

Descripción histológica de la regeneración ósea en cresta iliaca de conejos implantados con Nukbone® a las 4, 8, 12 y 16 semanas

Aline Domínguez Alonso¹, Claudia Karina Torres Villaseñor¹,
Fernando Villegas², Benjamín León², Cristina Piña³.

¹Universidad Simón Bolívar, ²Facultad de Medicina, UNAM,

³Instituto de Investigación en Materiales, UNAM, México D.F.

Resumen

La respuesta del tejido óseo al Nukbone® se evaluó histológicamente en conejos. Los animales fueron perforados en ambas crestas iliacas para crear una zona de daño, donde la derecha fue implantada con Nukbone®. Al término de 4, 8, 12 y 16 semanas, los conejos se sacrificaron y se disectaron las crestas iliacas para procesarlas con la técnica histológica. El grupo experimental implantado con Nukbone® presentó la invasión de células mesenquimatosas y osteoblastos en el xenoinjerto, favoreciendo la formación de trabéculas de hueso lamelar con diferenciación a osteocitos. Concluimos que Nukbone® es osteoconductor y acelera el proceso de la regeneración ósea.

Palabras clave: histología, regeneración ósea, xenoinjerto Nukbone®.

Abstract

Bone tissue response to biomaterial Nukbone® was histologically evaluated on rabbits. The animals were perforated both iliac crests to create a damaged zone; only the right iliac crests were implanted Nukbone®. After 4, 8, 12 and 16 weeks, rabbits were sacrificed and crest iliac bones were dissected to process them by the histological technique. Nukbone® group presented mesenchymal cells and osteoblasts invasion on xenograft and formed trabeculae of lamellar bone with osteocytes' differentiation. For previous evidence, we conclude that Nukbone® is an osteoconductor and it accelerates bone regeneration.

Keywords: histology, bone regeneration, xenograft Nukbone®.

Introducción

El hueso es un tejido conectivo especializado, que al estar calcificado posee rigidez y resistencia, proporcionando sostén al cuerpo. A pesar de estas características del tejido óseo, éste puede ser afectado por traumatismos, enfermedades degenerativas o defectos congénitos. Cuando esto sucede, el tejido óseo desencadena procesos de regeneración y/o de reparación, los cuales consisten en el reemplazo del tejido perdido. Ambos procesos se activan dependiendo del tamaño, lugar de la fractura, extensión

del daño al tejido adyacente, las características del tejido óseo (ejemplo: potencial de división, la vida media y la diferenciación celular) y el microambiente del tejido (medio mecánico y vascular). El proceso de regeneración permite el reemplazo con células y matriz ósea formando un tejido óseo con las mismas características indistinguibles del tejido original, mientras que la reparación crea una capa fibrosa inadecuada para la migración y unión celular que impide la recuperación de las propiedades del tejido óseo (Lieberman y Friedlaender, 2005; Lynch, et al., 1999; Buser, et al., 1994).

La regeneración ósea es un proceso único que aparece posteriormente a una fractura y se completa entre las 6 y 8 semanas después de la herida inicial dependiendo del paciente. También se considera una recapitulación de algunos eventos ocurridos durante el desarrollo embrionario. La formación de tejido óseo puede ocurrir por osificación intramembranosa o endocondral dependiendo del microambiente de la fractura (Lynch, et al., 1999; Geneser, 2000). Asimismo, la regeneración se divide en dos categorías:

- **Primaria, directa o cortical:** proceso que requiere estabilización o fijación rígida con o sin compresión del hueso terminal, donde la formación de callo se inhibe y el microambiente es aeróbico. Aquí se presentan dos etapas conocidas como curación gap y curación por contacto (Lieberman y Friedlaender, 2005).
- **Secundaria, indirecta o espontánea:** proceso espontáneo de curación de la fractura sin necesidad de fijación del sitio de daño. Consiste en tres fases: herida inicial o fase inflamatoria, fase reparativa o de proliferación y fase de remodelación (Lieberman y Friedlaender, 2005; Lynch, et al., 1999).

