrinology* 136, 33-38. 1995.
226. **Peck, W. A., Binge, S. J., and Fedak, S. A.** Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science* 146, 1476-1477. 1964.
227. **Pederson, W. C. and Sanders, W. E.** Bone and soft-tissue reconstruction. *Rockwood and Green's Fractures in Adults.* Fourth Edition , 353-423. 1996. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
228. **Pelker, R. R. and Friedlander, G. E.** Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin* 18, 54-57. 1987.
229. **Pettine, K. A. and Salib, R. N.** Femoral diaphyseal allograft for anterior lumbar interbody fusion: Long term followup. *Orthop Trans* 17, 12. 1993.
230. **Pérez Da Silva, M., Moro Rodríguez, E., Arlandis Villarroya, S., Zarzoso Sánchez, R., Domínguez Esteban, I., y López-Durán, L.** Nuestra experiencia en el manejo del banco de huesos del HUSC. *Libro de Resúmenes Jornadas Científicas SECOT*, 1997, 76. 1997. Madrid.

231. **Poitout, D., and Novakovitch, G.** Use of allografts in oncology and traumatology. *Int Orthop* 11, 169-178. 1987.
232. **Poser, J.W., Esch, F.S., Ling, N.C., and Price, P.A.** Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J Biol Chem* 255, 8685-8691. 1980.
233. **Price, P.A., Parthemore, J.G., and Deftos, L.J.** New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest* 66, 878-883. 1980.
234. **Pruss, A., Baumann, B., Seibold, M., Kao, M., Tintelnot, K., von Versen, R., Radtke, H., Dorner, T., Pauli, G., and Gobel, U.B.** Validation of the sterilization procedure of allogeneic avital bone transplants using peracetic acid-ethanol. *Biologicals* 29, 59-66. 2001.
235. **Puzas, J. E.** Osteoblast cell biology- Lineage and functions. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 11-15. 1996. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
236. **Raouf, A., and Seth, A.** Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. *Bone* 30, 463-471. 2002.
237. **Ray, R. D.** Bone grafts and bone implants. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 5, 389. 1972.
238. **Ray, R. D.** Vascularization of bone grafts and implants. *Clin Orthop* 87, 43-48. 1972.
239. **Rinaldi, E.** The first homoplastic limb transplant according to the legend of Saint Cosmas and Saint Damian. *Ital J Orthop Traumatol* 13, 394-406. 1987.
240. **Robey, P.G., and Termine, J.D.** Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 37, 453-460. 1985.
241. **Rodan, S.B., Imai, Y., Thiede M.A., Wesolowski G., Thompson, D., Bar-Shavit, Z., Shull, S., Mann, K., and Rodan, G.A.** Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res* 47, 4961-4966. 1987.
242. **Rodrigo, J. J., Fuller, T. C., and Mankin, H. J.** Cytotoxic HLA-antibodies in patients with bone and cartilage allografts. *Trans Orthop Res Soc* 1, 131. 1976.

243. **Roodman, G.D., Ibbotson, K.J., MacDonald, B.R., Kuehl, T.J., and Mundy, G.R.** 1,25(OH)₂ vitamin D₃ causes formation of multinucleated cells with osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 8213-8217. 1985.
244. **Sabbagh, A., Marie, P. J., and de Vernejoul, M. C.** Age-related changes in cell proliferation and response to hormones in osteoblastic cells isolated from osteoporotic patients. *Calcif Tissue Int* 41, S2, 14. 1987.
245. **Sakai, H., Jingushi, S., Shuto, T., Urabe, K., Ikenoue, T., Okazaki, K., Kukita, T., Kukita, A., and Iwamoto, Y.** Fibroblasts from the inner granulation tissue of the pseudocapsule in hips at revision arthroplasty induce osteoclast differentiation, as do stromal cells. *Ann Rheum Dis* 61, 103-109. 2002.
246. **Sampath, T. K. and Reddi, A. H.** Distribution of bone inductive proteins in mineralized extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 119, 949-954. 1984.
247. **San Julián, M. and Canadel, J.** Fractures of allografts used in in limb preserving operations. *Int Orthop* 22, 22-32. 1998.
248. **Sanchís Olmos, V.** El banco de huesos del Hospital Provincial de Madrid. *Acta Ortop Traumatol Ibérica* 1, 3-22. 1953.
249. **Schneider, J. R. and Bright, R. W.** Anterior cervical fusion using preserved allografts. *Transplant Proc* 8S, 73-76.
250. **Schratt, H. E. and Spyra, J. L.** Experimental studies of healing and antigenicity of sterilized bone transplants. *Chirurg Jan*; 68, 77-83. 1997.
251. **Segal, H. D. and Harway, R. A.** The use of fibular grafts with anterior cervical fusion. *Orthop Rev* 213, 367-369. 1992.
252. **Shih, H.N., Chen, Y.J., Huang, T.J., Hsu, K.Y., and Hsu, R.W.** Semistructural allografting in bone defects after curettage. *J Surg Oncol* 68, 159-165. 1998.
253. **Shimizu, K., Masumi, S., Yano, H., Fukunaga, T., Ikebe, S., and Shin, S.** Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg* 119, 57-61. 1999.

