

11262  
1 ej 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

TESIS PARA OBTENER GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS

(CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA)

PODER OSTEOGENETICO, MIELOGENETICO Y MIOGENETICO DEL PERIOSTIO. FORMACION DE HUESO, MEDULA OSEA, MUSCULO - LISO Y MUSCULO ESTRIADO POR AUTOINDUCCION EN EL EPIPLON MAYOR. (MODELO EXPERIMENTAL EN PERROS).

DR. DANIEL ASCENCIO GONZALEZ.

**FECHA DE ORIGEN**

FEBRERO 1984  
=====



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

La diferenciación celular y tisular son en el momento actual uno de los problemas centrales de la biología y de la medicina contemporánea; el análisis de los mecanismos de expresión genética, el conocimiento profundo de la forma en que interaccionan las moléculas intracelulares involucradas en la transcripción, translación y regulación de estos fenómenos -- permitirá obtener un concepto integral en el campo del trasplante de órganos y tejidos.

El estudio del hueso ha tenido distintos enfoques a través - del tiempo, en base al complejo sistema de su estructura y - función, niveles macroscópicos, celulares, subcelulares, moleculares y las interrelaciones entre la fisiología y la bioquímica de este tejido han sido motivo de múltiples trabajos experimentales y clínicos.

El estudio del crecimiento del hueso, la consolidación de -- las fracturas y el trasplante óseo fueron resumidos por - - Keith en 1919 en el libro titulado "La reparación de las mutilaciones" (9). Se menciona en esta obra las primeras ob--servaciones de Belchier y Duhamel de 1741, la tinción del callo óseo con alizarina.

Menciona también los trabajos experimentales de Ollier en los que se estableció que el periostio tiene una capa celular con poder osteogénico. De esta manera se inició la controversia entre los trabajos que atribuyen capacidad de producir hueso al periostio y los que niegan esta propiedad.

Entre los trabajos experimentales de trasplante libre de periostio a distintos órganos destacan los de Urist y Mc Lean (24) en donde llegaron a concluir que el periostio tiene potencia osteogénica cuando este tejido fué transplantado en la cámara anterior del ojo de conejos. Estudiaron los mecanismos de inducción de la osteogénesis y concluyeron que el producto final obtenido de la cámara anterior del ojo indicó claramente que el periostio contiene células con potencia osteogénica y que ésta es específica para la formación de tejido óseo compacto sin la concomitante producción de cartilago ó médula ósea hematopoyética.

En el terreno del cultivo de tejidos los trabajos de Friedenstein (3,4) y Ashton (1) demostraron evidencias de que las células no mielogénicas derivadas de cultivos de médula ósea pueden incluir células con competencia osteogénica y que esta podría ser expresada al transferir los cultivos a cámaras de -

difusión.

En el campo clínico el uso de trasplantes de periostio libre ó la formación de colgajos se ha utilizado en la reparación - de defectos del paladar primario (20, 21).

Los trabajos experimentales de trasplantes de hueso son diversos en cuanto a técnicas quirúrgicas en los que se incluyó ó no el periostio (19,20), en los que se tomó en cuenta la edad de los animales en experimentación (10,11), en donde la - importancia fundamental del trasplante fué atribuída a la -- circulación del lecho receptor (8), o bien los recientes trabajos donde se han transferido injertos de periostio libres - con microanastomosis vasculares (17).

El propósito de este trabajo es el de estudiar el poder osteogenético, mielogenético y miogenético del periostio por auto-inducción cuando este tejido es transplantado e implantado en el epiplón mayor, además de estudiar las condiciones ambientales creadas en las células, el patrón de desarrollo celular y tisular del llamado injerto colgajo compuesto para propiciar la expresión de diversas líneas celulares.

Otro propósito será conocer el comportamiento de este injerto

colgajo compuesto para la aplicación futura en el tratamiento de los problemas congénitos, traumáticos, tóxicos y tumorales en donde sea necesario utilizar los tejidos que se han obtenido en este modelo experimental.

#### MATERIAL Y METODOS

Después de estudiar las condiciones tisulares de la rata, el cobayo, el conejo y el perro fué seleccionado éste último para desarrollar el modelo experimental. El tejido mesodérmico elegido fué el periostio y las condiciones fisiológicas fueron dadas por el epiplón mayor que colocados ambos tejidos sobre la pared anterior del abdomen, forman una cámara de difusión in vivo e in vitro.

