

100
28j



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**CAPACIDAD HISTOGENICA DEL PERIOSTIO
AUTOLOGO DE PERRO, TRANSPLANTADO
ECTOPICAMENTE**

T E S I S

**Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

p r e s e n t a

MANUEL FELIPE HERNANDEZ RUIZ

**Asesores: M.V.Z. Alfredo Cortés Arcos
M.V.Z. Juan José Enriquez Ocaña**



México, D. F.

1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	<u>Página</u>
Resumen	1
Introducción	2
Material y Método	6
Resultados	9
Discusión	13
Bibliografía	16

R E S U M E N

Manuel Felipe Hernández Ruiz. Capacidad histogénica del periostio autólogo de perro, transplantado ectópicamente.

El periostio se ha usado únicamente para la formación de hueso en la corrección de defectos congénitos como es el malacdar hendido, defectos mandibulares, etc. (15,16), no considerando que el periostio, potencialmente es capaz de desarrollar líneas celulares diferentes a las formadoras de hueso.

Para valorar la capacidad histogénica del periostio autólogo de perro, se trabajaron doce perros criollos entre uno y medio a tres años de edad, a los que se les transplantó periostio en el epiplón mayor, se formó un colgajo que se dejó sobre la aponeurosis del músculo oblicuo abdominal del lado de recho.

La recuperación de los especímenes se hizo semanalmente de la primera a la décima segunda semana; se realizaron cortes histológicos secuenciales.

Los especímenes logrados mostraron tejido osteoide desde la tercera semana, un foco de formación ósea con buena irrigación en la cuarta semana, tejido mesenquimatoso y vasos sanguíneos de nueva formación en abundante cantidad en la sexta semana.

INTRODUCCION I

Las hojas germinativas (ectodermo, mesodermo y endodermo) dan origen a varios tejidos y órganos específicos durante el período embrionario.

En términos generales el ectodermo origina: Sistema nervioso central, sistema nervioso periférico, epitelio sensorial de oído, nariz y ojo, la epidermis que incluye pelo y uñas. Las glándulas subcutáneas, glándulas mamarias, hipófisis y esmalte también se origina del ectodermo (10,13).

El endodermo origina: Revestimiento epitelial del aparato respiratorio, parénquima de amígdalas, tiroides, paratiroides, timo, hígado y páncreas, revestimiento epitelial de la caja del tímpano y de la trompa de Eustaquio (10,13).

Entre los tejidos y órganos que se derivan del mesodermo encontramos: Tejido conectivo, cartílago y hueso; músculo estriado y liso, células linfáticas y sanguíneas así como paredes del corazón, vasos linfáticos y sanguíneos, riñones, gónadas y los conductos correspondientes, porción cortical de la glándula suprarrenal, bazo (10,13).

Los somitas son una serie de bloques de tejido mesodérmico situado en cada lado del tubo neural. Las células epitelioideas que forman las paredes ventral y medial del somita proliferan intensamente, poco a poco pierden la forma epitelial tornándose polimorfas. Estas células llamadas en conjunto esclerotoma, forman un tejido laxo llamado mesénquima o tejido conectivo joven (10,13)

El mesénquima no es un tejido definitivo, sino, primordial multipotencial, que puede dar origen a una sorprendente variedad de tejidos adultos. Sus derivados abarcan toda la-

gama de tejidos conectivos, incluyendo cartílago y hueso, y abarca clases tan diversas de tejidos como células sanguíneas, endotelio vascular, músculo estriado y liso, etc. (3,8,11).

Una vez que una célula mesenquimática llega a su lugar de destino, comienza a diferenciarse en el tipo de célula especializada, que le es dictado por su potencialidad de desarrollo intrínseco.

En cualquier tejido conectivo adulto es posible apreciar células mesenquimatosas indiferenciadas, parcialmente diferenciadas y diferenciadas completamente, debido a que hay tendencia a la interrupción del fenómeno en algún sitio de la línea de diferenciación. Estas células quedan como reserva de células multipotenciales (3,8,11).

Las células no diferenciadas tienen gran potencialidad siguiendo cualquier línea de diferenciación para construir todos los tipos de células que pueden observarse en cualquier tejido conectivo (3,8,11).