En ambas categorías, durante la regeneración ósea a nivel celular ocurren procesos entre los que se encuentran: angiogénesis, migración celular, proliferación de células indiferenciadas, diferenciación a osteoblastos, producción de osteoide (matriz orgánica), mineralización y remodelación (Lynch, et al., 1999; Reddi, et al., 1977). Con el fin de incrementar la velocidad de los eventos celulares y la calidad de este proceso, así como de disminuir la antigenicidad de los tratamientos, se han desarrollado diversos biomateriales e injertos, de los cuales los más recientes son el uso de matrices porosas como el biomaterial Nukbone® de origen bovino creado en el Instituto de Investigación de Materiales de la Universidad Autónoma de México (UNAM) (Piña, et al., 2006). Por lo tanto, su evaluación histológica a mayores tiempos del proceso de regeneración es de suma importancia para determinar su potencial como xenoinjerto óseo.

Objetivos

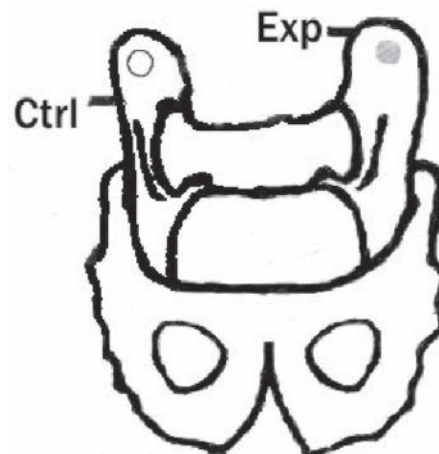
Describir y comparar histológicamente la regeneración del tejido óseo de la cresta iliaca de conejo con y sin xenoinjerto Nukbone® a los tiempos de 4, 8, 12 y 16 semanas.

Describir e identificar el tipo de hueso que se regenera en los grupos control y experimental.

Método

Se utilizaron 16 conejos machos de la raza Nueva Zelanda, con un peso de 2.5 a 3.5 kg. Éstos se dividieron en forma aleatoria en 4 grupos con cuatro conejos cada uno, para los tiempos de evaluación a las 4, 8, 12 y 16 semanas. En el Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la UNAM, se realizó la cirugía en la cresta iliaca de la cadera, la cual consistió en la elaboración de una perforación de 3 mm de diámetro por 10 mm de longitud en ambas crestas iliacas de cada conejo. La cresta iliaca derecha fue experimental (figura 1), en la cual se implantó el xenoinjerto Nukbone® de forma cilíndrica, mientras que la cresta iliaca izquierda fue control (figura 1), en donde la perforación no tuvo ningún tratamiento para la regeneración ósea.

Figura 1. Localización de la cresta iliaca y tratamientos empleados durante el estudio: cresta iliaca control (sin injerto; Ctrl) y cresta iliaca experimental (con Nukbone®, Exp).



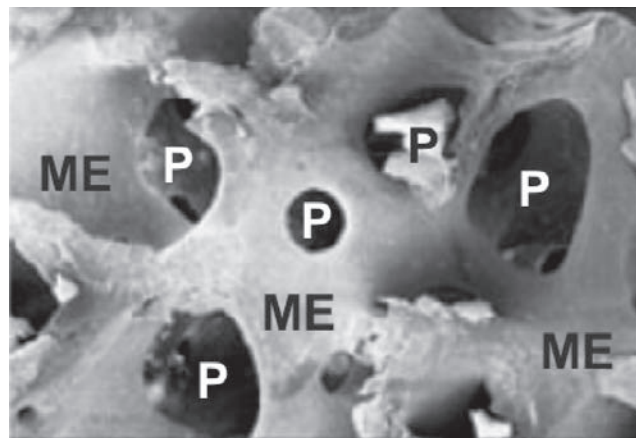
Todos los procedimientos de manejo, anestesia y cirugía se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana relacionada con los Animales de Laboratorio. De esta manera, se sacrificaron los conejos con una dosis de 60 mg/kg de pentobarbital sódico a las 4, 8, 12 y 16 semanas. Las muestras de las crestas iliacas se obtuvieron por medio de una disección con una sierra de diamante. Por último, las muestras se fijaron en formol al 10% durante 24 hrs.

