

## Descripción histológica de la regeneración ósea en conejos implantados con hueso de bovino liofilizado (NUKBONE®)

Aline Domínguez Alonso y M. en C. Claudia Karina Torres Villaseñor

Universidad Simón Bolívar

### Resumen

*El tejido óseo es rígido y resistente, sin embargo, puede sufrir fracturas y fisuras causadas por accidentes y enfermedades. Actualmente, los tratamientos para fracturas se basan en la regeneración ósea utilizando injertos que promuevan mecanismos de osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción para reemplazar osteocitos y matriz extracelular perdidas hasta formar hueso nuevo. Con base en lo anterior, el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM; creó el biomaterial Nukbone®, un xenoinjerto libre de materia orgánica con la finalidad de utilizarlo para la reconstitución ósea. Se evaluó histológicamente la respuesta del tejido óseo al Nukbone®; trabajando con conejos implantados en la cresta iliaca, del lado derecho Nukbone®, y del lado izquierdo se realizó una perforación como control; a los tiempos de 1, 2 y 5 semanas, al término de los cuales se sacrificaron los conejos y se disectó el hueso para procesarlo por la técnica histológica y teñirlos con H-E, Tricrómica de Gallego e impregnación argéntica. También se realizó la implantación de Nukbone® al tiempo de 5 semanas a nivel muscular, y se aplicó el mismo proceso histológico. En hueso, se observó la invasión de células mesenquimatosas y osteoblastos en el implante, y la formación de trabéculas, así como la formación de una nueva matriz extracelular. Mientras que, en músculo se observó el inicio de la formación de hueso nuevo a partir de células mesenquimatosas. Por lo anterior, podemos concluir que Nukbone® favorece la regeneración ósea. Sin embargo, es necesario trabajar con mayores tiempos para confirmar si el proceso es causado por osteoconducción y/o osteoinducción.*

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

### Abstract

*Bone tissue is rigid and resistant, and can suffer fractures and fissures caused by accidents and diseases. Lately, fracture treatments are based on bone regeneration using grafts that promote mechanisms of osteogenesis, osteoconduction and osteoinduction to replace lost osteocytes and extracellular matrix forming new bone. Based on the above mentioned method, the Institute of Investigation on Materials of the UNAM created a biomaterial called Nukbone®, a graft free of organic material, with the purpose of using it for bone regeneration. The present article evaluated the histological response of the bone tissue to Nukbone®. It was implanted on the right iliac crest of rabbits, and the left iliac crest was perforated for control. Rabbits were sacrificed and dissected to obtain the hip bone by weeks 1, 2 and 5. Bones were stained with H-E, Gallego's trichromic stain and argentic impregnation. Nukbone® was also implanted in muscular tissue on the 5th week, and it was processed with the same technique. Mesenchymal cells and osteoblast invasion in the graft were observed in bone tissue. The formation of trabecula bone and a new extracellular matrix formation were also observed. Furthermore, the beginning of a new bone formation from mesenchymal cells was also observed. Because of this evidence, it can be concluded, that Nukbone® allows bone regeneration, although it is necessary to analyze longer terms to confirm if it is an osteoconduction and/or osteoinduction process.*

**Key words:** histology, bone regeneration, Nukbone® graft.

## Introducción

El tejido óseo se caracteriza por su rigidez y resistencia. También posee cierta elasticidad al ser una forma de tejido conectivo denso especializado. Estas características le permiten desarrollar dos importantes funciones: una es como sostén y la segunda es la homeostasis de calcio, ya que los huesos contienen más del 99% del calcio del cuerpo (Geneser, 2000).

Macroscópicamente, existen dos tipos de tejido óseo: esponjoso y compacto. Ambos se encuentran rodeados por dos capas de tejido conectivo: la interna o endosito que recubre el espacio medular y los espacios del hueso esponjoso, y la externa o periostio que recubre a todo el hueso (Geneser, 2000).

Microscópicamente se encuentra formado por la matriz ósea compuesta por una porción orgánica formada por fibras de colágena, agua, proteínas séricas, electrolitos, osteocalcina, osteonectina, osteopontina y una parte inorgánica que se forma por cristales de hidroxapatita, en relación estrecha con las fibras de colágeno, así como por otros minerales como magnesio, sodio, potasio, carbonato y citrato. Por otro lado, en esta matriz se encuentran las células óseas de diferentes tipos, como las osteoprogenitoras y los osteoblastos, que son células formadoras de hueso; los osteocitos, cuya función más importante es sintetizar y reabsorber componentes de la matriz ósea, pero pueden presentar dos destinos posibles: ser osteocitos o formar parte de las células de revestimiento óseo. Por último, están los osteoclastos que son células especializadas en la remodelación del tejido óseo.

Todos los componentes del hueso antes mencionados poseen una organización histológica, formando conductos y sistemas donde se distribuyen los osteocitos. El hueso compacto se organiza en láminas con osteocitos que se comunican a través de canalículos para intercambiar diversas sustancias. Las láminas se organizan en forma concéntrica alrededor de los conductos de Havers formando osteonas y, a su vez, estos conductos de Havers se comunican por conductos de Volkmann. En cambio, el tejido óseo esponjoso se compone por láminas paralelas y osteonas trabe-

culares, sin la presencia de conductos de Havers ni de Volkmann (Geneser, 2000).