El modelo experimental se llevó a cabo en ocho perros criollos con edades de uno a tres años, cuyo peso fué de 16 a 26 kg.. Antes del inicio del experimento se examinaron clínicamente y se determinó que no tuvieran enfermedades infecciosas o parasitarias, se tomó biometría hemática y exámenes coproparasitoscópicos en serie de tres para corroborar su estado de salud. Se mantuvieron con dietas concentrada y agua ad-libitum.

### Técnica quirúrgica

Bajo anestesia general e intubación endotraqueal con pentobarbital sódico 20 mg. por kg. de peso y dehidrobenzoperidol 1 mg. por kg. de peso se practicó tricotomía de las regiones -- fronto-parietal y abdominal. En condiciones de asepsia y con técnica estéril se hizo incisión en la línea media de la región parieto-fronto-nasal, hemostasia de los vasos sangrantes disección de la galea aponeurótica, exposición del periostio; se incidió la porción libre de músculo y se tomaron medidas del rombo que forma la porción del periostio libre. Las medidas tomadas fueron los lados, la diagonal mayor y menor del rombo, el periostio fué mantenido en solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.9% a temperatura de 39°C. La incisión fué cerrada con puntos separados.

El siguiente tiempo se practicó en el abdomen, se hizo laparotomía media posteroumbilical, disección por planos y penetración a la cavidad. Se tomó la porción caudal del epiploon mayor, éste fué expuesto a través de otra incisión paramedia de recha sobre los músculos rectos de la pared abdominal, se formó con el periostio un cilindro que fué suturado con catgut - cuatro ceros, se introdujo epiploon dentro del mismo, se midió

su longitud, su diámetro y éste fué envuelto con el epiplón - circundante. El injerto colgajo compuesto se dejó sobre la - aponeurosis de los músculos de la pared abdominal del lado de recho y se cerró por planos.

Se planeó la recuperación de los especímenes cada semana, a partir de la semana trece de evolución hasta la veinte.

#### RESULTADOS

El depósito selectivo de la tetraciclina (13,14) en el hueso fué utilizada para marcar macroscópicamente y microscópicamente la formación de nuevo hueso. Dos días antes de tomar los especímenes todos los perros fueron inyectados con oxitetraciclina 50 mg. por kg. de peso por vfa intramuscular.

La toma de los especímenes fué realizada de la semana trece a la semana veinte; se hizo cada semana bajo anestesia general e intubación endotraqueal con los medicamentos y dosis utilizados en la primera sesión quirúrgica.

Con asepsia de la región abdominal se practicó incisión paramedia derecha sobre la piel y el tejido celular subcutáneo, -



se disecó el pedículo de epiplón y se ligó. El espécimen fué colocado en solución salina de formol al 10% y se cerró la piel con puntos separados.

Los especímenes fueron valorados en cuanto a consistencia y se examinaron individualmente bajo una lámpara de luz ultravioleta de 125 watts (3,660 angstroms).

A los especímenes se les tomó radiografías simples y tomografía computarizada. Los cortes tomográficos de 2 mm. de espesor fueron efectuados con un tomógrafo Somatom 2 "Siemens". Se practicó medición de diámetros mayores, densimetría directa de las zonas hipodensas e hiperdensas más representativas e histograma lineal de las regiones centrales de todos los especímenes.

La medición radiológica fué tomada a partir de la zona que mostró más hiperdensidad.

Todos los especímenes se mantuvieron en solución salina de formol al 10%, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos y tinciones de hematoxilina eosina, tricrómica de Masson (para fibras colágenas), las preparaciones fue--

ron vistas con luz ultravioleta (para detección de zonas de formación de hueso nuevo).

El examen macroscópico fué realizado semanalmente valorando la consistencia de los injertos colgajos compuestos con excepción de un caso en el que a la tercera semana de la intervención desapareció, todos los colgajos en estudio mostraron un volumen constante sin variaciones ostensibles.

Al momento de la toma de los injertos colgajos compuestos, en todos los casos no se encontraron adherencias significativas ni dificultad para obtener los especímenes. La forma de todos fué irregular y su consistencia dura semejante a la del cartilago y el hueso.

En la evaluación que se efectuó con la lámpara de luz ultravioleta se apreció distribución difusa de la fluorescencia en todos los especímenes demostrada por un color amarillo dorado brillante.