254. **Shors, E.** Bone graft substitutes: *Clinical studies using coralline hydroxiapatite biomaterials in surgery*. Walenkamp GHIM , 83-89. 1998. Stuttgart, George Thieme Verlag, Bakker FC (eds).
255. **Shors, E. and Holmes, R.** Bone formation in porous hydroxiapatite obtained from human biopsies. *Bioceramics* 6, 375-379. 1993.
256. **Sim, F. H. and Frassica, F. J.** Use of allografts following resection of tumors of the musculoskeletal system. *Instr Course Lect* 42, 405-413. 1993.
257. **Simonds, R.J.** HIV transmission by organ and tissue transplantation. *AIDS* 7 (Supl. 2), S35-S38. 1993.
258. **Simonds, R.J., Holmberg, S.D., Hurwitz, R.L., Coleman, T.R., Bottenfield, S., Conley, L.J., Kohlenberg, S.H., Castro, K.G., Dahan, B.A., and Schable, C.A.** Transmission of human immunodeficiency virus type-1 from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 326, 726-732. 1992.
259. **Simonian, P.T., Conrad, E.U., Chapman, J.R., Harrington, R.M., and Chansky, H.A.** Effect of sterilization and storage treatments on screw pullout strength in human allograft bone. *Clin Orthop* 302, 290-296. 1994.
260. **Singh, K., DeWald, C. J., Hammerberg, K. W., and DeWald, R. L.** Long structural allografts in the treatment of anterior spinal column defects. *Clin Orthop* 394, 121-129. 2002.
261. **Smedsrod, B., Melkko, J., Risteli, L., and Risteli, J.** Circulating C-terminal propeptide of type I procollagen is cleared mainly via the mannose receptor in liver endothelial cells. *J Biochem* 271, 345-350. 1990.
262. **Soboyejo, W.O., Nemetski, B., Allameh, S., Marcantonio, N., Mercer, C., and Ricci, J.** Interactions between MC3T3-E1 cells and textured Ti6Al4V surfaces. *J Biomed Mater Res* 62, 56-72. 2002.
263. **Solomon, J.** Bone grafts. *J Bone Joint Surg Br.* 73, 706-707. 1991.
264. **Somjen, D., Weisman, Y., Harell, A., Berger, E., and Kaye, A.M.** Direct and sex-specific stimulation by sex steroids of creatine kinase activity and DNA synthesis in rat bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 3361-3365. 1989.

265. **Sorger, J.I., Hornicek, F.J., Zavatta, M., Menzner, J.P., Gebhardt, M.C., Tomford, W.W., and Mankin, H.J.** Allograft fractures revisited. *Clin Orthop* 382, 66-74. 2001.
266. **Sowa, H., Kaji, H., Yamaguchi, T., Sugimoto, T., and Chihara, K.** Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 17, 1190-1199. 2002.
267. **Spire B., Dormont D., Barre-Sinoussi F., Montagnier L., and Chermann J.C.:** Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gamma rays, and ultraviolet light. *Lancet* 26, 188-189. 1985.
268. **Stahlman, G. C., Hanley, E. N., and Phillips, E.** Augmenters and alternatives to autogenous bone graft. Rothman-Simeone *The Spine*, Fourth edition, 1601-1607. 1997. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
269. **Stevenson, S.** Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop* 355 Suppl, S239-S246. 1998.
270. **Stevenson, S.** Biology of Bone Grafts. *Orthop Clin North Am* Vol 30; N°4, 543-552. 1999.
271. **Stevenson, S. and Horowitz, M.** The response to bone allografts. *J Bone Joint Surg Am* 74-A , 939-950. 1992.
272. **Stevenson, S., Li, X.Q., Davy, D.T., Klein, L., and Goldberg, V.M.** Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. Quantification of a complex process and structure. *J Bone Joint Surg Am* 79, 1-16. 1997.
273. **Sudo, H., Kodama, H.A., Amagai, Y., Yamamoto, S., and Kasai, S.** In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96, 191-198. 1983.
274. **Sugihara, S., van Ginkel, A.D., Jiya, T.U., van Royen, B.J., van Diest, P.J., and Wuisman, P.I.** Histopathology of retrieved allografts of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 81, 336-341. 1999.
275. **Sugiora, H., Sato, K., Miura, T., Nakanishi, K., and Rong, Y.** Tendon insertions onto allografts pretreated with heat and/or bone surface demineralization. *Clin Orthop* 66, 289-294. 1993.