La lámina fibrosa que recubre enteramente el hueso a excepción de las superficies articulares y de las inserciones musculares y tendinosas se denomina periostio, está formado de un tejido conectivo denso con fibras cruzadas en prevalente dirección longitudinal. Este revestimiento es fundamental para la manutención del tejido óseo, ya que de sus vasos parten ramificaciones que penetran en los huesos a través de los canales de Volkmann, y sirven como fuente de osteoblastos para el crecimiento y reparación de los huesos (9).

La historia del trasplante periosteal comienza con los trabajos de Olier (1867), quien no logró demostrar el poder osteogénico del periostio. Fué hasta 1899 cuando Grohe y Borpurgo realizando trasplantes periosteales obtuvieron resul

tados positivos; sin embargo, Brown y Brown en 1913 transplantando periostio libre en el tejido subcutáneo y músculo de perros fueron incapaces de producir hueso. Mayer y Wehner (1914) transplantando en el muslo de perros periostio autólogo obtenido de la superficie de la tibia intramuscular, observaron formación de hueso en cuatro casos (14).

Las recientes técnicas experimentales mediante cultivos de tejidos han demostrado que las células osteogénicas poseen una múltiple potencialidad formando hueso, cartilago o tejido fibroso según el grado de vascularización y el contenido de oxígeno (6). La interrupción del aporte de oxígeno, detiene la maduración ósea, produciendo un tejido intermedio entre hueso y cartilago; en cultivos de tejidos se ha podido demostrar, que diversos factores ambientales influyen la osteogénesis, la presión por ejemplo, modifica o bloquea la formación de hueso y determina la orientación de las trabéculas; una fuerte presión ejercida sobre el hueso cortical después de una fractura o una osteotomía, causa una masiva osteolisis y una eventual pseudoartrosis; una condición aparentemente sin importancia como la entidad del espacio a disposición del tejido en crecimiento pueden orientar células mesenquimatosas hacia la producción de tejido fibroso, de cartilago o de hueso (6).

Urist y McLean (17) concluyen en sus trabajos que el periostio tiene poder osteogénico al ser transplantado en la cámara anterior del ojo de conejos. Estudiaron los mecanismos de inducción de la osteogénesis y determinaron que el producto final obtenido de la cámara anterior del ojo, indicó que el periostio contiene células con potencia osteogénica y que ésta es específica para la formación de tejido óseo compacto sin la producción de cartilago o médula ósea hematopoyética.

Friedenstein (4,5) y Ashton (1) demostraron evidencias de que las células no mielogénicas derivadas de cultivos de médula ósea podían incluir células con competencia osteogénica y que ésta podía ser expresada al transferir los cultivos a cámaras de difusión.

En el campo clínico el uso de trasplantes de periostio libre o la formación de colgajos se ha utilizado en la reparación de defectos del paladar primario (14,16).

A nivel experimental existen trabajos en donde se han transferido injertos de periostio libre con microanastomosis vascular (12), así como trasplantes de hueso en los que se incluye o no el periostio (14,15).

HIPOTESIS

Tomando en cuenta que embriológicamente el periostio proviene del mesénquima y que posee células en diferentes etapas de diferenciación, es posible que éste pueda llegar a formar hueso, médula ósea o músculo.

El objetivo de éste trabajo es el de estudiar el comportamiento del periostio autólogo de perro, trasplantado e implantado en el epiplón mayor, es propicio para lograr que las células mesenquimatosas no diferenciadas manifiesten su potencialidad osteogénica, mielogénica y miogénica (formación de hueso, médula ósea o músculo).

M A T E R I A L Y M E T O D O II

1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

El modelo experimental se realizó con doce perros criollos; entre uno y medio a tres años de edad, cuyo peso en promedio fué de 18 Kg. Se mantuvieron a base de alimento concentrado y agua ad-libitum.

Antes del experimento, los animales se examinaron clínicamente, se les practicaron pruebas coproparasitológicas y biometrías hemáticas; se concluyó que no tenían enfermedades infecciosas y/o parasitarias, su estado de salud fué favorable.

2.- ANESTESIA.

Cada perro fué sometido a un ayuno de doce horas; se tranquilizó con dehidrobenzoperidol (Janssen Farmacéuticos S.A. de C.V. 1 mg/Kg. de peso); la anestesia fué con pentobarbital sódico (Norden de México, 28 mg/kg de peso), intubándose endotraquealmente.

3.- ANTISEPSIA.

Los animales fueron rasurados, lavados (con agua y jabón) y embrocados con cloruro de benzalconio en la región fronto-nasal y abdominal.

4.- INSTRUMENTAL.