La valoración del crecimiento de los injertos colgajos compuestos se comparó tomando en cuenta los siguientes paráme---

tros: la medida del cilindro en cuanto al diámetro y longitud del mismo, el límite que se tomó en cuenta fué el periostio y en la medición postoperatoria se midieron los mismos parámetros desde el punto de vista tomográfico, en éste caso el límite tomado fué la zona que mostró más hiperdensidad. El promedio preoperatorio de los cilindros medidos fué de  $7.25 \text{ cm}^3$  y el de los postoperatorios fué de  $14.33 \text{ cm}^3$ .

La evaluación radiológica demostró en las radiografías simples, especímenes irregulares de forma ovoide radio opacos, - con bordes bien definidos y múltiples zonas en su interior de radio opacidad variable.

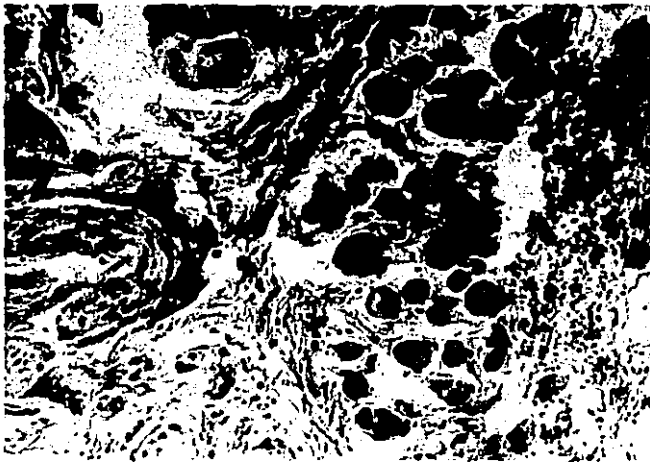
Los cortes tomográficos de todos los especímenes mostraron límites hiperdensos bien definidos de contenido irregular con zonas alternas hiperdensas e hipodensas que en la densimetría manifestaron tejidos cuyo coeficiente de absorción fué variable de -52 a +50 unidades Hounsfield. Lo que permite concluir la existencia de tejido graso (zona de hipodensidad) -- hasta tejido óseo hipocalcificado (zona hiperdensa) .

Secuencia histológica de la inducción ósea y muscular.

Los primeros depósitos de hueso fueron observados la semana trece. En el espécimen examinado se encontraron histiocitos, células plasmáticas, linfocitos pequeños y células multinucleadas semejantes a las observadas en la reacción inflamatoria y en la reacción granulomatosa. Así mismo fué manifiesta la gran cantidad de vasos capilares de neoformación. En la periferia se observó tejido calificado como mixoide, matriz osteoide, hueso calcificado y médula ósea hematopoyética. El tejido muscular estriado y liso se observaron en cantidad importante. Las características de todas las células y el patrón de crecimiento fué normal. (Fig. 1)

El espécimen que tenía catorce semanas mostró un manguito circular, por fuera del cual fué vista gran cantidad de músculo liso y tejido conectivo laxo. En la parte central del manguito había gran cantidad de espículas óseas, hueso de neoformación rodeado de vasos capilares de nueva formación y una capa de células mesenquimatosas, la médula ósea hematopoyética también fué observada en este caso. Circundando algunos cuerpos calcáreos se pudo apreciar reacción granulomatosa. El patrón y características celulares fueron normales. (Fig. 2)

Las observaciones histológicas a las quince semanas; las células



**FIG. 1** 13 semanas de evolución. Fibras musculares estriadas, nótese los núcleos periféricos de la célula multinucleada de la fibra muscular. Fibra nerviosa en extremo izquierdo central.

H. E. 560 X neg.



FIG. 2 14 semanas de evolución. Panorámica donde se aprecia cápsula de tejido conjuntivo, músculo liso. En la parte inferior se observa tejido -- adiposo con numerosos vasos de mediano cali-- bre.