276. **Taylor, G.I., Miller, G.D., and Ham, F.J.** The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 55, 533-544. 1975.
277. **Thavarajah, M., Evans, D.B., and Kanis, J.A.** Differentiation of heterogeneous phenotypes in human osteoblast cultures in response to 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 14, 763-767. 1993.
278. **Thompson, R. C., Pickvance, E. A., and Garry, D.** Fractures in large-segment allografts. *J Bone Joint Surg Am* 75 A, 1663-1673. 1993.
279. **Thomson, B. M., Mundy, G. R., and Chambers, T. J.** Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate bone resorption. *J Immunol* 138, 775-779. 1987.
280. **Thomson, B. M., Saklatvala, J., and Chambers, T. J.** Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med* 164, 104-112. 1986.
281. **Thoren, K. and Aspenberg P.** Ethylene oxide sterilization impairs allograft incorporation in a conduction chamber. *Clin Orthop* 318, 259-264. 1995.
282. **Tomford W.W., and Mankin H.J.** Bone banking. Update on methods and materials. *Orthop Clin North Am Oct*; 30, 565-570. 1999.
283. **Tomford, W. W.** Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 77-A, 1742-1753. 1995.
284. **Tomford, W. W., Ploetz, J. P., and Mankin, H. J.** Bone allografts of femoral heads: Procurement and storage. *J Bone Joint Surg Am* 68-A, 534-537. 1986.
285. **Tomford, W. W., Thongphasuk, J., Mankin, H. J., and Ferraro, M. J.** Frozen musculoskeletal allografts: a study of the clinical incidence and causes of infection associated with their use. *J Bone Joint Surg Am* 72-A, 1137-1143. 1990.
286. **Trumble T.E., Rafijah G., Gilbert M., Allan C.H., North E., and McCallister W.V.:** Thumb trapeziometacarpal joint arthritis: partial trapeziectomy with ligament reconstruction and interposition costochondral allograft. *J Hand Surg (Am)* 25, 61-76. 2000.

287. **Tuffier, T.** Des graffes de cartilage et dós humain dans les resections articulaires. *Bull Mem Soc Chir Paris* 37, 278-286. 1911.
288. **Tuffier, T.** Sur les graffes osteo articulailres. *Bull Mem Soc Chir Paris* 39, 1078-1096. 1913.
289. **Urist, M. R.** Bone morphogenetic protein, bone regeneration, heeterotopic ossification and the bone-bone marrow consortium. *Bone Miner Res Ann* 6, 57-112. 1989.
290. **Urist, M. R. and Hernández, A.** Excitation transfer in bone. Deleterious effects of cobalt 60 radiation-sterilization of bank bone. *Arch Surg* 109, 486-493. 1974.
291. **Vaccaro, A. R. and Cirello, J.** The use of allograft bone and cages in fractures of the cervical, thoracic and lumbar spine. *Clin Orthop* 394, 19-26. 2002.
292. **Van der Griend, R. A.** The effect of internal fixation on the healing of large allografts. *J Bone Joint Surg Am* 76-A, 657-663. 1994.
293. **Van Meekeren, J.** *Heel en geneeskonstige aanmerkingen.* 1668. Amsterdam, Commelijin.
294. **Viceconti, M., Toni, A., Brizio, L., Rubbini, L., and Borrelli, A.** The effect of autoclaving on the mechanical properties of bank bovine bone. *Chir Organi Mov* 81, 63-68. 1996.
295. **Voggenreiter, G., Ascherl, R., Blumel, G., and Schmit-Neuerburg, K. P.** Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study. *Arch Orthop Trauma Surg* 113, 294-296. 1994.
296. **Voggenreiter, G., Ascherl, R., Fruh, H. J., Blumel, G., and Schmit-Neuerburg, K. P.** Preservation and sterilization of cortical bone biomechanical studies in the rat. *Unfallchirurg* 98, 53-58. 1995.
297. **Voggenreiter, G., Klaes, W., Assenmacher, S., and Schmit-Neuerburg, K. P.** Massive intercalary bone allografts in the treatment of primary and secondary bone tumors. A report of 21 cases. *Arch Orthop Trauma Surg* 114, 308-318. 1995.
298. **Volkov, M.** Allotransplantation of joints. *J Bone Joint Surg Br.* 52-B, 49-53. 1970.