A pesar de lo antes mencionado y de las eficientes características de este tejido, es factible a alteraciones como fracturas y fisuras producidas por diversas causas como accidentes, golpes y enfermedades óseas. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 1995) asegura que las fracturas son el sexto lugar de ingreso hospitalario con 3.2 % de casos, y afirma que la osteoporosis, al ser el segundo problema de salud pública, ocasiona cada 30 segundos una fractura en todo el mundo. De esta manera se invierten alrededor de 730 millones de dólares para atender 36 mil 500 fracturas de fémur, cadera, antebrazo y vértebras. Todo esto es ocasionado porque la masa ósea está completamente formada a los 30 años, misma edad a la que ésta empieza a decaer es entre 1-4%, mayor en mujeres que en hombres a causa de los procesos hormonales.

Los tratamientos aplicados a fracturas son placas y tornillos que fijan el hueso hasta soldar, en su mayoría elaborados de materiales ajenos a la composición del hueso. Es por esto que cada día se elaboran materiales nuevos para obtener mejores resultados en el estudio del proceso de regeneración que consiste en reemplazar con células de la misma estirpe el tejido desaparecido mediante mecanismos de osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción, para realizar una serie de procesos de angiogénesis, migración, proliferación de células indiferenciadas, diferenciación a osteoblastos, producción de osteoides, mineralización y remodelación (Reddi, et al., 1977). Esta regeneración del tejido óseo ha potenciado el incremento de sustitutos y materiales de implante (Valle, et al., 2000).

## Objetivo

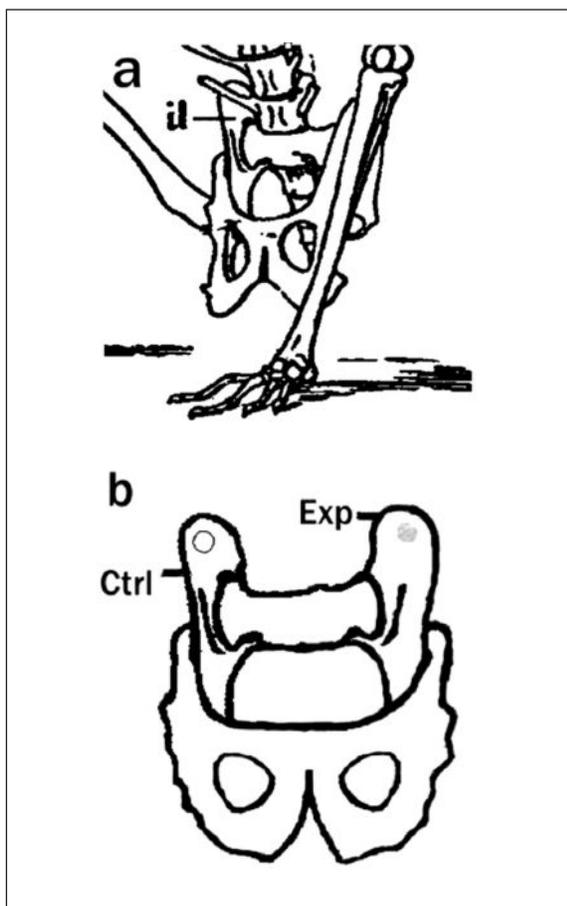
Describir y comparar histológicamente la regeneración del tejido óseo de la cresta iliaca de conejo con y sin xenoinjerto Nukbone® al tiempo de 1, 2 y 5 semanas.

Describir e identificar la formación de hueso en tejido muscular con el xenoinjerto Nukbone® a las 5 semanas después del implante.

## Método

Se utilizaron 28 conejos machos de la raza Nueva Zelanda, con un peso de 2.5 a 3.5 Kg.; estos se dividieron en forma aleatoria en 3 grupos con cuatro conejos cada uno, para los tiempos de evaluación a 1, 2 y 5 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 (figura 1a), 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 1b), en la cual se implantó el xenoinjerto Nukbone® de hueso de bovino liofilizado de forma cilíndrica, mientras que la cresta iliaca izquierda fue control (figura 1b), en donde la perforación no tuvo ningún tratamiento para la regeneración ósea.

Figura 1. Descripción ósea del conejo



a) Localización general de la cresta iliaca de conejo (il). b) Cresta iliaca control (sin injerto; Ctrl) y Cresta iliaca experimental (con Nukbone®; Exp).