H-E 60 X neg.

las mesenquimatosas fueron abundantes, así como, la neoformación vascular, en la periferia se observó osteoide y hueso en este caso no se observó médula ósea, la parte central del espécimen tenía tejido graso abundante, el patrón celular fue normal. (Fig. 3)

A las dieciséis semanas de evolución el espécimen estudiado - mostró las características siguientes, la forma de manguito - fue apreciada también dentro del cual había tejido conjuntivo graso en gran cantidad, osteoide, zonas de hueso maduro y con ductos de Havers fueron observados, el tejido celular liso y estriado también fue evidente en este espécimen, el patrón ce lular y de crecimiento fue normal. (Fig. 4)

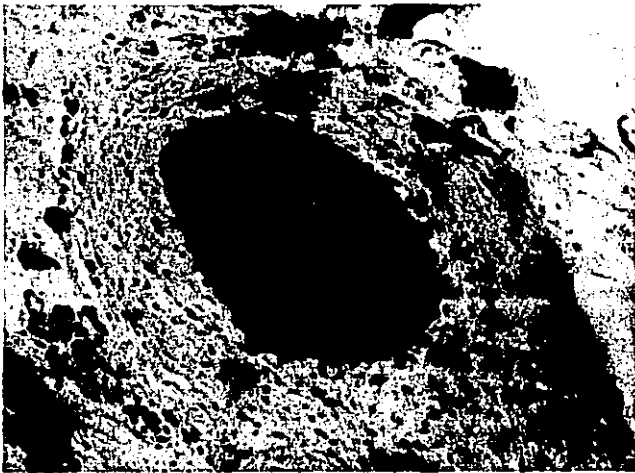
Las características microscópicas del espécimen de diecisiete semanas fueron: el tejido graso tenía predominio en el centro del manguito, en la periferia el tejido mesenquimatoso fue abundante, rodeó al osteoide y a las espículas óseas; fueron - observados además conductos de Havers con calcificaciones. En este caso fue aparente la reacción de cuerpo extraño con - histiocitos y macrófagos. El patrón celular observado fue -- también normal.



**FIG. 3** 15 semanas de evolución. Trabeculas óseas maduras ( en negro ), incluida en un haz de tejido conjuntivo rodeado de tejido célula adiposo.

H-E 560 C neg.





**FIG. 4** 16 semanas. Sistema haversiano bien calcificado en el que se aprecia en la parte central el conducto de Havers y su vaso central.

H-E 560 X neg.

Osteoide y médula ósea en gran cantidad fueron los tejidos -- que predominaron en la periferia del espécimen de diecinueve semanas de evolución. El músculo liso y estriado también se observó en el estudio histológico. En este caso el patrón ce lular una vez más fué normal. (Fig. 5)

A las veinte semanas se observó reacción inflamatoria y granu lomatososa de cuerpo extraño con abundancia de histiocitos. Te jido mixoide abundante en la periferia fué observado con os-- teoide, hueso calcificado y médula ósea hematopoyética abun-- dante tenia el espécimen. El músculo liso fué observado tam-- bién. El patrón celular y de crecimiento como en todos los - casos anteriormente descritos fué normal. (Fig. 6)

El examen macroscópico con luz ultravioleta mostró en todos - los especímenes la aparición de zonas dispersas de coloración intensa de fluorescencia amarillo dorado.

El examen microscópico de las laminillas con luz ultravioleta mostró en todos los casos examinados la aparición de la fluo- rescencia amarillo dorada intensa en las zonas donde existía neoformación vascular y osteoide.



**FIG. 5** 19 semanas de evolución. Islote de médula ósea  
en las vecindades de material osteoide.

H-E 560 X neg.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

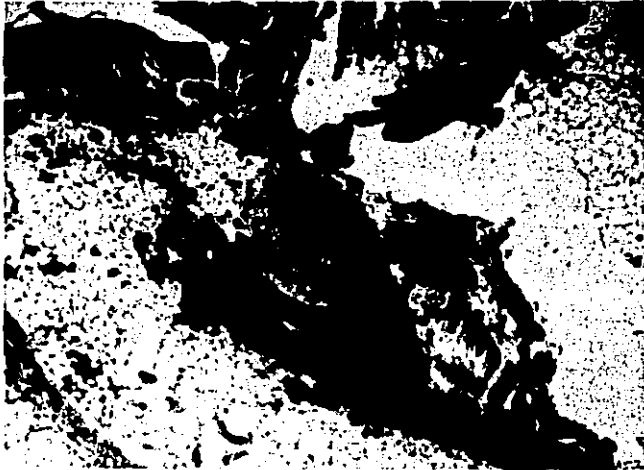


FIG. 6 20 semanas de evolución. Rodeado de tejido cé-  
lulo adiposo se aprecia en la parte central tejido  
osteóide de neoformación y en la periferia célu-  
las mononucleares.