Posteriormente, las muestras fijadas fueron lavadas con agua corriente y se descalcificaron con ácido nítrico al 15% a temperatura ambiente durante un periodo de 5 a 21 días dependiendo del tamaño de la muestra. A continuación, se lavaron con agua corriente y se deshidrataron con alcoholes graduales y fueron aclarados con xilol para ser incluidos en parafina con un punto de fusión de 54°C. Después se realizaron cortes utilizando el micrótopo por rotación con un grosor de 7 µm, los cuales se tiñeron con la técnica de Picrofucsina de Van Gieson (P.G.) (Aguilar, et al., 1996; Wallington, 1976). Los cortes obtenidos se observaron en el microscopio óptico tomando fotomicrografías de cada tiempo a los aumentos de 6x, 40x y 100x con un ocular de 10x (Axiostar, Zeiss) para determinar el proceso celular durante la regeneración ósea y ver la presencia de fibroblastos, células mesenquimatosas, osteoblastos y osteocitos, así como de vasos sanguíneos y la matriz extracelular. Con esta información se determinó el tipo de hueso formado durante la regeneración.

Resultados

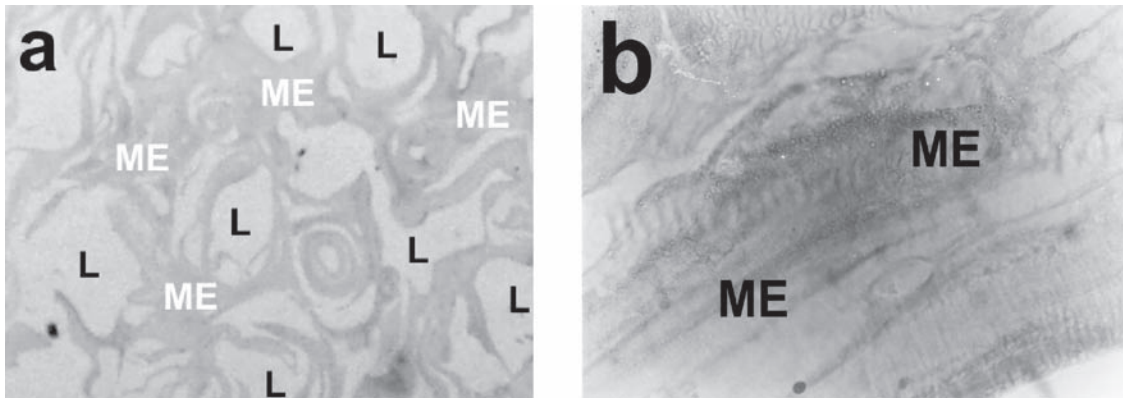
La cresta iliaca es un hueso perteneciente a la cadera conformado por hueso compacto, que posee un acomodo lamelar y concéntrico de los osteocitos en torno a un conducto de Havers, así como por hueso esponjoso, compuesto por trabéculas entre las que se dispone la médula ósea tanto roja como amarilla. Por otro lado, la microestructura del biomaterial Nukbone®, de acuerdo con una fotomicrografía tomada con el microscopio electrónico de barrido donde se observa la hidroxiapatita bovina que forma poros mayores a 150 µm (figura 2), muestra una similitud con la del hueso humano. Asimismo, en un corte histológico del biomaterial se observan trabéculas compuestas de hidroxiapatita y minerales conformando una red (figura 3a), mientras que a mayor aumento se observa que la trabécula es acelular (figura 3b).

Figura 2. Microestructura del Nukbone®



Se observa matriz extracelular (ME) que forma poros (P) mayores a 150µm. Modificado de: Piña et al., 2006.

