

146
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS
HISTOLOGICAS DEL TEJIDO OSEO DE MODELOS
ANIMALES EMPLEADOS EN PRUEBAS DE
BIOCOMPATIBILIDAD

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A :
SANDRA VEGA ROJAS

Vo. Bo.

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ANGEL ARAIZA TELLEZ
LABORATORIO DE BIOMATERIALES-JURIOQUILLA D.E.P.I.

ASESORES: DRA. SANTA PONCE BRAVO.
C.D. HUMBERTO ARENAS ALATORRE.

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27/2/99



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi Universidad, que me ha formado para ser una profesionista digna de decir, de donde vengo egresada.

UNAM, eres un privilegio; GRACIAS.

A mi Facultad, por que en el tiempo en el que estuve en sus aulas aprendí que lo más importante, es hacer bien las cosas, y lo demás con esfuerzo viene solo.

Facultad de Odontología de la UNAM; GRACIAS.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM, por permitir que en sus instalaciones, envidia de cualquier otra Institución, realizara esta investigación.

División de Estudios de Posgrado de Odontología, por tu apoyo; GRACIAS

Al Doctor, Miguel A. Araiza Téllez, quien me guió por todo este camino, invirtiendo minutos de su valioso tiempo, dando como resultado la presente investigación.

Doctor; GRACIAS.

A mis asesores por los conocimientos transmitidos a lo largo de esta investigación.

GRACIAS.

Por permitir que primero me realizara como mujer y después como Profesional; no dejándome sola en la vida.

DIOS, te debo todo; MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO.....	19
MATERIALES Y MÉTODO	
Tipo de estudio.....	20
Universo de trabajo.....	20
Muestra.....	20
Identificación y definición de variable.....	20
Material.....	21
Técnicas de caracterización (proceso histológico).....	21
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	página
1. Células constituyentes del tejido óseo.....	5
2. Preparación de las muestras (cortes).....	22

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía	página
1. Corte histológico de fémur humano.....	25
2. Corte histológico de hueso compacto humano.....	26
3. Corte histológico de hueso de perro.....	27
4. Corte histológico de la cabeza de fémur de conejo.....	28
5. Corte histológico de diáfisis de conejo.....	29
6. Corte histológico de fémur de cobayo.....	31
7. Corte histológico de cabeza de fémur de rata.....	32
8. Extremo distal de fémur de rata.....	33

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DEL TEJIDO ÓSEO DE MODELOS ANIMALES EMPLEADOS EN PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD.

Resumen.

Este trabajo fue realizado con la finalidad de determinar las diferencias histológicas de diferentes especímenes de modelos animales (rata, cobayo, conejo, perro y humano) que han sido empleados en pruebas de biocompatibilidad. Las muestras obtenidas fueron fijadas en formalina al 10% y procesadas de manera rutinaria para obtener cortes de 5µm que fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y vistos en campo claro a 2.5X, 10X y 40X. La observación histológica de los especímenes no mostró grandes diferencias, ya que en todos ellos existen los mismos elementos celulares, y la respuesta que presentarán en contacto con materiales extraños puede ser similar.

Palabras claves.- *Biocompatibilidad, hueso, histología.*

STUDY OF THE HISTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF BONE TISSUE FROM ANIMAL MODELS USED IN BIOCOMPATIBILITY TEST.

Abstract

The purpose of this work was to determine the histologic differences between bone tissues of animals employed as models in biocompatibility testing of materials. Femur of each specimens were collected and immediately fixed in a formalin solution (10%) by 48 hrs at least.

After this were processed by histologic routine in order to obtain cuts of 5µm and stained with hematoxin and eosin. Each specimen was observed by light microscopy and determined celular characteristics. The observation of slides was unable to show significant differences an celular population because there were present thesam cells and histological characteristics.

Key words: *Biocompatibility, bone, histology.*

INTRODUCCIÓN.

El comportamiento biológico de los materiales que serán utilizados como reemplazo de estructuras o tejidos en el cuerpo humano, es una característica que debe ser considerada conjuntamente con las cualidades químicas y físicas que tendrá cierto material o sustancia de uso humano, ya que de ello dependerá el éxito o fracaso de su utilización (Black, 1991). En el desarrollo de los biomateriales, una etapa importante la constituyen la realización de pruebas y ensayos pre-clínicos en los sitios donde serán colocados, como sustitutos de tejido óseo (Gay W, Heauner J, 1989). Uno de los ensayos más comunes es la implantación intramedular y cortical en modelos animales de diversa especie, dando por entendido que las características de respuesta pueden ser extrapolados a la que se tendrá cuando sean aplicados en humanos (Hench LL, 1998).

La información de las características histológicas, de ultraestructura y de composición del tejido óseo de los modelos animales empleados para las pruebas de biocompatibilidad no se encuentra concentrada en alguna fuente que nos permita conocer cuales son las diferencias, si es que las hay, o las similitudes de dichas características.

Con esta perspectiva, el objetivo de este estudio es la determinación de las características morfológicas e histológicas del tejido óseo de distintos modelos animales empleados en las pruebas de biocompatibilidad de materiales de sustitución y reparación ósea

ANTECEDENTES

El hueso es un tejido mineralizado, que a pesar de su dureza y fuerza es un material vivo y dinámico, que está siendo renovado continuamente y que experimenta una permanente reconstrucción a lo largo de la vida del individuo (Fawcett DW, 1998). Desde el punto de vista de la ciencia de materiales se le considera como un *composite*, éste término se relaciona al hecho de que está constituido de una matriz celular variable y un componente mineral. En condiciones normales la materia orgánica y los componentes minerales se encuentran en un equilibrio dinámico, donde los procesos de aposición y resorción de material calcificado son determinados por las condiciones de homeostasis o enfermedad presentes en el organismo (Gage JP, 1989).

En conjunto, el tejido óseo se estructura en un sistema que provee de soporte al cuerpo, de esta manera, el esqueleto está compuesto de tejido conjuntivo mineralizado, ligamentos, tendones y un sistema de distribución completo y eficiente de abastecimiento sanguíneo (Kent GC, 1978). El esqueleto sirve como un depósito para el calcio (Ca^{2+}) que es vital para el funcionamiento apropiado de las membranas celulares, y para el fósforo (P^{5}) que se necesita en el metabolismo intermedio. Además, los huesos largos del sistema esquelético son importantes como sitios en donde se lleva a cabo la producción de células sanguíneas (Junquera LC, 1996).