H-E 560 X neg.

## DISCUSION

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 habfan demostrado producir hueso. Los resultados logrados en este trabajo permiten concluir que la potencia del periostio no solo se limita a formar hueso sino también médula ósea, músculo liso y músculo estriado.

Las dos variedades de la diferenciación de los organismos multicelulares fueron expresadas; la primera en la que hubo desarrollo de células fenotípicamente diferentes a partir de un precursor común, la llamada propiamente diferenciación celular, y la segunda que fué la conjugación de células y sus productos para formar tejidos y órganos distintos, la llamada morfogénesis ó diferenciación tisular.

De las características de la diferenciación celular la expresión fenotípica fué modificada ya que el genoma que habitualmente permanece inactivo se expresó y de esta manera fué posible obtener de células ya diferenciadas una línea celular y tisular diferente, en otras palabras las condiciones se hicieron

ron óptimas para la expresión del cambio en el comportamiento celular.(3,5,6,7,8)

La diferenciación celular que se obtuvo en este trabajo se -- puede atribuir al efecto fisicoquímico que fué establecido entre el periostio y el epiplón mayor, este mecanismo se puede considerar como inducción.

Tomando en cuenta que las células del periostio están en diferentes etapas funcionales como propuso Young (29), las células pudieron revertir de un estado a otro su función cuando - el microambiente celular fué propicio, por lo tanto el osteoprogenitor fué capaz de diferenciarse en osteoblasto y osteoclasto de acuerdo a las condiciones ambientales y éstas influyeron en la diferenciación celular.(15,17,20,22)

Es posible suponer que una vez que el sistema de inducción ósea fué establecido en este trabajo, una capa de células inducidas puede convertirse en inductor celular de la capa siguiente de células. La inducción ocurrió en dos direcciones, una que produjo osteoide propiamente dicho y otra donde se obtuvo médula ósea, así el sistema de inducción ósea se considera

ró un mecanismo de organogénesis al desarrollarse un osículo con médula ósea.(4,8,25,26,27,28)

Queda como pregunta de este trabajo si el osteoprogenitor partió de células pre existentes de hueso en el periotio ó si -- fueron células migratorias del mesenquima las que dieron origen al tejido. Otro posible origen de las células osteoprogenitoras podría ser atribuido a las células endoteliales de -- los capilares y vasos sanguíneos que en gran cantidad fueron aportados por el epiplón al injerto colgajo compuesto del modelo experimental de este trabajo.(2,18)

Las condiciones del microambiente celular del modelo permitieron que se llevaran a cabo los procesos de autoinducción, modulación y organogénesis del hueso (médula ósea), del músculo liso y estriado.

Las células de la porción interna del periostio el llamado -- cambium, en las condiciones ambientales creadas en el modelo experimental de este trabajo probablemente iniciaron la síntesis de ADN y proliferaron. Este hecho fué demostrado por --- Tonna (23) al marcar las células con timidina tritiada.

Este mismo fenómeno ocurrió en el periostio al tener íntimo - contacto con las células endoteliales de los capilares y vasos sanguíneos del epiplón. De esta manera la expresión de los tejidos óseo, médula ósea, muscular liso y estriado se hizo manifiesta.

El proceso se considera como autoinducción por la influencia que tuvieron los tejidos conjugados de factores extrínsecos a las células.

El término Modulación se aplica al modelo de este trabajo por que se demostró que en las condiciones ambientales modificadas de los tejidos involucrados fue posible cambiar la potencia celular al obtener el periostio hueso, médula ósea, músculo liso y músculo estriado.

Se hace énfasis en el hecho de que además de haber obtenido - hueso, se obtuvo médula ósea, músculo liso y músculo estriado, de estos tres últimos tejidos también no se había reportado su histogénesis a partir de periostio.

Podemos concluir con este trabajo que se abre una nueva posi-



bilidad para el estudio de la diferenciación celular y de la organogénesis del tejido óseo y muscular. Los resultados que se obtengan de estos estudios permitirán conocer en el futuro con más objetividad la biología de los procesos celulares de la diferenciación y su posible aplicación en el campo del --- trasplante de órganos y tejidos.

**BIBLIOGRAFIA:**

- 1.- ASHTON, B.A., ALLEN, T.D., HOWLETT, C.R., EAGLESO, C.C., HATTORI, A., and OWEN, M. : Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. Clin. Orthop 151:294, 1980.
- 2.- BURINGG, K : On the origin of cells in heterotopic bone formation. Clin. Orthop. 110:293, 1975.
- 3.- FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHJAN, R.K., LATSINK, N.V., PANASYUK, A.F. and KEILISS-BOREK, I.V. : Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissue. Transplantation 17:331, 1974.
- 4.- FRIEDENSTEIN, A.J. : Precursor cells of mechanocytes. Int. Rev. Cytol. 47:327, 1976.
- 5.- HALL, B. : Cellular differentiation in skeletal tissue Biol. Rev. 45:455, 1970.
- 6.- HALL, B.K. : Histogenesis and morphogenesis of bone Clin. Orthop. 74:249, 1971.

- 7.- HAM, A.W. and CORMACK, D.H. : Histopathology of cartilage, bone and joints. Philadelphia and Toronto, J.B. Lippincott, 1979 : 390
- 8.- JACOBSON, A.G. : Inductive processes in embryonic development, Science 152:2534, 1966.
- 9.- KEITH, A.K. : Menders of the maimed. Oxford Univ. Press London and New York, 1919.
- 10.- LACROIX, P. : L'Organisation des Os. Paris, Masson et Cie. 1949.
- 11.- LERICHE, R. and POLICARD, A. : The normal and pathological physiology of bone. Hosby, St. Louis. 1928.
- 12.- LINDHOLM, I.S. and URIST, M.R. : A quantitative analysis of new bone formation by induction in composite grafts of bone marrow bone and bone matrix. Clin. Orthop. 150: 254, 1960.
- 13.- MILCH, R.A., RALL, D.P. and TOBIE, J.E.: Bone localization of the tetracyclines. J. Nat. Cancer Inst. 19, 87-93, 1957

- 14.- MILCH, R.A., RALL, D.O. and TOBIE, J.E. : Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. J. Bone Joint Surg. 40A 897-910, 1958.
- 15.- NOGAMI, H. and URIST, M.R.: Explants, transplants and implants of a cartilage and bone morphogenetic matrix. Clin. Orthop. 102:235, 1974.
- 16.- OLLIER, L. : Traité expérimental et clinique de la régénération des os et la production artificielle du tissu osseux. Vol. 1 Masson & Fils, Paris. 1867.
- 17.- OSTRUP, LT. and FREDRICKSON, J.M. : Distant transfer of a free living bone graft by microvascular anastomosis. An experimental study. Plast. and Reconstr Surg. 54:274, 1974
- 18.- OWEN, M. : Histogenesis of bone cells. Calcif. Tiss. Res. 25:205, 1978.
- 19.- RITSILA V., ALHOPURO, S., RINTALA, A. : Bone formation with free periosteum. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 6:51,1972

- 20.- RITSILA, V., ALHOPURO, S., GYLLING, U. and RINTALA, A. :  
The use of free periosteum for bone formation in congenital  
clefts of the maxilla. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.  
6:57, 1972
- 21.- 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.
- 22.- TERASHIMA, Y., and URIST, M.R. : Differentiation of carti-  
lage from clavarial bone under the influence of bone matrix  
in citro. Clin. Orthop. 113: 168, 1975.
- 23.- TONNA, E.A., and CRONKITE, E.P. : Cellular response to -  
fracture studied with tritiated thymidine. J. Bone Joint  
Surg. 43 A: 352-362, 1961.
- 24.- URIST, M.R. and 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, 1952.
- 25.- URIST, M.R. : Bone formation by autoinduction. Science -  
150: 893-898, 1965.

- 26.- VON DER MARK, K. and CONRAD, G. : Cartilage cell differentiation. Clin. Orthop. 139:185, 1979.
- 27.- WEISS, P.: Perspectives in the field of morphogenesis. Quart. Rev. Biol. 25 : 177-193, 1950.
- 28.- WEISS, P. : From cell to molecule in the molecular control of cellular activity. J.M. Allen (Ed) New York, McGraw Hill 1962.
- 29.- YOUNG, M.H. : 'The repair of experimental defects in rabbit skulls. J. Bone Joint Surg. 46A : 326-335, 1964.