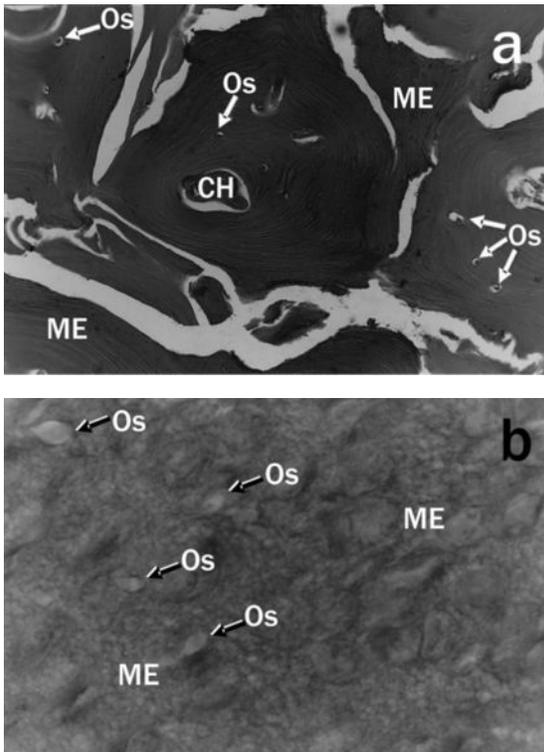
Todos los procedimientos de manejo, anestesia y cirugía se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana relacionada con los animales de laboratorio. De esta manera, se sacrificaron los conejos con una dosis de 60 mg/kg de pentobarbital sódico a las 1, 2 y 5 semanas. Las muestras de las crestas iliacas 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, en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Simón Bolívar, las muestras fijadas fueron lavadas con agua corriente y se descalcificaron con ácido nítrico al 15%, a temperatura ambiente y durante un periodo de 5 a 21 días dependiendo del tamaño de la muestra. A continuación, se lavaron con agua corriente, se deshidrataron con alcoholes graduales y fueron aclaradas con xilol para ser incluidas en parafina con un punto de fusión de 54 °C. Después se realizaron cortes utilizando el microtomo por rotación con un grosor de 7 µm y se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina (H-E), Nitrato de Plata (N.P.) y Tricrómica de Gallego (T.G.) (Aguilar, et al., 1996). Por último, se observaron al microscopio óptico para determinar el proceso celular durante la regeneración ósea.

## Resultados

La cresta iliaca de cadera de conejo se encuentra formada por hueso compacto (figura 2a) y hueso esponjoso (figura 2b). El primero muestra una formación de láminas con osteocitos organizados en un acomodo concéntrico alrededor del conducto de Havers, mientras que el hueso esponjoso se dispone en trabéculas formadas por osteocitos y una matriz extracelular de láminas paralelas.

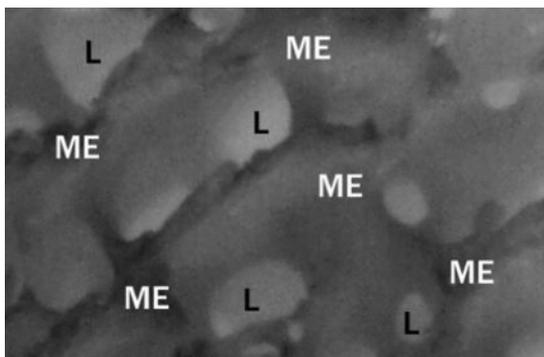
**Figura 2.** Estructura de la cresta iliaca



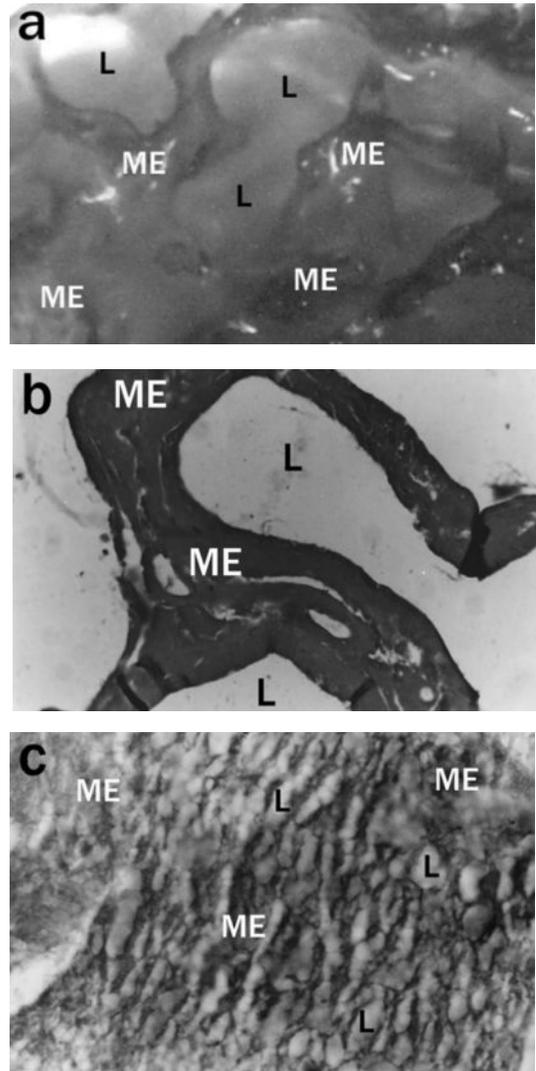
a) Hueso compacto, se observaron osteocitos (Os), el conducto de Havers (CH) y la matriz extracelular (ME) con un acomodo concéntrico de láminas. H-E, 100x. b) Hueso esponjoso, se observaron osteocitos (Os) y la matriz extracelular con láminas paralelas (ME). H-E, 400x.

El Nukbone® consiste de una matriz extracelular inorgánica formando una red, la cual se observa tanto en hueso calcificado (figura 3) como en descalcificado (figura 4a, b y c).

**Figura 3.** Nukbone® calcificado. Vista macroscópica, en la cual se distinguen luces (L) rodeadas por matriz extracelular (ME). Azul de metileno, 60x.