299. **Vuorio E, de Crombrughe B.** The family of collagen genes. *Ann Rev Biochem* 59, 837-872. 1990.
300. **Wagner, M. and Peschl, H. J.** Autoclaved bone grafts in prosthesis replacement of the hip. *Orthopade* 18, 463-467. 1989.
301. **Warwick, R. M., Eastland, T., and Fehily, D.** Role of blood transfusion service in tissue banking. *Vox Sanguinis* 71, 71-77. 1996.
302. **Weber, B. G. and Cech, O.** Pathophysiology, biomechanics, therapy, results. *Pseudoarthrosis* , 1-60. 1976. New York, Grune & Stratton.
303. **Weikel, A. M. and Habal, M. B.** Meralgia paraesthetica: a complication of iliac bone procurement. *Plast Reconstr Surg* 60, 572-574. 1977.
304. **Weiland, A.J., Phillips, T.W., and Randolph, M.A.** Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 74, 368-379. 1984.
305. **Wergedal, J.E., and Baylink, D.J.** Characterization of cells isolated and cultured from human bone. *Proc Soc Exp Biol Med* 176, 60-69. 1984.
306. **Whitson, S.W., Whitson, M.A., Bowers, D.E. Jr., and Falk, M.C.** Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine bone cells grown in vitro. *J Bone Miner Res* 7, 727-741. 1992.
307. **Wilde, A.H., Schickendantz, M.S., Stulberg, B.N., and Go, R.T.** The incorporation of tibial allografts in total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 72, 815-824. 1990
308. **Williams, D.C., Boder, G.B., Toomey, R.E., Paul, D.C., Hillman, C.C. Jr., King, K.L., Van Frank, R.M., and Johnston, C.C. Jr.** Mineralization and metabolic response in serially passaged adult rat bone cells. *Calcif Tissue Int* 30, 233-246. 1980.
309. **Wilson, P. D.** Experience with a bone bank. *Ann Surg* 26, 932-946. 1947.
310. **Wong G.L., and Cohn D.V.:** Target cells in bone for parathormone and calcitonin are different: enrichment for each cell type by

sequential digestion of mouse calvaria and selective adhesion to polymeric surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 3167-3171. 1975.

311. **Wong, G. L. and Cohn, D. V.** Separation of parathyroid hormone and calcitonin sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature* 252, 713-715. 1974.
312. **Yasuda, H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., and Mochizuki S.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 3597-3602. 1998.
313. **Yee, J.A.** Properties of osteoblast-like cells isolated from the cortical endosteal bone surface of adult rabbits. *Calcif Tissue Int* 35, 571-577. 1983.
314. **Youdas, J. W., Wood, M. B., Cahalan, T. D., and Chao, E. Y.** A quantitative analysis of donor site morbidity after vascularized fibula transfer. *J Orthop Res* 6, 621-629. 1988.
315. **Younger, E. M. and Chapman, M. W.** Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3, 192-195. 1989.
316. **Zhang, Y., Homsy, D., Gates, K., Oakes, K., Sutherland, V., and Wolfinbarger, L. Jr.** A comprehensive study of physical parameters, biomechanical properties and statistical correlations of iliac crest bone wedges used in spinal fusion surgery: IV. Effect of Gamma irradiation on mechanical and material properties. *Spine* 19, 304-308. 1994.
317. **Zheng, M.H., Wood, D.J., and Papadimitriou, J.M.** What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Pathol Res Pract* 188, 1104-1121. 1992.
318. **Zucherman, J., Brack, S., Hsu, K., and Levengood, G.** Demineralized allograft in posterior lateral fusions: Clinical efficacy in a prospective study. *Orthop Trans* 17, 13. 1993.