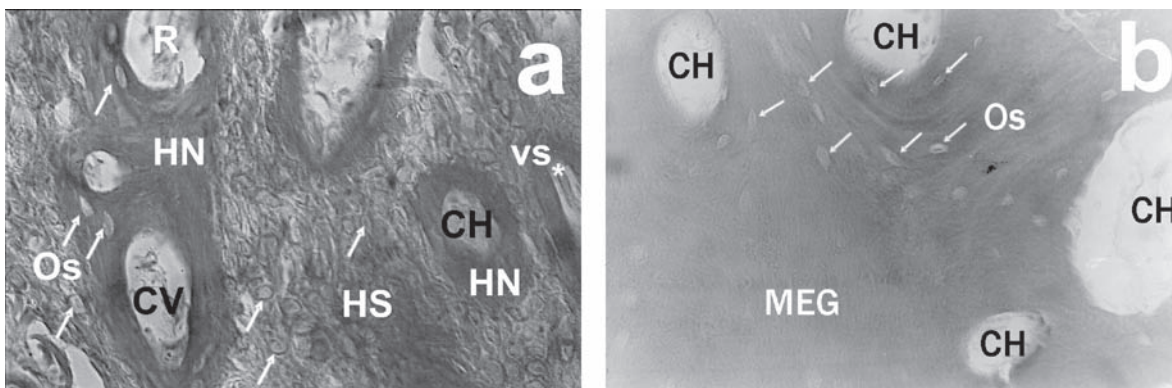
Figura 3. Corte Histológico del Biomaterial Nukbone®



a) Nukbone®, P.G. 60x, y b) Nukbone®, P.G. 1000x, donde se observan lumen (L) rodeadas de una matriz extracelular (ME).

A las 4 semanas de la regeneración ósea, en la cresta iliaca del grupo control se distingue un hueso suave constituido por la matriz extracelular en porción orgánica laxa depositada por osteocitos y osteoblastos. A su vez, continúa la angiogénesis y se observa la formación del hueso nuevo a partir de la periferia hacia el centro de las trabéculas. Para este tiempo inicia la formación de conductos de Havers y Volkmann que consecuentemente forman remanentes de la matriz depositada en la zona de daño (figura 4a). Mientras tanto, en la cresta iliaca experimental se distingue una matriz orgánica de apariencia granular en proceso de mineralización. Los conductos de Havers han completado su formación y existen osteocitos activos disponiéndose alrededor de éstos (figura 4b). Por otro lado, no se observan remanentes de una matriz debido a que el osteoide (matriz orgánica) se depositó sobre el patrón del Nukbone® y, al no existir remanente, comienza la invasión de la médula ósea.

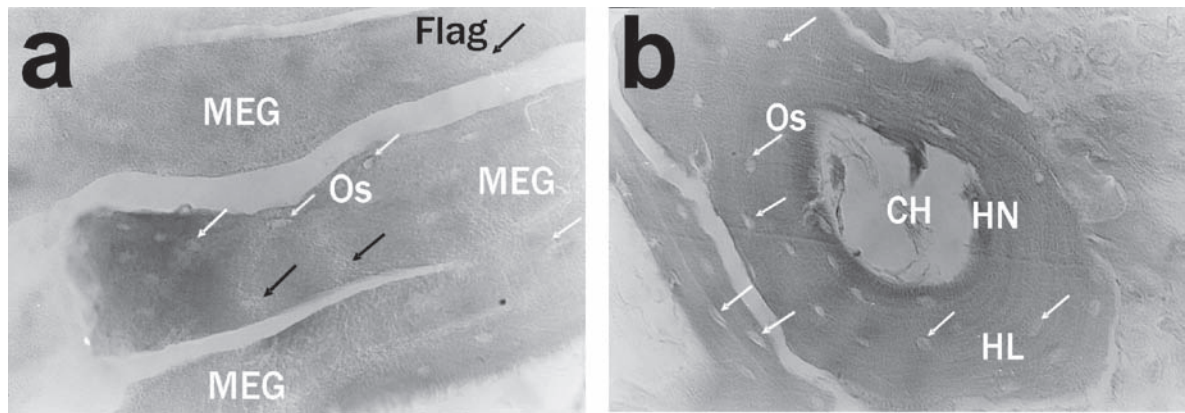
Figura 4. Regeneración ósea a las 4 semanas



a) Control y b) Experimental, P.G. 400x. Remanentes (R), Hueso suave (HS), Hueso nuevo (HN), Conducto de Havers (CH), Conducto de Volkmann (CV), Vaso sanguíneo (vs*), Osteocitos (Os, flechas blanca), Matriz extracelular granular (MEG).