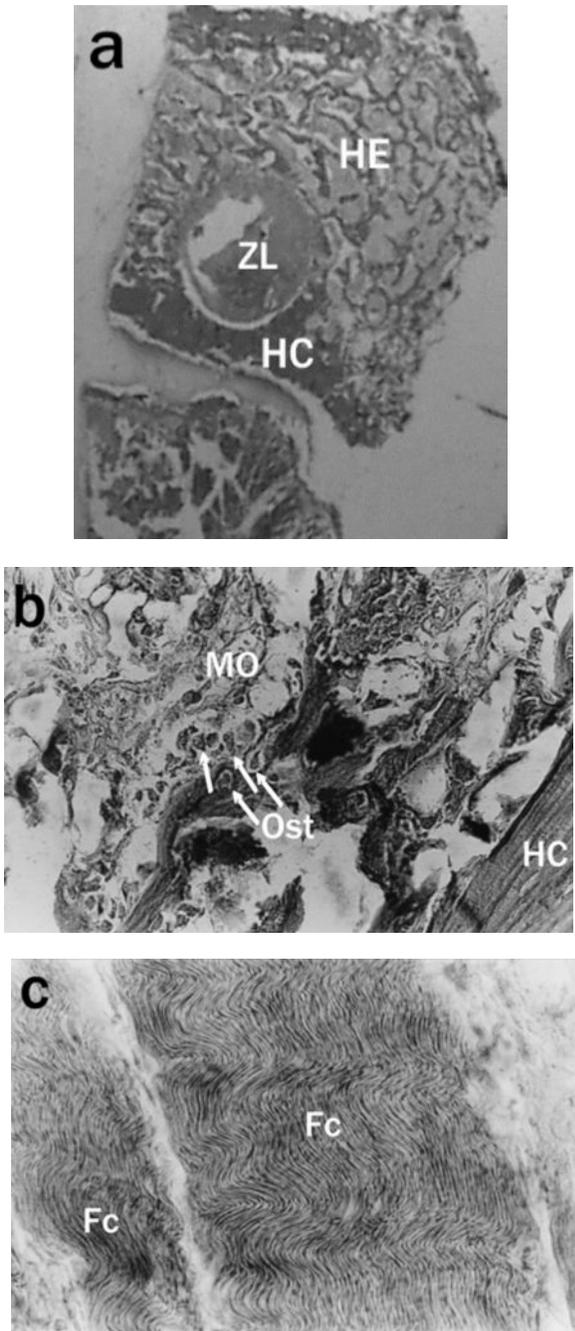
**Figura 4.** Nukbone® descalcificado



Vista panorámica: (a) Azul de metileno, 60x. (b) H-E, 400x y (c) H-E, 1000x, en donde se observan luces (L) rodeadas de matriz extracelular inorgánica (ME).

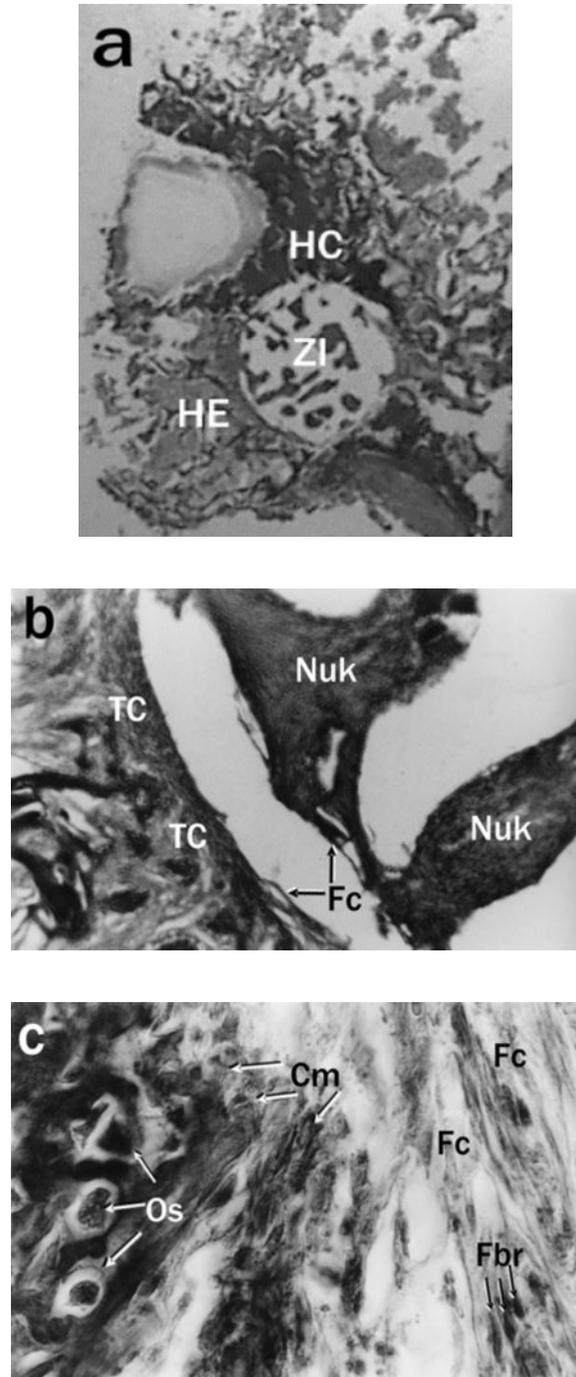
La invasión de tejido durante la primera semana de regeneración ósea es diferente para ambos grupos. En la muestra control (sin Nukbone®; figura 5a) existe una invasión de tejido conectivo laxo producido por los osteoblastos del hueso compacto adyacente (figura 5b). El tejido conectivo laxo se transforma a conectivo denso regular para la formación de trabéculas (figura 5c). Mientras tanto, en la muestra experimental (con Nukbone®; figura 6a) se observa el injerto unido al tejido conectivo adyacente; y también existe una invasión de fibras de colágena (figura 6b) en las cuales están presentes fibroblastos, células mesenquimatosas y osteocitos sobre el xenoinjerto (figura 6c). Alrededor de esta zona se observan eritrocitos extravasados.