Se utilizó un equipo de cirugía general, una legra Alexander, unas pinzas Adson con dientes y un electrocoagulador.

5.- TECNICA QUIRURGICA.

Se realizaron dos tiempos quirúrgicos: el primero fué en la región fronto-nasal y el segundo en la abdominal.

5.1 Primer tiempo.

Bajo anestesia general, intubación endotraqueal, en condiciones de asepsia y con técnica estéril se incidió en la línea media de la región fronto-nasal, haciendo hemostasia de los vasos sangrantes, disección de la galea aponeurótica -- hasta que se expuso el periostio. Ya expuesto éste se incidieron los bordes del rombo que forma la porción del veros tio libre, cuyos vértices son: La parte inferior de la cre ta parietal, las apófisis supraorbitarias y el tercio distal de la sutura nasal. Se hizo la obtención del verio stio con la legra Alexander, manteniéndose en solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.9% a temperatura de 39°C.

El tejido conjuntivo subcutáneo fué cerrado con catgut tres ceros empleando puntos separados simples, para la piel se empleó Sarnoff con algodón dos ceros.

5.2 Segundo tiempo.

Se hizo una laparotomía media pósterio umbilical, disección por planos anatómicos y penetración a cavidad abdominal. Se

expuso la porción caudal del epiplón mayor sin permitir la deshidratación de éste, para lo cual se roció frecuentemente con solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.9 %. Con el empleo de las pinzas Adson, catgut cuatro ceros y el periostio obtenido (primer tiempo), se formó un cilindro donde se introdujo el epiplón, para asegurar la completa irrigación del periostio, el cilindro se cubrió con el epiplón circundante. El injerto colgado compuesto, se colocó sobre la aponeurosis del músculo oblicuo abdominal (túnica abdominal) del lado derecho. La incisión se redujo con puntos en X (catgut tres ceros), abarcando veritoneso y músculo, hubo cuidado de no estrangular el epiplón; se utilizaron puntos separados simples y catgut tres ceros para suturar el tejido conjuntivo subcutáneo; la piel se suturó con Sarnoff y algodón dos ceros.

La recuperación de los especímenes se hizo semanalmente de la primera a la décimo segunda semana y se mantuvieron en formol al 10 % para su posterior inclusión en parafina.

R E S U L T A D O S I I I

Cada semana se valoró por palpación la consistencia - de los transolantes; todos mostraron un volumen constante sin - variaciones considerables. Cabe mencionar que en dos casos el - injerto involucionó, por lo que se tuvieron que repetir.

1.- OBTENCION DE LOS ESPECIMENES.

De la primera hasta la décima segunda semana fué realizada la obtención de los especímenes; se procedió cada semana bajo anestesia general e intubación endotraqueal, aplicando las mismas sustancias y dosis de la primera sesión quirúrgica.

1.1 Técnica quirúrgica.

Con antisepsia de la región abdominal, se practicó una incisión (de aproximadamente diez centímetros de largo) en la línea media sobre la piel y el tejido subcutáneo. Después - utilizando unas pinzas de disección con dientes y tijeras - Metzenbawn curvas, se disecó el pedículo de epiplón, se ligó y cortó en la base; el tejido conjuntivo subcutáneo fué cerrado con catgut tres ceros empleando puntos separados - simples, para la piel se empleó Sarnoff con algodón dos ceros.

En todos los casos, no se encontraron adherencias significativas, así que no hubo dificultad para la obtención de los especímenes; la forma de todos éstos fué irregu

lar y de consistencia cartilaginosa.

Todos los especímenes se mantuvieron en formol al 10% - , después fueron incluidos en parafina, tificando con el método de hematoxilina y eosina (2) ; se realizaron cortes histológicos secuenciales.

2.- SECUENCIA HISTOLOGICA.

2.1. Primera semana.

En este corte se observó una moderada cantidad de tejido adiposo, hemorragias y varios focos de sangre coagulada. En el centro se apreciaron focos de células inflamatorias (monocitos, linfocitos y fibroblastos); algunas áreas tenían pigmentación hemática.

2.2. Segunda semana.

En este corte apareció un tejido compuesto por adipocitos rodeados por coágulos sanguíneos, pigmento hemático y una incipiente migración de fibroblastos que formaban masas y algunas de éstas se agrupaban circularmente alrededor de algunos vasos sanguíneos; el resto era material amorfo.