El elemento mineral del hueso, que representa aproximadamente el 60%, está constituido principalmente por calcio, fosfatos, carbonatos, nitratos y cantidades más reducidas de otros iones como sodio, magnesio y flúor (Telford I, 1990). Estos minerales se combinan para formar cristales ultramicroscópicos de hidroxiapatita y otras sales de fosfato de calcio. La

matriz orgánica, por su parte se compone principalmente de colágeno tipo I (90%) y de un 10% de proteínas no colagénicas, agua y lípidos (Telford I, 1990). Se puede decir que la estructura íntima del hueso está constituida por células que viven en un medio rico en matriz orgánica impregnada por hidroxiapatita y otras sales de calcio y fósforo. Según diferentes estudios el interior de esta matriz está poblado por vesículas intra y extra celulares que tendrían como función principal la de iniciar el proceso de mineralización del hueso alveolar. En el centro de algunas zonas de los huesos maxilar y mandibular se encuentra la cavidad medular, ocupada por la médula ósea. En sus extremos, esta cavidad está interrumpida por una red trabecular (Gage JP, 1989).

Las superficies óseas maduras compactadas o esponjosas son histológicamente idénticas, compuestas por laminillas microscópicas. Se han descrito tres tipos de laminillas: *Circunferenciales*, *Concéntricas*, *Intersticiales*.

Las laminillas circunferenciales, rodean todo el hueso adulto, formando su perímetro.

Las concéntricas, conforman gran parte del hueso compacto, constituyendo el tejido óseo. El osteón es un cilindro de hueso cuyo centro está ocupado por una cavidad alargada denominada *conducto de Havers* que está revestida por una sola capa de osteoblastos. Cada conducto aloja un capilar que tiene como funciones fundamentales la nutrición y la defensa del tejido óseo (Borysenko M, 1985). Los conductos de Havers adyacentes se encuentran interconectados por los conductos de Volkman.

Interpuestas entre las laminillas concéntricas adyacentes se encuentran las laminillas intersticiales, que son fragmentos de laminillas concéntricas preexistentes.

Rodeando al hueso compacto se encuentra una membrana de tejido conectivo osteogénico ricamente vascularizada, llamada periostio. En la parte interna de éste se encuentra la mayor densidad celular, siempre orientada hacia la superficie ósea (Warren A, 1959).

CÉLULAS ÓSEAS

En el hueso se distinguen distintos tipos de células que son responsables de la reabsorción, formación y mantenimiento del mismo, de manera general se identifican y describen, las siguientes células: *Osteoclastos*, *Osteoblastos*, *Osteocitos*, *Células bordeantes* (Figura 1).

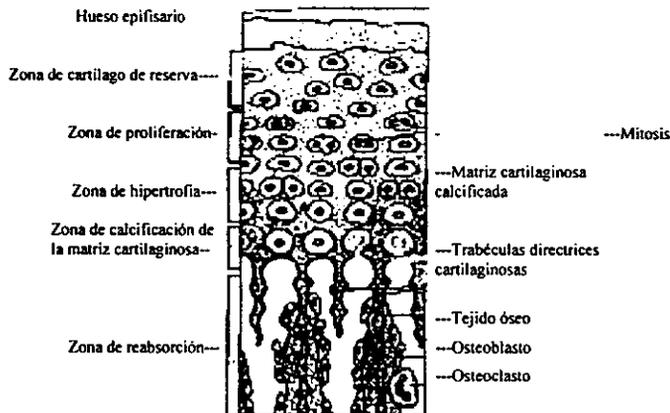


Figura 1) Diferentes tipos de células que se encuentran en un hueso largo en crecimiento (Ross MH, cols 1992).

A la interacción de estos elementos celulares y de las sustancias químicas que regulan este proceso se le llama remodelado óseo.

A los tres primeros se les considera ordinariamente como tipos celulares distintos, pero que en realidad son diversos estadios funcionales de un mismo tipo celular y ejemplo de modulación celular (Fawcett DW, 1988).

Las células progenitoras del hueso, a semejanza de los otros tejidos conjuntivos, se desarrollan a partir del mesénquima embrionario; estas células tienen núcleos alargados u ovals, pálidos y un citoplasma acidófilo poco llamativo o levemente basófilo. Se les encuentra sobre o cerca de las superficies libres del hueso: en el endostio, en la capa más interna del periostio, limitando los conductos haversianos y sobre las trabéculas de matriz cartilaginosa de la metafisis de los huesos en crecimiento. Están activas durante el crecimiento normal de los huesos y pueden ser estimuladas durante toda la vida adulta cuando ocurre la reorganización interna del hueso, la curación de las fracturas o la reparación de otras formas de lesiones. Bajo cualquiera de estas condiciones, se multiplican y se transforman en osteoblastos formadores de huesos, un paso preliminar en la formación de tejido esquelético es la síntesis de colágeno por los osteoblastos (Paulsen DF, 1991).

Los osteoblastos, son productores de la parte orgánica de la matriz, además de colágena tipo I, proteoglucanos y glucoproteínas. Se disponen siempre en la superficie ósea, al lado en forma similar al epitelio simple. (Junqueira LC, 1996).

Los osteoblastos son responsables de la formación de la matriz ósea y se encuentran invariablemente al frente del avance del hueso que crece o se remodela. Durante el depósito activo de nueva matriz, se dispone en una capa epitelioide de células cuboideas o cilíndricas bajas, conectadas unas con otras mediante expansiones cortas y finas. En las micrografías electrónicas se ve que los osteoblastos tienen la estructura esperada de células encargadas de las síntesis de proteínas. (Fawcett DW, 1988).

Los osteocitos son las células principales del hueso, residen en sitios ubicados en el interior de la sustancia intersticial calcificada. Su cuerpo celular se adapta a la forma lenticular de la cavidad que ocupa, pero emite numerosas prolongaciones delgadas que se extienden por los canaliculos de la matriz vecina. Las observaciones con microscopía electrónica muestran que las expansiones de los osteocitos vecinos se ponen en contacto por sus extremos, de esta forma parecen estar en comunicación unas con otras y, en último término con las situadas más superficialmente a través de una serie de uniones de baja resistencia eléctrica, que permite el flujo de iones y quizá también el de moléculas pequeñas. (Copenhaver WM, 1981).

Los osteoclastos son células gigantes, móviles y polinucleadas, que reabsorben el tejido óseo participando en los procesos de remodelación de los huesos. Secretan ácidos (H^+), colagenasa y otras enzimas que atacan la matriz y liberan calcio (Ca^{2+}), además de participar en la eliminación de los restos del tejido óseo que se forman durante la absorción de hueso (Junqueira LC, 1996).

Los osteoclastos se presentan como células gigantes de 20 a 100 μm de diámetro y que pueden tener hasta 50 núcleos, se encuentran en áreas de reabsorción ósea, y generalmente en cavidades poco profundas de la superficie del hueso, llamadas lagunas de Howship, las cuales se forman como consecuencia de la acción de los osteoclastos. (Fawcett DW, 1988).