En las 8 semanas de la regeneración ósea, en el grupo control se observa la matriz extracelular granular sobre la cual se localiza un número reducido de osteocitos en comparación con el grupo experimental; sin embargo, la formación de lagunas ha comenzado debido al depósito de minerales (figura 5a). El grupo experimental presenta la matriz extracelular conformada por láminas con osteocitos maduros. Estos componentes se observan en una disposición concéntrica en torno al conducto de Havers, formando un sistema llamado osteona y mostrando características de hueso lamelar. Asimismo, el hueso nuevo inmediato al conducto de Havers continúa su calcificación hasta formar hueso maduro al igual que el presente en el resto de la osteona (figura 5b).

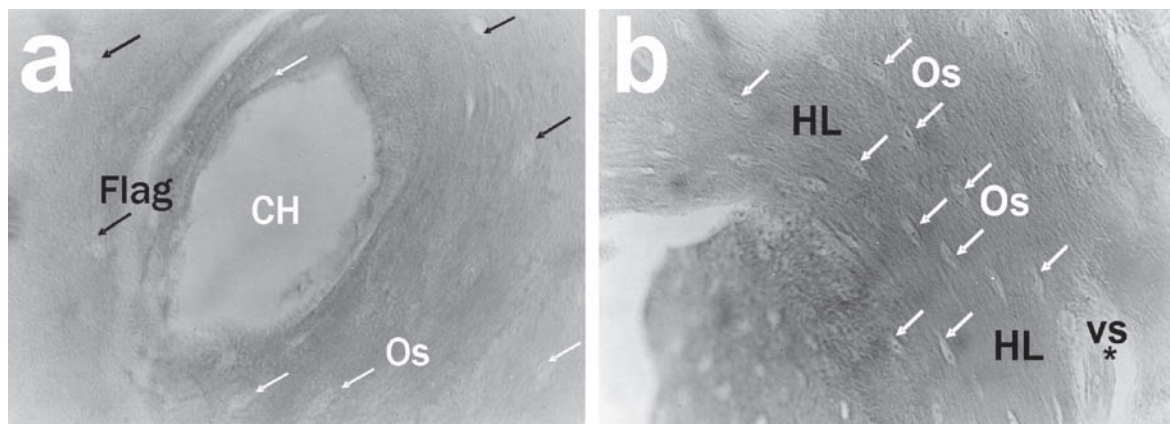
Figura 5. Regeneración ósea a las 8 semanas



a) Control y b) Experimental, P.G. 400x. Hueso lamelar (HL), Hueso nuevo (HN), Conducto de Havers (CH), Osteocitos (Os, flecha blanca), Matriz extracelular granular (MEG), Formación de lagunas (Flag, flecha negra).

A las 12 semanas de este proceso, en los ejemplares control se distingue un acomodo en osteonas de la matriz extracelular granular, la cual continúa calcificándose y se sigue observando la formación de lagunas y de conductos de Havers. Sin embargo, el número de osteocitos presentes es reducido en comparación con el grupo experimental (figura 6a). Para este grupo implantado con Nukbone® se muestra que sobre el hueso lamelar se incrementa el número de osteocitos activos. Asimismo, continúa la formación de vasos sanguíneos y conductos de Havers y Volkmann (figura 6b).