2.3. Tercera semana.

Se encontró un material de tipo fibroso con tendencia a formar hueso , se trataba de un tejido compuesto por células fusiformes con citoplasma elongado y ligeramente basófilo que se unían entre sí por un material fino, formando filamentos con la apariencia de ser matriz ósea; en el --

área de tejido adiposo había fibroblastos en escasa cantidad; otras áreas presentaron hemorragias y una moderada formación de nuevos vasos.

2.4. Cuarta semana.

Se observó un tejido compuesto por un material de células - tipo fibroso (fusiformes con núcleos basófilos y extremos - truncados). Algunas áreas presentaron gran cantidad de tejido adiposo, vasos congestionados y algunos focos de hemorragia; se encontró un punto de formación ósea con buena irrigación, estaba separado del resto de tejido adyacente por - células fibrosas y material de aspecto hialino que recuerda a colágena.

2.5. Quinta semana.

En este corte se encontraron gran cantidad de fibroblastos - con liberación de colágena, dando al tejido un aspecto sólido y permitiendo la estancia de vasos de nueva formación e - infiltración de células inflamatorias en escasa cantidad.

2.6. Sexta semana.

La muestra se componía esencialmente de dos tejidos: por un lado, abundante tejido adiposo y, por otro, áreas donde - existía infiltración de fibroblastos, vasos de nueva formación en abundante cantidad y una matriz firme de colágena.

Se observaron células que tienen capacidad de aglomerarse - en forma de espiral, dando una morfología de matriz osteoide, rodeando a ésto, se pudo observar células pluripotencia

les (células mesenquimatosas).

2.7. Séptima semana.

Se observaron dos tipos de tejidos con una separación tenue entre ellos; uno de los tejidos estaba formado básicamente de fibroblastos y fibrocitos con un gran espacio entre las células, unidas éstas por un material eosinofílico y denso (colágena). El tejido opuesto estaba compuesto por fibroblastos probablemente diferenciados en el borde limfotrofe, al alejarse de éste, las células iban adquiriendo una morfología propia, éstas células eran helicoidales con un citoplasma ligeramente basófilo y núcleo central, muchas de ellas eran parecidas a los osteoblastos; la agrupación celular era en forma de espiral con adherencias entre sí por un material compuesto por fibras eosinofílicas. Se observan hacia el polo opuesto a éste, una franca formación de matriz osteoide, las células que le formaban se acomodaban en un centro vacío y conformando una espiral, el citoplasma era eosinófilo, núcleo excéntrico y unidos estrechamente entre sí.

Existían varios vasos sanguíneos con paredes gruesas que se mejaban arterias de mediana importancia.

2.8. Octava semana.

El tejido observado comprendía gran cantidad de fibroblastos y fibrocitos que se agrupaban ordenadamente siguiendo un patrón de periostio. Se conformaba una matriz densa, sólida

da eosinofílica donde había escasos vasos sanguíneos, los que estaban presentes tenían una pared gruesa y su diámetro era grande. También se observaron dos focos de matriz ósea. Alrededor se captó tejido adiposo con vasos de pequeño calibre.

2.9. Novena, décima, décima primera y décima segunda semana.

Se componían básicamente de fibroblastos y fibrocitos en moderada cantidad, con una matriz cartilaginosa, basófila y eosinofílica en varias áreas; disminuyó la cantidad de vasos sanguíneos, muchos estaban solamente atrofiándose. Los vasos presentaban un endotelio y una capa adventicia muy delgada.

DISCUSION IV

Los resultados reportados en la literatura de trabajos experimentales y clínicos de trasplante libre de periostio a diferentes tejidos y en diversas condiciones ambientales, solamente habían demostrado producir hueso. Los resultados obtenidos por el Dr. González Ascencio (7), concluyen que no sólo la potencia del periostio se limita a formar hueso, sino también médula ósea, músculo estriado y liso. En dicho trabajo aparecen fibras musculares estriadas en la décima tercera semana; fibras musculares lisas en la décima cuarta semana; trabéculas óseas en la decimo quinta semana; sistemas Haversianos bien calcificados, músculo liso y estriado en la décima sexta, décima séptima y décima octava semana; en la décimo novena aparecen islotes de médula ósea en las vecindades de material osteoide; en la vigésima semana aparece hueso calcificado y abundante médula ósea, así como presencia de músculo estriado y liso.