El componente inorgánico del tejido óseo está inmerso en una matriz de fibras colágenas, donde la unidad fundamental mineral está representada por cristales de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, este compuesto químico es un mineral altamente estable cuyos componentes son el calcio, iones hidroxilo (OH), y el fosfato (Williams RAD, 1982). Los cristales son depositados bajo la influencia de los osteoblastos, mientras que una sustancia cementante compuesta de agua y mucopolisacáridos componen los cristales de la matriz colágena. (Kent GC, 1978). En la mayoría de los procesos de mineralización, el osteoblasto finalmente llega a ser atrapado por la matriz calcificada y son colocados abajo y alrededor de ellos; denominándoseles como osteocitos, los cuales ocupan lagunas de fluido intersticial que interconecta el llenado del canalículo de las lagunas con el fluido. El fluido en las lagunas y canalículos contienen los iones de fosfato y calcio que constantemente están siendo depositados sobre la matriz colágena dependiendo del nivel de calcio. (Kent GC, 1978)

TIPOS DE HUESO

Existen dos formas de hueso que pueden distinguirse al observarlos a simple vista o con la ayuda de una lupa: El hueso compacto y el esponjoso. (Fawcett DW, 1988). En los huesos largos típicos, tales como el fémur o el húmero, la diáfisis (tallo) es un cilindro de pared gruesa constituida de hueso compacto,

con una cavidad medular central voluminosa ocupada por la médula ósea. Los extremos de los huesos largos están formados fundamentalmente por hueso esponjoso recubierto por una corteza delgada de hueso compacto. (Fawcett DW, 1988).

En el animal en crecimiento, los extremos de los huesos largos, llamados epífisis, nacen de centros de osificación independiente y están separados de la diáfisis por la placa epifisiaria cartilaginosa que se une a la diáfisis gracias a una columna de hueso esponjoso de la región intermedia llamada metáfisis. En las superficies articulares de los extremos de los huesos largos, la delgada capa de la cortical de hueso compacto está recubierta por una capa de cartilago hialino, el cartilago articular. (Murray FE, 1978).

El hueso compacto es una masa sólida continua, en la cual con la ayuda del microscopio solo se ven espacios. Las dos formas del hueso se continúan una con otra sin un límite nítido que la separe (Fawcett DW, 1988). Está formado fundamentalmente por sustancia intersticial mineralizada, la matriz ósea esta depositada en capas o laminillas de 3 a 7 μ m de grosor, también existen cavidades lenticulares llamadas lagunas, cada una de las cuales está ocupada por una célula de hueso, denominada osteocito (Weiss L, 1977).

Desde cada laguna irradian en otras direcciones los canalículos, unos conductillos extraordinariamente delgados y ramificados que penetran en la sustancia intersticial de las laminillas y se anastomosan con los canalículos de las lagunas vecinas por lo cual se piensa que estos canalículos son esenciales para la nutrición de las células óseas. (Ham AW, 1984).

Las laminillas de hueso compacto se disponen de tres formas diferentes.

1) *Osteonas o sistemas Haversianos*. La gran mayoría están dispuestas concéntricamente en torno a un conducto vascular del interior del hueso, para formar unas unidades estructurales cilíndricas. Su tamaño es variable y pueden estar compuestas por un número de laminillas que va de cuatro a veinte.

2) *Sistemas intersticiales*. Entre los sistemas haversianos hay fragmentos angulosos de hueso laminar que tienen forma y tamaño irregular. Los límites entre los sistemas haversianos y los intersticiales están nítidamente marcados por unas líneas refringentes llamadas líneas de cemento.

3) *Laminillas circunferenciales externas e internas*. En la superficie externa del hueso cortical, inmediatamente por debajo del periostio y sobre su superficie interna, por debajo del endostio, hay varias laminillas que se extienden de modo ininterrumpido en torno a la mayor parte de la circunferencia del tallo. Los conductos haversianos comunican unos con otros y con la superficie o la cavidad medular por medio de unos conductos transversales u oblicuos, llamados conductos de Volkman (Borysenko M, 1985).

El hueso compacto consiste de lamelas mineralizadas de colágeno, concentraciones alrededor de los conductos de Havers, como en el eje de huesos largos o en mayor o menor hojas con disminución de conductos como en hueso perióstico. Los conductos de Havers contienen una arteriola, una vénula, un vaso linfático y fibras nerviosas. El conducto y su circunvalación lamelar, constituye un osteón o sistema de Havers. Los vasos sanguíneos son

responsables de la configuración de los sistemas de Havers. Los vasos sanguíneos en los canales son continuos en la médula del hueso. En el eje de huesos largos los sistemas de Havers son más o menos paralelos al eje largo del hueso, un aspecto arquitectónico que minimiza la probabilidad de fractura bajo extrema tensión. El plano lamelar de hueso perióstico es formado por osteoblastos sobre la superficie interior del periostio, la membrana fibrosa densa que adjunta a todos los huesos exceptúan a sus superficies articulares. (Kent GC, 1978).

El hueso esponjoso está compuesto también de laminillas, pero sus trabéculas son relativamente delgadas y de ordinario no contiene vasos sanguíneos en su interior, por ello no contiene vasos sanguíneos haversianos, sino que son simplemente un mosaico de piezas angulares de hueso laminar. Las células óseas se nutren por difusión a partir de la superficie endóstica a través de los diminutos canalículos que interconectan las lagunas y que llegan hasta la superficie; Durante el desarrollo embrionario y el crecimiento postnatal, existe una capa interna de células formadoras de hueso, en contacto directo con el hueso. Los osteoblastos en el adulto asumen una forma de reposo (células osteoprogenitoras), y no se distinguen de otras células fusiformes del tejido conjuntivo. Sin embargo, si un hueso es lesionado se reactiva la capacidad formadora de estas células, toman la apariencia de osteoblastos típicos y participan en la neoformación del hueso (Ross MH, cols. 1992).

Los huesos esponjosos, son semejantes en sus elementos esenciales pero diferentes en su aspecto cuando se observa detenidamente. El hueso esponjoso consiste de hueso trabecular y médula de hueso. Las trabéculas son un ensamblaje que emite, y excluye varillas, que como atados arquitectónicos

forman una estructura rígida que provee una fortaleza máxima en áreas de tensión. Ellos se componen de arreglos irregulares de lamelas sin sistemas de Havers. La médula ocupa las cavidades entre trabéculas. Esto consiste de un retículo de fibras conjuntivas de tejido que apoyan vasos sanguíneos, fibras nerviosas y tejido adiposo (médula amarilla), y en algunos huesos tejido hematopoyético que es la fuente de células rojas, de sangre y algunos tipos de células blancas (Borysenko M, 1985).