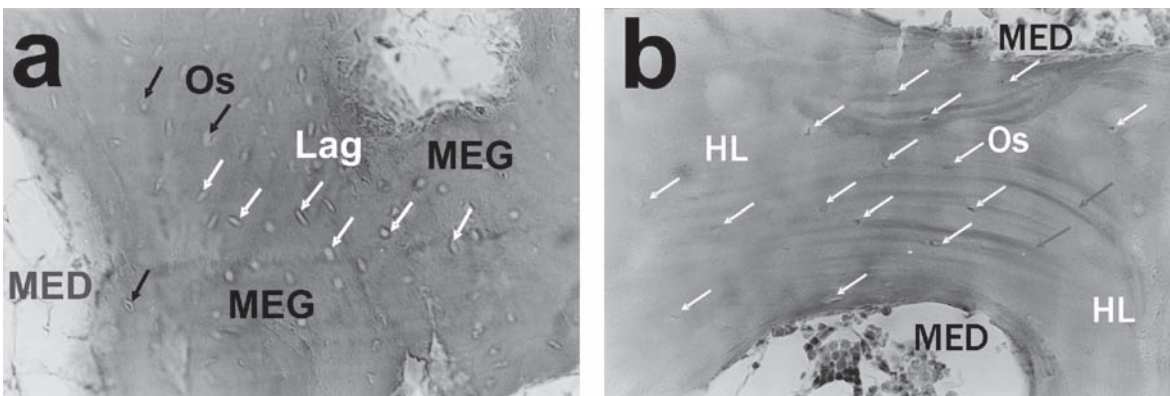
Figura 6. Regeneración ósea a las 12 semanas



a) Control y b) Experimental, P.G. 400x. Hueso lamelar (HL), Hueso nuevo (HN), Conducto de Havers (CH), Osteocitos (Os, flecha blanca), Matriz extracelular granular (MEG), Vaso sanguíneo (vs*), Formación de lagunas (Flag, flecha negra).

A las 16 semanas de la regeneración ósea, en el grupo control, se observa condensación de la matriz extracelular granular que continúa con la formación de lagunas producto de su calcificación. Aun así, el número de osteocitos es bajo en relación con el grupo experimental. La médula ósea amarilla invade entre las trabéculas periféricas de la zona de daño; sin embargo, la médula ósea roja no ha invadido la zona del daño y no existe el acomodo concéntrico de la matriz extracelular alrededor de conductos de Havers (figura 7a). En cambio, el grupo experimental presenta tejido óseo lamelar que se distingue por sus líneas de cementación formando láminas. En esta matriz se dispone una gran cantidad de osteocitos maduros alrededor de conductos de Havers y Volkman, y la médula ósea, tanto roja como amarilla, se dispone entre las trabéculas (figura 7b).

Figura 7. Regeneración ósea a las 16 semanas



a) Control y b) Experimental, P.G. 400x. Hueso lamelar (HL), Osteocitos (Os, flecha blanca), Matriz extracelular granular (MEG), Médula ósea (MED), Líneas de cementación (flecha gris), Lagunas (Lag, flecha negra).

Discusión

El biomaterial Nukbone® es una matriz extracelular porosa de origen bovino totalmente libre de la parte orgánica por medio de procesos de eliminación con detergentes y calor. Asimismo, se procede a un lavado con ultrasonido y esterilización con rayos gamma, para evitar su rechazo por el receptor y la transmisión de enfermedades. Estos procedimientos son los indicados para un aloplasto según Delloyd y Bannister (2004). Por otro lado, la microestructura del Nukbone® posee poros de 150µm, cercanos a lo apropiado para permitir la osteoconducción. Este aspecto se confirma en lo indicado por la ingeniería de tejidos según Estrada (et al., 2006), donde el tamaño ideal de poros de una matriz debe encontrarse entre 200 y 900µm.

Como se mencionó en un artículo previo a éste (Domínguez y Torres, 2006), las perforaciones realizadas para la experimentación abarcaron tanto la capa delgada de hueso compacto como el hueso esponjoso de la cresta iliaca, lo cual sugiere que el proceso de regeneración se completa hasta la recuperación de ambos tejidos, comenzando por la regeneración del hueso esponjoso. Sin embargo, las diferencias de los procesos observados en este trabajo en cada tiempo y tratamiento son evidentes, donde el grupo control muestra la formación de hueso suave y el comienzo de la calcificación, los cuales han sido mostrados por Sfeir, et al. (citado en: Lieberman y Friedlaender, 2005) como eventos finales de la fase inflamatoria de la regeneración secundaria. A diferencia de esto, el Nukbone® se adelanta mostrando una compactación y calcificación del tejido al tiempo de las 4 semanas. Asimismo, la colonización de osteocitos maduros sobre la matriz muestra características semejantes al tejido original que se perdió al realizar la perforación. Resultados similares se encontraron por Sfeir, et al. (citado en: Lieberman y Friedlaender, 2005) en la fase tardía de la regeneración secundaria. Igualmente, en este tiempo, en los ejemplares a los que se aplicó Nukbone®, la invasión de la médula se muestra claramente en zonas periféricas al implante debido a la existencia de los espacios intertrabeculares, los cuales son posibles a causa de que las trabéculas del Nukbone® funcionan como un modelo o patrón donde las células osteoprogenitoras, como las células mesenquimatosas y los osteoblastos, forman el hueso nuevo.

Posteriormente, durante la regeneración a las 8 y 12 semanas, se muestra un atraso del proceso en los ejemplares del grupo control, el cual indica una matriz que continúa calcificándose formando conductos de Havers y lagunas. En cambio, gradualmente la cresta implantada con Nukbone® se distingue por un avance en la formación de hueso lamelar tanto en estructura y funcionalidad del tejido óseo, como en la invasión de células osteoprogenitoras que se han diferenciado de osteocitos maduros para colonizar y formar el hueso definitivo. Por el contrario, en un artículo de revisión realizado por Golberg y Akhavan (citado en: Lieberman y Friedlaender, 2005), que proporciona información sobre la biología de los injertos autólogos, se observa la completa formación de hueso nuevo a los 6 meses post-implantación.

Al tiempo de 16 semanas, la regeneración del grupo control continúa formada por una matriz granular sin organización estructural y comienza la invasión de médula ósea amarilla sobre los espacios donde no existen remanentes de la matriz extracelular, en su porción orgánica que invadió la zona de daño. En comparación con los ejemplares implantados con Nukbone®, en los que la zona de implante se ha formado hueso lamelar con organización estructural de hueso esponjoso, conformado por osteocitos acomodados alrededor de conductos de Havers y trabéculas con líneas de cementación conformando láminas paralelas, con esto entre cada trabécula se organiza completamente médula ósea amarilla y roja dando lugar a la médula ósea original.


Por otro lado, los resultados observados durante la regeneración al implantar el xenoinjerto Nukbone® indican que éste proporciona funciones tanto mecánicas como biológicas. Entre las funciones mecánicas, está proveer un microambiente estable en la zona de implante y en el tejido adyacente, debido a la similitud tanto química como mecánica del Nukbone® con el hueso normal (ambos presentan hidroxiapatita y morfología similar), lo cual permite la curación del daño, desde la periferia de la zona de implante hacia el centro de ésta. Por el proceso de regeneración ósea, se asegura la osificación e integración del hueso nuevo con el hueso viejo, mientras que en el grupo control la osificación de la zona de daño es inversa, empezando en el centro de la zona hacia la periferia para aportar un soporte durante la regeneración.

Hubble, et al. (1997), describieron resultados donde se exhibe la similitud de estabilidad entre el hueso de bovino y el hueso normal. A su vez, el Nukbone® evita la deformación de tejidos adyacentes, funcionando como soporte con características mecánicas de elasticidad y compresión casi iguales a las del hueso humano. Por último, esta estabilidad mecánica producida por el xenoinjerto impide que la regeneración se extienda más allá del daño sin necesidad de formar un callo externo.