Figura 5. Zona lacerada



a) Vista panorámica de la zona lacerada (ZL) que se encuentra rodeada de hueso esponjoso (HE) y hueso compacto (HC). H-E, 10x. b) Se observa una parte de hueso compacto (HC) donde los osteoblastos (Ost) están produciendo matriz orgánica (MO). H-E, 400x. c) Producción de fibras de colágena (Fc). H-E, 1000x.

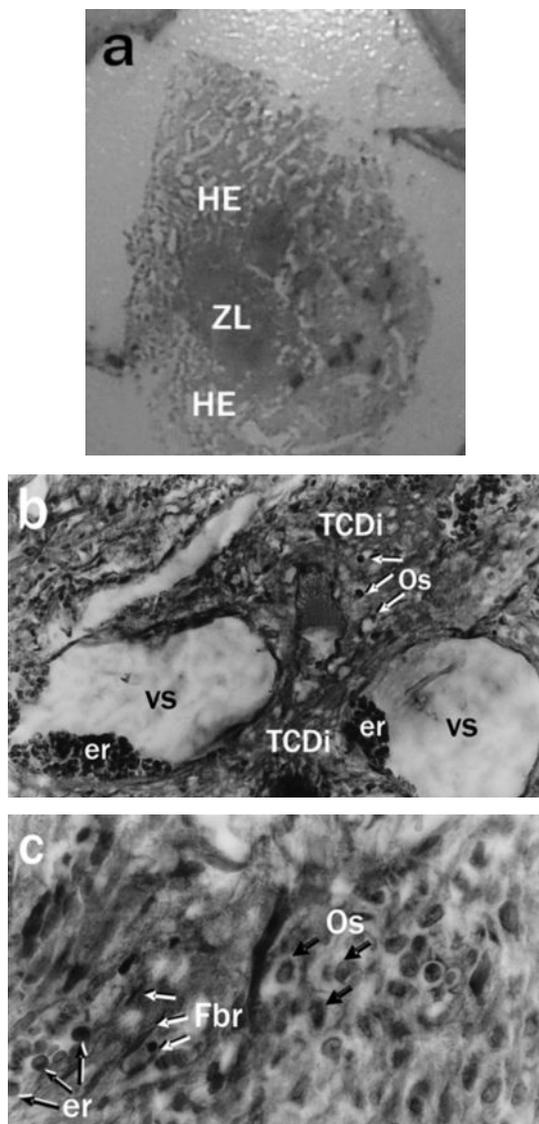
Figura 6. Zona de implantes



a) Vista panorámica de la localización de la zona de implante (ZI) que se encuentra rodeada de hueso esponjoso (HE) y hueso compacto (HC). H-E, 10x. b) Nukbone® (Nuk) unido al tejido conjuntivo adyacente (TC) por fibras de colágena (Fc). H-E, 100x. c) Nukbone® invadido por fibroblastos (Fbr), células mesenquimáticas (Cm), osteocitos (Os) y fibras de colágena (Fc). H-E, 400x.

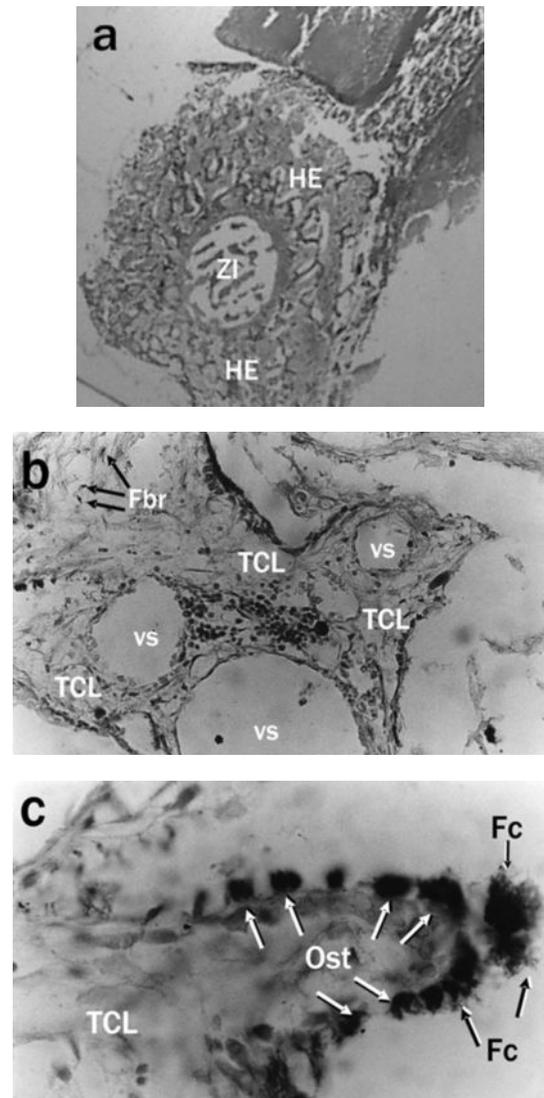
A las 2 semanas de regeneración ósea, en el control (Figura 7a) se observó la invasión de tejido en la zona lacerada que consiste en trabéculas compactas de tejido conectivo denso irregular sobre las que se observan osteocitos y vasos sanguíneos (Figura 7b y c). Mientras tanto, con el Nukbone® (Figura 8a) se observó la formación de trabéculas de tejido conectivo laxo con vasos sanguíneos, fibroblastos y células mesenquimatosas (Figura 8b). También se observa la migración de osteoblastos activos para la producción de fibras de colágena (Figura 8c).