La cavidad medular está compuesta de una membrana delgada de tejido conjuntivo formando el endostio. Estos tienen algunos aspectos de periostio y tienen la capacidad para depositar hueso, o remodelarlo bajo condiciones seguras (Kent GC, 1978).

Hueso acelular

Hay un tipo de hueso en el que los osteoblastos no solamente se retraen sino que se depositan creando una estructura donde no hay un proceso o canalículo. Esta es la capa del hueso acelular que se encuentra en el cemento de dientes en los vertebrados. (Weiss L, 1977).

Matriz ósea

La sustancia intersticial del hueso está constituida por dos componentes principales: uno es la matriz orgánica; y el otro, las sales inorgánicas y cada uno constituye el 50% del peso seco de la matriz. La matriz orgánica está formada por fibras colágenas embebidas en la sustancia fundamental. En los mamíferos adultos, alrededor del 95% de la matriz orgánica corresponde a colágeno (Gage JP, 1989).

Hueso membranoso.

El hueso depositado directamente dentro de un blastema membranoso sin tener que haber sido precedido por un modelo cartilaginoso es el hueso membranoso. Entre los procesos fisiológicos que ocurren en el hueso, la neoformación de tejido mineralizado depende de la existencia de células mesenquimatosas diferenciadas que respondan a una estimulación humoral y celular para que ocurra el proceso de reparación o neoformación (Junqueira LC, 1996).

Componente mineral.

En cuanto al componente mineral del hueso, esta conformado principalmente por fosfato y calcio integrados en cristales de hidroxiapatita $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Este fosfato de calcio constituye cerca del 95% del componente mineral del hueso, el resto lo constituyen otras sales de calcio, principalmente en forma de carbonato ($CaCO_3$), además de contener elementos en cantidad variable de Na, K, Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Cu^{2+} (Le Geros RZ, 1991).

La estequiometría de la hidroxiapatita en el hueso humano se ha determinado en un cociente (Ca/P) de 1.67, encontrando situaciones donde se podría determinar una relación de 1.3:1 a 2.0:1 donde la condición nutricional participa de manera directa en la constitución y disposición del contenido mineral de los tejidos (Le Geros RZ, 1991).

Por sus características químicas y cristalográficas, la hidroxiapatita es un compuesto de alta estabilidad, insoluble en medio fisiológico y de gran dureza, es por ello que su presencia en los tejidos les confiere gran resistencia y dureza (esmalte, dentina, cemento radicular y hueso), pero se ve afectada por la presencia de medios ácidos. En el ámbito biológico, la hidroxiapatita juega

un papel determinante para el diseño y elaboración de materiales que serán utilizados como sustituto o relleno de hueso (Ouhatoun JP, 1992).

A lo largo de esta revisión se ha visto que el tejido óseo, es una variedad de tejido conjuntivo que se caracteriza por la presencia de material calcificado. Si un hueso largo delgado, por ejemplo el peroné, se coloca suficiente tiempo en una solución débil de un ácido, se extraen las sales inorgánicas, dejando sólo la matriz colagena orgánica. Este hueso descalcificado se vuelve tan flexible que se puede formar un nudo con él. Por el contrario, la extracción de la matriz orgánica deja al hueso duro, pero quebradizo como un gis. De estas observaciones resulta evidente que la dureza de los huesos se debe a las sales inorgánicas, mientras que su fuerza y resistencia se debe al colágeno orgánico a su matriz (Armenta PS, 1975).

MODELOS ANIMALES EMPLEADOS EN PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Los animales han servido para realizar test o pruebas de materiales que luego serán empleados en el cuerpo humano, la conveniencia y seguridad de estas pruebas dependen del modelo animal empleado. De esta manera, es importante distinguir las ventajas, desventajas y condiciones en las cuales se utilizan los distintos modelos animales. Entre las ventajas que se pueden citar con respecto a los modelos animales se encuentran.

1. Periodos de vida cortos. Reaccionan y envejecen rápidamente.
2. Pueden ser sacrificados y se puede estudiar un proceso completo de cualquier enfermedad.

3. Disponible en número suficiente (Estadísticas).
4. Se pueden usar agentes infecciosos sin restricciones de moral.
5. Interacción de varios factores.

Los modelos animales pueden ser utilizados tan específicamente como sea necesario, sin embargo, es conveniente tomar en cuenta que básicamente los modelos animales se pueden clasificar en base al fenómeno que se les piensa observar (Melby EC, 1974).

1. Experimental, este tipo es inducido quirúrgicamente, debe imitar la enfermedad que esta siendo estudiada, y ser fácilmente manipulable y fácilmente reproducible. Sí este modelo no reproduce la enfermedad exactamente, la correlación entre animal y humano debe ser significativa, verificable y predecible.
2. Negativo, este tipo de modelo no desarrolla la enfermedad y usualmente es evitado. Puede ser útil para determinar por que algunas especies son resistentes, por ejemplo el Herpes saimirii no afecta al mono ardilla, la rata de campo es resistente a la mordida de la serpiente y la zarigüeya es resistente a la rabia.
3. Huérfano, este tipo de modelo incluye enfermedades de animales, las cuales no se encuentran en su contraparte humano, o enfermedades similares a estas en el hombre con etiología o patogénesis diferente. Por ejemplo el Sarcoma de Rous en el pollo fue descubierto en 1910 y ha sido usado de manera extensa desde la inmunología hasta investigaciones del cáncer, pero este no tiene una contraparte humana conocida.

4. Espontáneo, en estos casos la enfermedad ocurre naturalmente.

FACTORES QUE DEBEN SER CONSIDERADOS CUANDO SE SELECCIONA UN ANIMAL PARA INVESTIGACIÓN.

A continuación se mencionan las características que deben cumplir los animales que participaran en ensayos que pretendan llevarse a cabo (Mitruka, BM, 1976).

1. *Disponibilidad de especies*, se selecciona una especie la cual debe ser fácilmente disponible o pueda ser fácil de suministrar los animales al mismo investigador para que el trabajo pueda ser confirmado y/o sobre ampliado.

2. *Patogenesis*, comprender el proceso que se pretende estudiar.

3. *Periodo de vida* de las especies y el mejor segmento del proceso cada una de las fases de vida puede responder de manera diferente que las otras.

4. *Características anatómicas*, las características anatómicas propias, tamaño del animal, conformación, especialmente donde la restricción en el largo plazo esta comprometida.

5. *Requerimientos y hábitos nutricionales*, pueden variar con la edad, sexo, gestación, lactancia, embarazo, enfermedad, estación del año, temperatura, humedad relativa, ventilación algunos mecanismos psicológicos internos o la experimentación del estrés, por esta razón en el presente estudio se prefieren especímenes machos con la finalidad de evitar alteraciones hormonales.