En base al trabajo realizado por el Dr. González Ascencio y los resultados obtenidos en el presente trabajo, se comprueba la capacidad pluripotencial que posee el mesénquima, al colocar subcutáneamente una porción de periostio libre envuelto en epinión vascularizado; se consideró que dicha porción de periostio sufre una desdiferenciación en el proceso de reabsorción, puesto que se trata de un tejido libre que va sufriendo --

una degradación progresiva por falta de irrigación; se observó que ésta desdiferenciación llega hasta mesénquima en la sexta semana de implantación y es en este momento en que recibe un nuevo aporte sanguíneo adecuado, cuando inicia su capacidad pluripotencial; el hecho de colocarlo subcutáneamente, lo deja fuera de su lugar de acción y no recibe la información genética circunvecina, por lo tanto, forma lo que se ve hacer (hueso, médula ósea y músculo estriado y liso). Es muy posible que por ésta desituación anatómica en tejidos blandos, finalmente termina reabsorbiéndose, aún cuando las observaciones hechas en los diferentes especímenes logrados, nos dan fundamento para establecer que durante doce semanas, los tejidos de nueva formación continúan creciendo; de acuerdo al trabajo del Dr. González Ascencio, sabemos que tal desarrollo continúa en la vigésima semana.

El comportamiento del periostio autólogo, transplantado e implantado en el epiflón mayor fué satisfactorio, ya que el espécimen logrado, mostró tejido mesenquimatoso a partir de la sexta semana, sin embargo, la sobrevivencia de osteocitos del periostio libre, dió formación de tejido osteoide desde la tercera semana; en la cuarta semana aparece un foco de formación ósea con buena irrigación; en la sexta semana, además de aparecer el tejido mesenquimatoso, se observan vasos sanguíneos de nueva formación en abundante cantidad, lo que posiblemente -

favoreció el desarrollo celular.

El microambiente celular dado por el epiplón mayor fué pronicio, el osteoprogenitor fué capaz de diferenciarse en osteoblasto y osteoclasto de acuerdo a las condiciones ambientales y, éstas influyeron en la diferenciación celular.

B I B L I O G R A F I A

1. Ashton, B.A., Allen, T.D., Howlwt, C.R., Eagleso, C.C., Hattori, A. & Owen, M.: Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin. Orthop., 151: 294 (1980).
2. Armed Forces Institute of Patology: Manual of Staines Histology Methods. 3rd. ed. McGraw-Hill Book Company Inc., New York, 1968
3. Bloom, W.: A Textbook of Histology. 10rd. ed. W.B. Saunder Company, Philadelphia, 1975.
4. Friedenstein, A.J., Chilakhjan, R.K., Latsink, N.V., Panasyuk, A.F. & Keiliss-Borek, I.V.: Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissue. Transplantation, 17: 331-340 (1974).
5. Friedenstein, A.J.: Precursor cells of mechanocytes. Int. Rev. Cytol., 47: 327-355 (1976).
6. Freddi, M., Soana, S.: Fattori che influenzano l'osteogenesis e ruolo del periostio. Clin. Vet., 103: 669-674 (1980).
7. González, D.: Poder osteogénico, mielogénico y miogénico del periostio. Formación de hueso, médula ósea, músculo liso y músculo estriado por autoinducción en el epiglón mayor (modelo experimental en perros), Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1984.
8. Ham, A.: Tratado de Histología. 3a ed. Interamericana, 1961.
9. Junqueira, L.C.: Histología Básica. 2a ed. Salvat Editores S.A., 1981.

10. Langman, J.: Embriología Médica. 3a ed. Interamericana, 1976.
11. Lesson, T.S.: Histología. 2a ed. Interamericana, 1970.
12. Ostrup, L.T. & Fredrikson, J.M.: Distant transfer of a free living bone graft by microvascular anastomosis. An experimental study. Plast. and Reconstr. Surg., 54: 274 (1974).
13. Patten, B.M.: Embriología Humana. 5a ed. El Ateneo, 1976.
14. Ritsila, V., Alhopuro, S., Rintala, A.: Bone formation with free periosteum. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 6: 51 (1972).
15. Ritsila, V., Alhopuro, S., Gylling, U. & Rintala, A.: The use of free periosteum for bone formation in congenital clefts of the maxilla. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 6: 57 (1972).
16. Skoog, T.: The use of periosteum and surgical for bone restoration in congenital clefts of the maxilla. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 1: 113 (1967).
17. Urist, M.R. & McLean, F.C.: Osteogenetic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. J. Bone Joint Surg., 34A: 443-474 (1952).