Figura 7. Regeneración ósea



a) Vista panorámica de la zona lacerada (ZL) rodeada de hueso esponjoso (HE). H-E, 10x. b) Trabécula de tejido conectivo denso irregular (TCDi) y vasos sanguíneos (vs). H-E, 400x. c) Acercamiento de trabécula donde se observan osteocitos (Os), fibroblastos (Fbr) y eritrocitos (er); H-E, 1000x.

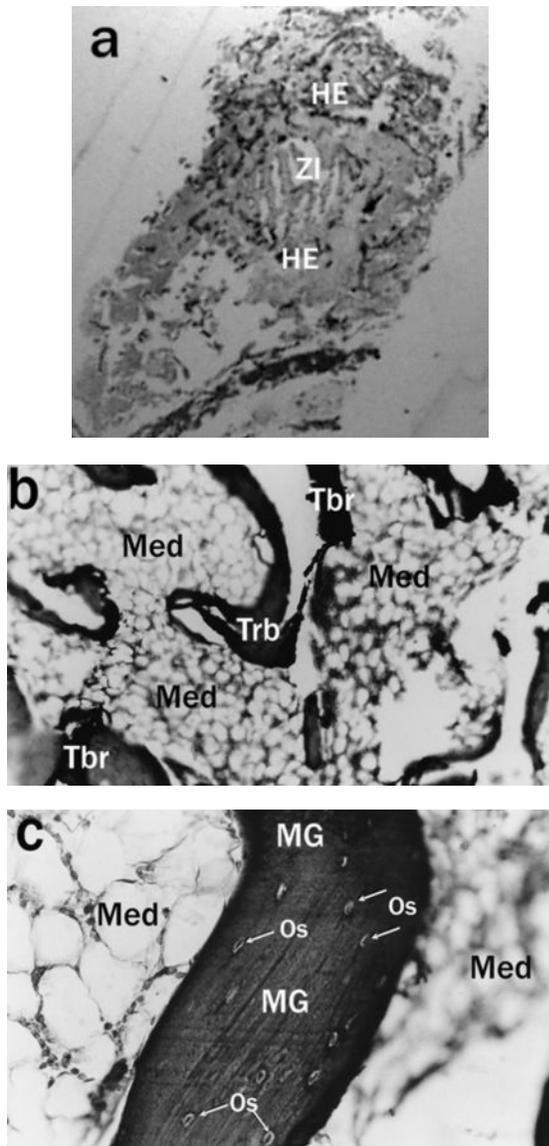
Figura 8. Producción de fibras de colágeno



a) Vista panorámica de la zona de implante (ZI) rodeada de hueso esponjoso (HE). H-E, 10x. b) Trabéculas de tejido conectivo laxo (TCL) y presencia de vasos sanguíneos (vs) y fibroblastos (Fbr); N.P, 400x. c) Migración de osteoblastos (Ost) y producción de fibras de colágena (Fc); N.P, 1000x.

A las 5 semanas, en los cortes de implante en hueso con Nukbone® (Figura 9a), las trabéculas empiezan a compactarse y existe presencia de médula entre éstas (Figura 9b). En esta etapa de la regeneración, las trabéculas poseen una matriz granular con osteocitos. (Figura 9c).

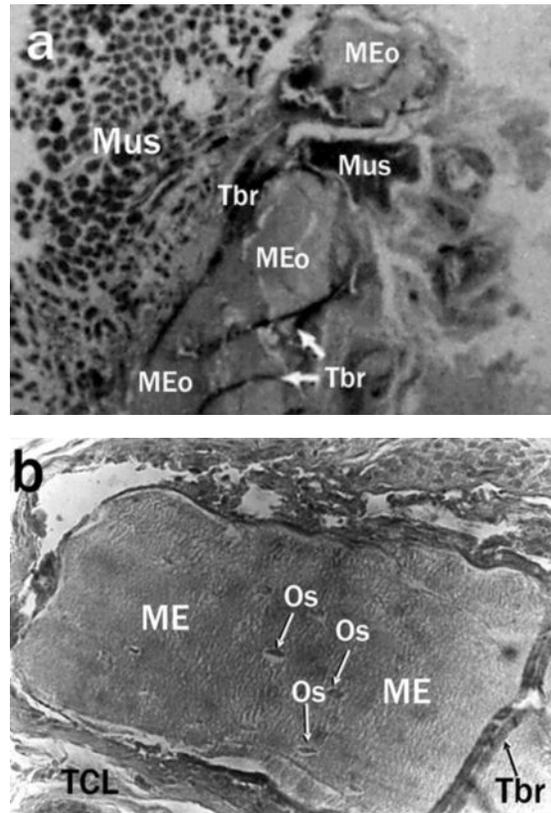
Figura 9. Regeneración en cortes de implante



a) Vista panorámica de la zona de implante (ZI) rodeada de hueso esponjoso (HE). H-E, 10x. b) Trabéculas (Tbr) rodeadas de médula (Med). H-E, 400x. c) Trabécula con una matriz compacta y granular (MG) y osteocitos (Os). H-E, 1000x.

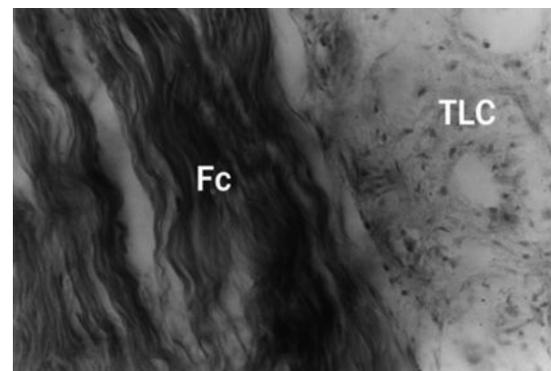
En el tejido muscular con Nukbone® a las 5 semanas de regeneración, se presenta una osteoinducción por parte del injerto (Figura 10a), que consiste en: una compartimentalización por medio la formación de trabéculas (Figura 10b), proliferación de fibras de colágena (Figura 11), migración de células mesenquimatosas (Figura 12), producción de matriz inorgánica y, por último, diferenciación a tejido óseo compacto (Figura 13).

Figura 10. Osteoinducción en injerto



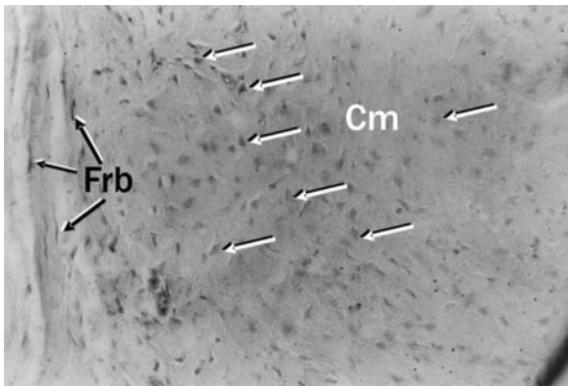
a) Vista panorámica de la compartimentalización del músculo (Mus) donde se observa la formación de trabéculas (Tbr) y la presencia de matriz extracelular ósea (MEo); H-E, 10x. b) Se observa la formación de matriz extracelular (ME) y de trabéculas (Trb), y de la misma forma se observa la diferenciación de algunas células mesenquimatosas a osteocitos (Os). H-E, 400x.

Figura 11. Proliferación de fibras de colágena

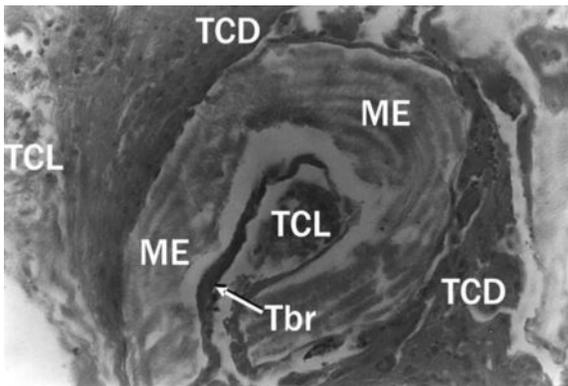


se puede observar que estas fibras de colágena (Fc) son producidas por el tejido conectivo laxo (TCL). T.G., 400x.

**Figura 12.** Migración de células mesenquimatosas y fibroblastos H-E, 1000x



**Figura 13.** Diferenciación de tejido óseo compacto



Se observa la organización en sistemas llamados osteonas. Se observan trabéculas (Trb), la matriz extracelular (ME), tejido conectivo laxo (TCL) y denso (TCD). T.G., 400x.

## Discusión

El xenoinjerto de hueso de bovino liofilizado (Nukbone®) se constituye de una matriz extracelular libre de materia orgánica al carecer de células. Esta matriz forma una red que puede favorecer osteoconducción y/o osteoinducción por células del tejido óseo y tejido muscular. Resultados similares obtuvieron Thorwarth y colaboradores (2006) con el material BioOss® que es una hidroxiapatita porosa elaborada a partir del componente inorgánico de hueso de bovino seguido de un tratamiento químico con hidróxido de sodio donde se demostraron las propiedades osteoconductoras de éste. La diferencia entre estos dos materiales, es que Nukbone® no ha sido tratado químicamente.

En el hueso iliaco de conejo, la perforación elaborada para la zona de implante y la zona lacerada abar-

có hueso esponjoso y hueso compacto. Se observó que la regeneración se inicia con hueso esponjoso. Sin embargo, en el hueso control se presenta una invasión de tejido conectivo laxo abarcando toda el área de forma homogénea, mientras que en el Nukbone® se observa la formación de trabéculas a partir de la estructura del injerto, con invasión de tejido conectivo laxo y de osteoblastos, y entre estas trabéculas quedan espacios, los cuales podrán ser colonizados por la médula ósea. Este proceso de la formación de trabéculas inmaduras y de la invasión de tejido conectivo ha sido descrito por Thorwarth y colaboradores (2006) y por Meijndert y colaboradores (2005) en investigaciones de implantes con el biomaterial BioOss®.

El proceso de regeneración en el control se inicia a la semana, con tejido laxo rodeando paquetes de fibras de colágena. Este tejido es previo a la formación de la matriz orgánica del hueso. En cambio, con Nukbone® las trabéculas se forman de tejido denso irregular con presencia de fibroblastos y células mesenquimatosas activas. La presencia de osteocitos puede derivarse de estas últimas o de osteoblastos.

Para la segunda semana, en el control la regeneración muestra la formación definida por trabéculas constituidas por tejido conectivo denso irregular con abundancia de osteocitos, que van invadiendo las trabéculas, y la presencia de vasos sanguíneos de diámetro mayor en esta zona y de menor diámetro hacia el interior de la zona lacerada. En contraste, con Nukbone® se observa la presencia de vasos sanguíneos de mayor diámetro en la zona del implante y continúa la presencia de fibroblastos y células mesenquimatosas además de osteoblastos.

A las quinta semana, con Nukbone® implantado en hueso, se observó una diferenciación de las células mesenquimatosas a osteocitos, los cuales comienzan a producir la matriz inorgánica que favorece la formación de lagunas rodeando al mismo. La deposición de carbonatos y fosfatos es incipiente, porque se observa una superficie granulosa. Resultados similares se han reportado con el biomaterial BioOss®. La diferencia son los tiempos, porque en Nukbone® la presencia de osteocitos es a las 5 semanas, mientras que en BioOss® a las 12 semanas (Thorwarth, et al.; 2006).

En cuanto a los efectos sobre el tejido muscular, a las 5 semanas se observó una osteoinducción con un pa-

trón similar al de hueso con Nukbone®. Se presenta una osteoinducción debido a que el Nukbone® promueve la formación de hueso nuevo a partir de una compartimentalización en el músculo por medio de trabéculas, y en estos compartimentos se promueve la formación de matriz orgánica e inorgánica debido a células mesenquimatosas de tejido conectivo laxo que se diferenciarán en osteocitos activos. Poco a poco, estos cambios originarán acomodados estructurales de forma concéntrica parecida a las osteonas en hueso.

Todo lo anterior nos indica que la regeneración con Nukbone® va un paso adelante del proceso de regeneración natural, debido a la calcificación de la matriz extracelular, la presencia de células precursoras de tejido óseo y de osteocitos, así como de la proliferación de médula ósea entre las trabéculas. Por otro lado, los resultados de los procesos celulares durante la regeneración ósea con Nukbone® son similares a los presentados a nivel subcutáneo con matriz extracelular de rata en la investigación realizada por Reddi y colaboradores (1977).

## Conclusión

El xenoinjerto Nukbone® favorece la regeneración del tejido óseo y la formación de hueso nuevo en tejido muscular al permitir la deposición de carbonatos y fosfatos para la calcificación de la matriz extracelular, así como por la presencia de osteocitos al tiempo de 5 semanas.

Por otro lado, Nukbone® va un paso adelante con respecto a la regeneración natural debido a la presencia de osteocitos sobre las trabéculas y por la colonización de médula ósea entre éstas. Sin embargo, es necesario analizarlo a mayores tiempos para observar el proceso de regeneración hasta la formación de ambos tipos de tejido óseo, cuestión que permita confirmar si el proceso es por osteoconducción y/o osteoinducción.

## Agradecimientos

\*Agradecemos al Dr. Fernando Villegas y al Dr. Benjamín León del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina UNAM, a la Dra. Cristina Piña Barba del Instituto de Investigaciones en

Materiales y a Biocriss S.A. de C.V por su asesoría y apoyo para la realización del presente trabajo. Este proyecto fue apoyado por el Proyecto IN101606 de la UNAM. 

## Referencias

- Aguilar, M., B. Coutiño, P. Salinas. (1996). *Manual general de técnicas histológicas e histoquímicas*. Las prensas de Ciencias UNAM.
- Geneser, F. (2000). *Histología*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 263-298.
- Meijndert L., G. M. Raghoobar, P. Schüpbach, H. J. A. Meijer, A. Vissink. (2005). *Bone quality at the implant site after reconstruction of a local defect of the maxillary anterior ridge with chin bone or deproteinised cancellous bovine bone*. Int. J. Oral Maxillofac. Surg, 34: 877-884.
- Organización Mundial de la Salud (1995). *Osteoporosis*. En: <http://www.oms.org>
- 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 (74): 5589-5592.
- Thorwarth, M., K.A. Schlegel, F. Wehrhan, S. Srour, S. Schultze-Mosgau. (2006). *Acceleration of de novo formation following application of autogenous bone particulated anorganic bovine material in vivo*. *Oral Surger Oral med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, (101): 309 -316.
- Valle, M., R. Crespo, V. García, C. González, B. Jiménez, T. Martínez. (2000). Aloinjertos óseos. *Acta Ortopédica Castellano-Manchega*. 59-62.