6. *Genéticas*, tamaño de los genes comparados con los humanos.

7. *Polimorfismo*, cada una de las especies tienen características únicas que los separa de otros.

8. *Reproducción*, las características reproductoras incluidas como son el estatus endocrino según el sexo, periodo de gestación, tipo de placentación, tamaño de la camada y velocidad de desarrollo en el útero.

9. *Factores indígenas*, peculiares de una especie, cepa o repuesto.

10. *Tipo de agente* debe ser definido con su posible acción metabólica y productos, su efecto en un órgano final y su modo de excreción, este deberá llevar especial cuidado y manejo.

11. *Cédula de administración*, frecuencia, cantidad y ruta tomada de dicho medicamento.

12 *Estado de salud de los animales* deben estar tan saludables como el experimento designado se llame, dentro de las restricciones monetarias.

13. *Requerimientos ambientales*, temperatura, humedad, luz, limpieza, ruido, así bien como otros numerosos factores deben ser considerados, pero siempre tomando en cuenta el tipo de estudio que se requiera.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION.

El estudio y desarrollo de materiales que serán considerados como biomateriales debe seguir los lineamientos de las organizaciones reguladoras del uso y validación de este tipo de recursos. La International Standard Organization (ISO), la American Standard for Testing Materials (ASTM) y la British Standard Institute (BSI) son las entidades encargadas de dar los parámetros de prueba para los nuevos materiales, esto es importante porque una de las etapas fundamentales para la validación la constituye su prueba en tejido óseo vivo, ya sea de humano o de animales, siendo hasta la fecha que no existe un estudio comparativo de las características histológicas y de ultraestructura entre las diferentes especies empleadas para las pruebas de regeneración y neoformación ósea. El aspecto más importante radica en que los resultados que se obtienen en un estudio se tienden a extrapolar a modelos humanos, sin tomar en cuenta que pueden existir diferencias morfométricas en los componentes celulares de las distintas especies, lo cual se reflejará en la respuesta que se presente ante materiales porosos y no porosos, y aún puede influir la relación del tamaño y componente celular, además de el tamaño y forma de las partículas del material.

La elaboración de pruebas de materiales que serán sustitutos de tejidos mineralizados, se ha desarrollado en modelos en los cuales no existe una evidencia de similitudes o diferencias entre las distintas especies empleadas, a esto debe agregarse que las características propias del material juegan un papel importante en la respuesta expresada en las pruebas in vivo. Para comprender mejor la diversidad de los mecanismos y de la respuesta histológica presente en las pruebas de biocompatibilidad, es necesario llevar a cabo la caracterización de los materiales para conocer las similitudes y las diferencias

que puedan existir entre los distintos modelos, esto permitiría hacer una discriminación entre la eficacia y la utilidad de los diferentes modelos cuando se pretenda valorar materiales con características específicas.

HIPOTESIS:

H₁: Existen diferencias de las características morfométricas del tejido óseo de distintas especies animales empleadas como modelos in vivo de prueba de biocompatibilidad de materiales.

H₀: No existen diferencias de las características morfométricas del tejido óseo de distintas especies animales empleadas como modelos in vivo de prueba de biocompatibilidad de materiales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características histológicas de distintos modelos animales (cobayo, conejo, rata, perro, humano) empleados para evaluar la respuesta de tejido óseo ante materiales de relleno y reconstrucción de tejido duro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Establecer las características histológicas del tejido óseo en el fémur de las especies seleccionadas
- 2.- Establecer las similitudes y diferencias histológicas de los componentes esponjoso y compacto del tejido óseo y el cartílago de las distintas especies animales

MATERIAL Y MÉTODO.

Tipo de estudio: Por sus características este proyecto puede ser identificado como descriptivo y comparativo

Universo de trabajo.- En términos generales las muestras fueron obtenidas de animales sanos sistémicamente, que no tuvieron antecedentes de enfermedades crónicas ni adquiridas del tejido conectivo, y que su sacrificio haya sido determinado con fines experimentales o que hayan sufrido algún traumatismo que les produjo la muerte, pero sin involucrar el fémur derecho o izquierdo.

Muestra.- Se utilizarán tres especímenes de cada modelo animal, haciendo un total de 15 muestras. Por consideraciones éticas, en el caso de los especímenes humanos se obtuvieron de algún anfiteatro que contó con material disponible, teniendo cuidado de obtener la información referente a las características propias del espécimen.

IDENTIFICACIÓN Y DEFINICIÓN DE VARIABLES.

Las variables de este estudio son las siguientes

Independiente: Tejido óseo de modelos animales.- Esta variable es de tipo nominal y con fines de operatividad se le consideró como aquel tejido obtenido del fémur de rata, cobayo, conejo, perro y humano.

Dependiente: Características morfológicas es una variable de tipo cualitativo. Con fines de operatividad, a continuación se describe cada una de las variables.

Células: como ya lo habíamos mencionado se distinguen estos tipos de células óseas: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos.

MATERIALES

Recursos Biológicos: Huesos de cobayo, rata, conejo, perro y humano. El hueso seleccionado fue el fémur de las especies antes mencionadas.

Recursos Materiales: El material que se utilizó para preparar las laminillas de histología fue: ácido nítrico, agua desionizada o destilada, parafina, xilol y alcohol, portaobjetos, cubreobjetos, navajas para corte, bisturí, rollos fotográficos de impresión en papel y diapositiva, Equipo de Histokinett, microtomo, cuchillas reafilables.

Recursos físicos: contamos con las instalaciones del Laboratorio de Patología Experimental y del Laboratorio de Biomateriales de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología.

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN (PROCESO HISTOLÓGICO).

Preparación de las muestras: Todos los especímenes fueron almacenados en solución de formaldehído al 10%, después se cortaron con un disco de diamante y refrigeración con agua desionizada, se hicieron cortes en sentido longitudinal y transversal para realizar las observaciones en diferente cara. La orientación de los cortes se encuentra esquematizada en la (Figura 3)

La metodología descrita a continuación ha sido seleccionada para cubrir nuestras necesidades del estudio del esqueleto o hueso de los animales de laboratorio.