En cuanto a la aportación de funciones biológicas, se encuentra la osteoconducción, que es dada por el papel que el Nukbone® desempeña como andamio para la migración de las células de la médula ósea y del tejido óseo adyacente hacia la zona de implante, especialmente de células mesenquimatosas y osteoblastos que producirán el osteoide necesario para la formación de hueso maduro. También el xenoinjerto Nukbone® evita la antigenicidad debido a que se observa osteointegración al existir una continuidad de tejido óseo en la interfase xenoinjerto-hueso. Estos resultados fueron analizados por Sutherland y Bostrom (citado en: Lieberman y Friedlaender, 2005) de forma similar en el hueso desproteinizado Pyrost de origen bovino.

Todo lo anterior indica que con Nukbone® la regeneración se adelanta a los eventos naturales, debido a la formación de un hueso lamelar seguido por la migración, proliferación y diferenciación celular, angiogénesis, producción de osteoide y calcificación. Estos resultados son similares a los procesos celulares como la proliferación, la migración y la diferenciación celular, la angiogénesis, la producción de osteoide y la calcificación, presentados a nivel subcutáneo con matriz extracelular de rata en la investigación realizada por Reddi y colaboradores (1977).

Conclusión

El biomaterial Nukbone® favorece la regeneración ósea de la cresta iliaca a través del mecanismo de osteoconducción, garantizando la migración y proliferación celular debido a la estabilidad mecánica proporcionada por éste, lo que acelera el proceso de calcificación, invasión de osteocitos maduros y médula ósea desde las 4 semanas de su aplicación. En consecuencia, permite la formación de hueso lamelar o maduro desde las 8 semanas post-implante y, por lo tanto, desde el punto de vista histológico, se considera un biomaterial adecuado para la regeneración ósea. 

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Proyecto IN101606 de la UNAM.

Referencias

- Aguilar, M., B. Coutiño, P. Salinas. (1996). Manual general de técnicas histológicas y histoquímicas. *Las prensas de Ciencias*. UNAM. p. 74.
- Buser D., C. Daulhin, R. K. Sohenk. (1994). *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Quintessence Publishing Co. Inc. Hong Kong. pp. 31-116.
- Delloyd C. y G. Bannister. (2004). *Impaction Bone Grafting in Revision Arthroplasty*. Basel. New York. pp. 109-139.
- Domínguez- Alonso, A. y Torres-Villaseñor. C. K. (2006). Descripción histológica de la regeneración ósea en conejos implantados con hueso de bovino liofilizado (Nukbone®). *Revista de Investigación Universitaria Multidisciplinaria de la Universidad Simón Bolívar*. 5(5):27-35.
- Estrada C., C. Paz, E. López. (2006). Ingeniería del tejido óseo: Consideraciones Básicas. *Revista EIA*, 5:93-100. Junio 2006.
- Geneser, F. (2000). *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 263-298.
- Hubble M., A. Goodship, I. Learmonth. (1997). *Xenograft bone for impaction grafting in revision total hip arthroplasty. An in vivo pilot study*. *J. Bone Joint Surgery*, 79-B

(supply IV): 468.

- Lieberman, J. & G. Friedlaender. (2005). *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical applications*. Human Press. Totowa, New Jersey. pp. 1-19, 21-43, 57-65, 133-155.
- Lynch S.E, R.J. Genco, R.E. Marx. (1999). *Tissue Engineering Applications in Maxillofacial surgery*. Quintessence Pub. Co. Chicago, EUA. p. 279.
- Piña Barba, M. C., N. Murguía Acevedo, R. Palma Cortés, E. Lima. (2006). *Caracterización de hueso de bovino anorgánico: Nukbone*. *Acta Ortopédica Mexicana*. 20(4):150-155.
- Reddi H., R. Gay, S. Gay, E. Miller. (1977). Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone, and bone marrow formation. *Cell Biology*, 12 (Vol. 74): 5589-5592.
- Valle, M., R. Crespo, V. García, C. González, B. Jiménez, T. Martínez. (2000). *Aloinjertos óseos*. *Acta Ortopédica Castellano-Manchega*. pp. 59-62.
- Wallington, F. A. (1976). Editorial El Manual Moderno, S. A. México, D.F. p. 47.