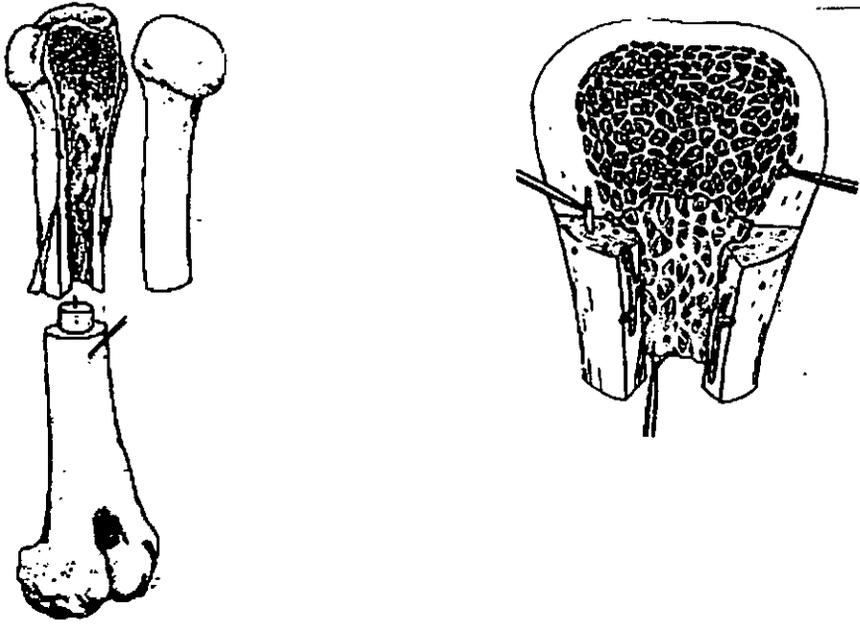


Figura 2. Esquematización de los cortes obtenidos para la preparación de las muestras.

Como paso previo a la descalcificación, los especímenes tuvieron una fijación inmediata en una solución de formalina al 10%, durante un periodo mínimo de 48 horas. Posteriormente los especímenes se colocaron en un descalcificador automático que giraba constantemente a temperatura ambiente y con solución del 5% de ácido nítrico.

En los casos de hueso de rata, conejo y cobayo, el tiempo requerido para la desmineralización fue menor debido a que eran los huesos con menor tamaño y volumen.

La consistencia óptima del hueso descalcificado se comprobó por la resistencia que presentaba a la presión con una aguja.

A partir de este punto los especímenes se procesaron de manera automatizada en un Histokinette, para su deshidratación, clarificación, emulsión e inclusión en parafina.

Después se realizaron cortes a $5\mu\text{m}$ de espesor y fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina para su observación al microscopio óptico en aumentos de 2.5X, 10X y 40X.

La interpretación de las laminillas fue realizada por un Patólogo experimentado en la descripción del tejido óseo.

RESULTADOS

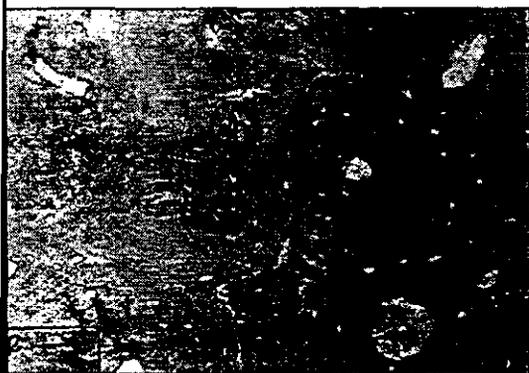
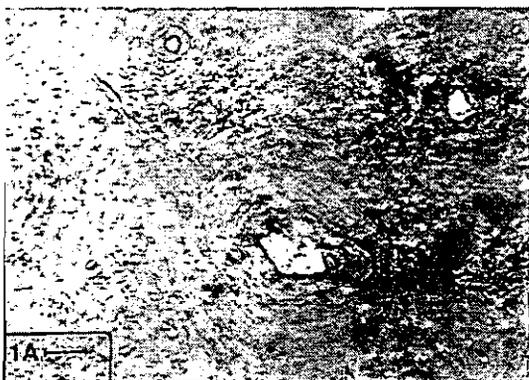
Las muestras fueron observadas con un microscopio óptico Rossbach a campos de 2.5X, 10X y 40X; a continuación se describen los hallazgos según la especie estudiada.

Hueso humano.

En el examen microscópico se observó la presencia de estructuras laminares. El tejido mostró estructuras circunferenciales conformadas por láminas que se acomodaban alrededor de vasos sanguíneos (sistemas de Havers), con presencia de lagunas, lisis de osteocitos, así como ausencia de osteoblastos. El tejido que circunda a las osteonas es fibroso denso.

La presencia de lisis celular en este espécimen puede ser atribuida a que este hueso ya había sido fijado con anterioridad, es decir, ya tenía mucho tiempo de haber estado en fijación y por lo tanto no se podía establecer si la fijación fue mediata o inmediata.

La observación de otros segmentos del espécimen humano mostró la presencia de hueso compacto dispuesto en trabéculas con escasa cantidad de medula ósea. En ambas imágenes (2ay2b) se puede apreciar la forma irregular de los espacios correspondientes al contenido orgánico.



Fotografía 1) Corte de hueso humano teñido con Hematoxilina y Eosina, en A) se observan conductos de Havers y láminas concéntricas con tejido conjuntivo lisado en 10X. B) a 40X se observan los espacios de los osteocitos que se han lisado. C) Conjunto de la osteona a mayor detalle (40X).



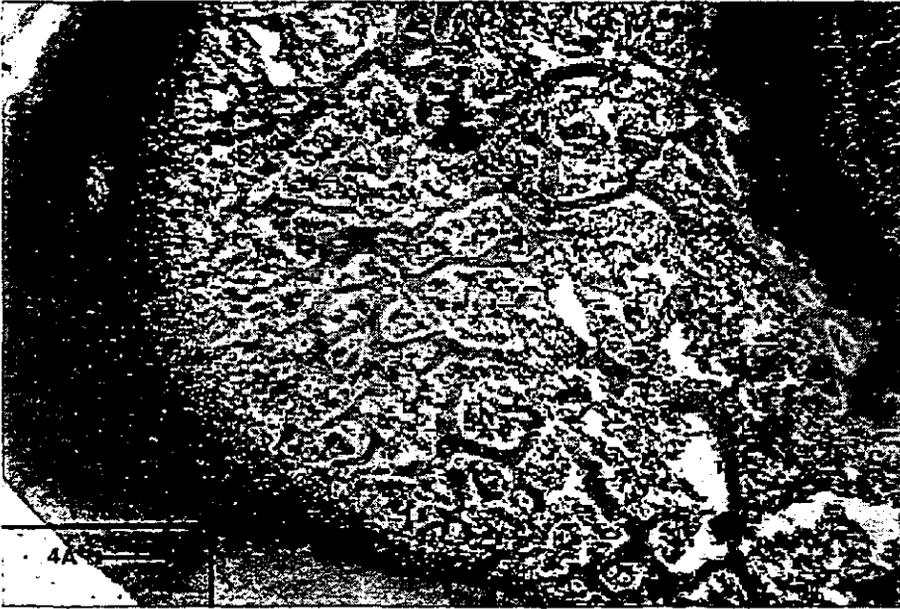
Fotografía 2) Trabeculado óseo observado en una magnificación de 2.5X y 10X. Corte teñido con H y E en el que se observa A) el trabeculado óseo a 2.5X y B) a 10X.



Fotografía 3A y B) los cortes teñidos con H y E a 20X presentan laminillas intersticiales (LI). C) restos de citoplasma de osteocitos. médula D) ósea (40X).

Tejido óseo de perro.

El espécimen correspondiente al tejido óseo del perro, presentó laminillas intersticiales con prolongaciones citoplásmicas de osteocitos y médula ósea (fotografía 3) ; en esta figura se observan los conductos de Havers de forma irregular y la presencia de laminillas con disposición irregular.



Fotografía 4A) cabeza del fémur que muestra a 2.5X, tejido cartilaginoso calcificado, zonas de desaparición del cartilago y sustitución de éste por hueso compacto.

Tejido de conejo.

En la cabeza del fémur se observó la presencia de cartilago maduro, así como la transición de la osificación endocondral, con trabeculado ósea y médula ósea formada por abundantes megacariocitos, tejido adiposo, eritrocitos, linfoblastos, así como la presencia de grupos isógenos en el cartilago. El Trabeculado esta rodeado por osteoblastos y por abundantes haces de fibras colagenas y células activas de forma fusiforme con citoplasma eosinófilo (fotografía 4 y 5).



Fotografía 5A) corte teñido con H y E que muestra cartilago calcificado con presencia de grupos isógenos (GI), hueso (H), rodeados por tejido conectivo fibroso denso. B) a 40X se pueden observar con mayor detalle la transición de cartilago a hueso, con presencia de megacariocitos. C) a 40X el Trabeculado óseo está rodeado por osteoblastos adheridos a éstas, así como su estroma fibroso denso, altamente celular.

Tejido óseo de cobayo

Las características microscópicas de estas muestras son muy parecidas a las descritas anteriormente. Se observó cartílago calcificado, cartílago en proliferación y cartílago en reposo.

Las zonas de sustitución cartilaginosa por hueso son muy evidentes en todo el trabeculado óseo que se encuentra cubierto por osteoblastos así como también se observaron laminillas intersticiales con presencia de osteocitos. También se vieron osteoclastos. La médula ósea era muy activa, con presencia de abundantes megacariocitos, eritrocitos, linfocitos y células progenitoras (Fotografía 6).

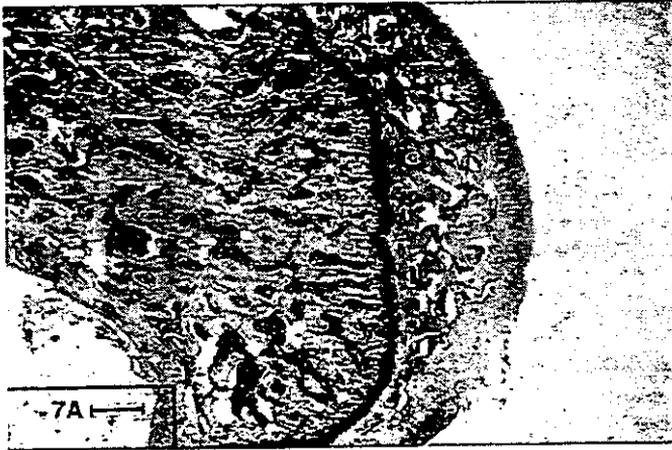
Hueso de rata.

Este tejido óseo está constituido en la cabeza por cartílago mineralizado, en la superficie externa con cartílago atrófico y hueso en la parte media con abundantes vasos sanguíneos, en su parte interna se observó cartílago mineralizado así como la transición de éste en hueso, con proyecciones trabeculares de hueso compacto rodeados por osteoblastos hacia el espacio medular conteniendo esta gran cantidad de elemento formes de la sangre (Fotografía 7).

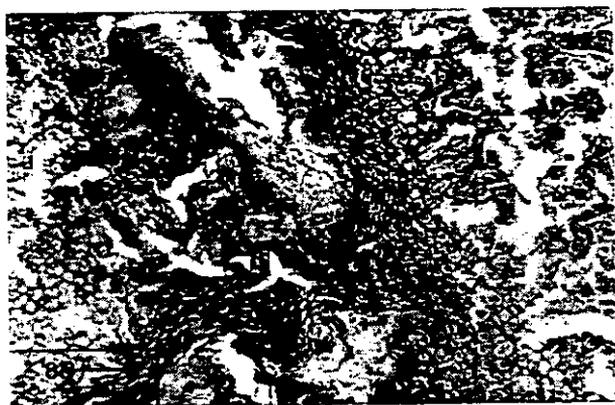
En este espécimen el tejido duro se encontró con abundante actividad celular, lo que corresponde a tejido joven (Fotografía 8).



Fotografía 6) Corte de la cabeza de fémur correspondiente a cobayo con su aumento de 2,5X, teñido con H y E, en A) muestra cartilago, Trabeculado óseo y médula ósea. B y C) grupos isogénios, hueso, cartilago y médula ósea. D) trabeculado óseo con presencia de osteoclastos en la periferia.



Fotografía 7) corte de cabeza de fémur, teñido con H y E a 2.5x en la que se puede observar en a) la superficie exterior con cartilago mineralizado, trabeculado óseo y médula ósea. B) con presencia de grupos isogénicos, megacariocitos y + elementos formes de la sangre, hueso con diferentes grados de mineralización (20x)



Fotografía 8A) Extremo distal del fémur teñido con H y E que presenta cartilago atrófico, mineralizado, hueso y médula ósea. B) grupos isogénicos, estroma fibroso denso (20X). C) el trabeculado óseo se encuentra rodeado por osteoblastos y estroma duro (20X).

DISCUSIÓN.

El componente biológico de los materiales será determinado no sólo por la composición química y las características físicas de los materiales de implante, este concepto involucra la interrelación de dichos materiales con el tejido vivo, es decir las características del tejido receptor (Back J, 1992). En este contexto en la literatura actual se encuentra que los materiales que se pretende utilizar en humanos primero deben de ser probados en animales (Hench LL, 1998), de aquí se desprende la idea de que si funcionan en animales inferiores y no causa problema de rechazo, entonces se comportará de la misma manera cuando se coloque en el tejido humano (Stanley HR, 1990). Uno de los parámetros que pueden determinar la respuesta celular en procesos de implante está dada por las características que tenga el tejido óseo, sin embargo, tal como se describe en la literatura no existen diferencias en el contenido celular del hueso entre las distintas especies utilizadas como modelo de pruebas de biocompatibilidad (Murray FE, 1978, Telford I, 1990, Warren A, 1959).

En este estudio si hizo la caracterización histológica del fémur de las distintas especies que han sido utilizadas para determinar en funcionamiento de materiales de injerto y sustitución ósea, en la práctica cuando se realiza un experimento in vivo el criterio con el cual son seleccionados involucra aspectos que van desde lo económico hasta la facilidad del manejo, y en todos los casos se inicia, por lo menos en pruebas in vivo e in situ, con especies pequeñas hasta terminar con modelos más grandes (Stanley HR, 1990).

Es importante mencionar que estos modelos son los mas comúnmente empleados en las pruebas in situ, y que en la actualidad el desarrollo de

pruebas in vitro tales como el cultivo y el desarrollo de tejidos específicos, como los fibroblastos y osteoblastos de cualquier especie animal, hace que sea más controlable la respuesta biológica a los materiales, es posible aunque su aplicación adquiere un gran costo económico y de infraestructura.

Entre las diferentes especies estudiadas no se logró encontrar diferencias significativas en las características histológicas de los especímenes estudiados. Esto puede ser debido a que morfológicamente no se exprese ninguna diferencia tanto de las células como de las estructuras asociadas a ellas, tal como las fibras colagenas, la substancia intercelular y las proteínas asociadas con los procesos celulares. La determinación histológica, por lo menos en este estudio, tuvo un alcance limitado, ya que únicamente mostró que los componentes celulares en las distintas especies poseían características muy parecidas y que las diferencias encontradas eran debidas a las diferencias en la edad y en el tiempo de procesado de las muestras. Esto se observó principalmente en el tejido de humano, ya que la presencia de lisis celular puede ser atribuida a una deficiente fijación del espécimen.

Los resultados de este estudio no permiten establecer diferencias entre las especies, sin embargo es de suponer que las características físicas y químicas del componente mineral pueden ejercer influencia en los procesos de reparación e integración de los implantes, al igual que debe tomarse en cuenta que el componente orgánico no solo celular, participa de manera fundamental en dicho proceso y no solo el material de implante como tal determina la respuesta a largo plazo en los procesos de reconstrucción y reparación ósea.

CONCLUSIONES.

En el presente estudio no se presentó ninguna diferencia en cuanto a la composición histológica del tejido en los modelos animales empleados, ya que en cuanto a componentes celulares se encontraron los mismos en todos los especímenes (células responsables de reabsorción, formación y mantenimiento del tejido óseo).

Las diferencias histológicas encontradas se explican por la edad de los especímenes ya que esta determinaba la actividad celular presente, siendo mayor en especímenes más jóvenes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armenta PS. :Histología. Ed. Manual Moderno, México D.F., 1975, pp.51-61.
2. Black J., Biological performance of materials. Fundamentals of Biocompatibility, 2nd. ed., 1992. Marcel Dekker, Inc, N.Y.
3. Borysenko M: Histología funcional. Editorial Limusa. 1985. pp. 68-79.
4. Copenhaver WM, Kelly DE. : Tratado de Histología. 17a Edición. Editorial Interamericana. México D.F., 1981. pp. 175-199.
5. Doherty MJ, Schlag G, Schwarz N, Mollar RAB, Nolan PC, Wilson DF.: Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblast. *Biomaterials*.1994, 15(8): 286-294.
6. Fawcett DW. : Tratado de Histología, Décimo primera edición, Editorial Interamericana, 1988, pp.199 - 237.
7. Gage JP, Francis MJO, Triffitt JT: Collagen and Dental Matrices, Wright-Butterworth &Co, 1989, pp.70-90.
8. Gay WI, Heavner JF: Methods of animal Experimentation, Academic Press, 1989, pp1-27
9. Ham AW, Cormack DH. :Tratado de Histología. Ed. Interamericana S.A. de C.V.; México D.F.; 1984, pp. 421-498.
10. Hench, LL. : Bioceramics, A clinical success. *Ceramic Bulletin*, 1998, 77:67-74.
11. Holmes RE, Hagler HK: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in cranial reconstruction: a histometric study. *Plast. Reconstr. Surg*, 1988, 81:662-669.
12. Junqueira LC, Carneiro J.: Histología Básica. 4a. edición. ; Ed. Masson, S.A.; México D.F.; 1996, pp. 121-141.

13. Kent GC, Comparative Anatomy of the Vertebrates, Mineralized Tissues an Introduction to the Skeleton. 7th. edition, 1978. Ed. Mosby year Book. St. Louis Baltimore, Boston. pp.180-187.
14. LeGeros RZ: Calcium phosphates in oral Biology, Monographs in Oral Science, 1991, vol. 15, 46-67.
15. Melby, EC, Jr, Altman NH, Handbook of Laboratory Animal Science, vol. I, II and III, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
16. Meghji S, BSc, Mphil. Bone remodelling, British Dental Journal, 1992. pp. 172-235.
17. Mitruka BM, Rawnsley HM, and Vadehra DV, Animals for Medical Reserch: Models for the study of Human Disease, Jhon Wiley & Sons, Inc; 1976.
18. Mindscape, INC., (1996), Human Skeleton, Grolier Multimedia Encyclopedia, Version 8.01.
19. Murray FE: Zoo and Wild Animal Medicine. Ed. W.B. Saunders Company, 1978. pp.334
20. Ouhayoun JP, Shabana AHM, Issahakian S, Patat JL, Guillemin G, Sawaf MH y Forest N.. Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material en miniature swine mandible; *J. Mat. Sci: Materials in Medicine*, 1992, 3 pp. 222-228.
21. Paulsen DF, Acuña-Díaz H.: Histología Básica. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. México D.F., 1981. pp.121-144.
22. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Histología Texto y Atlas color. 2ª Edición. De. Panamericana. México D.F., 1992, pp 147-181.
23. Stanley HR, Toxicity Testing of Dental Materials, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1990, 166 pp.

24. Shukla BP, and Singh GR: Radiographic evaluation of fresh autogenous, freeze dried and decalcified freeze dried segmental xenogenous bone grafts in dogs, *Indian J. Vet, Surg*, 1994, 15 (1):16-20.
25. Telford I, Bringman C,F, Introduction to functional Histology. Edit. Harper Collins Publishers, 1990. pp 116-136.
26. Warren A. Text book of comparative Histology. New York Oxford University Press. 1959. pp. 40-48.
27. Weiss L, Greep RO, Histology. Fourth Edition. Mc Graw-Hill Book Company. 1977. pp.205-242.
28. Williams RAD, Elliot JC.: Bioquímica Dental Básica y Aplicada. El Manual Moderno, 1982. Pp212-227.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA