

**ESTUDIO DEL ENTORNO MECÁNICO EN EL
DESARROLLO DE HUESOS LARGOS:
ENFOQUE COMPUTACIONAL Y
EXPERIMENTAL**

Miguelangel Moncayo Donoso

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia, Diciembre de 2014

ESTUDIO DEL ENTORNO MECÁNICO EN EL DESARROLLO DE HUESOS LARGOS: ENFOQUE COMPUTACIONAL Y EXPERIMENTAL

Miguelangel Moncayo Donoso

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería Biomédica

Director:

Diego Alexander Garzón Alvarado, Ph.D.
Departamento de Ingeniería Mecánica y Mecatrónica

Línea de Investigación:

Mecanobiología de órganos y tejidos

Grupo de Investigación:

Grupo de Modelado Matemático y Métodos Numéricos GNUM
Grupo de Mecanobiología de Tejidos y Órganos
Universidad Nacional de Colombia - Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia, Diciembre de 2014

Dedicatoria,

A Dios que me ha dado la fuerza para soportar los obstáculos, que me ha dado valor en los momentos de duda y que mantiene mi norte siempre a la vista.

A mis padres Janeth Donoso Delgado y Tomas Miguel Moncayo Sarasty por su apoyo incondicional, porque a pesar de las adversidades siempre han estado ahí alentándome para cumplir mis metas, por inculcarme valores y enseñarme a soñar.

A mis abuelos José Felix Moncayo y Martha Sarasty por ser mi ejemplo, porque desde pequeño me enseñaron a pensar por mí mismo y porque no me han desamparado en este camino de formación.

A mi abuelo Hugo Donoso porque su recuerdo me mantiene vivo y me enorgullece y a mi querida Albita que me cuida desde el cielo y me guía en todas las locuras que se me ocurren, gracias mi albis por vivir en mi mente y en mi corazón.

A toda la gente importante en mi vida, porque cada uno ha contribuido de alguna manera en lo que hoy soy.

Por su puesto....a mis compañeros del laboratorio que me han acogido como un amigo y como un hermano de alegrías y sufrimientos y al profesor Diego Garzón Alvarado por brindarme la oportunidad de vivir esta experiencia tan enriquecedora en el grupo de investigación.

Miguel Ángel Moncayo

Agradecimientos

Es el fin de un proceso supremamente enriquecedor en mi vida, tanto intelectual como personal, proceso que no podría haber culminado exitosamente sin el apoyo e intervención de muchas personas, es por esto que los agradecimientos van dirigidos a todas aquellas personas que han hecho posible este logro.

A mi director Diego Alexander Garzón Alvarado, PhD., quien me acogió en su grupo de investigación y me demostró que todo es posible, que la ciencia es una pasión y hay un mundo de posibilidades por descubrir, también gracias por todo el tiempo y la paciencia dedicados.

A las profesoras Afife Mrad De Osorio y Carmen Alicia Cardozo de Martínez por su disposición para compartir su conocimiento y por el interés que siempre mostraron con los proyectos realizados en el laboratorio de Biomiméticos - IBUN

A mi compañera Johana Guevara por que definitivamente este trabajo no sería lo que es sin su apoyo e intervención, gracias por que este logro es tan mío como tuyo, gracias por demostrarme que la ciencia es divertida, pero con disciplina, que en nuestras manos está el poder de avanzar, innovar y crear, objetivos que gobiernan mis ambiciones, gracias por mantenerme en el camino.

A mis compañeros del laboratorio y a Yaneth Camargo quienes han sido indispensables para llevar a cabo todos objetivos de este trabajo.

Resumen

Durante el desarrollo embrionario, los huesos largos se forman mediante un proceso conocido como osificación endocondral.¹ Los huesos presentan una estructura cartilaginosa encargada del crecimiento longitudinal, conocida como placa de crecimiento, la cual se divide histológicamente en 3 zonas: la zona de reserva, la zona proliferativa, aquí los condrocitos adquieren una forma aplanada y se caracterizan por su alta tasa de proliferación y su organización columnar y la zona hipertrófica constituida por condrocitos que han detenido el proceso de división y aumentan el volumen celular alrededor de 10 veces.^{2,3} La morfología y grosor de la placa de crecimiento varían en función del hueso y la edad. De la misma forma, el comportamiento de la placa de crecimiento se encuentra regulado por una compleja interacción de factores bioquímicos y físicos.³ Se han realizado varias aproximaciones teóricas con el fin de entender la regulación mecánica sin embargo no existen reportes del efecto de la distribución de esfuerzos durante el desarrollo, de esta manera en este trabajo se presenta una aproximación computacional del efecto de estos factores sobre la tasa de osificación y dinámica de la placa de crecimiento. Por otra parte, en la literatura se encuentran trabajos de que describen algunos factores bioquímicos que intervienen en el funcionamiento de la placa de crecimiento, sin embargo no incorporan el efecto de las cargas mecánicas sobre estos procesos bioquímicos, siguiendo este esquema se presenta un estudio que incorpora el efecto del bucle regulatorio bioquímico Ihh-PTHrP bajo cargas mecánicas en la transición de condrocitos de la zona proliferativa a hipertrófica. Finalmente, debido a la necesidad de retroalimentar los modelos computacionales existentes sobre el desarrollo óseo, se presenta una descripción completa del desarrollo de huesos largos (fémur y humero) desde etapa embrionaria hasta la madurez sexual en ratones, con el fin de extrapolar estos datos al desarrollo óseo en humanos. En conclusión, tanto la implementación de modelos matemáticos y computacionales, combinados con estudios experimentales, permiten mejorar el entendimiento de procesos biológicos complejos como el desarrollo óseo y la dinámica del crecimiento de los huesos. Lo anterior es importante en pro de diseñar estrategias terapéuticas, en base a la información generada por estos estudios, para contribuir a la solución de diferentes patologías relacionadas con el desarrollo óseo.

Palabras clave: Desarrollo óseo, placa de crecimiento, centro secundario de osificación, esfuerzos mecánicos, factores bioquímicos.

Abstract

During embryonic development, long bones are formed through a process known as endochondral ossification.¹ After ossification, longitudinal bone growth is achieved by a cartilaginous structure known as growth plate. It is divided in three histological zones: reserve, proliferative and hypertrophic. In proliferative zone, chondrocytes acquire a flattened shape and are characterized by their high proliferation rate and their columnar arrangement. On the other side, hypertrophic zone is composed by chondrocytes that have undergone cell cycle arrest and increase their size up to 10 fold.^{2,3} Growth plate morphology and thickness varies depending on the bone and the age. Likewise, growth plate behavior is regulated by a complex interaction between biochemical and physical factors.³ Many theoretical approaches have been made in order to understand mechanical regulation; however there is no information available regarding stress distribution during bone development. Thus, in this work we present a complete study of the mechanical environment of the growth plate during development. Additionally, there are reports in the literature that describe some biochemical factors influencing growth plate behavior, however the effect of mechanical loading on those biochemical processes is not described. Therefore, here it is presented a study that takes into account biochemical regulation performed by the loop Ihh-PTHrP and mechanical loading on proliferative to hypertrophic transition of chondrocytes. Finally, given the importance of biological feedback for computational studies about bone development, here we present a complete description of long bone development in mice (femur and humerus) from gestation to sexual maturity, in order to extrapolate the information obtained to human bone development. In conclusion, implementation of computational mathematical models, as well as experimental studies, allow improving of the understanding of complex biological processes such as bone development. This is important in order to design new therapeutical strategies, based on information derived from such studies, to contribute to solve pathologies affecting bone development.

Keywords: bone development, growth plate, secondary ossification center, mechanical stress, biochemical factors.

Contenido

	Pág.
1. Alcances de la investigación	1
1.1. Objetivos de la investigación	1
1.1.1. Objetivo general	1
1.1.2. Objetivos específicos	2
1.2. Esquema de la tesis	3
2. Escenarios mecánicos y bioquímicos en el desarrollo de la placa de crecimiento y la epífisis en huesos largos.	4
2.1. Desarrollo de huesos largos en humanos	4
2.2. Placa de crecimiento	5
2.3. Comportamiento de la placa de crecimiento bajo cargas mecánicas	6
2.4. Factores bioquímicos de la placa de crecimiento	7
2.5. Modelos computacionales	7
2.6. Conclusiones	11
3. Implicaciones de la Distribución de Esfuerzos Mecánicos Durante el Desarrollo Óseo: Un Enfoque Computacional	12
3.1. Introducción	12
3.2. Materiales y métodos	13
3.2.1. Modelo	14
3.2.2. Condiciones de Carga y Restricciones	17
3.2.3. Análisis de Datos	17
3.3. Resultados	19
3.3.1. Efecto de la Placa de Crecimiento en la Distribución de Esfuerzos en la Epífisis	19
3.3.2. Efecto del SOC en la Distribución de Esfuerzos en la Epífisis	19
3.3.3. Distribución de Esfuerzos en la Placa de Crecimiento	20
3.4. Discusión y Conclusiones	24
4. Escenarios del desarrollo de la epífisis y de la placa de crecimiento bajo cargas mecánicas: Enfoque computacional	30
4.1. Introducción	30
4.2. Materiales y Métodos	32
4.2.1. Modelo	32
4.2.2. Índice osteogénico	34
4.3. Resultados y Discusión	34
4.3.1. Distribución de esfuerzos	34
4.3.1.1. Presión hidrostática	34
4.3.1.2. Estrés octaédrico cortante	35
4.3.1.3. Índice osteogénico	36
4.4. Conclusión	39
5. Modelo de la placa de crecimiento	41
5.1. Introducción	41
5.2. Materiales y métodos	43
5.2.1. Descripción del modelo matemático	44
5.2.1.1. Bucle bioquímico	44
5.2.1.2.1. Concentración de PTHrP	45
5.2.1.2.2. Concentración de Ihh	48
5.2.1.2. Crecimiento celular	51

5.2.1.3. Frente de osificación	53
5.2.2. Implementación numérica	55
5.3. Resultados	57
5.3.1. Resultados para los casos sin alteración del bucle bioquímico	57
5.3.1.1. Ausencia de carga mecánica	57
5.3.1.2. Presencia de carga mecánica – Compresión	60
5.3.1.3. Presencia de carga mecánica – Tensión	60
5.3.2. Resultados para los casos con alteraciones del bucle bioquímico	61
5.4. Discusión	63
6. Caracterización del Desarrollo Óseo Pre y Postnatal en Ratones: Fémur	66
6.1. Introducción	66
6.2. Materiales y Métodos	67
6.2.1. Fase experimental	67
6.2.1.1. Animales	67
6.2.1.2. Obtención de las muestras	67
6.2.1.3. Análisis Histológico	68
6.2.2. Fase Computacional	69
6.2.2.1. Micro-CT	69
6.3. Resultados y Discusión	69
6.3.1. Prenatal	69
6.3.2. Postnatal	73
6.4. Conclusiones	78
7. Caracterización del Desarrollo Óseo Pre y Postnatal en Ratones: Húmero	79
7.1. Introducción	79
7.2. Materiales y Métodos	80
7.2.1. Fase Experimental	80
7.2.1.1. Animales	80
7.2.1.2. Obtención de las muestras	80
7.2.1.3. Análisis Histológico	81
7.2.2. Fase Computacional	82
7.2.2.1. Micro-CT	82
7.3. Resultados y Discusión	82
7.3.1. Prenatal	82
7.3.2. Postnatal	85
7.4. Conclusiones	90
8. Conclusiones y Recomendaciones	91
8.1. Conclusiones	91
8.2. Recomendaciones	92
Anexo A.	94
Anexo B.	95
Anexo C.	96
Anexo D.	97
Anexo E.	97
Anexo F.	98
Anexo G.	99
Anexo H.	100
Anexo I.	101
9. Bibliografía	102

Lista de figuras

	Pág.	
2-1	Esquema de los procesos de condrogénesis y osificación endocondral	5
2-2	Localización y estructura de la placa de crecimiento	6
2-3	Simulación de estrés octaédrico cortante e hidrostático	9
2-4	Estrés octaédrico cortante evaluado en tres casos (60°, 85° y 105°)	10
2-5	Modelo geométrico de la placa de crecimiento con diferentes grosores y morfologías	10
3-1	Geometría de un hueso genérico	15
3-2	Condiciones de carga, restricciones y análisis de datos	17
3-3	Distribución de IO en la epífisis cartilaginosa	19
3-4	Distribución del índice osteogénico (IO) en la epífisis con SOC	20
3-5	Distribución del índice osteogénico (IO) en la placa de crecimiento para todas las condiciones simuladas	21
3-6	Patrón de los valores de IO horizontales en la placa de crecimiento durante diferentes etapas del desarrollo	22
3-7	Distribución del índice osteogénico de acuerdo a la morfología de la placa de crecimiento	23
3-8	Distribución de los valores de IO horizontales en la placa de crecimiento de acuerdo a la morfología	23
3-9	Comparación entre los resultados de las simulaciones y los estudios imagenológicos	28
4-1	Geometría de un hueso genérico	32
4-2	Distribución de la presión hidrostática (P) en la epífisis y la placa de crecimiento.	35
4-3	Distribución del esfuerzo octaédrico cortante (S) en la epífisis y la placa de crecimiento	36
4-4	Distribución del índice osteogénico (IO) en la epífisis y la placa de crecimiento	37
4-5	Comparación de los valores del factor k de acuerdo a la etapa del crecimiento	38
4-6	Variación del factor k	39

5-1	Diagrama esquemático del bucle regulatorio Ihh-PTHrP	44
5-2	Representación esquemática de las condiciones de frontera bioquímicas en el dominio Ω del problema.	46
5-3	Representación esquemática de la concentración de PTHrP	47
5-4	Representación de los tiempos de hipertrofia (t), tiempo de producción de Ihh y del tiempo simulado (t_s).	49
5-5	Representación esquemática de la gráfica de la concentración de Ihh	50
5-6	Función de la velocidad de crecimiento celular $\gamma(t)$	52
5-7	Descripción del dominio Ω del problema	55
5-8	Condiciones de contorno y cargas aplicadas al dominio Ω del problema	56
5-9	Crecimiento de la malla para el caso sin carga	58
5-10	Concentraciones de Ihhh y PTHrP para los casos sin alteraciones en el bucle regulatorio (sin carga, tensión y compresión).	58
5-11	Tamaño celular máximo alcanzado por las células	59
5-12	Altura máxima alcanzada por la columna para todos los casos de simulación	60
5-13	Resultados de las concentraciones de Ihhh y PTHrP cuando hay alteración en Ihh	62
5-14	Resultados de las concentraciones de Ihhh y PTHrP cuando hay alteración en PTHrP	62
6-1	Imágenes fémur proximal y distal embriones de ratón de 15 días	70
6-2	Imágenes fémur proximal y distal embriones de ratón de 17 días	72
6-3	Imágenes fémur proximal y distal embriones de ratón de 19 días	72
6-4	Imágenes fémur proximal y distal de neonatos de ratón	74
6-5	Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 7 días de edad	74
6-6	Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 14 días de edad	75
6-7	Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 21 días de edad	76
6-8	Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 35 días de edad	77
6-9	Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 46 días de edad	78
7-1	Imágenes humero proximal y distal embriones de ratón de 15 días	83
7-2	Imágenes humero proximal y distal embriones de ratón de 17 días	84
7-3	Imágenes humero proximal y distal embriones de ratón de 19 días	85
7-4	Imágenes humero proximal y distal de neonatos de ratón	86

7-5	Imágenes humero proximal y distal de ratones de 7 días de edad	87
7-6	Imágenes humero proximal y distal de ratones de 14 días de edad	87
7-7	Imágenes humero proximal y distal de ratones de 21 días de edad	88
7-8	Imágenes humero proximal y distal de ratones de 35 días de edad	89
7-9	Imágenes humero proximal y distal de ratones de 46 días de edad	90

Lista de tablas

	Pág.
3-1 Propiedades de los materiales de los tejidos	16
5-1 Parámetros empleados en el modelo	54
5-2 Propiedades mecánicas de los tejidos	56
6-1 Número de animales experimentales en periodo prenatal y postnatal	68
7-1 Número de animales experimentales en periodo prenatal y postnatal	81

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
<i>E</i>	Módulo de elasticidad	Pa
<i>v</i>	Coefficiente de Poisson	--
P	Presión hidrostática	--
S	Esfuerzo cortante	--
Ihh	Indian hedgehog homolog	--
PTHrP	Proteína Relacionada con la Parathormona	--
KOH	Hidróxido de potasio	ml

Abreviaturas

Abreviatura	Término
IO	Índice osteogénico
Ihh	Indian hedgehog homolog
PTHrP	Proteína Relacionada con la Parathormona
CPO	Centro primario de osificación
CSO	Centro secundario de osificación

1. Alances de la investigación

Teniendo en cuenta que en la literatura que se encuentra disponible sobre la formación y dinámica de la placa de crecimiento y de la epífisis de huesos largos, aún carece de elementos que ayuden a entender como algunos aspectos mecánicos y biológicos intervienen en este proceso, este trabajo busca esclarecer el efecto de estos factores principalmente sobre la dinámica de la placa de crecimiento y la aparición del centro secundario de osificación en la epífisis. Sin embargo, aún existen muchas interrogantes por solucionar respecto al desarrollo y dinámica de estas estructuras en huesos largos en humanos, por lo que es necesario desarrollar investigaciones que incluyan diferentes factores mecánicos, tal como distintos tipos de cargas mecánicas, modelos dinámicos de distribución de esfuerzos en la placa de crecimiento y la epífisis, entre otros. Por otra parte el componente biológico en este trabajo incluyó exclusivamente la influencia del bucle regulatorio bioquímico Ihh-PTHrP sobre el proceso de transición de los condrocitos de la placa de crecimiento de zona proliferativa a hipertrófica, de este modo es necesario realizar modelos computacionales adicionales que amplíen la información sobre la dinámica de la placa, como por ejemplo la transición de los condrocitos de zona de reserva a zona proliferativa y también la inclusión de otras moléculas reguladoras que aunque tienen un papel menos relevante en estos procesos, también se deben tener en cuenta.

1.1. Objetivos de la investigación

1.1.1. Objetivo general

Evaluar diferentes escenarios mecánicos, bioquímicos y morfológicos de la placa de crecimiento y la epífisis de huesos largos.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la distribución de esfuerzos mecánicos a escala macro en la placa de crecimiento y en la epífisis de huesos largos.

2. Simular la regulación bioquímica del bucle Ihh-PTHrP bajo cargas mecánicas en la transición de condrocitos a fase hipertrófica en la placa de crecimiento.
3. Realizar una descripción morfológica del desarrollo de la placa de crecimiento y las epífisis del humero y del fémur en ratones.

1.2. Esquema de la tesis

El presente trabajo está dividido en 7 capítulos. El primer capítulo consta de los alcances del estudio y los objetivos de investigación. Los capítulos 2 al 7 se presentan como artículos científicos y el último capítulo como una recapitulación de las conclusiones más importantes de la investigación. El esquema general de este estudio incluye una fase computacional y una fase experimental. A continuación se describe brevemente cada capítulo:

Capítulo 1. Se presentan los objetivos, general y específicos y los alcances del trabajo.

Capítulo 2. En este capítulo inicial se presenta un artículo de revisión, en el cual se enfatiza principalmente el proceso de osificación endocondral, responsable de la formación de los huesos largos y de la formación de la placa de crecimiento, estructura encargada del crecimiento longitudinal de los huesos. Además se presentan los trabajos computacionales más relevantes en este campo, incluyendo trabajos netamente mecánicos, bioquímicos o algunos que incluyen ambos factores.

Capítulo 3. En este capítulo se trata la distribución de esfuerzos mecánicos, basados en el estrés octaédrico normal, el esfuerzo octaédrico cortante y el índice osteogénico, sobre el comportamiento de la placa de crecimiento durante el desarrollo de los huesos largos. Lo anterior teniendo en cuenta diferentes morfologías, posiciones y grosores de la placa de crecimiento, las cuales se ven durante el crecimiento en humanos. Además se incluye el efecto de la presencia o ausencia del centro secundario de osificación.

Capítulo 4. En este capítulo se aborda un estudio computacional para caracterizar ciertos componentes del ambiente mecánico en la placa de crecimiento enfocándose en establecer los patrones que se pueden correlacionar con el conocimiento del comportamiento biológico de la placa de crecimiento y explorar si en la placa de crecimiento, la influencia mecánica puede jugar un papel similar al propuesto para el desarrollo de la epífisis.

Capítulo 5. En este capítulo se presenta un modelo matemático que simula la transición de los condrocitos de la placa de crecimiento desde la zona proliferativa a la zona hipertrófica, teniendo en cuenta la regulación del bucle bioquímico Ihh-PTHrP, bajo cargas mecánicas y en ausencia de estas, además se presentan casos patológicos en los cuales alguna de estas proteínas reguladoras no están presentes.

Capítulo 6. El presente capítulo introduce la fase experimental del trabajo, presentando una caracterización morfológica macro y microscópica del desarrollo del fémur en ratones, considerando el desarrollo de los centros secundarios de osificación de las epífisis proximal y distal y las características de las respectivas placas de crecimiento desde el periodo embrionario hasta los 2 meses de edad.

Capítulo 7. Continuando con la parte experimental, en este capítulo se presenta una caracterización morfológica macro y microscópica del desarrollo del humero en ratones, considerando las estructuras óseas y cartilaginosas mencionadas en el capítulo 6.

Capítulo 8. Principales conclusiones del estudio.

2. Escenarios mecánicos y bioquímicos en el desarrollo de la placa de crecimiento y la epífisis de huesos largos

2.1. Desarrollo de huesos largos en humanos

El sistema musculoesquelético está compuesto por diferentes huesos individuales conectados por tejidos conectivos como músculos, tendones, ligamentos y cartílagos. La rigidez y dureza del tejido óseo es lo que permite al esqueleto mantener la forma del cuerpo, proteger los tejidos blandos, servir de soporte para la médula ósea y transmitir las fuerzas de una parte del cuerpo a otra durante el movimiento ⁴. Por lo tanto, su composición y geometría varían según factores como su localización, magnitud y frecuencia de las cargas a las que está sometido. Adicionalmente el hueso funciona como una reserva de minerales, especialmente calcio.⁵ Los huesos largos presentan una alta relación altura/espesor, a este grupo pertenecen los huesos de los dos primeros segmentos de las extremidades. Constan de una porción central o diáfisis, constituida por hueso compacto en la periferia y en su interior de cavidad medular.⁶

Durante el desarrollo embrionario, los huesos largos se forman mediante un proceso conocido como osificación endocondral. Este implica la generación inicial de un molde constituido por tejido cartilaginoso, similar en su estructura y composición al cartílago hialino articular y cuyo único tipo celular son los condrocitos. La osificación de este molde inicia con la hipertrofia de los condrocitos ubicados en la zona más central, siendo estos condrocitos hipertróficos los encargados de promover la calcificación del tejido y el reclutamiento de otros tipos celulares propios del tejido óseo maduro como osteoblastos y osteoclastos. De esta manera se forma el centro primario de osificación (CPO) que da origen a la diáfisis. Posteriormente, los condrocitos adyacentes a la zona de hipertrofia adoptan una morfología aplanada y organización columnar a lo largo del eje de crecimiento. En el periodo perinatal, en los extremos de los huesos (proximal y distal) en

donde persiste el tejido cartilaginoso, se generan los denominados centros secundarios de osificación (CSO). Estas son áreas en donde suceden procesos análogos a los ocurridos en el CPO y que darán origen a las epífisis.^{1,7}

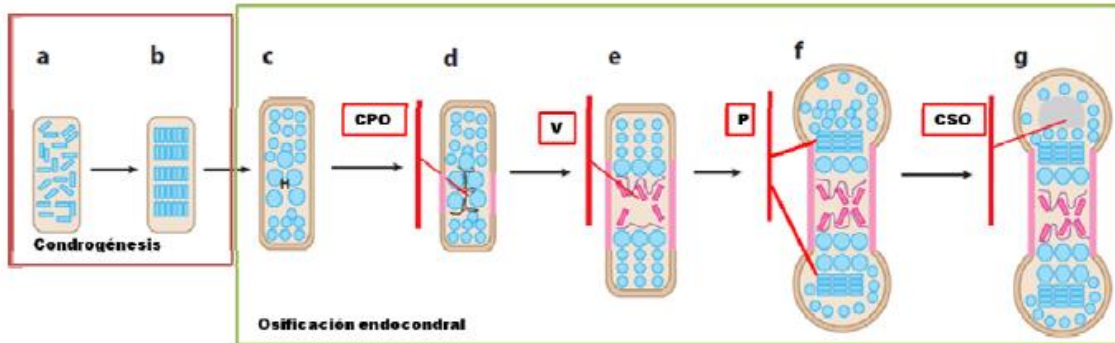


Figura 2-1. Esquema de los procesos de condrogénesis y osificación endocondral. **A)** Condensación de células mesénquimales. **B)** Diferenciación a condrocitos y proliferación. **C)** Diferenciación a condrocitos hipertróficos (H) **D)** Formación del centro primario de osificación (CPO), diferenciación de células a osteoblastos (rosado) **E)** Vascularización (V) **F)** Los condrocitos adyacentes al CPO continúan su proliferación (P) **G)** Formación del centro secundario de osificación (CSO). Figura modificada de Karsenty y colaboradores. 2009.

2.2. Placa de crecimiento

La estructura encargada del crecimiento y la adquisición de la morfología característica de los huesos largos, es la denominada placa de crecimiento, la cual se encuentra ubicada entre el tejido óseo generado a partir de CPO y CSO. Histológicamente la placa de crecimiento se encuentra organizada en 3 zonas: La primera zona y más cercana a la epífisis, se denomina zona de reserva, la cual es estructuralmente similar al cartílago hialino articular. Hacia la diáfisis se encuentra la segunda zona o zona proliferativa, aquí los condrocitos adquieren una forma aplanada y se caracterizan por su alta tasa de proliferación. En esta zona las células adquieren una organización columnar orientada en el mismo eje del crecimiento. La tercera zona está constituida por condrocitos que han detenido el proceso de división y aumentan el volumen celular (hipertrofia) alrededor de 10 veces. Dichos condrocitos posteriormente entran en apoptosis y la matriz se calcifica,

generando así una zona constituida por cartílago calcificado que está en contacto directo con el hueso de la diáfisis (Figura 2-2).^{1,7-9}

La morfología y grosor de la placa de crecimiento varían en función del hueso y la edad. De la misma forma, el comportamiento de la placa de crecimiento se encuentra regulado por una compleja interacción de factores bioquímicos (matriz extracelular, factores de crecimiento, hormonas) y estímulos físicos a los que está sometido el tejido (Figura 2-2).⁹

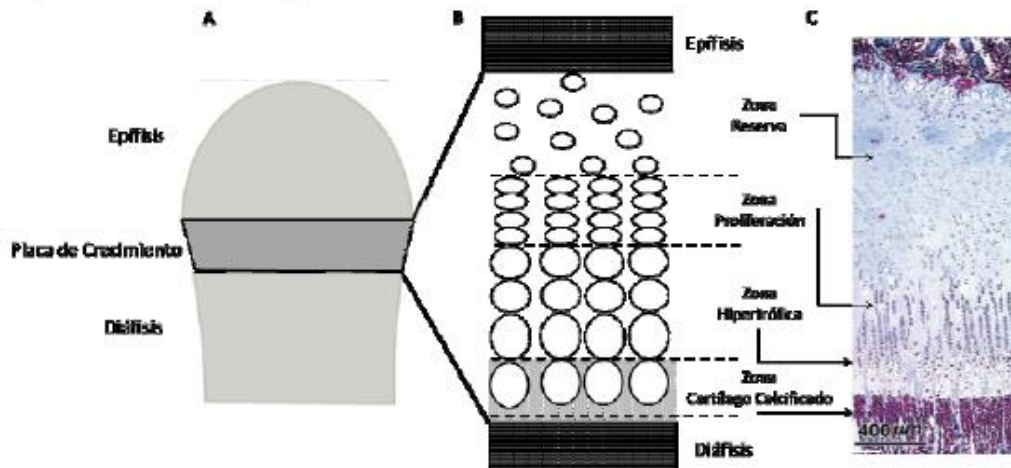


Figura 2-2. Localización y estructura de la placa de crecimiento. A. Esquema de un hueso genérico que indica la ubicación de la placa de crecimiento. B. Esquema de la estructura histológica de la placa de crecimiento. C. Corte histológico de placa de crecimiento de cubito distal de conejo. Modificada de Abad et al. 2002.

2.3. Comportamiento de la placa de crecimiento bajo cargas mecánicas

Entre los estímulos físicos más importantes en la fisiología ósea, se encuentran los estímulos mecánicos, reconocidos desde hace más de un siglo. La ley de Hueter-Volkmann de 1862 es uno de los principios ortopédicos más importantes sobre el crecimiento óseo, reconoce la asociación entre los estímulos mecánicos y el crecimiento, de tal manera que las fuerzas compresivas inhiben el crecimiento mientras que las fuerzas tensiles lo estimulan.¹⁰ Este principio se ha evaluado experimentalmente mediante estudios

de compresión y distracción sobre la placa de crecimiento realizados in vivo en modelos animales. Dichos estudios sugieren una relación inversamente proporcional entre la aplicación de cargas de manera sostenida y la tasa de crecimiento en huesos.¹⁰⁻¹² Sin embargo Análisis histológicos más detallados del tejido de animales sometidos a aplicación de cargas compresivas sugieren que la aplicación de cargas compresivas se asocia a reducción en las zonas de proliferación e hipertrofia, demostrando que el proceso de osificación endocondral se ve influenciado por los estímulos mecánicos presentes durante el desarrollo.¹³ Por otra parte, estudios en cultivos de tejidos ex vivo sugieren que la aplicación de estímulos mecánicos favorece la formación del CSO.¹⁴

2.4. Factores bioquímicos de la placa de crecimiento

La regulación de la tasa de crecimiento de los huesos es un proceso que aún no se entiende por completo. Este se puede ver afectado por numerosos factores, incluyendo el control genético, como la limitación del número de divisiones celulares permitidas, niveles hormonales sistémicos, la acción local de factores de crecimiento y citoquinas, estatus nutricional y suplemento de sangre, cargas mecánicas y restricciones del tejido blando; transporte de solutos, como nutrientes y moléculas señalizadoras; influencias autocrinas y paracrinas, influenciadas por factores mecánicos por la acción directa del núcleo celular y de la consecuente regulación de la expresión génica.¹⁰ Entre estos factores regulatorios, se encuentra un factor bioquímico local importante es el bucle negativo activador-inhibidor formado por la proteína relacionada con la hormona paratoidea (PTHrP) y el Indian hedhehog (Ihh): Ihh es producida por las células en estado prehipertrófico, y se difunde hacia la zona de reserva, donde activa la producción de PTHrP. Esta, a su vez, aumenta la proliferación celular y retrasa el proceso de hipertrofia.^{15,1,7} Dicho bucle ha sido reportado como un posible regulador mayor del proceso de hipertrofia en la placa de crecimiento.¹⁶

2.5. Modelos computacionales

Desde el punto de vista de la biomecánica y la mecanobiología un modelo es una interpretación matemática del comportamiento mecánico y biológico de un cuerpo material

o sistema. Estos tipos de modelos son frecuentemente llamados modelos mecánicos debido a que se basan en leyes físicas o relaciones empíricas las cuales son relevantes para la consideración de diversas variables del problema. En los modelos mecanobiológicos además de las leyes físicas se intenta determinar de forma cuantitativa la influencia del entorno mecánico en la diferenciación de tejidos, así como en su crecimiento, adaptación y modificación estructural incorporando los procesos biológicos y celulares implicados.⁵ El papel de los modelos mecánicos y mecanobiológicos es esclarecer la importancia de los diferentes factores que intervienen en los procesos mecánicos y biológicos para luego simularlos y predecir la respuesta de un sistema mecánico o mecanobiológico. También estos modelos pueden ayudar al diseño de sistemas o procesos y pueden servir como herramienta de acompañamiento experimental o investigaciones clínicas. Para condiciones simples los modelos pueden ser formulados utilizando aproximaciones analíticas. Sin embargo, en el análisis de problemas más complejos se deben emplear métodos numéricos o computacionales. Estos modelos computacionales necesitan de un desarrollo significativo de software y un uso considerable de herramientas y sistemas de cómputo. Actualmente los modelos computacionales complejos para sistemas o procesos biológicos asumen la integración de disciplinas fundamentales (física, biología, química) con métodos numéricos, ciencias computacionales y medicina.¹⁷

El crecimiento de la placa epifisaria ha sido estudiado desde el punto de vista computacional usando el método de elementos finitos.¹⁷⁻¹⁹ Se han desarrollado modelos de osificación en huesos largos desde la octava semana de embarazo hasta los dos años después del nacimiento, en los cuales se simula el desarrollo de la osificación endocondral. Estos modelos usan el índice de madurez que refleja la progresión de una región de cartílago a través de la secuencia de proliferación, hipertrofia y mineralización. Un estudio en particular realizado por ⁸ establece que el crecimiento depende del control biológico y de esfuerzos mecánicos como el estrés octaédrico cortante y la presión hidrostática. Sin embargo, a pesar de las múltiples aproximaciones experimentales realizadas hasta el momento aún se desconocen muchos aspectos relacionados con la distribución mecánica del proceso de osificación endocondral. Con el objetivo de entender dicha regulación, durante los últimos 20 años se han realizado múltiples aproximaciones teóricas enfocadas en el análisis de la distribución de cargas en el tejido en desarrollo. Estudios iniciales realizados por Carter y colaboradores utilizando un modelo elástico en el que mostraron

que el esfuerzo deviatorico favorece la osificación mientras las áreas cartilaginosas se asocian a zonas de esfuerzo hidrostático (Figura 2-3).²⁰

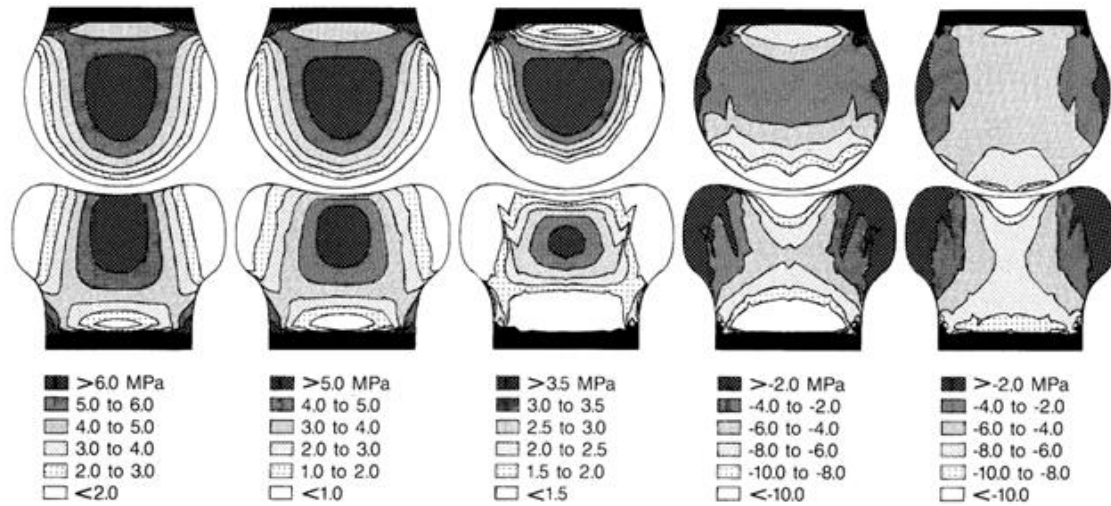


Figura 2-3. Simulación de estrés octaédrico cortante e hidrostático con diferentes valores de índice ontogénico para evaluar osificación en la epífisis de huesos largos.

El modelo presentado por Carter y Wong, 1988 solo tiene en cuenta la distribución de fuerzas en la diáfisis, de tal manera que con este modelo no es posible conocer el efecto y la distribución de las cargas en la placa de crecimiento, además tampoco es posible conocer el efecto de la formación del centro secundario de osificación en la distribución de cargas sobre la placa de crecimiento. Sin embargo, en base a estos modelos, se han realizado modelos 2D y 3D que analizan la distribución de cargas en diferentes articulaciones mostrando que la concentración de esfuerzos deviatoricos coincide con los patrones fisiológicos de osificación (Figura 2-4).^{20,21}

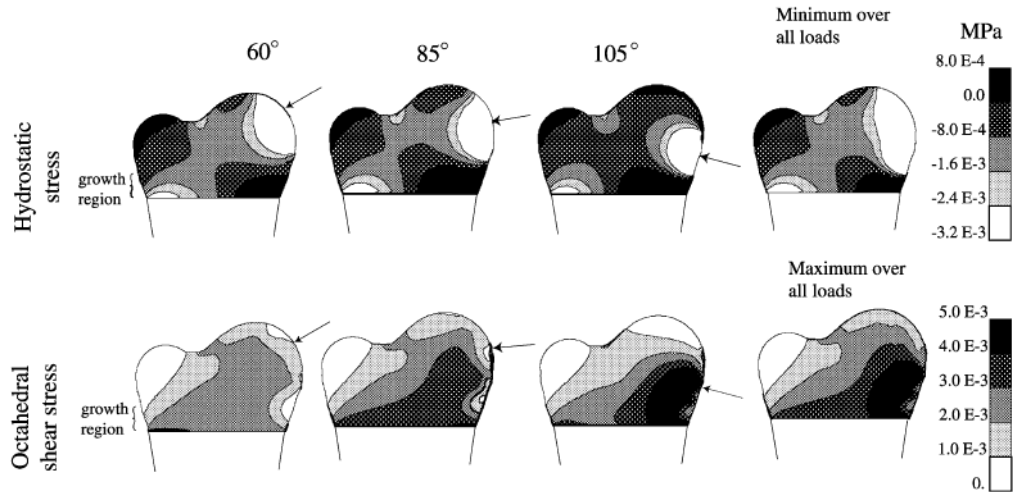


Figura 2-4. Estrés octaédrico cortante evaluado en tres casos (60°, 85° y 105°)

Recientemente, Piszczatowski ha simulado lo ocurrido únicamente en la placa de crecimiento, teniendo en cuenta la presencia de tejido óseo tanto en epífisis como en diáfisis y diferentes tipos de morfología de la placa de crecimiento (Figura 2-5).^{22,23}

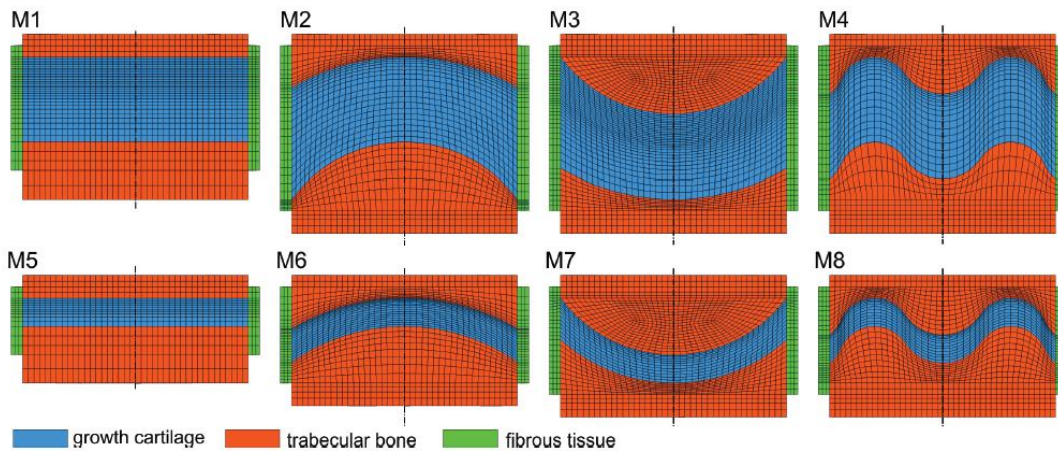


Figura 2-5. Modelo geométrico de la placa de crecimiento con diferentes grosores y morfologías.

Como se observa al analizar los modelos anteriores ninguno integra tanto la distribución de fuerzas en la placa de crecimiento, epífisis y centro secundario de osificación y como cada una de estas modifica la distribución en cada una de ellas.

Por otra parte, se han realizado aproximaciones que integran los componentes mecánicos y bioquímicos asociados a la aparición del CSO.^{17,24,25} Estos acercamientos, solo han considerado la distribución de esfuerzos en estadios iniciales previos a la formación del CSO y no han tenido en cuenta la morfología de la placa de crecimiento. La dinámica biológica de la placa de crecimiento también se ha estudiado *in silico* a través de la formulación de diversos modelos matemáticos que describen el comportamiento de la placa de crecimiento durante el proceso de osificación endocondral, enfocándose principalmente en el avance del frente de osificación como función de algunos parámetros bioquímicos o mecánicos.^{17,26,20,26,27} Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no detallan el efecto de dichos estímulos sobre los condrocitos en la placa de crecimiento. Otros trabajos, por su parte, consideran la osificación de la placa a escala macroscópica, sin detallar los procesos celulares que se llevan a cabo en ella, limitando su capacidad para analizar el comportamiento microscópico de la placa de crecimiento.

Algunos de los trabajos más relevantes se enfocan en el efecto bioquímico sobre la dinámica de crecimiento de la placa, destacando dos proteínas que actúan en conjunto, formando un bucle regulatorio: Indian hedgehog (Ihh) y el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP, por sus siglas en inglés). Dicho bucle ha sido reportado como un posible regulador mayor de la actividad biológica de la placa de crecimiento.¹⁶

2.6. Conclusiones

Tanto factores mecánicos como bioquímicos están estrechamente relacionados en la formación y dinámica de la placa de crecimiento y la epífisis de huesos largos en humanos. Sin embargo, aún existen muchos vacíos de conocimiento en relación a los diferentes mecanismos que toman lugar en estas estructuras y como estos factores interactúan. Aunque se han realizado diferentes aproximaciones computacionales y experimentales es necesario implementar modelos que permitan esclarecer en qué medida cada uno de estos factores actúa en la funcionalidad de las diferentes estructuras del hueso. Lo anterior es importante en pro de diseñar estrategias terapéuticas, en base a la información generada por estos estudios, para contribuir a la solución de diferentes patologías relacionadas con el desarrollo óseo.

3. Implicaciones de la Distribución de Esfuerzos Mecánicos Durante el Desarrollo Óseo: Un Enfoque Computacional

3.1. Introducción

El desarrollo embriológico de los huesos largos es un proceso complejo que se deriva de las células mesénquimales que se condensan y se diferencian en condrocitos para formar un molde cartilaginoso. El proceso de osificación inicia con el establecimiento del centro primario de osificación (CPO) en la parte central del futuro hueso o diáfisis.¹ El molde cartilaginoso se extiende hasta el final de la diáfisis estableciéndose así la epífisis.⁷ Hacia el final de la gestación se forma el centro secundario de osificación (CSO) en la parte central de la epífisis, seguido por un crecimiento radial hasta que se alcanza una epífisis completamente osificada.²⁸ De esta manera, el desarrollo de las epífisis de los huesos largos empieza desde un estado completamente cartilaginoso, seguido por la formación del CSO y finalizando con una epífisis completamente osificada.^{1,28}

En el esqueleto apendicular el cartílago de crecimiento permanece entre la diáfisis y la epífisis en una región identificada como placa de crecimiento. Histológicamente la placa de crecimiento se organiza en tres zonas: reserva, proliferativa e hipertrófica.^{1,9,29} Esta zona es responsable del crecimiento longitudinal y de la adquisición de la forma característica (cóncava, recta, irregular y convexa). Otras características de la placa de crecimiento como su localización en el hueso, morfología y grosor cambian de acuerdo al tipo y edad del hueso.³⁰ Esto se refleja en el trabajo realizado por Kandzierski *et al.*, en el cual se evidencia que la morfología de la placa de crecimiento de la epífisis proximal del fémur aparece como un menisco cóncavo a la edad de cuatro años. Con el incremento de la edad, a los siete años la placa de crecimiento es recta como una línea poco uniforme. Finalmente, la placa de crecimiento asume la forma de un arco en el inicio de la pubertad.^{3,29-33} Además, el grosor de la placa de crecimiento también cambia durante la vida, con una placa de crecimiento más gruesa en las primeras etapas del desarrollo y

disminuyendo progresivamente hasta que desaparece hacia el fin de la adolescencia.^{3,34,35} Estos cambios son controlados por varios factores incluyendo factores genéticos, bioquímicos y mecánicos.³⁶ Este último se ha reconocido ampliamente como un importante factor de la regulación de la placa de crecimiento, modificando las poblaciones celulares en las zonas proliferativa e hipertrófica así como la síntesis de matriz extracelular tal como se ha evidenciado en estudios *in vivo* e *in vitro*.^{10,11,18,37}

Se han realizado varias aproximaciones teóricas con el fin de entender la regulación mecánica. Estos enfoques varían desde el análisis de la distribución de esfuerzos en el desarrollo del tejido^{20,38} a modelos más complejos que integran tanto factores mecánicos como bioquímicos.^{17,39} Estos modelos solo han considerado eventos que se presentan en la epífisis, y no tienen en cuenta las características o el comportamiento mecánico de la placa de crecimiento. Además, hasta el momento no se ha estudiado la distribución de esfuerzos en la epífisis y en la placa de crecimiento en diferentes etapas del crecimiento del hueso.

Usando un análisis axisimétrico (3D) por elementos finitos se modeló un hueso con una geometría genérica para explorar la distribución de esfuerzos mecánicos en la epífisis y en la placa de crecimiento en diferentes etapas de la osificación epifisaria. El objetivo de este trabajo fue esclarecer determinar la distribución de esfuerzos mecánicos en la placa de crecimiento en diferentes etapas de la osificación epifisaria y establecer el efecto de la morfología de la placa de crecimiento en la distribución de esfuerzos epifisarios y viceversa. Los resultados derivados de este trabajo ayudarán a dilucidar los eventos mecánicos que tienen lugar en la placa de crecimiento y en la epífisis durante el crecimiento de huesos largos. Adicionalmente, la información generada podría ser útil para formular hipótesis en relación a la influencia de factores mecánicos en eventos biológicos en escenarios con placas de crecimiento normales y patológicas.

3.2. Materiales y métodos

Se realizó una aproximación computacional para entender el comportamiento mecánico de un hueso largo en diferentes etapas del crecimiento utilizando el método de elementos finitos considerando un comportamiento elástico lineal. Para el análisis numérico se

implementó un sistema de ecuaciones diferenciales parciales usando el lenguaje de programación Fortran (Formula Translating System). La solución de las ecuaciones se realizó utilizando el software comercial ABAQUS v 6.1. La visualización de resultados se llevó a cabo mediante el software TECPLOT 360 (Tecplot Inc. Bellevue, WA USA).

3.2.1. Modelo

Se designó un modelo axisimétrico de un hueso genérico, simulando el fémur proximal durante etapas embriológicas tempranas, con una longitud de 25 mm y un radio de 10 mm en la epífisis (Fig. 3-1). Por efectos de simplificación se mantuvo la misma morfología para etapas tardías del desarrollo. El modelo incluyó cuatro regiones: diáfisis, placa de crecimiento, nódulo de Ranvier y epífisis (Fig. 3-1A). Aunque el cartílago es un tejido altamente hidratado, se usó un modelo lineal elástico, teniendo en cuenta que la carga mecánica aplicada fue estática y constante y que el flujo de fluido de contorno se consideró como cero. Adicionalmente, los modelos elásticos lineales han probado en estudios previos ser tan efectivos como los modelos constitutivos poro-elásticos para el análisis de distribución de esfuerzos en el cartílago.⁴⁰ Las propiedades del material para cada zona se describen en la Tabla 3-1. Para las simulaciones el módulo de elasticidad y el coeficiente de Poisson en los diferentes tejidos se planteó de la siguiente manera: la diáfisis se designó como hueso trabecular, el nódulo de Ranvier, estructura encargada de dar soporte mecánico, como tejido fibrosos y la placa de crecimiento como cartílago.

Aunque existe un drástico cambio en las propiedades del material entre la región de la placa de crecimiento y la diáfisis, los análisis se realizaron con el fin de evaluar el impacto de la transición del material en la distribución de esfuerzos. Por ende se simuló una zona de transición entre la placa de crecimiento y la diáfisis. Esta zona genera un cambio gradual de las propiedades del material del cartílago (arriba) hacia el hueso (abajo); la transición de las propiedades del material están dadas por:

$$E_{TRANSITION\ ZONE} = E_{GROWTH\ PLATE} + \frac{\Delta E}{\Delta y}(y - y_{GROWTH\ PLATE})$$

Donde,

$$\Delta E = E_{BONE} - E_{GROWTH PLATE}$$

Y Δy si la zona de transición con “y” y cualquier punto en la zona de transición. E es el modulo de young para cada zona.

La prueba de concepto se realizó usando una placa de crecimiento recta. El análisis mostró un menor impacto en el cambio de material en la distribución de la placa de crecimiento, así como un patrón similar con o sin zona de transición. Se observaron algunos cambios en el patrón de estrés epifisario, sin embargo a pesar de que esta zona ya se encuentra osificada, la distribución de esfuerzos en esta zona no es relevante para el propósito de este estudio (Fig. 3-1 suplementaria).

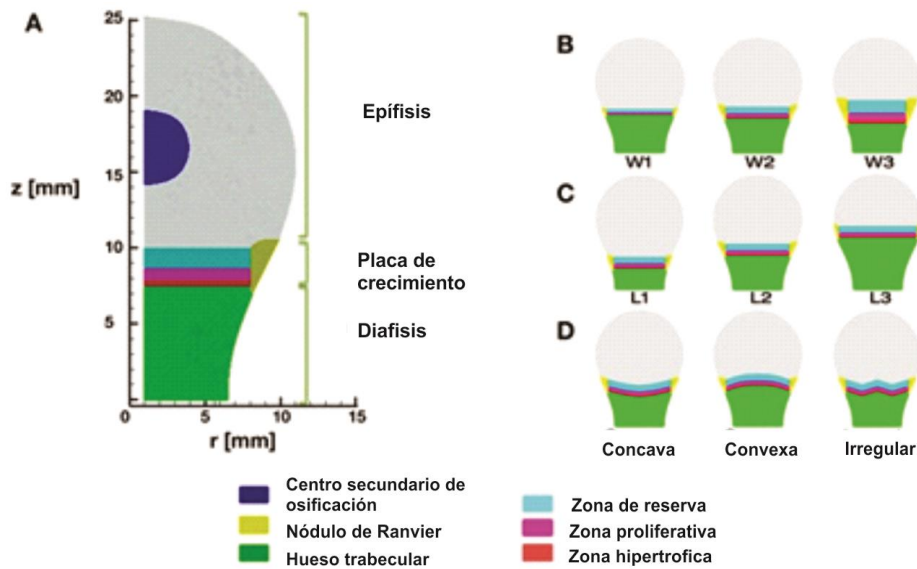


Fig. 3-1. Geometría de un hueso genérico. **A)** descripción y escala de la geometría del hueso genérico. **B)** grosores. Ejemplo representativo de la morfología recta. W1: delgada, W2: media, W3: gruesa. **C)** localización. Ejemplo representativo de la morfología recta. L1: baja, L2: media, L3: alta. **D)** morfologías correspondientes a W2, L2.

Tabla 3-1. Propiedades de los materiales de los tejidos. Módulo de elasticidad y el coeficiente de Poisson para cartílago, hueso y nódulo de Ranvier como se estableció por Piszczatowski. ²²

Tejido	Módulo de Elasticidad (E)	Coeficiente de Poisson (ν)
Cartílago	6.0	0.495
Hueso trabecular	345.0	0.300
Tejido fibroso	10.0	0.300

En la epífisis de los huesos simulados se identifican tres fases representando el desarrollo óseo cronológicamente como sigue: primero, completamente cartilaginoso (caso 1), segundo, formación del SOC (caso 2) y tercero, epífisis completamente osificada (caso 3). Para el caso 2 el tamaño del SOC y la forma se designó individualmente para todas las condiciones probadas basados en las áreas demarcadas por el índice osteogénico (IO) obtenidas en las simulaciones del caso 1 (ver el análisis de datos para obtener más información). Así la geometría del SOC varía en tamaño y forma, incluyendo círculos y elipses orientados como se muestra en la Fig. 3 suplementaria. Para el caso 3, se usó la misma morfología que para el caso 1, pero la epífisis se consideró como hueso trabecular en vez de cartílago (Fig. 3-1 y Tabla 3-1).

Se simularon cuatro morfologías de la placa de crecimiento para cada uno de los casos mencionados anteriormente: placa recta, cóncava, convexa e irregular. Finalmente se simularon tres grosores de la placa de crecimiento (W1: delgada, W2: media, W3: gruesa) y tres localizaciones de la placa en la epífisis (L1: baja, L2: media, L3: alta) para cada morfología (Fig. 3-1B-D). Con el fin de determinar diferentes localizaciones, se usó la configuración L2 como referencia y la L1 y L3 se lograron moviendo la placa de crecimiento hacia arriba o hacia abajo respectivamente.

Para las simulaciones se usaron un total de 36 morfologías. En el mallado se usaron elementos cuadrilaterales convencionales. El análisis de convergencia mostró un tamaño de elemento óptimo de 0.01 unidades de malla de largo (Fig. 3-4 suplementaria). El número de elementos varía entre morfologías en un rango de 16.000 a 20.000.

3.2.2. Condiciones de Carga y Restricciones

En el modelo se tomó el eje “Y” como el eje simétrico; adicionalmente se estableció un desplazamiento de cero para el eje “Y” en el borde inferior de la geometría. Con el fin de ser capaces de realizar comparaciones unitarias, las cargas se aplicaron a una presión de 1Mpa (Fig. 3-2A) de acuerdo a las pruebas realizadas en.^{8,21}

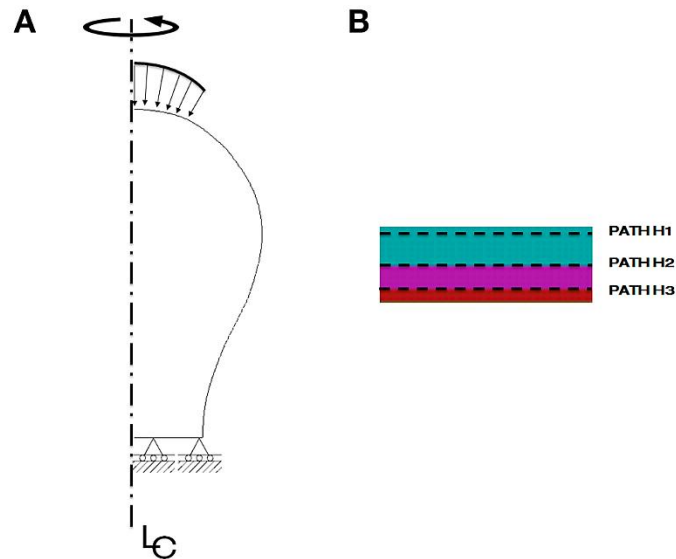


Fig. 3-2. Condiciones de carga, restricciones y análisis de datos. **A)** Contorno de la figura mostrando el eje de simetría y las restricciones. La posición de la carga se indica con flechas. **B)** Las secciones de la placa de crecimiento (Paths H1, H2 y H3) usadas para el análisis de la distribución del índice osteogénico (IO) están marcadas por líneas discontinuas. Cada Path corresponde a una sección histológica de la placa de crecimiento: zona de reserva (azul), zona proliferativa (morado) y zona hipertrófica (roja).

3.2.3. Análisis de Datos

Los resultados de las simulaciones se analizaron en términos de estrés octaédrico normal (P) y estrés cortante (S). De acuerdo a estudios realizados por Carter y Wong la formación del cartílago resulta de un pico en el estrés octaédrico normal y la formación del hueso se ve como resultado de un pico en el esfuerzo octaédrico cortante.³⁸ Estos autores definen

una relación numérica entre P y S, llamado índice osteogénico (IO) como un indicador de la influencia del estímulo mecánico en el proceso de osificación y es dado por:

$$OI= S + kP \quad (1)$$

Donde k es una constante empírica que se probó con valores entre 0.2 y 2 (Fig. 3-5 suplementaria). Sin embargo para todas las simulaciones se usó $k=0.5$, hasta que el valor se pareció a un escenario biológico como se describe por Carter *et al*, donde se observa una región de bajo IO en el cartílago articular y valores altos de IO en el área de predicción del CSO, él se distingue claramente en las epífisis.³⁸

El IO es un parámetro escalable que incorpora el efecto del estrés octaédrico normal y del esfuerzo octaédrico cortante. El IO se puede usar para predecir que regiones del elemento esquelético cartilaginoso osificarán primero (altos valores de IO) y cuales probablemente permanecerán cartilaginosas (bajos valores de IO).³⁸ Teniendo esto en cuenta, la distribución del IO se analizó solo en las estructuras cartilaginosas en el modelo las cuales corresponden a la epífisis y a la placa de crecimiento (solo casos 1 y 2).

Con el fin de caracterizar el comportamiento mecánico en la placa de crecimiento para todas las condiciones simuladas la distribución del IO se determinó en el plano horizontal usando las secciones nombradas como Path H1, H2 and H3 (Fig. 3-2B).

3.3. Resultados

3.3.1. Efecto de la Placa de Crecimiento en la Distribución de Esfuerzos en la Epífisis

Se realizó el análisis de la distribución de esfuerzos en la epífisis durante etapas tempranas del desarrollo del hueso en una epífisis completamente cartilaginosa (caso 1). El patrón de la distribución de esfuerzos para todas las simulaciones mostró un pico del estrés octaédrico normal (P) bajo el área de carga. Además, se observaron valores altos de estrés

octaédrico cortante (S) en la zona central de la epífisis. De igual forma, se observaron valores altos de IO localizados centralmente al igual que con S (Fig. 3-6 suplementaria).

La distribución del IO se evaluó para diferentes localizaciones de la placa de crecimiento en la epífisis, para las diferentes morfologías y para los cambios en grosor. Se observaron cambios en la distribución del IO principalmente asociados con la localización de la placa de crecimiento (Fig. 3-3, Fig. 3-2 suplementaria). Cuando la placa de crecimiento se encuentra en posición baja (L1) presenta altos valores de IO en el centro con una distribución vertical alargada que se aplana a medida que la placa se acerca más al área de la carga (L3) (Fig. 3-3A). Los valores de índice osteogénico mostraron un decrecimiento marcado en la placa localizada en posición L3 comparado con la placa L2 y L1 (Fig. 3-3B).

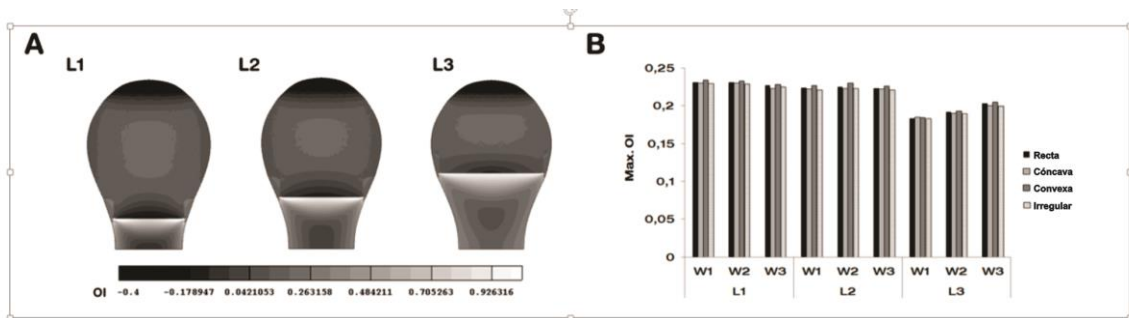


Fig. 3-3. Distribución de IO en la epífisis cartilaginosa. **A)** Ejemplo representativo para IO en la placa de crecimiento recta en las tres localizaciones simuladas (L1, L2, L3, W2, caso 1). **B)** Valores máximos de IO obtenidos en la región central de la epífisis para todas las localizaciones, morfologías y grosores de la placa de crecimiento.

3.3.2. Efecto del SOC en la Distribución de Esfuerzos en la Epífisis

Durante el desarrollo del hueso hacia el fin de la gestación se forma el centro secundario de osificación (SOC). Este proceso involucra la osificación en la región central de la epífisis cartilaginosa. Con el fin de entender el efecto del SOC en la distribución de esfuerzos en la epífisis se simuló una epífisis cartilaginosa con las propiedades de material del cartílago rodeando un área central con características de material del hueso trabecular como se especifica en la Tabla 3-1 (caso 2). Como se esperaba, la apariencia de una estructura

ósea (SOC) en la epífisis conduce a cambios en el patrón IO epifisario comparado con la epífisis completamente cartilaginosa (caso 1). El índice osteogénico (en el tejido cartilaginoso) alcanza valores altos en el área que rodea el SOC, principalmente en los sitios flanqueantes horizontales, alcanzando inclusive valores mayores que los del caso 1 (Fig. 3-4). Los valores de OI parecen verse afectados principalmente por la localización de la placa de crecimiento (Fig. 3-3 suplementaria).

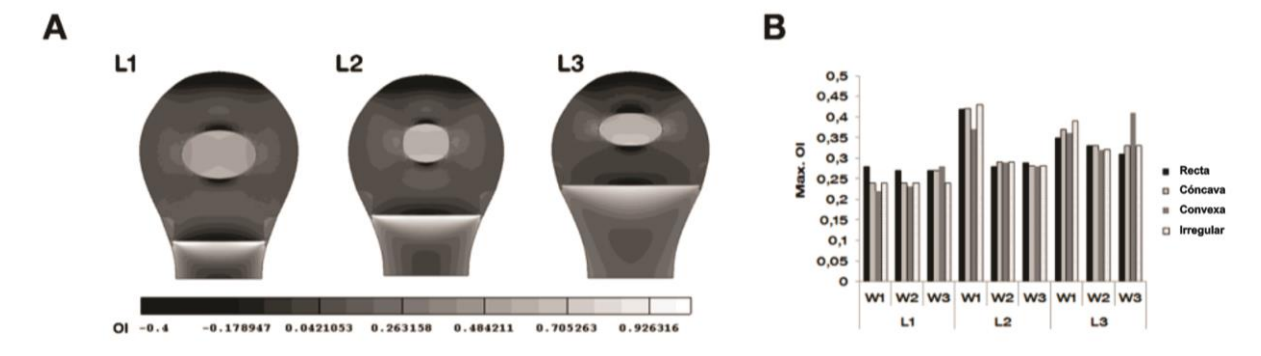


Fig. 3-4. Distribución del índice osteogénico (IO) en la epífisis con SOC. **A)** Ejemplo representativo para valores de IO en las simulaciones con placa recta en las tres diferentes localizaciones y con grosor medio (L1, L2, L3, W2 caso 2). **B)** Los valores máximos de IO se obtienen en las regiones horizontales adyacentes al SOC.

3.3.3. Distribución de Esfuerzos en la Placa de Crecimiento

Debido a que la placa de crecimiento es responsable del crecimiento longitudinal de los huesos, la distribución del IO se analizó específicamente para diferentes características de la placa de crecimiento (localización, morfología y grosor). Además, se simuló estos eventos para todas las etapas del desarrollo epifisario (casos 1, 2 y 3). Se observó una distribución heterogénea del IO en todas las simulaciones (Fig. 3-5).

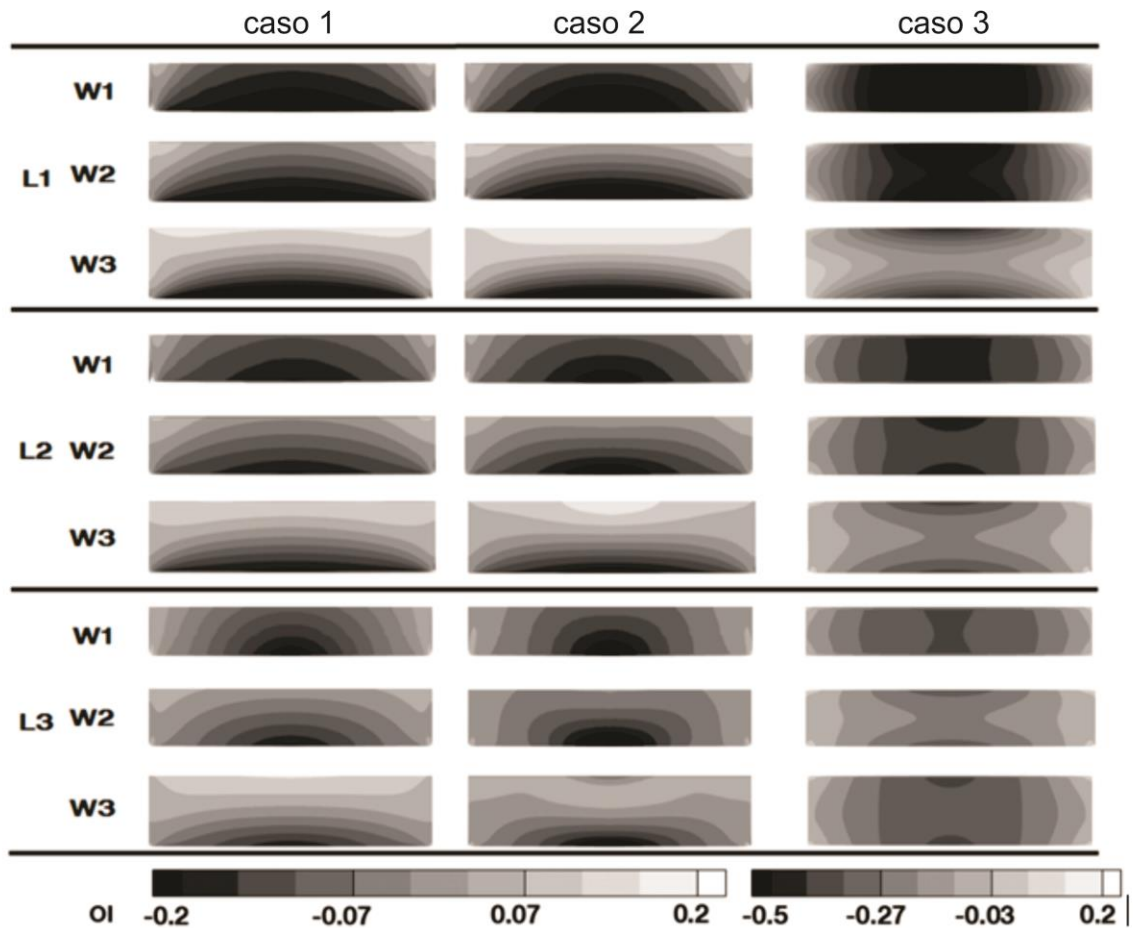


Fig. 3-5. Distribución del índice osteogénico (IO) en la placa de crecimiento para todas las condiciones simuladas. Ejemplo representativo para las simulaciones con placa de crecimiento recta.

Con el fin de caracterizar el patrón de valores de IO horizontales en todas las simulaciones se realizaron diferentes Paths (Path H1, H2 y H3). Estos Paths ilustran los valores de IO a través de la placa de crecimiento, empezando desde el nódulo de Ranvier hasta la zona de reserva (H1), proliferativa (H2) e hipertrófica (H3).

Dado que los valores de IO altos predicen la osificación del tejido cartilaginoso, los resultados de los Paths pueden ayudar a establecer una asociación entre el estímulo mecánico y una respuesta biológica. Para las epífisis cartilaginosa (caso 1) y con SOC (caso 2) la distribución de IO en la placa de crecimiento mostró un comportamiento similar. Los valores más altos de IO se observaron en el Path H1, con una tendencia decreciente para los Paths H2 y H3 (Fig. 3-6A-B). Sin embargo, para la epífisis completamente

osificada (caso 3) se observaron cambios drásticos en la distribución de los valores del IO (incremento en magnitud negativa) con una tendencia parabólica (Fig. 3-6C).

Adicionalmente, para el Path H1 el IO incrementa concomitantemente con el grosor de la placa de crecimiento.

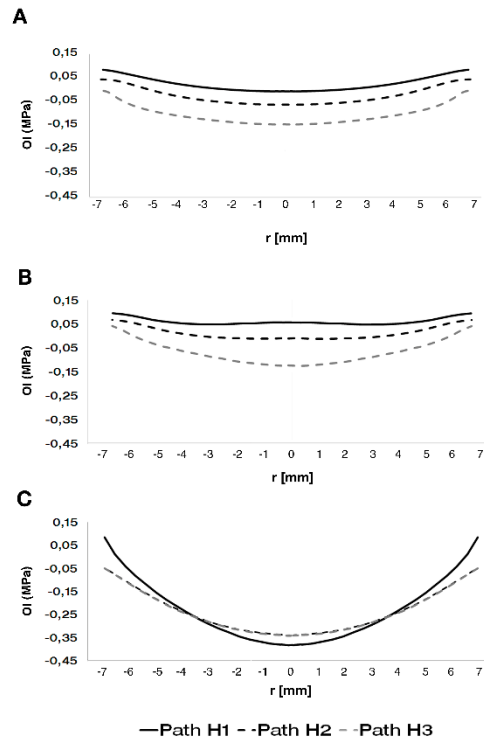


Fig. 3-6. Patrón de los valores de IO horizontales en la placa de crecimiento durante diferentes etapas del desarrollo. Ejemplo representativo de una placa de crecimiento recta, L2, W2. Los resultados obtenidos de los Paths H1: zona de reserva (—), H2: zona proliferativa (---) y H3 zona hipertrófica (-·-·-). **A)** Caso 1. **B)** Caso 2. **C)** Caso 3.

De acuerdo a las etapas de desarrollo del hueso la placa de crecimiento adquiere diferentes morfologías (8). De este modo se realizaron simulaciones de las morfologías recta, cóncava, convexa e irregular. Los resultados mostraron asociación entre la morfología y el patrón de distribución del IO (Fig. 3-7, Figs. 3-7,9 suplementarias). El patrón de los valores de IO horizontales para el Path H1 fue dependiente de la morfología de la placa de crecimiento y de la etapa del desarrollo epifisario. Para el caso 1, el patrón de los valores IO horizontales se vio grandemente afectado por la morfología de la placa de crecimiento especialmente para el Path H1 (Fig. 3-8).

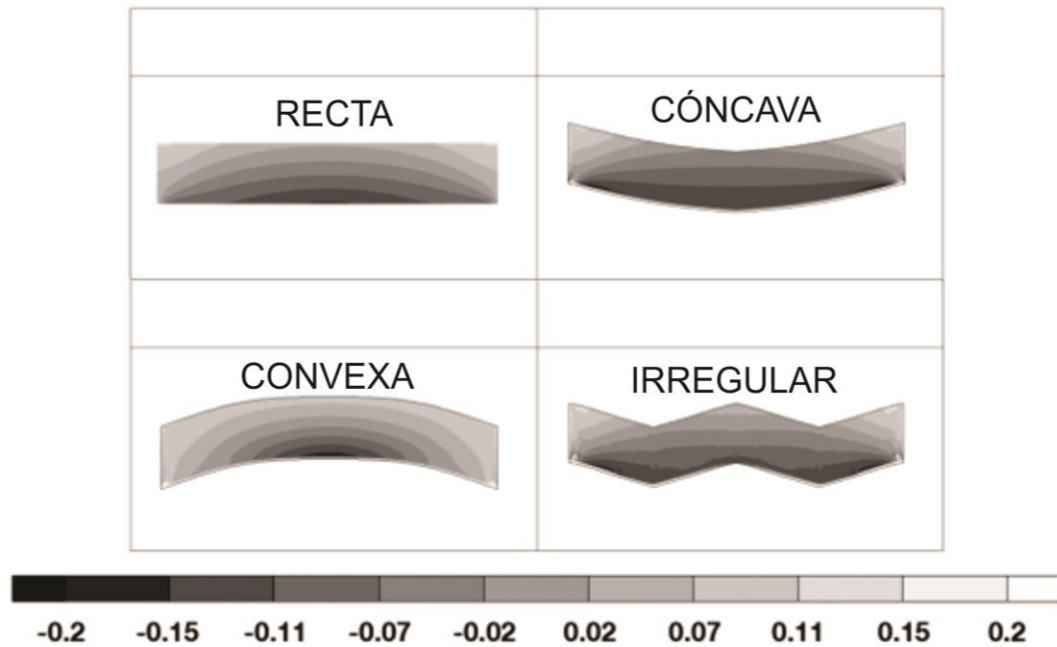


Fig. 3-7. Distribución del índice osteogénico de acuerdo a la morfología de la placa de crecimiento. Ejemplo representativo para cada morfología de la placa de crecimiento (L2, W2, caso 1).

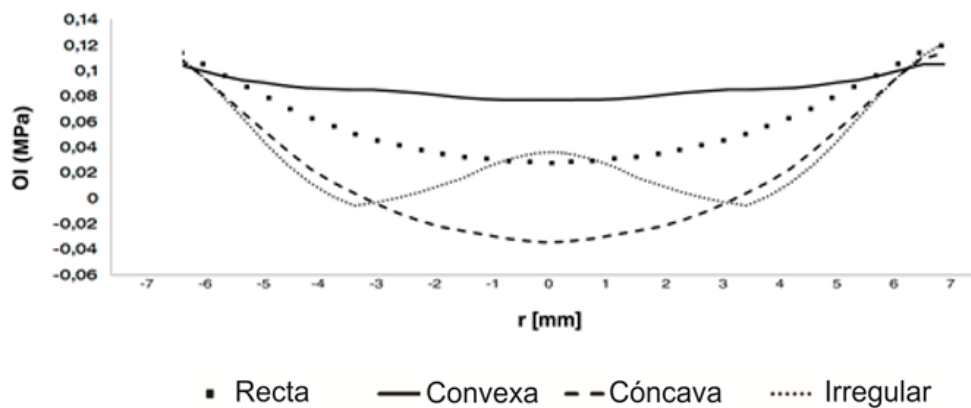


Fig. 3-8. Distribución de los valores de IO horizontales en la placa de crecimiento de acuerdo a la morfología. Ejemplo representativo de las simulaciones para cada morfología de la placa de crecimiento (L2, W2, caso 1). Resultados obtenidos del Path H1.

3.4. Discusión y Conclusiones

Varios enfoques computacionales han explorado el ambiente mecánico en el desarrollo óseo antes de la aparición del SOC, estableciendo posibles asociaciones entre los estímulos mecánicos y la respuesta biológica.^{8,19,21,24,38-42} Sin embargo, pocos estudios han abordado tales aspectos para la placa de crecimiento o explorado los cambios durante el desarrollo. En efecto, para un mejor entendimiento, este estudio es el primer enfoque para entender la distribución en la epífisis y en la placa de crecimiento en diferentes etapas del desarrollo del hueso. Este trabajo se basa en el parámetro escalar propuesto por Carter *et al.* El cual integra el estrés octaédrico normal y el estrés octaédrico cortante para predecir el proceso de osificación.³⁸ En contraste con estudios previos que se enfocaron principalmente en el desarrollo del CSO, se aplicó la aproximación de Carter para analizar el comportamiento de la placa de crecimiento en diferentes etapas del desarrollo, lo anterior con el fin de explorar una posible relación entre los patrones de esfuerzos y las características morfológicas características de la placa de crecimiento. Uno de los principales hallazgos de este estudio fue la observación de un gradiente de estrés mecánico que parece estar relacionado con el arreglo histológico de la placa de crecimiento. De esta manera, antes de que finalice la osificación los patrones de IO coinciden con la organización de la placa (reserva, proliferativa e hipertrófica) la cual verse afectada en la estimulación del crecimiento longitudinal de los huesos. Adicionalmente, se observó que la osificación completa de la epífisis tiene un impacto en la distribución de esfuerzos de la placa de crecimiento favoreciendo su mantenimiento en vez de su osificación. Además, los resultados sugieren que el estímulo mecánico juega un papel importante en el desarrollo de la epífisis así como de la osificación de la placa, en particular durante etapas tempranas del desarrollo, en concordancia con la creciente evidencia *in vivo* e *in vitro* que relación el efecto mecánico en el desarrollo óseo.^{10,37,42}

Los resultados para la epífisis completamente cartilaginosa (caso 1) se presenta durante el desarrollo embriológico (segundo trimestre) hasta el primer año de vida en humanos.^{29,30,43} Nuestros resultados concuerdan con los presentados por Carter *et al.*, bajo condiciones de carga y restricciones similares. Las áreas epifisarias con valores considerables de IO permiten predecir la localización del SOC y su morfología.³⁸ En base con nuestros resultados para el caso 1, es posible predecir la aparición del SOC en la zona

central de la epífisis independiente de la localización, morfología y grosor de la placa de crecimiento (Fig. 3-2, Fig. 3-2,3 suplementaria).

Además, de acuerdo a nuestros resultados las futuras características del SOC dependen principalmente de la localización de la placa de crecimiento (Fig. 3-3). Se observa un patrón similar durante el desarrollo del esqueleto apendicular. En huesos como el fémur el cual presenta una placa de crecimiento localizada en una zona medial, el CSO se desarrolló como una estructura redondeada (simulación L2). Mientras que en huesos como el radio, con una placa de crecimiento localizada cerca del área de carga (simulación L3) el SOC adquiere una forma más aplanada.³⁰ Además, se observó decrecimiento de los valores de IO en la región del CSO para una placa de crecimiento localizada cerca del área de carga (L3). Para esta localización en particular los bajos valores de IO podrían estar asociados con el estímulo mecánico que puede resultar en una aparición retardada del CSO. Biológicamente, estos eventos se presentan en huesos como el radio, huesos de la mano, pie y falanges, en los cuales la osificación se presenta después del primer año de vida.³⁰

Con la aparición del SOC, los resultados muestran una distribución de esfuerzos uniforme que conduce a altos valores de IO en zonas laterales en vez de presentarse en las zonas superior e inferior, resultado en una tendencia de crecimiento ovoide (Fig. 3-4). Estos resultados se asemejan a un patrón de crecimiento del SOC para huesos como el fémur distal.^{30,32} Adicionalmente, así como para el caso 1, los valores de IO y su distribución parecen verse afectados principalmente por la localización de la placa de crecimiento (Fig. 3-3 suplementaria).

Para los casos 1 y 2 los resultados sugieren que el desarrollo del CSO solo se vio afectado por los cambios en la localización de la placa de crecimiento (Fig.3-2). Para todos los casos simulados fue posible predecir la aparición del SOC en la zona central de la epífisis, al igual que en el desarrollo del SOC *in vivo* en la mayoría de los huesos en humanos.³⁰ Sin embargo, se conoce bien que el número de CSOs y la morfología varía entre diferentes elementos esqueléticos.³⁰ Estudios previos han sugerido otros factores que pueden afectar la apariencia del CSO y su forma tal como el contorno epifisario y su localización.^{20,38} En este estudio estas condiciones fueron constantes (forma epifisaria redonda – carga central). De esta manera, se requieren estudios adicionales para evaluar en conjunto la

localización de la placa de crecimiento y la forma epifisaria para casos específicos con el fin de entender como su interacción puede afectar el desarrollo epifisario.³⁸

Carter y Wong propusieron el IO como indicador del estímulo mecánico para la osificación. Así que, altos valores de IO pueden estar relacionados con un incremento en la velocidad de osificación.³⁸ Dado que el crecimiento de los huesos largos resulta de la osificación en la placa de crecimiento, se sugirió que valores altos de IO en esta estructura pueden ser un indicador de la tasa de crecimiento esperada. En la placa de crecimiento los valores de IO se vieron afectados por las variables estudiadas: localización, morfología y grosor (Figs. 3-5,7, Figs. 3-5,7 Suplementarias) con una placa localizada en una zona baja (L3) y gruesa (W3) alcanzando los valores máximos. Las características antes mencionadas son comparables con hallazgos histológicos durante etapas embriológicas para los huesos de las extremidades inferiores en humanos y otros mamíferos. En estos casos la placa de crecimiento es más ancha y presenta altas tasas de crecimiento.^{29,44} Teniendo esto en cuenta, es posible sugerir que el estímulo mecánico puede contribuir a un incremento en la tasa de crecimiento en este periodo.

Adicionalmente se obtuvo una tendencia de decrecimiento en los valores del IO de la placa de crecimiento, desde la epífisis hasta el fin de la diáfisis. Los resultados obtenidos evidencian un pico en los valores del IO en la zona de reserva (Figs. 3-5,6,7), con valores de IO comparables con los observados en la epífisis. La zona de reserva es la encargada de proveer celular a la zona proliferativa asegurando la continuidad del proceso de crecimiento.⁴⁵ Además, se ha propuesto que los condrocitos de la zona de reserva pueden sintetizar factores bioquímicos, responsables de la orientación del crecimiento y la inhibición de la hipertrofia en la zona proliferativa. Estos eventos favorecen la organización histológica de la placa de crecimiento en diferentes zonas.⁴⁵⁻⁴⁸

Basado en los cambios observados en los valores de IO entre las áreas que corresponden a reserva, proliferativa e hipertrófica podría sugerirse que el estímulo mecánico podría estar asociado con cambios en el comportamiento celular. De esta manera, altos valores de IO en la zona de reserva pueden estimular a las células para que inicien su proliferación o sinteticen factores bioquímicos o ambos, particularmente en etapas tempranas del desarrollo (casos 1 y 2). La regulación mecánica puede actuar como un regulador epigenético de síntesis de proteínas.¹⁴

Varios reportes en literatura muestran una asociación entre el estímulo mecánico y el proceso de diferenciación así como la síntesis de morfógenos.^{14,22,24,37,40,49,50} Además, el estrés octaédrico normal ha reportado un incremento lineal del embalaje de lípidos en la membrana de los condrocitos así como la expresión génica.⁵¹ Se ha documentado bien las propiedades bioquímicas de la membrana para regular la transducción de señales.⁵² Por lo tanto se sugirió para una epífisis completamente cartilaginosa así como para una epífisis con CSO que las carga mecánicas observadas como altos valores de IO en la zona de reserva, podrían ser un factor que contribuye a cambios bioquímicos iniciados por estas células.

La etapa final del desarrollo epifisario resulta en una estructura completamente osificada (caso 3) el cual se presenta en la infancia tardía. Los resultados obtenidos para este caso muestran valores bajos de IO desde la región central de la placa de crecimiento hacia el nódulo de Ranvier (Figs. 3-5,6C), lo cual corresponde con lo reportado por Piszczatowski.²³ Estos valores centrales, de acuerdo con Carter y Wong, pueden interpretarse de acuerdo a que el estímulo mecánico favorece la preservación del cartílago en vez de promover la osificación.³⁸ Por otra parte, los altos valores hacia el nódulo de Ranvier sugieren osificación. El comportamiento del IO mencionado anteriormente puede conducir a un desbalance en el crecimiento forzando la placa de crecimiento a adquirir una morfología convexa.

En este estudio se realizaron análisis sobre la distribución de esfuerzos para las combinaciones entre las variables consideradas (geometría de la placa de crecimiento, localización, grosor y estado de osificación de la epífisis). Esto permite una aproximación a la situación de la placa de crecimiento en un amplio rango de huesos largos; el cual podría ser el caso de la cabeza del fémur proximal. Los resultados de las simulaciones en este estudio se pueden comparar con eventos del desarrollo óseo en humanos.^{32,3} mostraron los cambios en la placa de crecimiento epifisaria durante el desarrollo óseo mediante estudios de imagenología (Fig. 3-9).³ En los resultados obtenidos de las simulaciones en este estudio las regiones con altos valores de IO (similares a los observados en la epífisis) pueden predecir tasas de osificación altas. De acuerdo a esto, por ejemplo, los resultados para una placa cóncava L3W2-caso 2, irregular L3W2-caso 3 y convexa L3W1-caso 3 las placas siguen la tendencia observada para el fémur proximal

a los 4, 7 y 12 años de edad respectivamente (Fig. 3-9). De esta manera se evidencia la correspondencia entre los patrones de los esfuerzos y las características morfológicas.

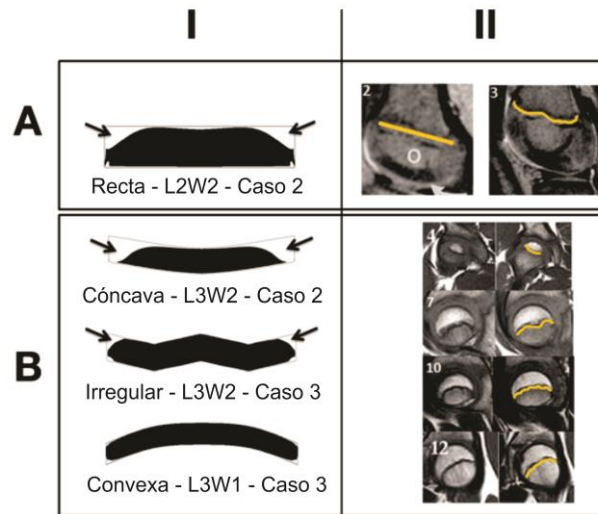


Fig. 3-9. Comparación entre los resultados de las simulaciones y los estudios imagenológicos. Para la simulación (I) las regiones con altas tasas de crecimiento se muestran en blanco (flechas). La predicción de la morfología se muestra en negro. En las imágenes (II) la placa de crecimiento está resaltada con amarillo. **A)** Epífisis del fémur distal. A la izquierda (I) se representa la tendencia de crecimiento de acuerdo a la simulación, a la derecha (II) se muestran las imágenes de epífisis de niñas de 2 y 3 años de edad. Imágenes modificadas de (9). **B)** Epífisis del fémur proximal. A la izquierda (I): tendencia de crecimiento de acuerdo a las simulaciones. A la derecha (II): imágenes de epífisis de niños de 4, 7, 7 y 12 años de edad. Imagen modificada de Kandzierski.³

Los resultados obtenidos se ven altamente influenciados por un único esquema de carga considerado, por esto es importante considerar que in vivo cada hueso tiene cargas específicas características que están relacionadas con las interacciones óseas con los músculos, ligamentos y otros huesos. Teniendo esto en cuenta, aunque en este estudio se observó una tendencia que se correlaciona con algunos hallazgos biológicos, para derivar conclusiones biológicas más acertadas se debe realizar estudios en huesos específicos.

Este trabajo consiste de un enfoque inicial sobre el ambiente mecánico durante diferentes etapas del desarrollo de los huesos largos. Por esta razón para un mejor análisis del impacto de la morfología de la placa de crecimiento en la distribución de esfuerzos

mecánicos y viceversa, este modelo computacional se estableció en base a varias simplificaciones como la morfología de la epífisis, las condiciones de carga y el modelo usado para el análisis del comportamiento mecánico. A pesar de estas limitaciones, el modelo usado revela información importante relacionada con la distribución de esfuerzos en la placa y en la epífisis y del proceso de osificación. La relevancia biológica de estos hallazgos se debe confirmar a través de modelos de huesos específicos que tengan en cuenta la poroelasticidad y el flujo de fluido intersticial.^{53,54} Además los modelos multiescala que tienen en cuenta el comportamiento células y de la matriz extracelular podrían ser informativos. Sin embargo, estos análisis específicos están fuera del alcance del presente estudio.

En conclusión, este estudio es un intento inicial por entender la influencia mecánica en la biología de la placa de crecimiento. El modelo planteado, aunque simple, revela información importante relacionada con los esfuerzos mecánicos en la epífisis y en la placa de crecimiento y en el proceso de osificación. Los resultados del estudio pueden ser útiles para entender los mecanismos subyacentes a la influencia de estímulos mecánicos en el desarrollo óseo, en particular para formular hipótesis en relación a las patologías óseas que resultan de condiciones genéticas o adquiridas. No obstante, es necesario considerar trabajos adicionales para considerar factores como la forma epifisaria, diferentes condiciones de carga, y la morfología de la placa de crecimiento en huesos específicos.

4. Escenarios del desarrollo de la epífisis y de la placa de crecimiento bajo cargas mecánicas: Enfoque computacional

4.1. Introducción

El desarrollo óseo es un proceso complejo. Este empieza temprano durante el desarrollo embriológico con la formación de un molde cartilaginoso por medio del proceso de condrogénesis. Este molde se osifica progresivamente mediante un proceso conocido como osificación endocondral. Durante esta transición de cartílago a hueso, la matriz extracelular (MEC) sufre cambios asociados con la diferenciación de los condrocitos a un fenotipo hipertrófico. De esta manera, los condrocitos se ven sometidos a cambios en la morfología celular, el estado de proliferación y la síntesis de MEC conduciendo finalmente al reclutamiento de células óseas e invasión vascular para iniciar la mineralización del tejido ^{1,7,9}.

La osificación inicia durante el primer trimestre de la gestación en humanos con el establecimiento del centro primario de osificación (CPO) en la región central de alargamiento. El proceso de osificación se expande hacia la periferia dando origen a una diáfisis flanqueada en ambos extremos por una epífisis cartilaginosa. Al final de la gestación la epífisis se somete a una serie de cambios en el desarrollo al igual que en la diáfisis, con la formación del centro secundario de osificación (CSO).

Finalmente, entre las edades de cinco y seis años el SOC se alarga hasta completar la osificación de la epífisis, manteniendo la región cartilaginosa en la superficie articular y en la placa de crecimiento ³⁰. El cartílago articular permanecerá durante toda la vida actuando como una estructura que absorbe choques y que provee una superficie de baja fricción. Además, esta estructura asegura una movilidad articular adecuada y la capacidad de absorber cargas, así como de preservar la integridad del hueso subcondral. ^{55,56} Después

de la pubertad la placa de crecimiento es completamente reabsorbida con la fusión de la epífisis y la metáfisis.²

La osificación endocondral es un proceso altamente regulado por estímulos biológicos y mecánicos. Ambos determinan la velocidad de la formación del hueso y consecuentemente las tasas de crecimiento ⁵⁷. La diferenciación de los condrocitos es influenciada biológicamente por factores solubles locales y sistémicos, así como por los componentes de la MEC, los cuales regulan el progreso de una etapa a la siguiente.^{47,58} Varias hormonas se ven involucradas sistémicamente, las cuales varían dependiendo de la edad, el género y el estatus nutricional. ^{47,59} Localmente, los condrocitos en diferentes etapas sintetizan una plétora de factores de crecimiento y morfógenos, generando gradientes responsables de la estimulación de programas celulares específicos.^{46,47,15}

Adicionalmente a los factores biológicos, se ha reconocido ampliamente que el crecimiento del hueso se ve influenciado por cargas mecánicas también, como se planteó en la ley de Hueter-Volkman. Estas asociaciones se sugirieron inicialmente en base a observaciones clínicas. ^{10,11} Estas observaciones se confirmaron por evidencia de estudios *in vitro* e *in vivo* que demostraron que los estímulos mecánicos pueden desencadenar cambios en las tasas de proliferación de los condrocitos, el tamaño de las células hipertróficas, alteraciones en los componentes de la MEC, con la expresión y síntesis de moléculas reguladoras ^{10,13,51,60,61}. Con el fin de mejorar el entendimiento sobre el papel de los estímulos mecánicos sobre el desarrollo de los huesos, se han realizado varias aproximaciones teóricas.

Estudios computacionales iniciales sobre el ambiente mecánico durante el desarrollo del SOC, realizados por Carter y Wong, revelaron asociaciones entre el estrés octaédrico cortante (s) y las zonas de osificación; así como la presión hidrostática (p) en las zonas cartilaginosas ³⁸. Trabajos previos se han enfocado en la caracterización del ambiente mecánico y su relación con la osificación de la epífisis, ^{19-21,24,25,39,41,62} el desarrollo de la articulación ³⁸ y la formación inicial del hueso. ^{54,63,64} Sin embargo, los estímulos mecánicos en la placa de crecimiento y su aplicación en las tasas de crecimiento se han explorado muy pobremente.

En este trabajo contribuye al entendimiento del ambiente mecánico en la placa de crecimiento enfocándose en dos objetivos principales: primero, establecer los patrones que

se pueden correlacionar con el conocimiento del comportamiento biológico de la placa de crecimiento; y segundo, explorar si en la placa de crecimiento, la influencia mecánica puede jugar un papel similar al propuesto para el desarrollo de la epífisis. De esta manera, se realizó un análisis computacional de la distribución de esfuerzos en la placa de crecimiento y la epífisis durante diferentes etapas del desarrollo y su asociación con los cambios fisiológicos en las tasas de crecimiento observadas durante el desarrollo del hueso. La información derivada de este estudio puede esclarecer una posible interacción biológica-mecánica en la función de una placa de crecimiento normal, lo que será útil para un mejor entendimiento de los eventos asociados con el crecimiento de huesos largos y la posible implicación de los estímulos mecánicos en situaciones patológicas.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Modelo

Se modeló una morfología genérica que representa un extremo de un hueso largo, consistiendo de una geometría axisimétrica con una superficie articular redondeada. La geometría designada se dividió en cuatro regiones: diáfisis, placa de crecimiento, nódulo de Ranvier, epífisis y cartílago articular (Fig. 4-1).

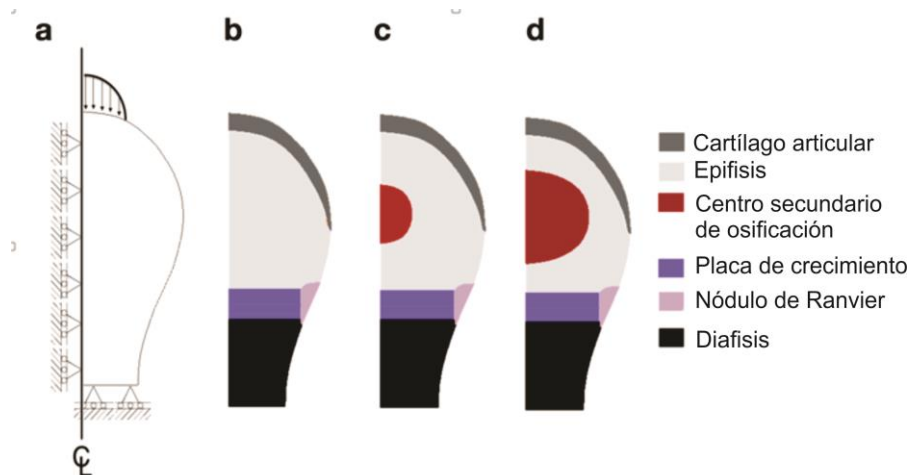


Figura 4-1. Geometría de un hueso genérico. **A)** Restricciones y localización de la carga mecánica. **B)** Geometrías correspondientes a las etapas 1 y 4. **C)** Geometría de la etapa 2. **D)** Geometría de la etapa 3.

Se usó un modelo elástico lineal a pesar de que el cartílago es un tejido altamente hidratado, considerando que la carga aplicada fue estática y constante, y que el flujo del fluido de contorno no se tomó en cuenta. Las propiedades mecánicas se asignaron considerando tres tipos principales de acuerdo a Piszczatowski, 2011: hueso trabecular (módulo de elasticidad: 345; coeficiente de Poisson: 0.3), cartílago (módulo de elasticidad: 6.0; coeficiente de Poisson: 0.495), y tejido fibroso (módulo de elasticidad: 10; coeficiente de Poisson: 0.3). Para todas las simulaciones la diáfisis se consideró como hueso trabecular; el nódulo de Ranvier como tejido fibroso, el cartílago articular y la placa de crecimiento con las mismas propiedades mecánicas del cartílago.

El modelo incluye eventos posteriores a la osificación de la diáfisis. Para estudiar el ambiente mecánico del desarrollo del hueso, se simularon cuatro etapas que recapitulan los eventos secuenciales observados en el desarrollo de huesos largos en humanos.

Etapa 1: epífisis completamente cartilaginosa (Fig. 4-1B). Esta etapa corresponde al desarrollo embriológico, desde la formación del blastema.

Etapa 2: se incluyó una área pequeña de hueso trabecular en la epífisis, representando las etapas de formación del SOC (Fig. 4-1C). Esta etapa se presenta desde el periodo perinatal hasta el primer año de vida dependiendo del hueso.

Etapa 3: se incluyó un área de hueso trabecular de tamaño medio en la epífisis, representando una fase intermedia del crecimiento del SOC (Fig. 4-1D). El alargamiento del centro secundario de osificación se presenta en la infancia desde los dos a cinco años de edad para la mayoría de los huesos.

Etapa 4: epífisis completamente osificada, donde todos los tejidos se consideraron como hueso trabecular (Fig. 4-1B). Para la mayoría de los huesos esta etapa se alcanza en la infancia media cerca de los 6 años de edad.

Los análisis se realizaron por el método de elementos finitos, usando un modelo elástico lineal. Siguiendo las ideas sugeridas por Peinado y colaboradores, ²⁵ para todas las simulaciones se usó una carga constante máxima de 1Mpa aplicada como una curva parabólica en la superficie articular y alineada con el eje de crecimiento (Fig. 4-1A *flechas*). Las condiciones de contorno se definieron como constantes de desplazamiento cero para

el eje Y en el borde inferior de la geometría, y para el eje X en el contorno izquierdo (contorno axisimétrico) (Fig. 4-1).

4.2.2. Índice osteogénico

Carter y Wong describieron la red de estímulos mecánicos para la osificación como el índice osteogénico (IO) descrito por la siguiente ecuación: ³⁸

$$OI = S + kP$$

Donde S es el estrés octaédrico cortante, P es la presión hidrostática y el parámetro adicional *k*, el cual asume diferentes valores ³⁸. Carter usó un valor constante *k* para la simulación del desarrollo del SOC.^{38,21,62} Dado que se consideró que *k* representa los cambios fisiológicos durante el desarrollo del hueso, se hipotetizó que *k* debe variar en el tiempo dependiendo de los cambios bioquímicos para cada etapa de la maduración del hueso. Por esta razón, se propuso considerar *k*, no como constante, sino como un factor de ponderación biológica que varía durante el desarrollo del hueso para cada etapa. Como una prueba de concepto, se evaluaron diferentes valores de *k* empezando desde 0.01 hasta 0.25 (0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25) para las cuatro etapas del desarrollo propuestas.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Distribución de esfuerzos

4.3.1.1. Presión hidrostática

En la epífisis, la presión hidrostática (P) alcanzó valores altos en áreas correspondientes al cartílago articular y a la placa de crecimiento para todas las simulaciones realizadas. En esta última, P incremento concomitantemente con el progreso de la osificación epifisaria (Fig. 4-2). Estos resultados concuerdan con el papel propuesto de P en la conservación del cartílago.³⁸ Estas relaciones teóricas se han evaluado en estudios *in vitro*, donde los condrocitos bajo presiones hidrostáticas cíclicas han regulado corriente abajo la

producción de marcadores de hipertrofia los cuales incrementan con la síntesis de matriz, soportando el papel condro-protector propuesto. ⁶⁵⁻⁶⁷

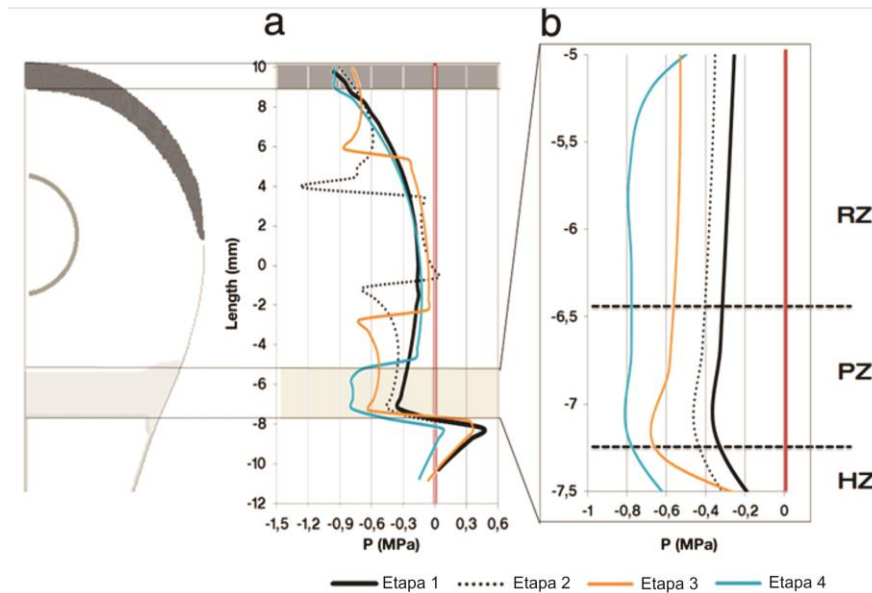


Figura 4-2. A) Distribución de la presión hidrostática (P) en la epífisis y la placa de crecimiento. **B)** Ampliación descriptiva para cada zona de la placa de crecimiento.

De acuerdo a esto, los resultados de este trabajo sugieren que a medida que la osificación de la epífisis progresa, los estímulos mecánicos en la placa de crecimiento, generan un papel protector. Así como en etapas tardías, la influencia mecánica puede estar más relacionada con el mantenimiento de esta estructura cartilaginosa en vez de favorecer el crecimiento.

4.3.1.2. Estrés octaédrico cortante

Estudios recientes realizados por Carter *et al.* Sugieren que altos valores de estrés octaédrico cortante (S) promueven el proceso de osificación.^{38,21,20} De acuerdo a esta teoría, los resultados en la epífisis cartilaginosa simulada en este trabajo muestran altos valores de estrés octaédrico cortante total (S) en el área donde se desarrollara el SOC.³⁸ De esta manera, desde que el SOC aparece y durante su expansión, se alcanzan altos valores de estrés octaédrico cortante al rededor del SOC en las áreas correspondientes al frente de osificación. Esto contrasta con valores bajos alcanzados en las regiones cartilaginosas, tales como la superficie articular y la placa de crecimiento (Fig. 4-3A).

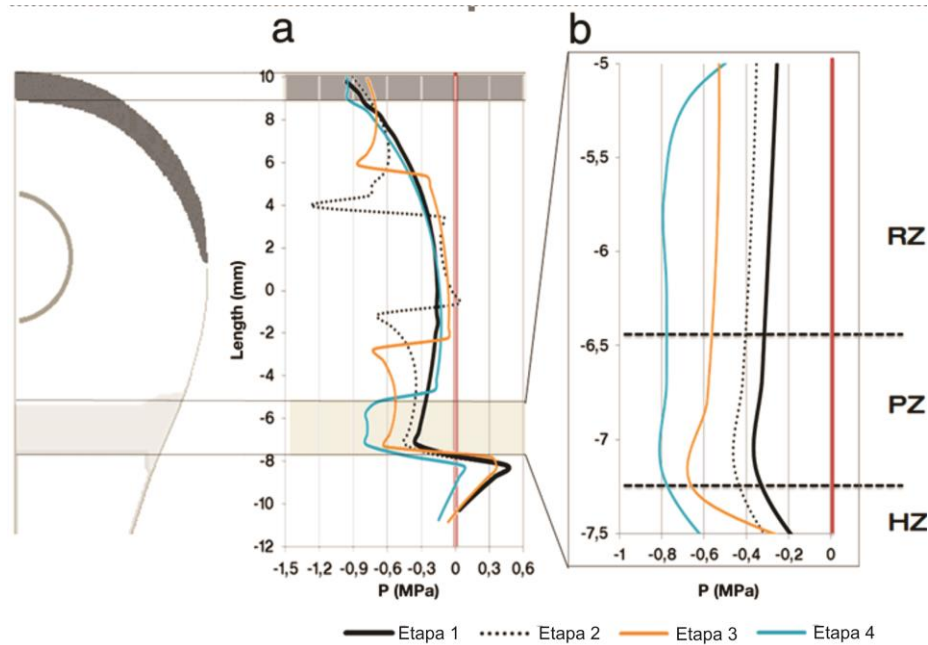


Figura 4-3. A) Distribución del esfuerzo octaédrico cortante (S) en la epífisis y la placa de crecimiento. **B)** Ampliación descriptiva para cada zona de la placa de crecimiento.

Estos resultados pueden indicar la asociación entre altos valores de S y un disparo de procesos celulares específicos para el proceso de diferenciación. Se ha reportado en la literatura que estos eventos incluyen la síntesis de factores solubles, tales como factores de crecimiento, morfógenos o inhibidores, además de promover la proliferación celular.^{51,60,61,68-71} Esta afirmación está soportada por estudios *in vitro* que sugiere la capacidad de los condrocitos de sentir cambios en la MEC secundarios al estrés mecánico⁶⁶. Reportes indican que estos cambios se presentan principalmente en las proteínas de membrana que interactúan directamente con la MEC y con los canales de iones mecanosensibles, conduciendo a cambios en la respuesta biológica de decrecimiento de la síntesis de MEC e incluyendo los cambios moleculares asociados con la apoptosis.⁶⁶

4.3.1.3. Índice osteogénico

El índice osteogénico (IO) es un indicador de la potencial formación del hueso asociada con estímulos mecánicos.^{20,21,38} Los valores del índice osteogénico se interpretaron considerando cero como el punto de corte. De esta manera, valores negativos de IO previenen la osificación manteniendo el tejido cartilaginoso, mientras que cuando son

positivos favorecen la formación del hueso. De acuerdo a esto, los resultados exhibieron valores altos de IO en regiones donde se espera osificación como en la epífisis (Fig. 4-4 – etapa 1, eje Y desde -4 a -7). Por otra parte, se observaron valores bajos especialmente en la zona del cartílago articular (Fig. 4-4 – etapa 1, eje Y desde -5 a -7).

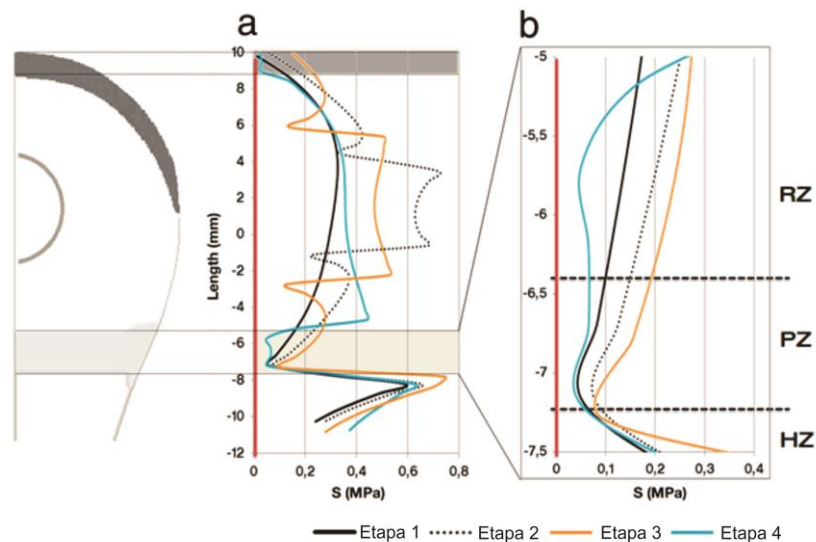


Figura 4-4. A) Distribución del índice osteogénico (IO) en la epífisis y la placa de crecimiento. **B)** Ampliación descriptiva para cada zona de la placa de crecimiento.

El crecimiento de la placa de crecimiento es responsable del crecimiento longitudinal por medio de la osificación endocondral². Por lo tanto, la tasa de crecimiento está relacionada con la velocidad de osificación. Generalmente los resultados exhiben valores de IO cercanos a cero, los cuales solo alcanzan valores levemente positivos en el área que corresponde a la zona de reserva (Fig. 4-4B). Se sugirió que estos valores positivos representan un potencial crecimiento. De la misma forma la teoría de Carter propuso una relación directa para la epífisis entre los valores de IO y la velocidad de osificación, de esta manera se podría especular que estos mismos eventos se presentan en la placa de crecimiento.³⁸ En conclusión, el IO de la placa de crecimiento puede ser un indicador de la tasa de crecimiento.

De acuerdo a la Figura 4-5b las etapas de osificación 1,2 y 3 presentan valores similares de IO. Basados en estos resultados, y solo teniendo en cuenta el estímulo mecánico, se podría esperar velocidades de crecimiento comparables en estas etapas. Sin embargo, los datos biológicos indican una alta tasa de crecimiento durante el desarrollo embriológico,

decreciendo progresivamente durante los primeros dos años de vida.⁷² Después entre los 2 y los 10 años de edad, se alcanza una estabilización seguida por un incremento final en la adolescencia. Después de esto, se observa un continuo decrecimiento hasta que la placa de crecimiento se cierra a la edad de 20 años (Fig. 4-5).⁷²

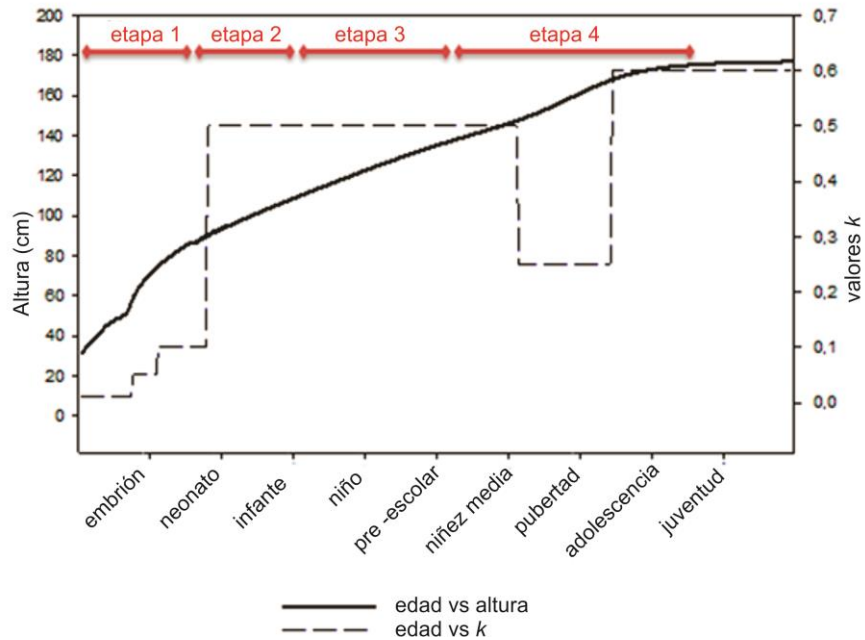


Figura 4-5. Comparación de los valores del factor k de acuerdo a la etapa del crecimiento.

La tasa de crecimiento es el resultado de interacciones mecánicas y biológicas que cambian de acuerdo a la edad.^{47,59} Con el fin de describir adecuadamente esta relación se propuso la modificación de la estimación del IO, considerando “ k ” como una variable evolutiva que representa el comportamiento de factores no mecánicos que varían de acuerdo al estado del desarrollo del hueso (etapas 1-4).

Como una prueba de concepto, se realizaron simulaciones considerando cambios en k para una epífisis completamente osificada la cual se presenta durante la adolescencia (etapa 4). Los resultados indican valores de IO cercanos a cero tendiendo a ser positivos para valores de k que varían desde 0.1 a 0.025. Esto se puede interpretar como un estímulo mecánico despreciable. Consecuentemente el incremento en la tasa de crecimiento se puede explicar mejor por factores biológicos. De acuerdo a esto, se observó que en la placa de crecimiento disminuyendo los valores de k por debajo de 0.1 permite alcanzar valores de IO para un incremento adicional en la tasa de crecimiento durante la

adolescencia (Fig. 4-6A). Además, un incremento sostenido del IO podría estar relacionado con el cierre de la placa de crecimiento observado al final de la adolescencia.^{7,35}

En comparación los valores de IO para el cartílago articular permanecen negativos a pesar del decrecimiento de los valores de k variando desde 0.1 a 0.05 (Fig. 4-6B). Estos resultados concuerdan con el comportamiento esperado para el cartílago articular, dado que el mantenimiento del cartílago es esencial para la función articular.^{55,56}

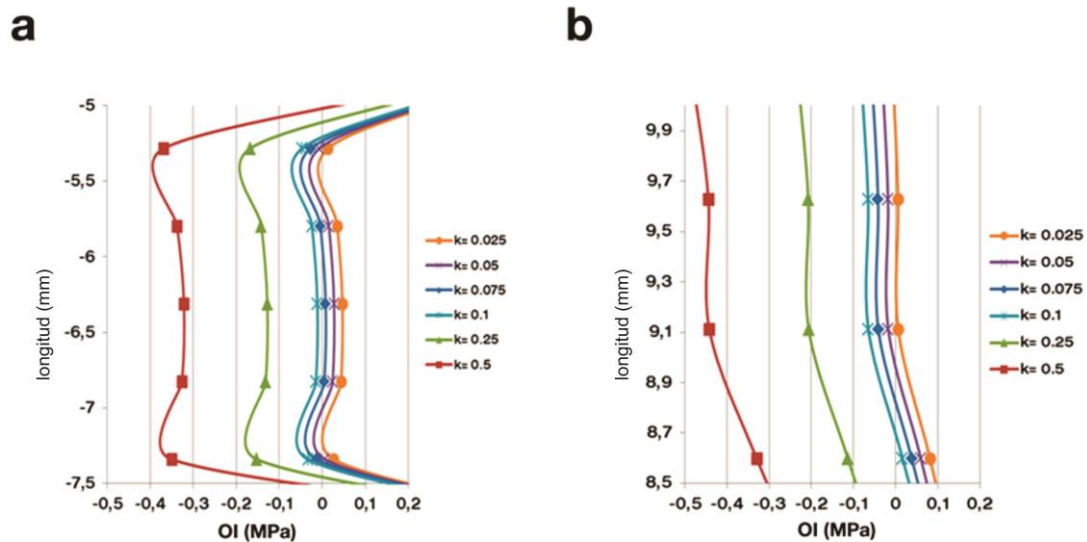


Figura 4-6. A) Variación del factor k debajo de 0.1. **B)** Variación en los valores del factor k para el cartílago articular.

4.4. Conclusión

Este trabajo computacional presenta un análisis detallado de la distribución de esfuerzos sobre la estructura de la placa de crecimiento en diferentes etapas del desarrollo del hueso, el cual, para un mejor entendimiento, no se ha abordado anteriormente en la literatura. Los resultados de este estudio sugieren que los estímulos mecánicos pueden afectar de igual forma la osificación de la placa de crecimiento y de la epífisis. Adicionalmente, en la placa de crecimiento estos estímulos muestran variaciones durante cada etapa del desarrollo del hueso. De acuerdo a esto, una aproximación completamente mecánica para el desarrollo del hueso representa satisfactoriamente el comportamiento biológico durante etapas iniciales, aunque falla una vez se ha osificado completamente la epífisis. Además, se presentan cambios en la tasa de crecimiento durante la vida no se pueden predecir.

Para mejorar la relevancia biológica de aproximaciones netamente mecánicas, y fortalecer el IO como un indicador general del estímulo de la osificación se sugirió considerar valores cambiantes de k , especialmente para la placa de crecimiento, de acuerdo a la etapa de desarrollo del hueso para integrar influencias mecánicas y eventos moleculares que conducen a la madurez del hueso. Con el fin de tener un indicador de osificación que integre tanto el efecto mecánico como biológico se propuso el mismo índice osteogénico descrito por Carter et al., considerando sin embargo a k como el factor variable reflejando influencias bioquímicas para cada etapa específica. Teniendo esto en cuenta, se deben dirigir más estudios para definir matemáticamente el factor k y determinar posibles valores para diferentes etapas del desarrollo.

5. Modelo de la placa de crecimiento

5.1. Introducción

La placa de crecimiento es una estructura cartilaginosa, constituida por una matriz extracelular rica en proteoglicanos y colágeno tipo II, y cuyo principal tipo celular es el condrocito. Esta estructura

es la encargada del crecimiento longitudinal de los huesos largos por medio de un proceso conocido como osificación endocondral.^{9,2} En este proceso, el cartílago es reemplazado continuamente por hueso a través de un ciclo que inicia con la proliferación de los condrocitos, continúa con la síntesis de matriz extracelular y la hipertrofia celular y termina con la mineralización de la matriz extracelular, la invasión vascular y la apoptosis de los condrocitos hipertróficos.^{7,1} En concordancia con las funciones anteriormente descritas, la placa de crecimiento se divide histológicamente en tres grandes zonas: reserva, proliferativa e hipertrófica. La zona de reserva se caracteriza por la presencia de condrocitos esféricos con baja tasa de proliferación y por tener matriz extracelular abundante. Por otra parte, la zona proliferativa contiene condrocitos aplanados, que poseen una alta actividad replicativa y se organizan formando columnas. Finalmente, en la zona hipertrófica, los condrocitos columnares cesan su división e inician un proceso de diferenciación celular terminal. Este proceso se caracteriza por un aumento de hasta 10 veces del volumen, síntesis de proteínas que permiten la calcificación de la matriz extracelular y formación de vasos sanguíneos y osteoblastos.^{9,15}

El proceso de hipertrofia constituye un paso crucial en el crecimiento longitudinal de los huesos, ya que aporta cerca del 70% del crecimiento total, mientras que el 30% restante lo provee el proceso de proliferación.^{10,13} La transición de los condrocitos de la zona proliferativa a la zona hipertrófica se encuentra altamente regulada tanto por factores bioquímicos (sistémicos y locales), como por factores mecánicos. Dentro de los factores bioquímicos, destacan dos proteínas que actúan en conjunto, formando un bucle regulatorio: Indian hedgehog (Ihh) y el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP, por sus siglas en inglés). Ihh es producida por las células en estado prehipertrófico, y se difunde hacia la zona de reserva, donde activa la producción de PTHrP. Esta, a su vez, aumenta la proliferación celular y retrasa el proceso de

hipertrofia.^{15,58,1,7} Dicho bucle ha sido reportado como un posible regulador mayor del proceso de hipertrofia en la placa de crecimiento.¹⁶ En cuanto a los factores mecánicos, la ley de Hueter-Volkman establece que la compresión dinámica es esencial para el desarrollo óseo; sin embargo, el exceso de carga puede alterar el crecimiento normal del hueso. Esto hace que la placa de crecimiento sea sensible a su ambiente mecánico. En particular, el tamaño y el número de las células presentes en la placa se ven afectados por dichas cargas. Esto implica que los tamaños de las distintas zonas de la placa también son sensibles al entorno mecánico. En efecto, diversos estudios reportan que la aplicación de cargas mecánicas afecta el tamaño de las zonas proliferativa e hipertrófica.^{15,10,73,74,75} Además, desde el punto de vista experimental se ha mostrado que las cargas también afectan la síntesis de proteínas de la matriz, morfógenos y factores de crecimiento.^{76,68,70,71,60,50,51,61,77} .

El proceso de transición de los condrocitos de proliferación a hipertrofia también se ha estudiado *in silico* a través de la formulación de diversos modelos matemáticos. Estos describen el comportamiento de la placa de crecimiento durante el proceso de osificación endocondral, enfocándose principalmente en el avance del frente de osificación como función de algunos parámetros bioquímicos o mecánicos.^{17,26,78,19,20,27} Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no detallan el efecto de dichos estímulos sobre los condrocitos en la placa de crecimiento. Otros trabajos, por su parte, consideran la osificación de la placa a escala macroscópica, sin detallar los procesos celulares que se llevan a cabo en ella, limitando su capacidad para analizar el comportamiento microscópico de la placa de crecimiento.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se presenta el desarrollo de un modelo matemático que simula la transición de condrocitos desde la zona proliferativa a la zona hipertrófica al interior de una columna de la placa de crecimiento. Este proceso se encuentra regulado por el bucle bioquímico (Ihh-PTHrP) y por la carga mecánica (compresión y tensión). El modelo propuesto logra reproducir el comportamiento de las células durante el proceso de hipertrofia, en términos de producción de las moléculas reguladoras y de variaciones en la altura celular.

5.2. Materiales y métodos

La osificación endocondral, responsable del crecimiento longitudinal del hueso, se encuentra sujeta al proceso continuo de proliferación e hipertrofia de los condrocitos al interior de cada columna de la placa de crecimiento.² Estos procesos se encuentran regulados por factores bioquímicos y mecánicos. Teniendo en cuenta lo anterior, se formuló un modelo matemático para la transición de los condrocitos en estado proliferativo a hipertrófico. Este considera la influencia de las cargas mecánicas y la acción bioquímica en la regulación del crecimiento celular y se basa en los siguientes supuestos:

- El proceso de hipertrofia es anisotrópico en la dirección axial del hueso y se encuentra controlado únicamente por la carga mecánica y el componente bioquímico. La carga mecánica afecta el tamaño y la morfología celular, mientras que el componente bioquímico regula el tiempo de hipertrofia.^{79,7,80,57,53,81}
- El componente bioquímico que se modeló, involucra únicamente la interacción entre Ihh y PTHrP.^{16,2} Ihh es expresado a través de la membrana celular de la célula hipertrófica y estimula la producción de PTHrP. Por su parte PTHrP es producido en la frontera de la zona de reserva y proliferativa. Esta molécula retrasa el proceso de hipertrofia.^{16,82,83}
- El comportamiento mecánico de los componentes celulares y extracelulares se modeló como elástico-lineal, teniendo en cuenta que: 1) no se consideraron grandes deformaciones; y 2) la placa de crecimiento es una estructura esencialmente avascular donde no ocurren grandes intercambios de fluidos.^{9,2}
- La mineralización inicia una vez el condrocito finaliza su proceso de hipertrofia. Este proceso no se ve afectado directamente por la presencia de la carga mecánica o del bucle bioquímico.^{81,2}

De acuerdo a lo anterior, las variables principales del modelo son la carga mecánica, en forma de una presión aplicada (P), y las concentraciones de Ihh (SI) y PTHrP (SP). En las secciones siguientes, se describirá el dominio del problema y se presentarán las ecuaciones correspondientes al modelo de la deformación celular, el bucle bioquímico y el avance del frente de osificación.

5.2.1. Descripción del modelo matemático

5.2.1.1. Bucle bioquímico

Desde el punto de vista bioquímico, se consideró que el proceso de hipertrofia está regulado únicamente por la interacción entre Ihh y PTHrP. Ihh es un morfógeno sintetizado por las células que se encuentran en los primeros estadios de hipertrofia. Esta molécula se difunde a lo largo de la placa de crecimiento, estimulando la síntesis de PTHrP en las células ubicadas en la zona de reserva.^{9,2,1,7,28,82,83} Por su parte, PTHrP inhibe la síntesis de Ihh, dado que retrasa el proceso de hipertrofia, manteniendo las células en estado proliferativo (Fig. 5-1).^{1,7,28,82,83}

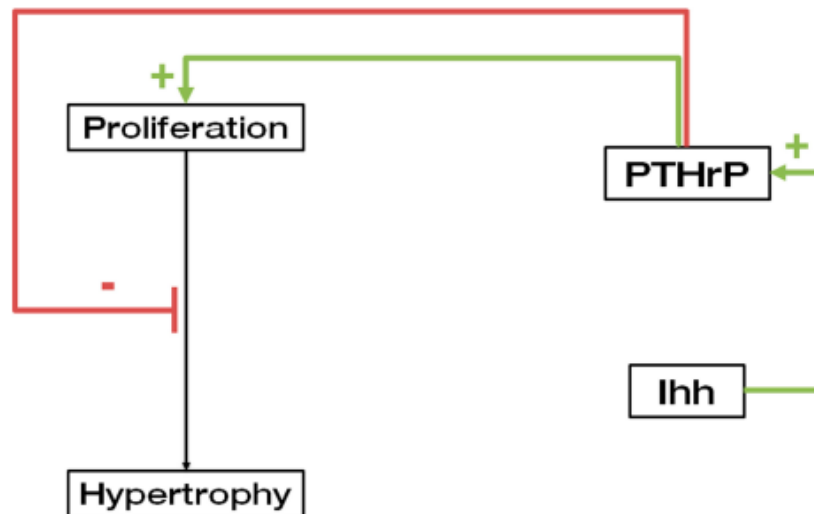


Figura 5-1. Diagrama esquemático del bucle regulatorio Ihh-PTHrP. El esquema muestra las interacciones entre Ihh y PTHrP, así como la influencia de estas moléculas sobre los procesos de proliferación y la transición entre estado proliferativo e hipertrófico (indicada mediante la flecha negra). En verde se indican los estímulos positivos. En rojo se indica inhibición.

De acuerdo a lo anterior, se supuso que el bucle regulatorio Ihh-PTHrP forma un sistema de ecuaciones de reacción difusión. A continuación, se mostrarán las ecuaciones que rigen las concentraciones de Ihh y PTHrP.

5.2.1.1.1. Concentración de PTHrP

La concentración de PTHrP (s_p) aumenta debido a la presencia de lhh en la zona de reserva (identificada por el borde T de la figura 5-2). De esta manera, el cambio en la concentración de PTHrP en el tiempo se debe a la difusión de la molécula en la matriz extracelular, a su degradación y a la velocidad del crecimiento del dominio:

$$\underbrace{\frac{dS_p}{dt}}_{\text{Cambio en el tiempo}} + \underbrace{S_p \nabla \cdot \mathbf{v}}_{\text{Velocidad de crecimiento del dominio}} = \underbrace{D_p \nabla^2 S_p}_{\text{Difusión de la molécula}} - \underbrace{\frac{\ln(2)}{\tau_p} S_p}_{\text{Degradación}} \quad (1)$$

Donde S_p representa la concentración de PTHrP, D_p su coeficiente de difusión, τ_p su tiempo de vida medio y v la velocidad de crecimiento del dominio. Esta velocidad se encuentra relacionada con el tensor velocidad de deformación ($\dot{\epsilon}$) de la siguiente manera:

$$tr(\dot{\epsilon}) = \nabla \cdot \mathbf{V}, \quad (2)$$

con $tr(\dot{\epsilon})$ como la traza del tensor $\dot{\epsilon} \cdot \nabla \cdot \mathbf{V}$ es la divergencia del vector v . Desarrollando la ecuación 2, y teniendo en cuenta que el crecimiento celular sólo se da en la dirección preferencial del eje del hueso y que el modelo asume una condición de deformación plana, esta ecuación se reduce a:

$$\dot{\epsilon}_y = \frac{\partial v_y}{\partial y}, \quad (3)$$

$\dot{\epsilon}_y$, y $\frac{\partial v_{x,y}}{\partial x,y}$ indican las componentes en la dirección axial del hueso (y) del tensor $\dot{\epsilon}$ y de la derivada parcial del vector v , respectivamente.

Teniendo en cuenta que, biológicamente, PTHrP se produce sólo en la zona de reserva, el modelo consideró que dicha producción se limita a la frontera entre las zonas de reserva y proliferativa, que corresponde al límite superior del dominio del problema (borde (Γ_T) en la Figura 5-2).

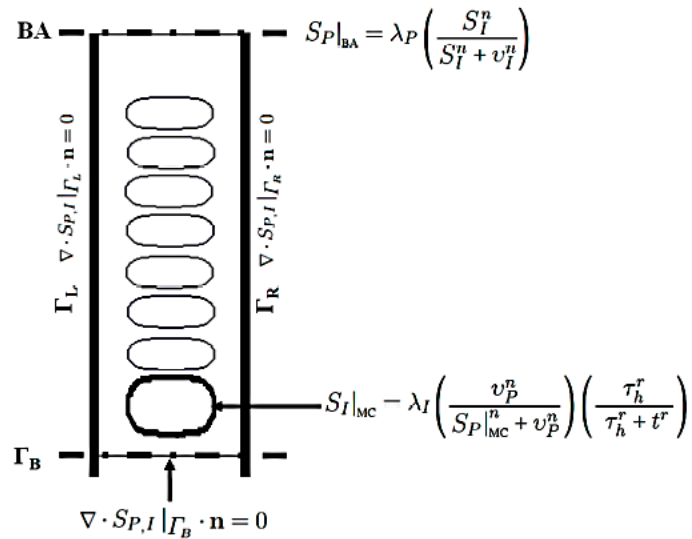


Figura 5-2. Representación esquemática de las condiciones de frontera bioquímicas en el dominio Ω del problema.

De esta manera, la ecuación 1 está sujeta a la siguiente condición de borde:

$$S_P|_{\Gamma_T} = \lambda_P * \psi_P(S_I), \quad (4)$$

Donde S_P representa la concentración de PTHrP en Γ_T (que es la frontera entre la zona de reserva y la zona proliferativa (Figura 5-2)). El valor λ_P representa una constante que indica la cantidad máxima de PTHrP en el borde superior debido a que las células que están en la zona de reserva, o en el pericondrio; y $\psi_P(S_I)$ es una función que depende de la concentración de Ihh (S_I). Dicha función indica que la producción de PTHrP sólo ocurre

bajo el estímulo de Ihh (Figura 5-3). De esta manera, $\psi_P(S_I)$ viene dada por la siguiente expresión:

$$\psi_P(S_I) = \frac{S_I^n}{S_I^n + Th_{S_I}^n}, \quad (5)$$

S_I es la concentración de Ihh que detectan las células que expresan PTHrP en la frontera T (figura 5-2). Th_{S_I} indica un valor umbral de la concentración de Ihh al cual se activa la producción de PTHrP. El valor n representa la pendiente del escalón en la figura 5-4. Los valores de las constantes empleadas se muestran en la Tabla 5-2.

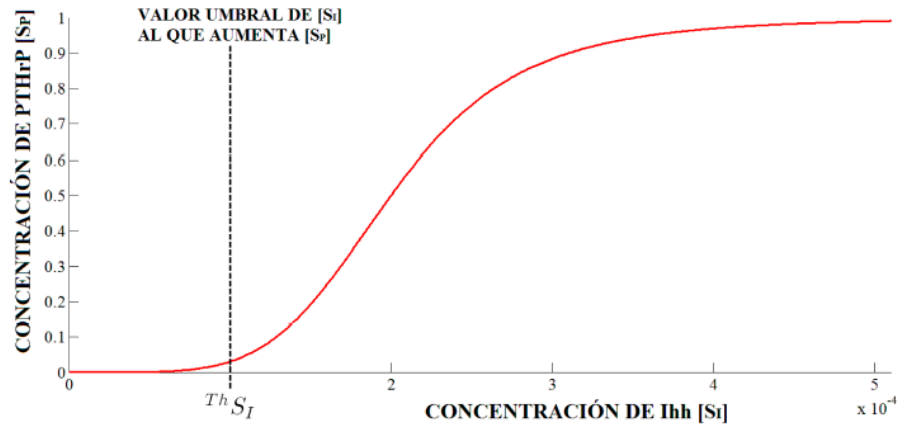


Figura 5-3. Representación esquemática de la concentración de PTHrP ($[S_P]$), como una función de la concentración de Ihh ($[S_I]$). El valor umbral de activación para la producción de PTHrP está representado por Th_{S_I} .

Adicionalmente, dado que la columna modelada presenta periodicidad, se supuso que el flujo de PTHrP ($\nabla S_P \cdot n$) en los bordes lateral izquierdo (Γ_L), lateral derecho (Γ_R) e inferior (Γ_B) del dominio es cero (Figura 5-2). Esto quiere decir que:

$$\nabla S_P |_{\Gamma_{L,R,B}} \cdot n = 0, \quad (6)$$

Donde $\nabla S_P|_{\Gamma_{L,R,B}}$ representa el flujo de PTHrP en los bordes lateral izquierdo, lateral derecho e inferior del dominio del problema, respectivamente.

5.2.1.1.2. Concentración de Ihh

La concentración de Ihh aumenta en ausencia de PTHrP y se produce al interior de las células en las primeras fases de la hipertrofia. Esta molécula es luego secretada a través de la membrana celular hacia la matriz extracelular. De acuerdo con lo anterior, y de manera similar a lo descrito para PTHrP, el cambio en la concentración de Ihh en el tiempo se debe a la difusión de la molécula en la matriz extracelular, a su degradación y a la velocidad de crecimiento del dominio:

$$\underbrace{\frac{dS_I}{dt}}_{\text{Cambio en el tiempo}} + \underbrace{S_I \nabla \cdot \mathbf{v}}_{\text{Velocidad de crecimiento del dominio}} = \underbrace{D_I \nabla^2 S_I}_{\text{Difusión de la molécula}} - \underbrace{\frac{\ln(2)}{\tau_I} S_I}_{\text{Degradación}} \quad (7)$$

representa la concentración de Ihh, D_I su coeficiente de difusión, τ_I su tiempo de vida medio y v la velocidad de crecimiento del dominio.

Dado que Ihh se produce solamente en los primeros estadios de las células que han iniciado el proceso de hipertrofia, el modelo consideró que dicha producción ocurre en la membrana celular (MC) de estas células. De esta manera, la ecuación 8 está sujeta a las siguientes condiciones de borde:

$$S_I|_{MC} = \lambda_I * \Psi_I(S_P, \tau_h, t), \quad (8)$$

donde $S_I|_{MC}$ indica la concentración de Ihh en la membrana celular de la célula que se encuentra en el proceso de hipertrofia. El valor λ_I representa la cantidad de Ihh secretada a través de la membrana celular, y la función $\psi_I(S_P, \tau_h, t)$ indica la producción de Ihh.

Dicha función depende de la concentración de PTHrP (S_P), que retrasa el proceso de hipertrofia; del tiempo de producción de Ihh (τ_h) y del estadio de hipertrofia celular, . De acuerdo con la literatura, la producción de Ihh ocurre en la zona prehipertrófica de la placa. ^{2,9} Por esta razón, se supuso que el tiempo de producción de Ihh de un condrocito (τ_h , figura 5-4) fue de 10 horas. La expresión para $\psi_I(S_P, \tau_h, t)$ viene dada a continuación:

$$\psi_I(S_P, \tau_h, t) = \left(\frac{Th S_P^n}{S_P|_{MC}^n + Th S_P^n} \right) \left(\frac{\tau_h^r}{\tau_h^r + t^r} \right), \quad (9)$$

$Th S_P^n$ indica un valor umbral de la concentración de PTHrP medido por el condrocito, al cual la expresión de Ihh disminuye, $S_P|_{MC}$ se refiere a la concentración promedio de PTHrP en la membrana celular, τ_h^r representa el tiempo total de la producción de Ihh durante el proceso de hipertrofia celular (ver Figura 5-4 para la explicación del inicio de los tiempos de hipertrofia). Los números r y n representan parámetros de forma de la gráfica de producción de Ihh (figura 5-5).

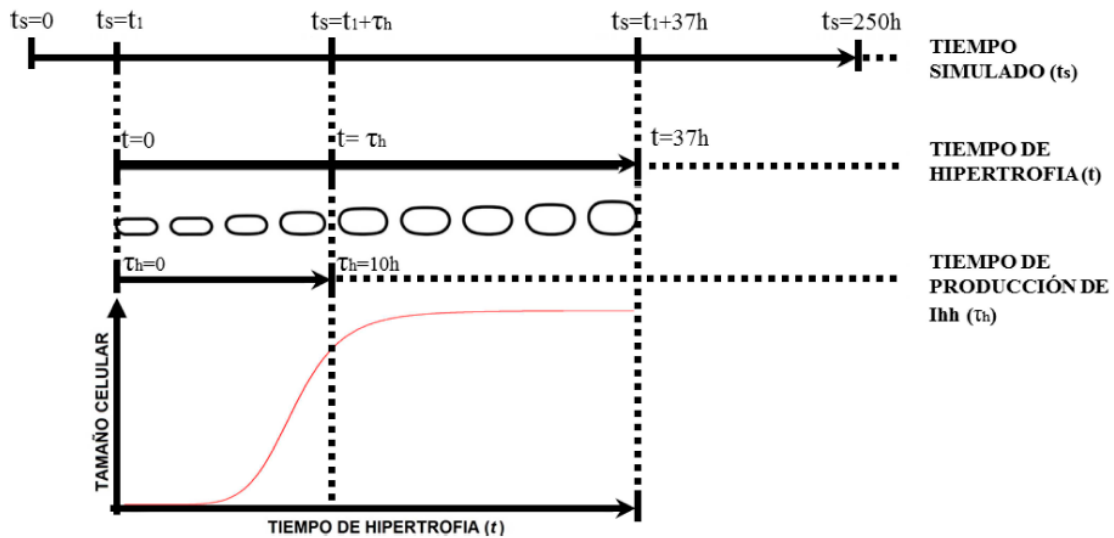


Figura 5-4. Representación de los tiempos de hipertrofia (t), tiempo de producción de Ihh (τ_h) y del tiempo simulado (ts).

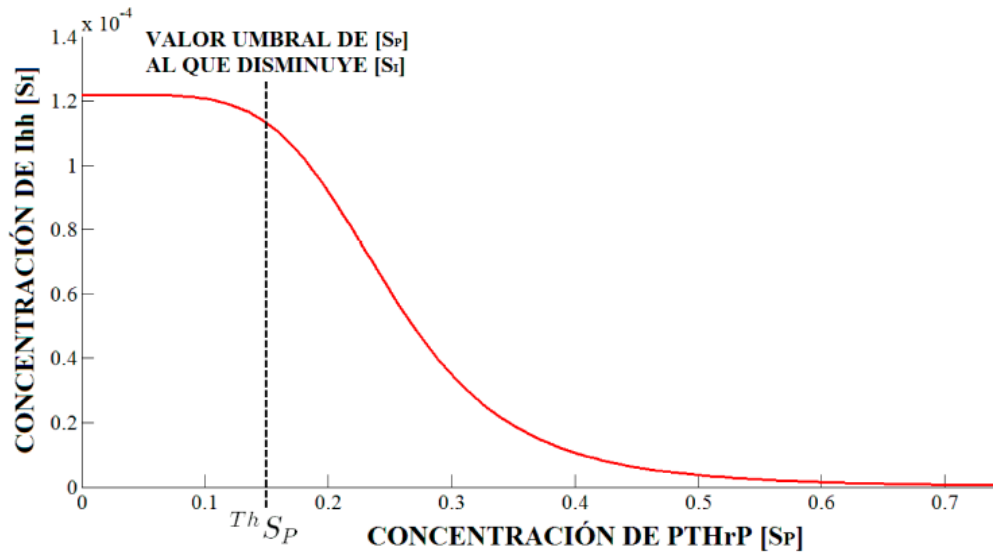


Figura 5-5. Representación esquemática de la gráfica de la concentración de Ihh ($[S_I]$) en función de la concentración de PTHrP ($[S_P]$). El valor Th_{S_P} representa un valor umbral de PTHrP para el cual la concentración de Ihh empieza a disminuir.

De manera similar a la sección anterior, se supuso que el flujo de Ihh en los bordes laterales del dominio es cero. Esto quiere decir que:

$$\nabla S_I |_{\Gamma_{L,R,B}} \cdot n = 0, \quad (10)$$

donde $\nabla S_I \cdot n$ representa el flujo de Ihh en la dirección normal al contorno y $\Gamma_{L,R,B}$ indican los bordes lateral izquierdo (Γ_L), lateral derecho (Γ_R) e inferior (Γ_B) en la figura 5-2.

Adicionalmente, se supuso que los tiempos de vida media de dichas moléculas vienen dada por la siguiente expresión:

$$\tau_P, \tau_I = \begin{cases} k_1 & \text{en la matriz extra y pericelular} \\ k_2 & \text{en el frente de osificación,} \end{cases}$$

donde τ_P es el tiempo de vida medio de PTHrP, τ_I el tiempo de vida medio de Ihh (Tabla 1). Se supuso que el tiempo de vida medio de Ihh y de PTHrP disminuyó en la zona

cercana al frente de osificación. Esto se debe a que existe un alto recambio de matriz peri y extracelular en la zona hipertrófica, como consecuencia de la presencia de un gran número de enzimas que pueden afectar la vida media de estas moléculas.^{15,46}

5.2.1.2. Crecimiento celular

El proceso de hipertrofia celular se caracteriza por un aumento del volumen de la célula como resultado del incremento en el tamaño de sus organelos.^{84,85} En la célula, este proceso ocurre de manera gradual de tal manera que esta alcanza su tamaño máximo en un tiempo aproximado de 24 horas.² En el modelo, el crecimiento celular se expresó en términos de la deformación experimentada por la célula (ε_t), que dependió del tiempo t de hipertrofia y de las cargas mecánicas impuestas.

Así, el tensor de velocidad de deformación celular $\dot{\varepsilon}$ viene expresado de la siguiente manera:

$$\dot{\varepsilon} = \gamma(t) * \alpha(\sigma_{mec}) n \otimes n, \quad (11)$$

Donde $\gamma(t)$ y $\alpha(\sigma_{mec})$ son funciones que dependen del tiempo de hipertrofia (t) y del esfuerzo en la célula debido a la carga impuesta. El vector n indica la dirección preferencial de crecimiento y se define de la siguiente manera:

$$n^T \equiv [0 \ 1], \quad (12)$$

La función $\gamma(t)$, que representa la función de la velocidad de crecimiento celular (Figura 5-6), se seleccionó de acuerdo con el comportamiento observado del crecimiento del condrocito durante el proceso de hipertrofia (Breur et al., 1994; Bush et al., 2008; Cooper et al., 2013). Esta función depende de 3 parámetros, β , θ y K (Tabla 5-2) que la regulan de tal manera que, cuando el condrocito inicia la hipertrofia ($t = 0$ horas), se presenta un periodo de crecimiento rápido; seguido por una disminución progresiva de la velocidad de

crecimiento, que se detiene completamente en el tiempo máximo de hipertrofia ($t = 24$ horas):

$$\gamma(t) = \frac{t^{\beta-1} e^{-t/\theta}}{K} \quad (13)$$

con, β , θ y K las constantes de la función $\gamma(t)$. El tiempo t se refiere al tiempo de hipertrofia de la célula (Figura 5-4).

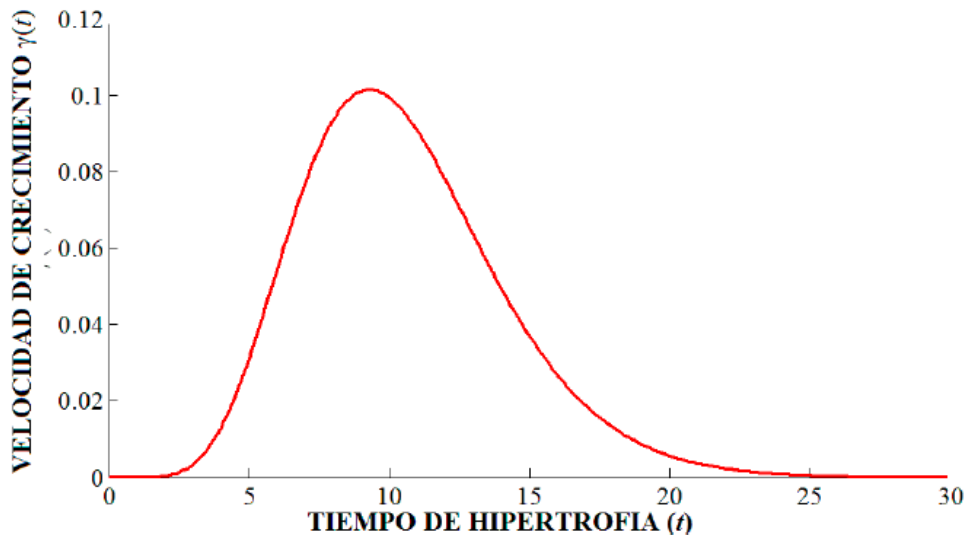


Figura 5-6. Función de la velocidad de crecimiento celular $\gamma(t)$. Para este caso, $\beta = 8.5$, $\theta = 1.4$ y $K = 1 \times 10^5$

Por su parte, la función $\alpha(\sigma_{mec})$ indica un factor de escalamiento de la deformación celular que depende del esfuerzo promedio en la célula tras la imposición de una carga mecánica (P). Esta función depende del esfuerzo mecánico promedio en la célula σ_{mec} , y concuerda con los principios establecidos por la ley de Hueter-Volkman. De esta manera se asumió que, si el esfuerzo en la célula σ_{mec} se encuentra en un rango fisiológico, la velocidad de crecimiento celular no sufrirá cambios; de lo contrario, experimentará modificaciones que dependerán del valor de dicho esfuerzo. Así, si este valor es inferior a una cantidad σ_{min} ,

que representa un esfuerzo compresivo, la velocidad de crecimiento disminuirá. En contraste, si es superior a un valor σ_{max} , que representa un esfuerzo a tensión, dicha velocidad sufrirá un aumento. Por último, si el esfuerzo se encuentra entre σ_{min} y σ_{max} , la velocidad de crecimiento se mantendrá inalterada.

La expresión para la función $\sigma(\sigma_{mec})$ viene dada por la siguiente ecuación:

$$\alpha(\sigma_{mec}) = \begin{cases} 0.75 & \sigma_{mec} < \sigma_{min} \\ 1 & \sigma_{min} \leq \sigma_{mec} \leq \sigma_{max} \\ 1.25 & \sigma_{mec} > \sigma_{max}, \end{cases} \quad (14)$$

donde σ_{mec} es el esfuerzo promedio en toda la célula debido a la acción de la carga impuesta, y σ_{min} y σ_{max} son valores de esfuerzo predeterminados. Para las simulaciones, los valores para σ_{max} y σ_{min} se encuentran resumidos en la tabla 2.

5.2.1.3.Frente de osificación

Se supuso que la mineralización del tejido de la matriz extra y pericelular y del condrocito, considerada como una función del tiempo, inicia una vez el condrocito termina su proceso de hipertrofia. Esto implica que el avance del frente de osificación es también una función del tiempo. De esta manera, la posición de dicho frente en el tiempo t viene dada por la siguiente expresión:

$$y_{os_t} = y_{os_{t-1}} + y_{os}\Delta t, \quad (15)$$

donde y_{os_t} es la posición del frente en el tiempo t , $y_{os_{t-1}}$ su posición en el tiempo anterior, y_{os} la tasa de avance del frente y Δt el incremento del tiempo. La expresión y_{os} yos viene dada por:

$$y_{os} = v_{os}\lambda_{os}, \quad (16)$$

Donde y_{os} indica el cambio en la posición del frente con respecto al tiempo, v_{os} la velocidad de osificación y os es una constante que depende del estado del condrocito en transición.

Tabla 5-1. Parámetros empleados en el modelo.

Parámetro	Descripción	Valor	Observaciones
β	Parámetros de forma para la función de crecimiento	8.5	Estimado
θ		1.4 horas	Estimado
K		$1 * 10^5$	Estimado
σ_{min}	Límite inferior de la función $\alpha(\sigma_{mec})$	$-1 * 10^{-11}$ Pa	Estimado
σ_{max}	Límite superior de la función $\alpha(\sigma_{mec})$	$1 * 10^{-11}$ Pa	Estimado
λ_p	Producción fija de PTHrP en la frontera RZ/PZ	1[unidades de masa]/ μm^3	Estimado
n	Pendiente del escalón en la curva de producción de PTHrP	4	Estimado
D_p	Coefficiente de difusión de PTHrP	$180000 \mu m^2 / hora$	(Browsers et al., 2006)
v_p	Valor umbral de la concentración de PTHrP	0.15 [unidades de masa]/ μm^3	Estimado
v_l	Valor umbral de la concentración de Ihh	$1 * 10^{-4}$ [unidades de masa]/ μm^3	Estimado
D_l	Coefficiente de difusión de Ihh	$180000 \mu m^2 / hora$	(Browsers et al., 2006)
λ_l	Producción fija de Ihh en la membrana celular	1[unidades de masa]/ μm^3	Estimado
τ_H	Tiempo de producción de Ihh	10 horas	Estimado
r		4	Estimado
K_1	Tiempo de vida medio de Ihh/PTHrP en cartilago	0.017 horas	(Browsers et al., 2006)
K_2	Tiempo de vida medio de Ihh/PTHrP en hueso	$5.77 * 10^{-6}$ horas	Estimado
v_{os}	Velocidad de osificación		Estimado
λ_{os}			Estimado
P	Carga aplicada	± 50 Pa	+50 pa, tensión; -50 Pa, compresión

5.2.2. Implementación numérica

El modelo propuesto se implementó para el dominio bidimensional Ω mostrado en la Figura 5-7. Este dominio representó un segmento de una columna de la placa de crecimiento, correspondiente a la zona de transición de los condrocitos desde la zona proliferativa a la zona prehipertrófica (Figura 5-7). Dicho segmento incluyó ocho condrocitos, los cuales limitan en la parte superior e inferior con dos zonas constituidas por cartílago. Todas las células se modelaron como estructuras ovoides con dimensiones de $8 \times 20 \mu\text{m}^2$ de acuerdo a la información reportada por Hunziker *et al.* ⁷⁹ Se modeló también la matriz pericelular, como un área que circunda cada célula. En los extremos laterales de la columna, se supuso la presencia de matriz extracelular (Figura 5-7).

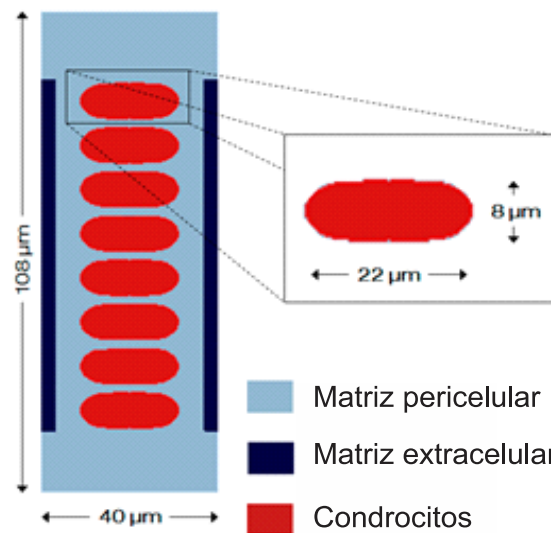


Figura 5-7. Descripción del dominio Ω del problema

Se supuso un modelo elástico-lineal para representar las propiedades mecánicas (E y ν) de los tejidos:

Tabla 5-2. Propiedades mecánicas de los tejidos.

Tejido	Módulo de Young, E (Pa)	Relación de Poisson (ν)	Referencia
Condrocito	350	0.43	(Alexopoulos et al., 2005)
Matriz pericelular	48500	0.36	(Kim et al., 2010)
Matriz extracelular	500000	0.12	(Kim et al., 2010)
Hueso	$11 \cdot 10^9$	0.3	(Jirousek, 2012)

El enmallado del dominio se realizó empleando elementos cuadriláteros de 4 nodos. En total, se utilizaron 4194 elementos y 4343 nodos. Las cargas aplicadas correspondieron a cargas distribuidas de tensión (+50 Pa) y compresión (-50 Pa) en la parte superior de la columna (carga P en la Figura 5-8). Se asumieron restricciones de movimiento en los bordes laterales e inferior de la columna, tal como se observa en la Figura 5-8.

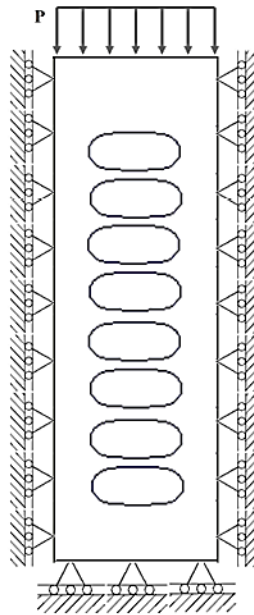


Figura 5-8. Condiciones de contorno y cargas aplicadas al dominio Ω del problema.

La simulación consistió en 250 pasos de tiempo, equivalentes a 250 horas en tiempo real. La componente mecánica se modeló por medio de un modelo elástico-lineal de deformación plana.⁸⁶ El modelo se solucionó empleando elementos finitos para la discretización espacial, y un esquema de Euler hacia atrás (backward Euler) para la discretización temporal. La solución numérica se realizó utilizando una subrutina de usuario de Fortran.

5.3. Resultados

5.3.1. Resultados para los casos sin alteración del bucle bioquímico

5.3.1.1. Ausencia de carga mecánica

El proceso de hipertrofia en una placa de crecimiento se caracteriza por un aumento gradual del área celular. Los resultados obtenidos mostraron que este incremento tuvo una duración de 37 horas para cada célula. Este fenómeno inició en la célula más cercana a la frontera entre las zonas proliferativa e hipertrofica. Una vez finalizado el crecimiento de dicha célula, el proceso de hipertrofia se repitió en las células adyacentes hasta obtener 4 células hipertroficas al final del tiempo simulado (250 horas). La altura máxima alcanzada por un condrocito hipertrofico tuvo un valor promedio de $16.96 \mu m$, que correspondió a un aumento del 100% del área celular (Figuras 5-9,10 y 11a). Esto resultó en un incremento del 35% de la altura total de la columna (Figura 5-12).

Se observó que la producción de *Ihh* se llevó a cabo por las células en las primeras fases del proceso de hipertrofia (aproximadamente 10 horas). A lo largo de este tiempo, la molécula se difundió a través de la matriz extracelular hasta alcanzar el frente de producción de PTHrP (Material suplementario Video), localizado en la frontera entre la zona de reserva y proliferativa (borde Γ_T en la Figura 5-2). La presencia de *Ihh* en esta zona estimuló la producción de PTHrP (Figura 5-10), que se difundió generando un gradiente a través de la columna.

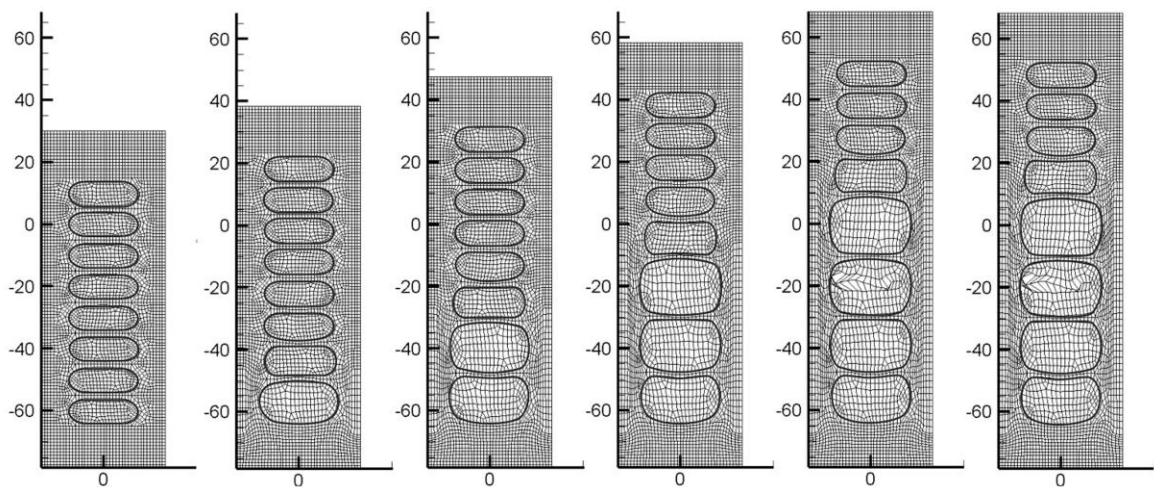


Figura 5-9. Crecimiento de la malla para el caso sin carga.

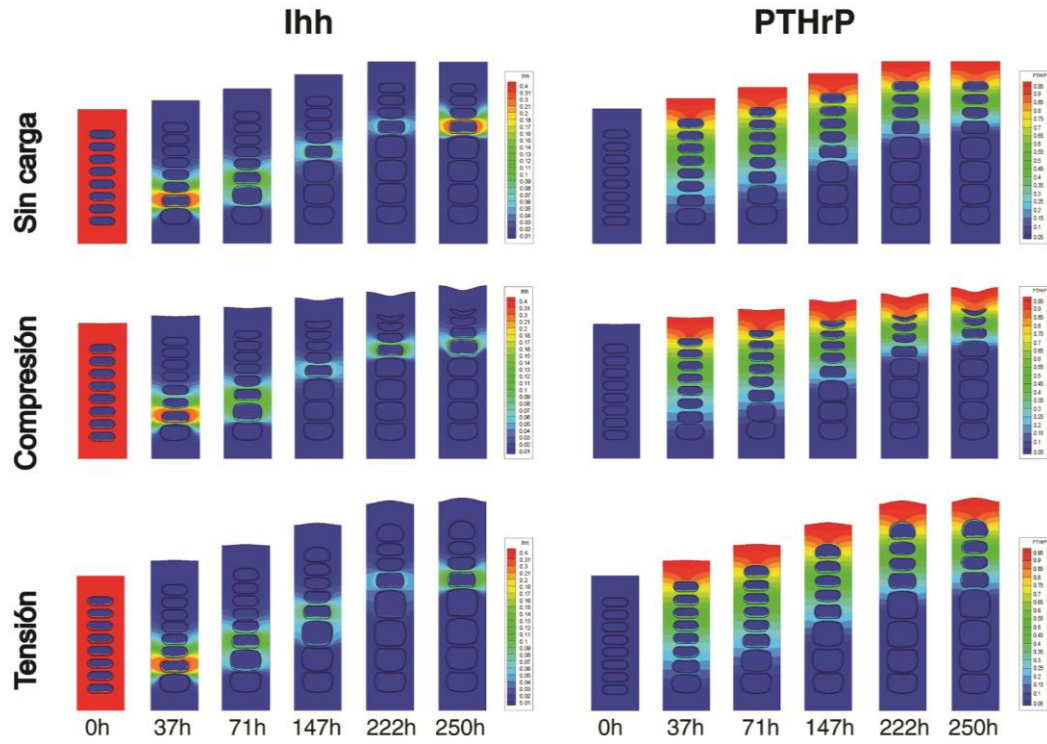
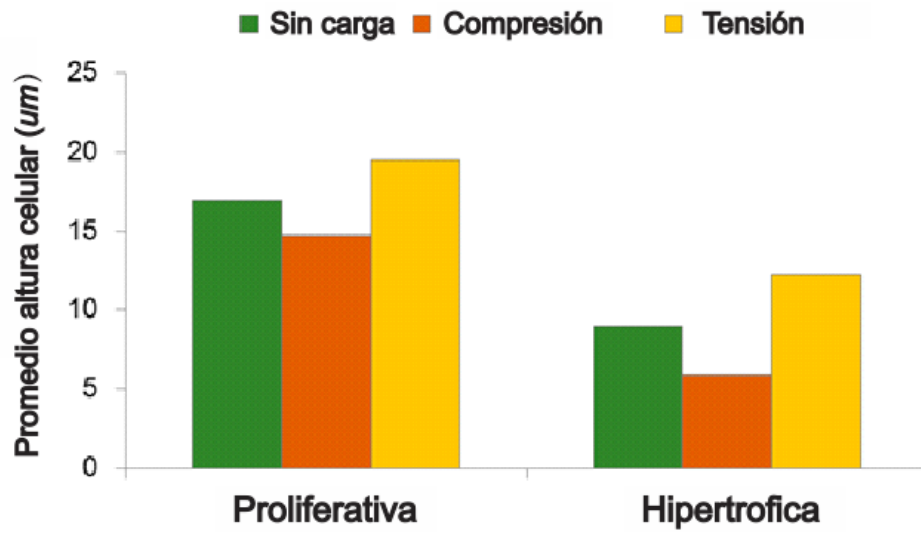
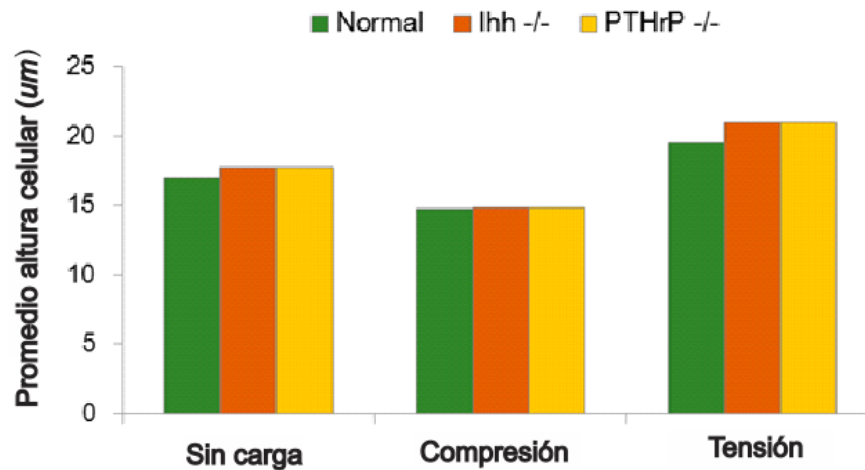


Figura 5-10. Concentraciones de Ihh y PTHrP para los casos sin alteraciones en el bucle regulatorio (sin carga, tensión y compresión).



(a) Casos normales



(b) Casos con alteraciones en lhh o PTHrP

Figura 5-11. Tamaño celular máximo alcanzado por las células en 10(a) casos sin alteraciones en el bucle, y 10(b) con alteraciones en el bucle.

5.3.1.2. Presencia de carga mecánica – Compresión

Bajo cargas compresivas (-50 Pa) se observó que, la altura máxima alcanzada por dichas células disminuyó aproximadamente 13%, en comparación con el valor correspondiente al caso sin carga (Figura 5-11a). Adicionalmente, se notó un cambio en la morfología de las células proliferativas cercanas a la frontera entre las zonas de reserva y proliferativa (figura 5-9). Esto resultó en una disminución en su altura (Figura 5-11a).

Con respecto al crecimiento de la columna, se presentó una disminución del 6% comparada con la altura alcanzada por el caso sin carga (Figura 5-12). Además, se observó la formación de una concavidad en el extremo superior de la columna (Figura 5-10).

5.3.1.3. Presencia de carga mecánica – Tensión

Bajo el efecto de cargas a tensión (+50 Pa), el aumento de la altura máxima en dichas células fue de 24% con respecto al caso sin carga (Figura 5-11a). Por su parte, las células proliferativas cercanas a la frontera entre las zonas de reserva y proliferativa, experimentaron una deformación mayor que en el caso compresivo (Figuras 5-10 y 5-11a). Estos cambios resultaron en un aumento del 16% comparado con el caso sin carga (Figura 5-12). Además, se presentó un cambio en la morfología de la parte superior de la columna (Figura 5-12).

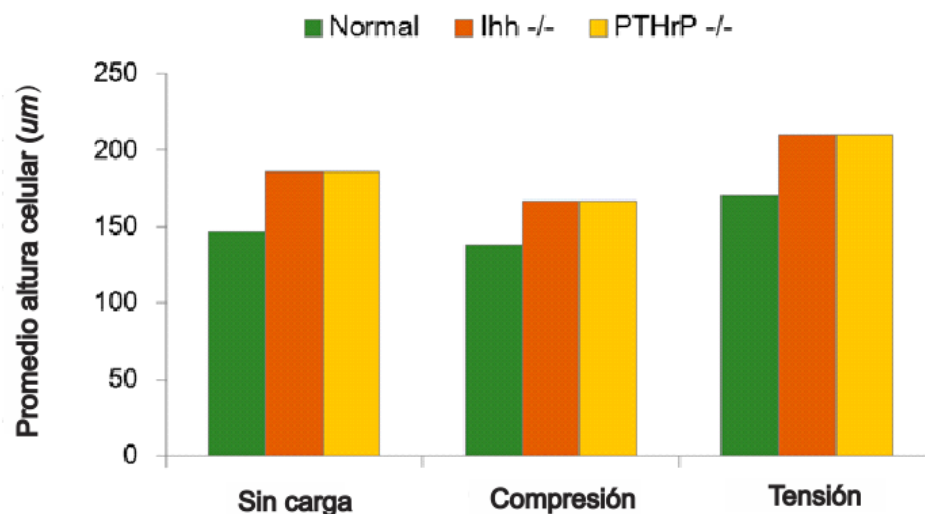


Figura 5-12. Altura máxima alcanzada por la columna para todos los casos de simulación.

5.3.2. Resultados para los casos con alteraciones del bucle bioquímico

Con el objetivo de determinar la robustez del modelo, se simularon casos de alteraciones en el bucle regulatorio Ihh/PTHrP. Se analizó la respuesta celular, expresada en términos de la altura máxima alcanzada y del tiempo requerido para finalizar el proceso de hipertrofia, en presencia y ausencia de cargas mecánicas suprimiendo la producción de alguna de estas proteínas. En dichos casos se observó que las células experimentaron hipertrofia prematura, alcanzando una altura máxima promedio de $17,7 \mu\text{m}$ a las 27 horas

de tiempo simulado (Figuras 5-13 y 5-14). Por su parte, el tamaño de la columna mostró un aumento del 27% comparado con el tamaño del caso normal sin carga (Figura 5-12).

Al igual que en el caso normal, la altura máxima de la célula y de la columna fueron afectadas por la aplicación de cargas, observándose disminución en el caso compresivo y aumento en el caso de tensión (Figuras 5-11b, 5-13 y 5-14). En cuanto a las concentraciones de las moléculas involucradas en el bucle regulatorio, se observó que la ausencia de *Ihh* resultó en la supresión de la producción de PTHrP (Figura 5-13). En contraste, en ausencia de PTHrP se observó que todas las células de la columna iniciaron la producción de *Ihh* de manera simultánea, al inicio del proceso de hipertrofia (figura 5-14).

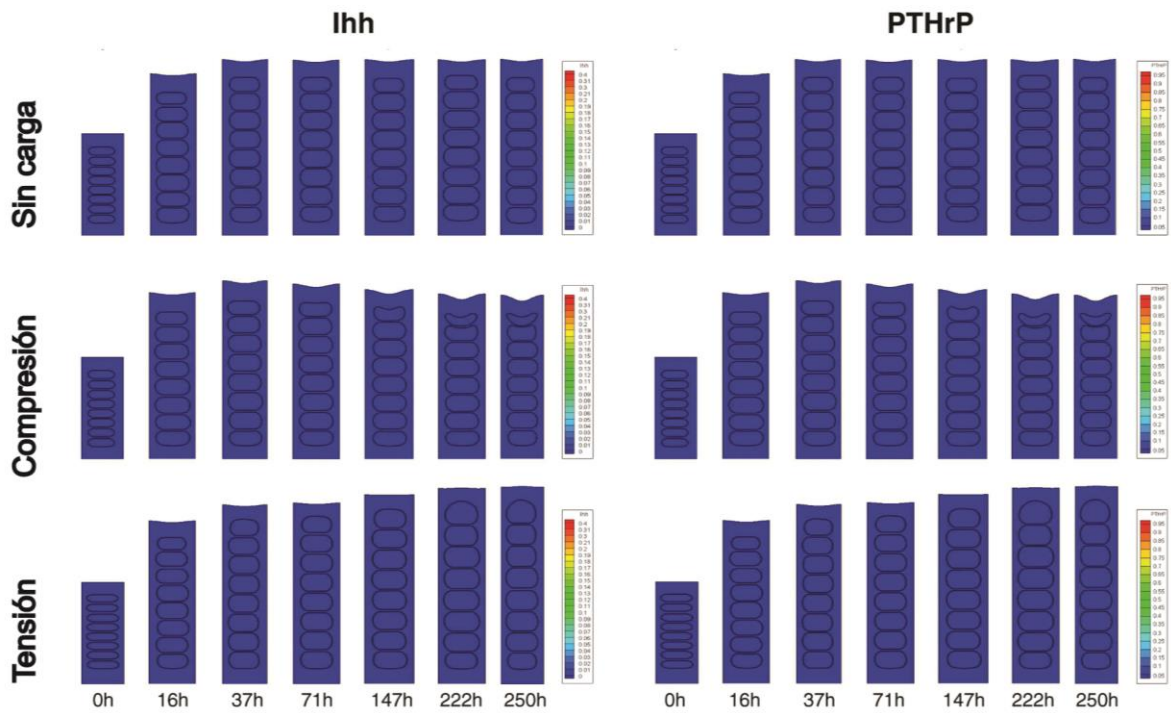


Figura 5-13. Resultados de las concentraciones de *Ihh* y PTHrP cuando hay alteración en *Ihh*.

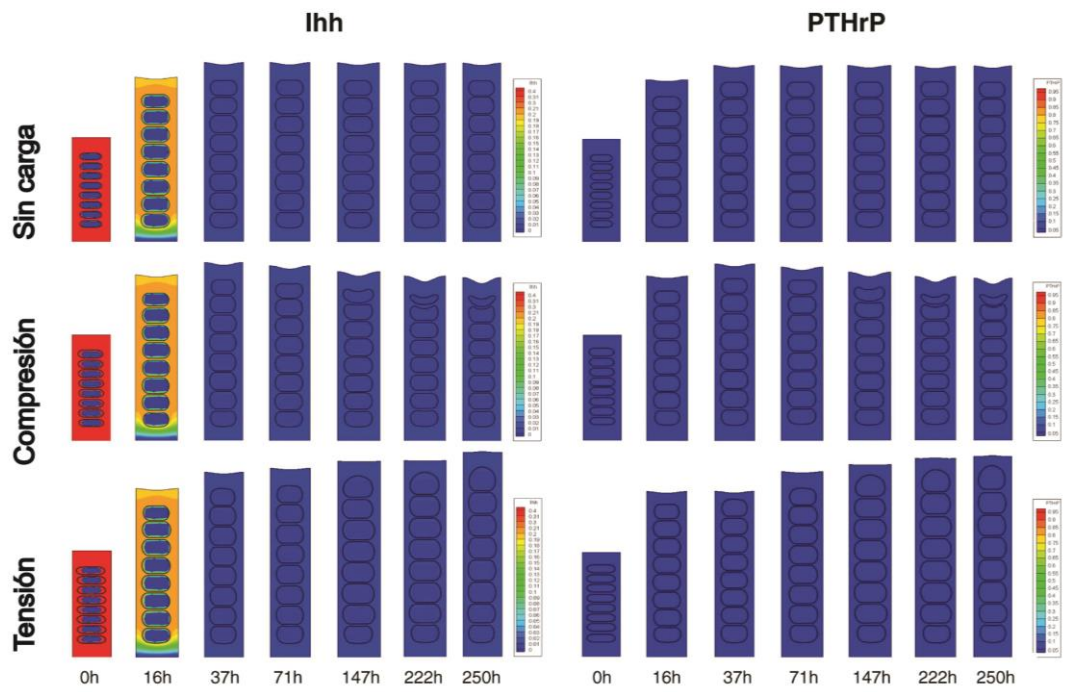


Figura 5-14. Resultados de las concentraciones de Ihh y PTHrP cuando hay alteración en PTHrP.

5.4. Discusión

En este trabajo se formuló un modelo matemático bidimensional para simular la transición de un condrocito de estado proliferativo a hipertrófico en un segmento de la zona proliferativa de una placa de crecimiento. El modelo considera este proceso en células organizadas en columnas que representan la unidad estructural básica de la placa de crecimiento.^{81,87,79} Este modelo incorpora la influencia de cargas mecánicas y del bucle regulatorio bioquímico Ihh-PTHrP. Estos dos parámetros han sido reportados por diversos autores como factores esenciales para el proceso de hipertrofia.^{7,1,81,36,57,28,54}

Estudios computacionales previos han formulado diversos modelos matemáticos para simular la hipertrofia celular. Van Donkelaar *et al.* consideran la hipertrofia celular como el resultado de un proceso mecánico que incluye la acción de la carga mecánica, la presión osmótica celular, la síntesis y degradación de fibras de colágeno y proteoglicanos de la matriz extracelular.⁷⁸ Sin embargo, no consideran el efecto de factores bioquímicos en la hipertrofia. Otros modelos, propuestos por Garzón-Alvarado *et al.*^{17,24} y Narváez-Tovar *et*

*al.*²⁷ han considerado la acción conjunta de las cargas mecánicas y del bucle regulatorio *Ihh*-PTHrP en el proceso de hipertrofia. Sin embargo, estos estudios simulan cambios en la morfología columnar y la progresión del frente de osificación. El modelo propuesto en este documento analiza en detalle el efecto conjunto del componente mecánico y de factores bioquímicos en los procesos de proliferación e hipertrofia celular al interior de una columna de la placa de crecimiento.

Análisis histológicos de placa de crecimiento en diferentes especies muestran que durante el proceso de hipertrofia, el condrocito experimenta un incremento de área. Este ocurre de manera anisotrópica en la dirección preferencial del crecimiento del hueso, lo que se refleja en cambios de la altura celular.^{79,7,45} La altura máxima alcanzada por un condrocito hipertrófico varía dependiendo de la edad del individuo y la especie. Por ejemplo, Hunziker *et al.*, reportan alturas celulares máximas que oscilan entre 31.2 μm y 18.2 μm , en placas de crecimiento de la tibia proximal de ratas de 21 y 80 días de edad, respectivamente⁷⁹; mientras que Weise *et al.*, reportan alturas celulares máximas alrededor de 20 μm para conejos de 12 semanas.⁸⁸ Los resultados obtenidos en este modelo muestran mayor similitud con la altura alcanzada por los condrocitos de las placas de crecimiento de mayor edad (Figura 5-11a). En efecto, la diferencia entre los datos obtenidos y los reportados para placas de crecimiento de ratas (80 días) y conejos (12 semanas) fue de 7%. Sin embargo, la diferencia con las alturas alcanzadas por los condrocitos hipertróficos de las placas más jóvenes fue en promedio de 49%. Estas diferencias pueden explicarse considerando que existen variaciones fisiológicas, que implican cambios en la velocidad de crecimiento celular en diferentes etapas del desarrollo.⁷⁹ Este tipo de variaciones pueden estar controladas por factores bioquímicos adicionales que no se consideraron en este modelo.

En relación con las concentraciones de *Ihh* y PTHrP, se consideró un incremento en el coeficiente de extinción de estas proteínas en la zona cercana al frente de osificación. Esto puede sustentarse en el hecho de que existe un alto recambio de matriz peri y extracelular en la zona hipertrófica. Esto implica la presencia de un gran número de enzimas que pueden afectar la vida media de *Ihh* y PTHrP.^{58,15,46} Los gradientes de concentración de *Ihh*-PTHrP generados, permitieron controlar el proceso de hipertrofia, tal como ocurre in vivo en condiciones normales.^{2,1,7}

En adición a las condiciones fisiológicas, el modelo consideró casos anormales donde la producción de alguna de las dos moléculas fue bloqueada (Ihh -/- o PTHrP -/-). En ambos casos, la hipertrofia prematura observada puede explicarse teniendo en cuenta que la principal función del bucle es promover la proliferación celular mediante el retraso de la hipertrofia. Por tanto, cualquier alteración del bucle afecta directamente dichos procesos celulares. Esto concuerda con descripciones previas en estudios experimentales.^{15,1,7}

En cuanto a la influencia del estímulo mecánico sobre el proceso de hipertrofia, el modelo permitió analizar el efecto físico producido por dichas cargas. En efecto, la aplicación de cargas mecánicas afectó principalmente la morfología celular. En el caso de cargas compresivas, la disminución observada en altura máxima de las células se debió a los efectos restrictivos de dicha carga, que limitaron el espacio intercelular. Estos cambios en el espacio intercelular afectaron la difusión de Ihh-PTHrP, acelerando el proceso de hipertrofia, lo que resultó en una célula hipertrófica adicional al final del tiempo de simulación. Para las cargas a tensión se observó que el espacio intercelular aumentó, permitiendo un mayor crecimiento celular. Estos hallazgos concuerdan con reportes previos en la literatura, en donde se muestra que la aplicación de cargas mecánicas genera cambios en las zonas proliferativa e hipertrófica.^{75,13,10} Los resultados anteriormente descritos, permiten predecir el efecto que tienen las cargas sobre el tamaño de la placa de crecimiento y sobre la velocidad de crecimiento, tal como se describe en estudios experimentales.^{75,13,10,73,74}

A pesar de que el modelo reproduce adecuadamente el proceso de hipertrofia y revela información acerca de los efectos a corto plazo del bucle regulatorio y las cargas mecánicas sobre los condrocitos de una columna, es necesario aclarar que este modelo no permite realizar análisis sobre tasas de crecimiento en un individuo. Esto se deba a que no se incluyó la zona de reserva ni el proceso de proliferación, elementos importantes para la regulación de dichas tasas.^{2,13,10} Adicionalmente, no se consideraron interacciones entre el bucle bioquímico y las cargas, como sugieren algunos autores que han reportado cambios en la síntesis de Ihh y PTHrP asociados a estímulos mecánicos.^{60,50,51,77}

En conclusión, este trabajo constituye una primera aproximación al desarrollo de modelos computacionales integrales que permitan estudiar efectos conjuntos entre estímulos físicos

y bioquímicos en los distintos procesos biológicos que tienen lugar dentro de la placa de crecimiento.

6. Caracterización del Desarrollo Óseo Prenatal y Postnatal en Ratones: Fémur

6.1. Introducción

El fémur es el único elemento óseo presente en la parte superior del miembro posterior. Su epífisis proximal articula con los huesos que conforman la pelvis, de tal manera que la cabeza femoral encaja en el acetábulo. Esta unión se encuentra estabilizada por la capsula articular, el ligamento articular y el ligamento de la cabeza femoral. Por su parte, la epífisis distal articula con la patela, la tibia y el peroné formando la articulación de la rodilla.^{30,89}

Al igual que todos los huesos largos en mamíferos, el fémur se forma por osificación secuencial de un molde cartilaginoso generado en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Dicha osificación origina primero la diáfisis y posteriormente las epífisis, dejando una porción cartilaginosa conocida como placa de crecimiento en las metáfisis, donde la osificación continua permitiendo el crecimiento longitudinal del hueso.^{1,7,30,90}

La morfología del fémur proximal es única entre los elementos óseos del esqueleto de los mamíferos, caracterizándose por la proyección de la cabeza femoral formando un ángulo respecto de la diáfisis del hueso. Adicionalmente sobresalen los trocánteres mayor y menor en la porción externa e interna del hueso respectivamente. La epífisis distal, es de mayor tamaño tiene una forma ovalada y como característica presenta dos prominencias oblongas denominadas cóndilos, donde articula con la tibia y el peroné.⁸⁹

Aunque la estructura general del fémur, así como su proceso de osificación son similares entre diferentes especies de mamífero, las características geométricas del hueso varían entre especies.^{91,92} Hasta el momento lo que se conoce del desarrollo óseo en mamíferos se deriva de estudios en aves y pequeños roedores, especialmente en lo concerniente al inicio de la osificación en etapas embrionarias.⁵³ Adicionalmente, el advenimiento de técnicas imagenológicas como la RMN y la tomografía computarizada han permitido evidenciar algunos detalles del desarrollo en bovinos, equinos y humanos.^{3,93} Sin embargo

hasta el momento no se dispone de estudios morfológicos detallados del proceso de desarrollo.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se presenta un análisis morfológico macro y microscópico del proceso de osificación del fémur en ratones, teniendo en cuenta el desarrollo de los centros secundarios de osificación de las epífisis proximal y distal y las características de las respectivas placas de crecimiento desde el periodo embrionario hasta los 2 meses de edad. La información derivada de este estudio podrá ser utilizada para realizar análisis comparativos con otras especies así como punto de partida para estudios tendientes a esclarecer mecanismos responsables de la morfogénesis ósea en mamíferos.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Fase experimental

6.2.1.1. Animales

La experimentación con animales fue avalada por el comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Se utilizaron ratones estériles. Los animales fueron criados en la sala de animales del Laboratorio de Biomiméticos – Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, bajo condiciones controladas que incluyeron ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad; temperatura y humedad promedio de 25° C y 47 g/m³ respectivamente.

6.2.1.2. Obtención de las muestras

Se obtuvieron embriones correspondientes a los días 15, 17 y 19 de gestación (Tabla 6-1), para lo cual se tuvo en cuenta que el día de aparición del tapón vaginal en las hembras correspondió al día 1 de preñez. En la etapa postnatal se utilizaron animales de 1, 7, 14 y 21 días (Tabla 6-1), de los cuales se aislaron ambas extremidades posteriores. Todas las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4%.

Tabla 6-1. Número de animales experimentales en periodo prenatal y postnatal

Días	Prenatal	Postnatal	Total
15	4		
17	4		
19	4		
1		4	
7		4	
14		4	
21		4	
Total	12	16	28

6.2.1.3. Análisis Histológico

Para el análisis estereoscópico y microscópico de la evolución del proceso de osificación y formación del hueso, las muestras embrionarias y las postnatales fueron sometidas a doble tinción de azul de Alcian y rojo de Alizarina, utilizando el método descrito por Redfern y colaboradores⁹⁴ y el cual se modificó y se describe brevemente a continuación: la tinción consistió en someter la muestra inicialmente a solución de Azul Alcian 0.03% por 3 días a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con etanol al 95% por 6 horas en agitación, seguido de un paso por solución KOH 2% de 12 a 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente se realiza tinción con solución Rojo de Alizarina 0.03% por 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras se sometieron a 3 pasos por soluciones de glicerol/1% KOH con incremento gradual de la concentración de glicerol (20%, 50% y 80%), cada una con un tiempo de incubación de 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron en glicerol al 100%.^{95,96}

Para todas las muestras embrionarias y para los neonatos del día 1, previo a la tinción, se realizó un proceso de transparentación del tejido blando utilizando KOH según el protocolo descrito por Nagy y colaboradores.⁹⁷ Una vez teñidos los huesos se realizó un análisis morfológico descriptivo a nivel macroscópico de la placa de crecimiento, el centro secundario de osificación y la forma general del hueso en los diferentes puntos del desarrollo planteados anteriormente, por medio de un estereoscopio. El análisis histológico de la etapa embrionaria se realizó mediante observación de cortes de 5 μm de grosor usando un microscopio de luz mientras que para la etapa postnatal se realizó un corte en el plano sagital a los huesos para observación en estereoscopio, utilizando un

micrótopo de sólidos Buehler con un disco de 320 μm a 500 rpm. Para esto, las muestras fueron previamente teñidas y embebidas en dimetil metacrilato.

6.2.2. Fase computacional

6.2.2.1. Micro-CT

La adquisición de las imágenes por MicroCT se realizó teñiendo las muestras con hematoxilina fosfotungstica para permitir la observación de tejido blando. Todas las muestras fueron escaneadas utilizando un microtomografo de rayos X Skyscan 1172 (Micro Photonics, Allenton PA). Los parámetros de adquisición se ajustaron a 60kV, 124 μA y se utilizó un modo de adquisición de 180° con 6 cuadros en promedio y un tiempo de rotación de 0.6.

La reconstrucción 3D se realizó utilizando el software de reconstrucción NRECON (Micro Photonics, Allenton PA) con un factor de corrección de la señal registrada de 10 unidades y corrección artefactos por endurecimiento del haz del 60%. Las imágenes 3D fueron generadas utilizando el software CtVox (Micro Photonics, Allentown, PA).

6.3. Resultados y Discusión

6.3.1. Prenatal

El desarrollo de las extremidades es un proceso que inicia en etapas tempranas del desarrollo embrionario con la condensación de células mesenquimales que se dividirá en varios segmentos que darán origen a cada uno de los huesos de la extremidad. Posteriormente formara un molde cartilaginoso que posteriormente sufrirá un proceso gradual de osificación. El análisis de las muestras obtenidas durante el periodo embrionario muestran que a los 15 días de gestación, el fémur es aún una estructura completamente cartilaginosa, como evidencia su afinidad por el colorante Azul alcian el cual se usa para distinguir el tejido cartilaginoso y la carencia de tinción con Rojo de Alizarina, usado para distinguir depósitos de calcio y por ende tejido osificado. De la misma forma, las imágenes por micro-CT no muestran cambios en la densidad del tejido. Sin embargo, es evidente

que ya en esta etapa el rudimento óseo presenta un contorno cuya morfología emula la del hueso adulto, de esta manera se observa la definición de lo que será la cabeza femoral y el trocánter mayor en el fémur proximal y los cóndilos del fémur distal (Fig. 6-1).

Desde el punto de vista histológico no hay evidencia de inicio de la osificación endocondral, de manera que aún no se distinguen condrocitos en proceso de diferenciación por el contrario se observa homogeneidad en la morfología de las células en toda la estructura (Fig. 6-1C-D). Estos hallazgos contrastan con lo reportado por Patton y Kaufman⁹⁸ quienes para esta etapa reportan un pequeño centro de osificación el cual se extiende hacia los 17 días de gestación, sin embargo aclaran también que el proceso de osificación como tal, inicial después de 17 días de gestación.

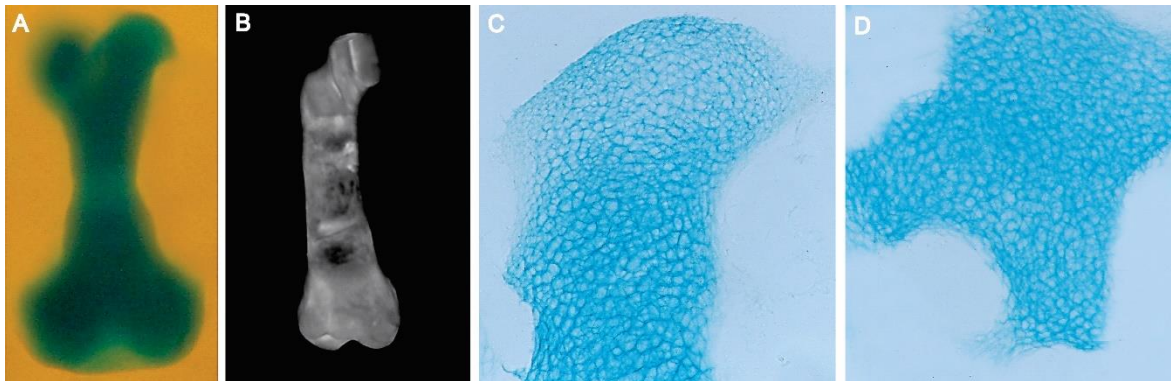


Figura 6-1. Imágenes fémur proximal y distal embriones de ratón de 15 días **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología fémur proximal, vista 10X **D)** histología fémur distal, vista 10X.

A los 17 días de gestación el fémur del embrión de ratones muestra crecimiento de la estructura con un mayor desarrollo de la porción distal donde los cóndilos femorales se ven mucho más definidos (Fig. 6-2A), en la zona proximal, la cabeza femoral empieza a desarrollarse y se observa el inicio de la formación del cuello femoral. Para este momento ya hay evidencia histológica e imagenológica de la presencia del centro primario de osificación, observada como un área de mayor densidad en la porción central del hueso en la imagen de micro tomografía computarizada (Fig. 6-2B), y un área con una tinción ligeramente rojiza evidenciando en la doble tinción con Azul de Alcian/Rojo de Alizarina evidenciando la deposición de calcio en la diáfisis (Fig. 6-2A).

En los cortes histológicos realizados longitudinalmente, es posible distinguir las diferentes zonas de una placa de crecimiento rudimentaria (Fig. 6-2C-D). En la porción más proximal del fémur ya sea distal o proximal (diáfisis), se observan pequeñas células organizadas aleatoriamente, estas corresponden a la zona de reserva de la placa de crecimiento. Un poco más cerca de la diáfisis se observan células aplanadas organizadas en columnas bien definidas, correspondientes a la zona proliferativa, adyacente a esta zona, se observa una región compuesta por células redondas de gran tamaño, estas células corresponden a condrocitos hipertróficos que finalmente mueren y dan paso a la calcificación del tejido (Fig. 6-2E-F). En la Figura 6-2G se puede observar la transición de las células proliferativas a células hipertróficas. Este proceso de hipertrofia se reconoce con el principal factor del crecimiento longitudinal de los huesos en mamíferos.

Estos hallazgos apuntan a que el centro primario de osificación del fémur aparece en el transcurso del día 16, lo que contrasta con reportes previos lo reportado previamente por Patton y Kaufman⁹⁸ que ubican su aparición hacia el día 15. Esta diferencia puede estar relacionada con posibles variaciones entre cepas, considerando que en este estudio se utilizó una cepa de ratón diferente. De hecho, y aunque en este estudio no se observó, se han descrito sutiles variaciones en los tiempos de osificación en humanos y roedores.⁹⁸

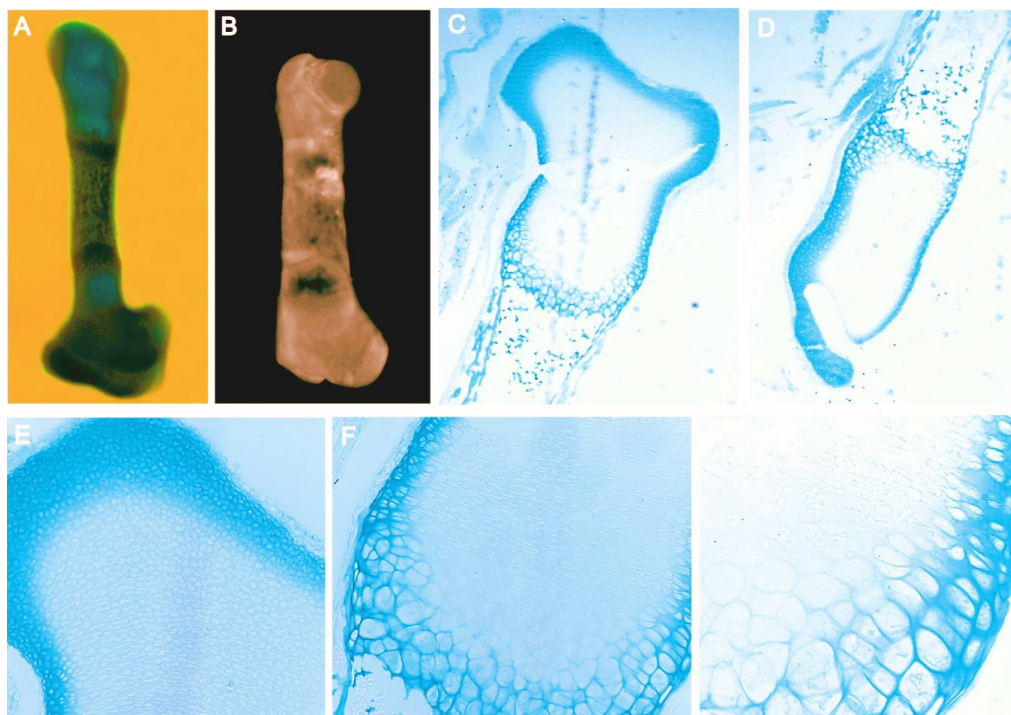


Figura 6-2. Imágenes fémur proximal y distal embriones de ratón de 17 días **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología fémur proximal, vista 4X **D)** histología fémur distal, vista 4X **E)** acercamiento epífisis proximal, vista 10X **F)** acercamiento placa de crecimiento, vista 20X **G)** acercamiento zona de transición de condrocitos proliferativos a hipertróficos, vista 40X.

Cercano al nacimiento, el embrión de 19 días de gestación presenta un fémur en el cual ya se ha osificado la diáfisis completamente. El principal cambio morfológico se evidencia en la epífisis proximal donde estructuras como la cabeza femoral y los trocánteres presentan formas mucho más definidas (Fig. 6-3A-B). Histológicamente, se observa un acercamiento del frente de osificación a la superficie articular. En la Figura 6-3E se observan todo el proceso de diferenciación morfológica de los condrocitos de la placa de crecimiento, desde la fase proliferativa hasta la hipertrofia, y subsecuentemente su muerte y osificación.

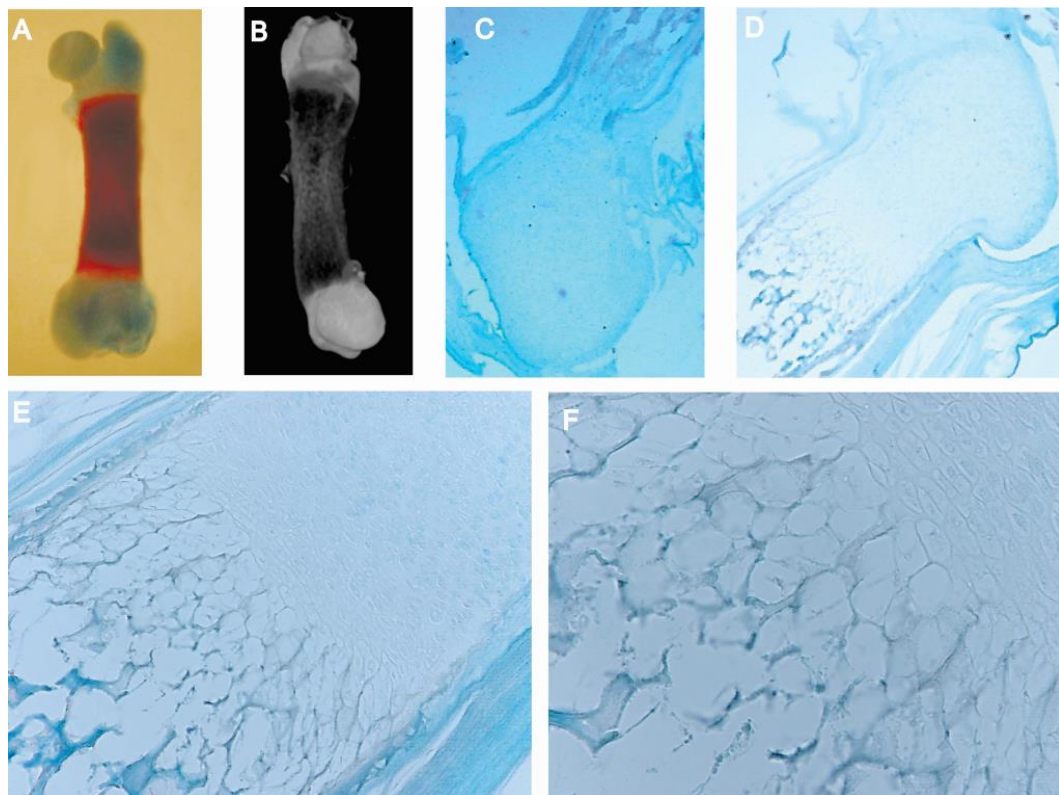


Figura 6-3. Imágenes fémur proximal y distal embriones de ratón de 19 días **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina. **B)** reconstrucción 3D **C)** histología fémur proximal,

vista 10X **D)** histología fémur distal, vista 10X **E)** acercamiento placa de crecimiento, vista 20X **F)** acercamiento zona de transición de condrocitos proliferativos a hipertróficos, vista 40X.

6.3.2. Postnatal

El fémur de neonatos de ratón presenta la morfología característica de un fémur adulto, sin embargo el cuello femoral aún no se ha desarrollado completamente. Por otra parte la cabeza femoral presenta la morfología redondeada característica del fémur proximal y el trocánter mayor se ha extendido. En la Figura 6-4A es evidente una fuerte deposición de calcio en la diáfisis evidenciando la extensión del centro primario de osificación (CPO). Las diáfisis proximal y distal aun aparecen completamente cartilagosas. Al igual que en etapas embrionarias tardías se observa una placa de crecimiento dividida en las tres zonas histológicas descritas anteriormente. En la Figura 6-4C-E se presentan los cortes histológicos para el fémur proximal donde se puede observar la transición de los condrocitos desde la zona de reserva, pasando por la zona proliferativa, hasta la zona hipertrófica. En la Figura 6-4E se observa un acercamiento a 40X de la zona de transición entre proliferativa e hipertrófica y en la Figura 6-4H se observa la zona de transición entre reserva y proliferativa.

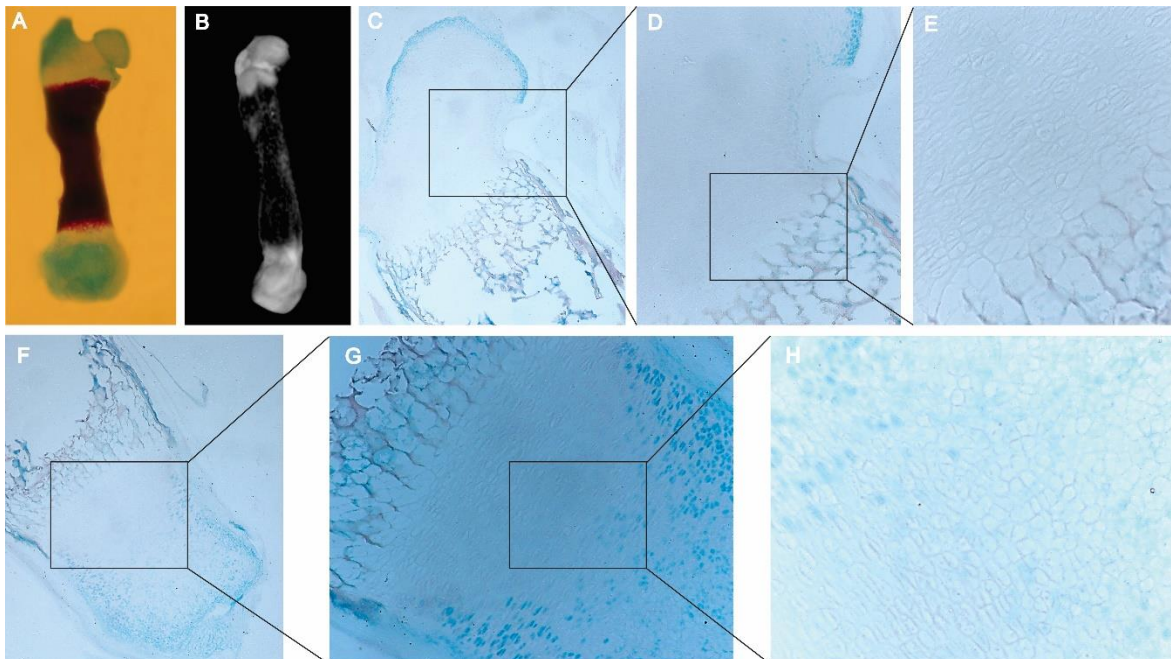


Figura 6-4. Imágenes fémur proximal y distal de neonatos de ratón **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología fémur proximal, vista 10X **D)** acercamiento zona correspondiente a la placa de crecimiento, vista 20X **E)** acercamiento zona de transición de condrocitos proliferativos a hipertróficos, vista 40X **F)** histología fémur distal, vista 10X **G)** acercamiento zona de la placa de crecimiento, vista 20X **H)** acercamiento zona de transición de condrocitos de reserva a proliferativos, vista 40X .

La aparición de los CSO ocurre durante la primera semana de vida, ya que a los 7 días de edad, las epífisis se han osificado en gran parte de su volumen (zonas rojas), sin embargo aún se observan zonas cartilaginosas (zonas azules) como por ejemplo la cabeza femoral y los cóndilos distales (Fig. 6-5A). Estos hallazgos contrastan con reportes previos que indican una aparición más tardía de los CSO tanto proximales como distales.⁹⁸ En la Figura 6-5B se observan zonas de mayor densidad correspondientes a las zonas de hueso que ya se han osificado, resaltando las zonas donde se localizan las placas de crecimiento en la porción proximal y distal del hueso.

Al observar la estructura microscópica de la placa de crecimiento en esta etapa se observa una estratificación y delimitación clara de la placa, además el frente de osificación se encuentra más cercano a la epífisis como se observa en la Figura 6-5C-G.

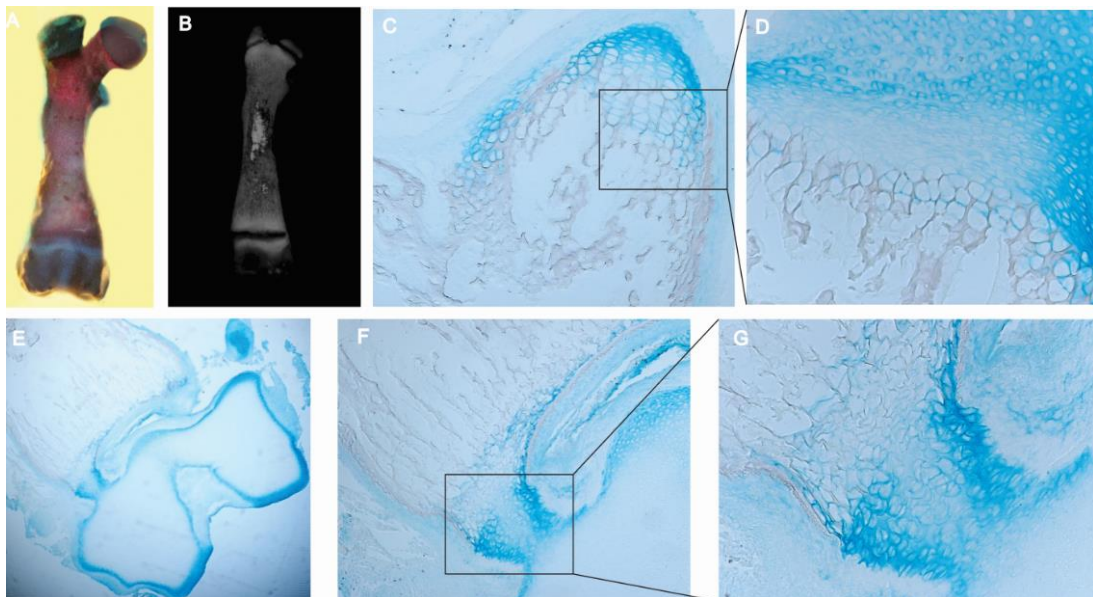


Figura 6-5. Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 7 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología de fémur proximal, vista 10X **D)** acercamiento placa de crecimiento, vista 20X **E)** histología fémur distal, vista 10X **F)** acercamiento placa de crecimiento, vista 20X **G)** acercamiento zona de transición de condrocitos proliferativos a hipertróficos, vista 40X.

A los 14 días de edad el fémur del ratón continúa su proceso de osificación, con la fusión de los CSO de la epífisis distal y el en la porción proximal del hueso la cabeza femoral se encuentra casi completamente osificada y se observa la progresión de la osificación en el trocánter mayor y el trocánter menor. En los cóndilos distales del fémur se puede observar la forma redondeada del CSO (Fig. 6-6A-B). En la Figura 6C-E se puede ver la forma curva de la placa de crecimiento que aparece en azul por la tinción con Azul Alcian y la cual delimita el CSO en rojo por la tinción con Rojo de Alizarina.

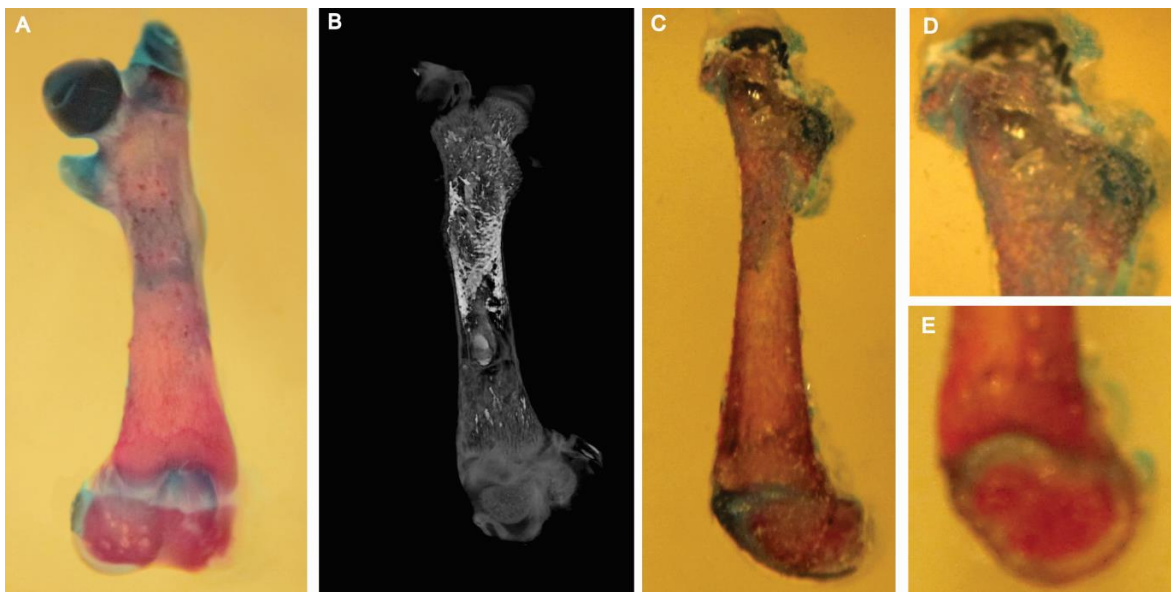


Figura 6-6. Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 14 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina. **B)** reconstrucción 3D **C)** corte en solido de fémur **D)** acercamiento fémur proximal **E)** acercamiento fémur distal.

Pasados 21 días de crecimiento, las diáfisis se encuentran osificadas y se observa una placa de crecimiento amplia, sin embargo ha cambiado su morfología debido al cambio en la morfología de la epífisis, resultado del crecimiento. La placa de crecimiento distal ahora muestra una forma en “M” (Fig. 6-6,7A-E).

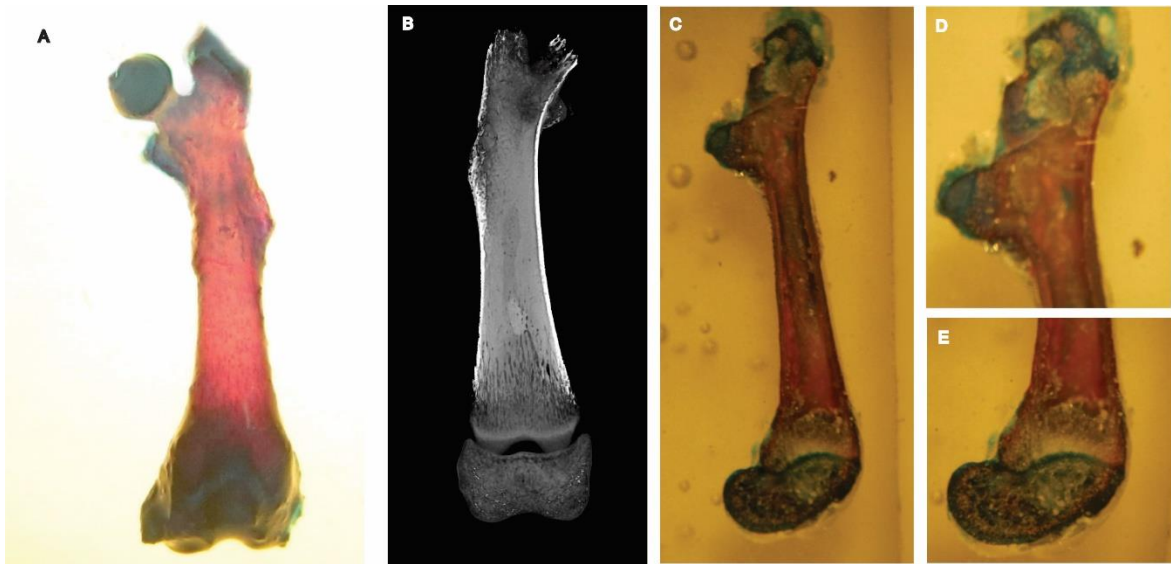


Figura 6-7. Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 21 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** corte en solido de fémur **D)** acercamiento fémur proximal **E)** acercamiento fémur distal.

A 35 días de desarrollo posnatal el fémur muestra cambios importantes en la morfología de la placa de crecimiento, la placa de la cabeza femoral muestra una morfología convexa y su grosor ha disminuido paulatinamente a lo largo del desarrollo, de igual forma la placa del fémur distal ha cambiado su morfología. Las placas del crecimiento del trocánter mayor y menor aunque no han sufrido cambios drásticos en su morfología, si han cambiado en grosor y posición respecto a la zona osificada.

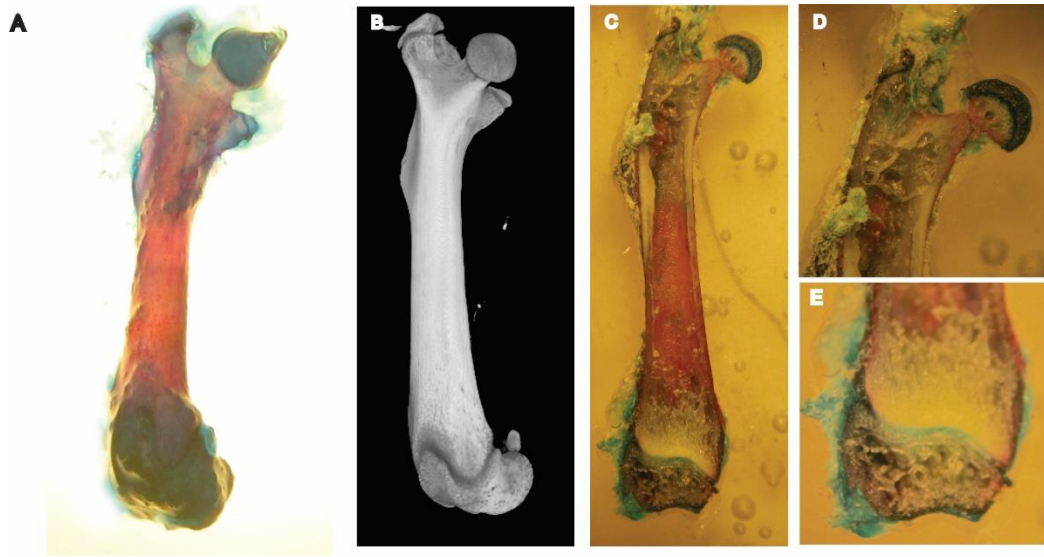


Figura 6-8. Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 35 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** corte en solido de fémur **D)** acercamiento fémur proximal **E)** acercamiento fémur distal.

Finalmente a 46 días de desarrollo en la porción proximal del fémur se encuentra totalmente osificada, se observa el cierre de la placa de crecimiento la cual aparece totalmente teñida con Rojo de Alizarina, sin embargo en la porción distal del hueso aún mantiene zonas cartilaginosas que se evidencian por la tinción con Azul de Alcian y la placa de crecimiento aunque ha cambiado de morfología una vez más, adquiriendo una forma ondulada en una vista aneroposterior.

Las características observadas en la placa de crecimiento posterior a los 21 días refleja la disminución en la actividad de esta estructura en las etapas tardías del crecimiento de los mamíferos. De tal manera que los principales cambios se observan en términos del grosor de la placa. Adicionalmente, se observan cambios en la morfología de la placa e incluso en etapas tardías osificación completa de algunos segmentos. Sin embargo, esta estructura se preserva a lo largo de toda la vida en roedores, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos grandes en los cuales ocurre una osificación completa de esta estructura una vez alcanzada la madurez sexual.

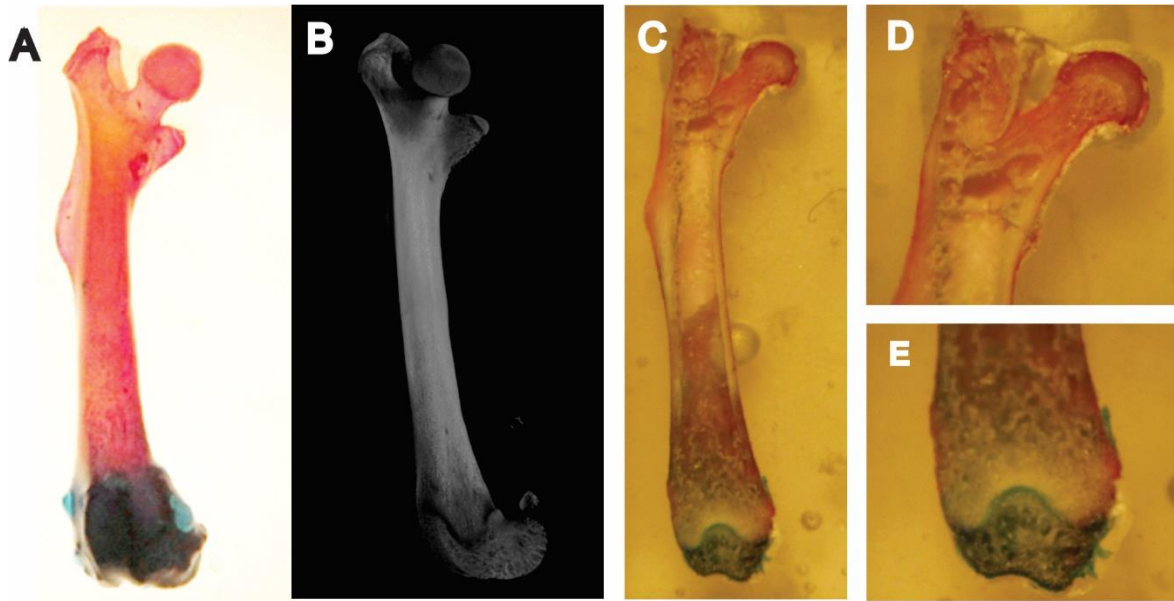


Figura 6-9. Imágenes fémur proximal y distal de ratones de 46 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** corte en solido de fémur **D)** acercamiento fémur proximal **E)** acercamiento fémur distal.

6.4. Conclusiones

El modelo murino para el estudio del desarrollo óseo es eficaz representando los patrones de osificación que sufre el fémur a través del desarrollo. Por esta razón los datos obtenidos en este estudio se podrían extrapolar al desarrollo del humero en humanos. Las técnicas utilizadas son eficaces en el estudio del desarrollo de estructuras como los centros de osificación y la placa de crecimiento, sin embargo es necesario desarrollar técnicas que permitan realizar cortes histológicos a tejidos solidos sin perder la tinción.

7. Caracterización del Desarrollo Óseo Prenatal y Postnatal en Ratones: Húmero

7.1. Introducción

El húmero es el hueso más proximal de la extremidad superior/anterior. Este conecta con el esqueleto axial a través de la articulación escapulo-humeral, de tal manera que la cabeza femoral encaja con la cavidad glenoidea. La estabilidad de esta articulación está dada por la inserción de los músculos escapulares. Su porción distal forma la articulación del codo junto con el radio y el cubito.^{30,89}

Este hueso es de origen endocondral, es decir, durante el desarrollo embrionario, el proceso de osificación ocurre a partir de un molde cartilaginoso. Dicha osificación inicia en la porción central del molde, expandiéndose hacia los extremos. Posteriormente, se genera un centro de osificación secundario en cada una de las epífisis. Este proceso es altamente conservado y ocurre de manera similar entre diferentes especies de mamíferos.^{1,7,30,90,99}

Aunque actualmente no se han capturado con imágenes in vivo de los cambios en el molde cartilaginoso, es esencial entender el proceso de osificación para ser capaces de interpretar las distintas arquitecturas que pueden tomar la epífisis, la metáfisis y la epífisis.¹⁰⁰

Hasta el momento se han usado varios modelos animales como el de cerdo, aves y ratones para entender el proceso de desarrollo óseo en humanos.^{53,100} El modelo de ratón ha sido el más utilizado para el estudio del desarrollo óseo y las implicaciones de las enfermedades óseas congénitas humanas, dada la facilidad de manipulación y generación de cepas mutantes.^{53,101} Actualmente, la información disponible en la literatura en relación al desarrollo óseo normal en ratones se limita a la descripción cronológica de la aparición de los centros de osificación primario y secundario de osificación y algunos hallazgos histológicos particularmente durante el desarrollo embrionario.^{53,98,101}

Este trabajo presenta un estudio detallado de los cambios morfológicos e histológicos a nivel de las epífisis proximal y distal del humero y sus respectivas placas de crecimiento durante el proceso de osificación en ratones. El estudio comprende el análisis desde la etapa embrionaria hasta alcanzada la madurez sexual, revelando los momentos de mayores cambios morfológicos en este hueso. La información derivada de este estudio complementa la que se encuentra disponible en la literatura permitiendo reconstruir los eventos ocurridos durante el desarrollo normal del humero. Esta información podría esclarecer detalles importantes sobre el desarrollo óseo en humanos, dada su similitud con el proceso en roedores, además de proveer herramientas para el diseño de estudios posteriores que buscan abordar aspectos fisiológicos y patológicos de este proceso.

7.2. Materiales y métodos

7.2.1. Fase experimental

7.2.1.1. Animales

La experimentación con animales fue avalada por el comité de ética de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. Se utilizaron ratones estériles. Los animales fueron criados en la sala de animales del Laboratorio de Biomiméticos – Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, bajo condiciones controladas que incluyeron ciclos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad; temperatura y humedad promedio de 25° C y 47 g/m³ respectivamente.

7.2.1.2. Obtención de las muestras

Se obtuvieron embriones correspondientes a los días 15, 17 y 19 de gestación (Tabla 7-1), para lo cual se tuvo en cuenta que el día de aparición del tapón vaginal correspondió al día 1 de preñez. En la etapa postnatal se utilizaron animales de 1, 7, 14 y 21 días (Tabla 7-1), de los cuales se aislaron ambas extremidades anteriores. Todas las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4%.

Tabla 7-1. Número de animales experimentales en periodo prenatal y postnatal

Días	Prenatal	Postnatal	Total
15	4		
17	4		
19	4		
1		4	
7		4	
14		4	
21		4	
Total	12	16	28

7.2.1.3. Análisis Histológico

Para el análisis estereoscópico y microscópico de la evolución del proceso de osificación y formación del hueso, las muestras embrionarias y las postnatales fueron sometidas a doble tinción de azul de Alcian y rojo de Alizarina, utilizando el método descrito por Redfern y colaboradores⁹⁴ y el cual se modificó y se describe brevemente a continuación: la tinción consistió en someter la muestra inicialmente a solución de Azul Alcian 0.03% por 3 días a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó un lavado con etanol al 95% por 6 horas en agitación, seguido de un paso por solución KOH 2% de 12 a 24 horas a temperatura ambiente. Finalmente se realiza tinción con solución Rojo de Alizarina 0.03% por 24 horas a temperatura ambiente.

Las muestras se sometieron a 3 pasos por soluciones de glicerol/1% KOH con incremento gradual de la concentración de glicerol (20%, 50% y 80%), cada una con un tiempo de incubación de 24 horas a temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron en glicerol al 100%(13; 14).⁹² Para todas las muestras embrionarias y para los neonatos del día 1, previo a la tinción, se realizó un proceso de transparentación del tejido blando utilizando KOH según el protocolo descrito por Nagy y colaboradores.³¹

Una vez teñidos los huesos se realizó un análisis morfológico descriptivo a nivel macroscópico de la placa de crecimiento, el centro secundario de osificación y la forma general del hueso en los diferentes puntos del desarrollo planteados anteriormente, por medio de un estereoscopio. El análisis histológico de la etapa embrionaria se realizó mediante observación de cortes de 5 μ m de grosor usando un microscopio de luz mientras

que para la etapa postnatal se realizó un corte en el plano sagital a los huesos para observación en estereoscopio, utilizando un micrótomo de sólidos Buehler con un disco de 320 μm a 500 rpm. Para esto, las muestras fueron previamente teñidas y embebidas en dimetil metacrilato.

7.2.2. Fase computacional

7.2.2.1. Micro-CT

La adquisición de las imágenes por micro-CT se realizó tiñendo las muestras con hematoxilina fosfotungstica para permitir la observación de tejido blando. Todas las muestras fueron escaneadas utilizando un microtomografo de rayos X Skyscan 1172 (Micro Photonics, Allenton PA). Los parámetros de adquisición se ajustaron a 60kV, 124 μA y se utilizó un modo de adquisición de 180° con 6 cuadros en promedio y un tiempo de rotación de 0.6.

La reconstrucción 3D se realizó utilizando el software de reconstrucción NRECON (Micro Photonics, Allenton PA) con un factor de corrección de la señal registrada de 10 unidades y corrección artefactos por endurecimiento del haz del 60%. Las imágenes 3D fueron generadas utilizando el software CtVox (Micro Photonics, Allentown, PA).

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Prenatal

El desarrollo óseo empieza temprano en la etapa embrionaria con la formación de un molde cartilaginoso el cual a quince días de gestación ya presenta algunos rasgos morfológicos propios de humero adulto, particularmente en la epífisis proximal donde se reconocen estructuras tales como la cabeza humeral y el tubérculo mayor. La cabeza ya presenta la forma redondeada característica y sobresale lateralmente de forma medial. Por su parte, la epífisis distal presenta una morfología redondeada con dos prominencias que sobresalen medialmente y son simétricas en el plano anteroposterior. La diáfisis tiene una apariencia cilíndrica homogénea y con un diámetro similar a lo largo del hueso (Fig. 7-1A). A quince días de gestación el humero es principalmente cartilaginoso como evidencia su

aparición azul posterior a la doble tinción con Azul de Alcian/Rojo de Alizarina (Figura 7-1A). Sin embargo, microscópicamente ya es evidente una amplia zona de hipertrofia en la porción central (Figuras 7-1C-D), la cual además presentan una mayor densidad en las imágenes de micro-CT.

Similar a lo reportado por Patton y Kaufman, 1995,⁹⁸ después de quince días de gestación ya existen indicios de la formación del centro primario de osificación (CPO), los resultados presentados en este estudio muestran una zona de mayor densidad en las imágenes de micro-CT donde probablemente se originará el CPO. A partir de este momento los principales cambios se relacionan con la consolidación y expansión del CPO hasta el nacimiento. Por otra parte, en las imágenes de micro-CT del humero en esta etapa embrionaria muestran una zona redondeada de mayor densidad donde se formará el centro secundario de osificación (CSO) (Fig. 7-1B).

Anteriormente se han realizado estudios de imagenología en huesos largos en humanos, estos trabajos describen la aparición del CSO a ocho semanas de la gestación, sin embargo estos datos varían dependiendo del hueso.¹⁰⁰

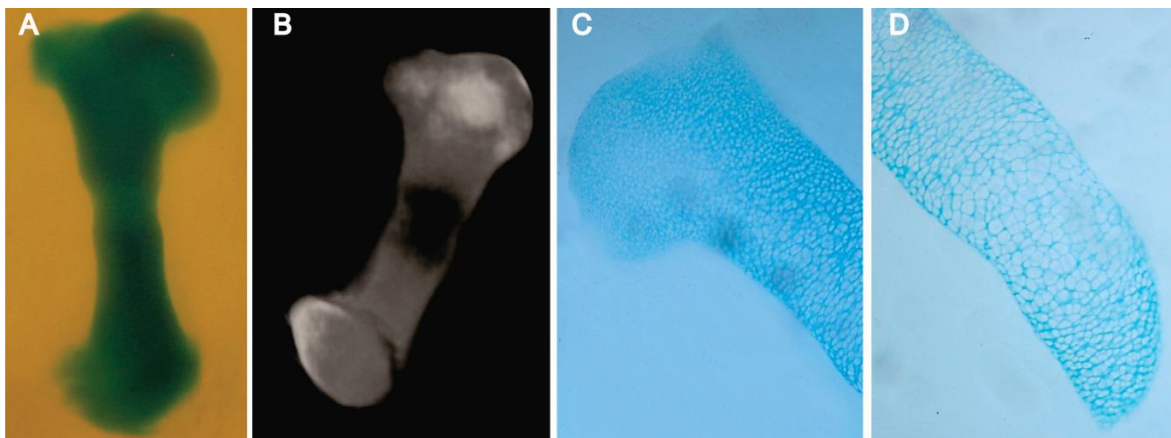


Figura 7-1. Imágenes humero proximal y distal embriones de ratón de 15 días **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología humero proximal, vista 10X **D)** histología humero distal, vista 10X.

En general en el periodo de tiempo analizado durante el desarrollo embrionario, los principales cambios en la morfología del humero se observan en la zonificación de lo que

será la placa de crecimiento además del tamaño total del hueso y de las características de la diáfisis. De esta manera, se observa que los especímenes obtenidos al día 17 presentan una coloración más oscura en una amplia zona en la porción central del humero cuando se someten a tinción con Azul de Alcian/Rojo de Alizarina, que está acompañada por un aumento en la densidad en las micro-CT, lo que sugiere el inicio de la osificación en esta zona. A escala microscópica se observa la diferenciación de los condrocitos desde células de reserva, pasando por proliferativas y finalmente como células hipertróficas, características de la placa de crecimiento (Fig. 7-2).

Aunque la mayoría de los estudios disponibles en literatura hasta el momento se centran en la descripción del CSO existen todavía muchas falencias respecto a la descripción del desarrollo de la placa de crecimiento en etapas embrionarias. Trabajos como el de Hirasawa et al., 1999,¹⁰² describen como la señalización celular es indispensable para el desarrollo del cartílago, sin embargo aunque usan doble tinción con Rojo de Alizarina/Azul Alcian no se enfocan en describir el patrón de osificación a lo largo del crecimiento.

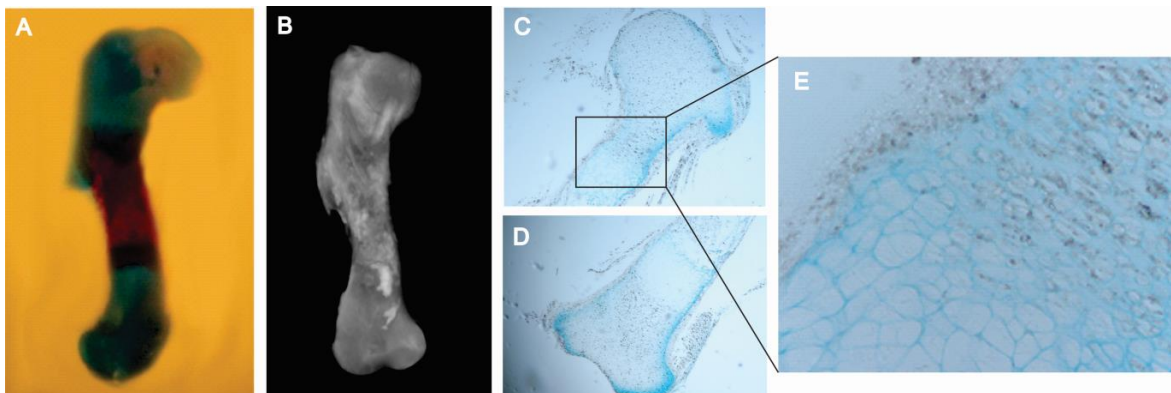


Figura 7-2. Imágenes humero proximal y distal embriones de ratón de 17 días **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología humero proximal, vista 10X **D)** histología humero distal, vista 10X **E)** acercamiento placa de crecimiento, zona de transición de condrocitos proliferativos a hipertróficos, vista 40X.

Al día embrionario 19 el CPO en la diáfisis se ha extendido hasta alcanzar el límite con las epífisis. Adicionalmente, en esta etapa se observa la aparición de una prominencia lateral en el área donde se desarrollará la cresta deltoidea que se acompaña del ensanchamiento de las metáfisis tanto distal como proximal en el plano anteroposterior. La placa de

crecimiento en esta etapa del desarrollo se encuentra mucho más organizada, pudiéndose reconocer fácilmente las tres zonas de la placa de crecimiento. (zona de reserva, proliferativa e hipertrófica) (Fig. 7-3).

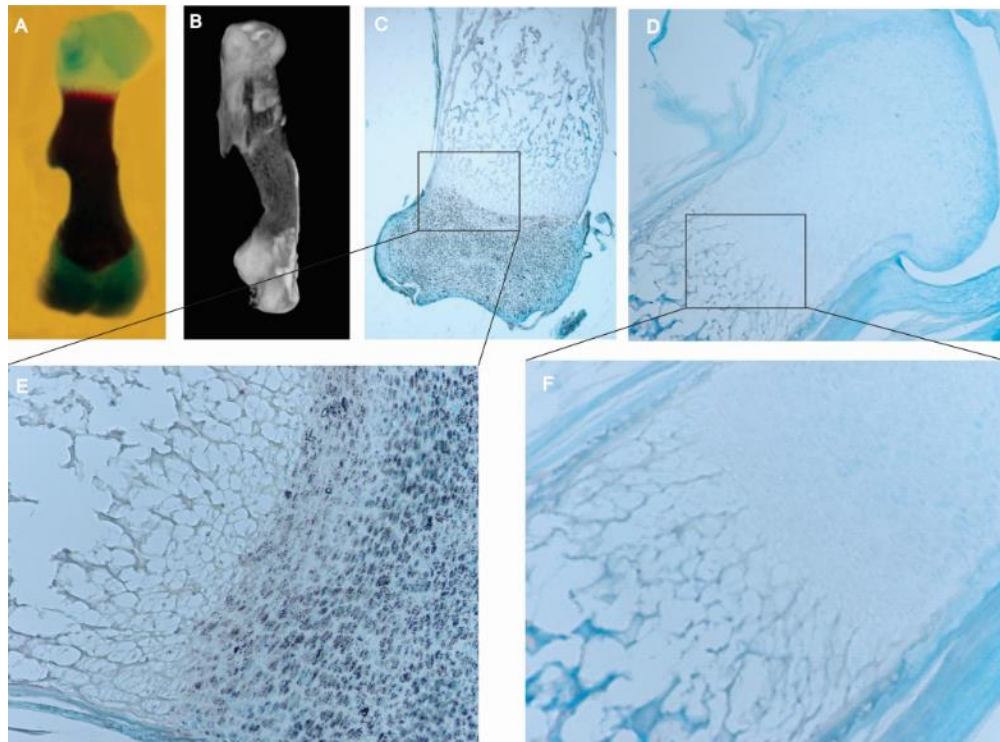


Figura 7-3. Imágenes humero proximal y distal embriones de ratón de 19 días **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología humero distal, vista 10X **D)** histología humero proximal, vista 10X **E)** acercamiento placa de crecimiento distal, vista 20X **F)** acercamiento placa de crecimiento proximal, vista 20X.

7.3.2. Postnatal

En el periodo postnatal se consideró cortes histológicos para los humeros de ratones neonatos y de siete días de edad, debido a que el tejido aún es en su mayoría cartilaginoso y permite implementar este tipo de técnicas. Sin embargo para las muestras de ratones de 14 a 46 días de edad se cortaron usando la técnica de corte sobre tejidos sólidos. En esta etapa del desarrollo del humero, este ya presenta una morfología definida.

En las muestras de neonatos ya se observa presencia de tejido óseo a lo largo de toda la diáfisis, evidenciado por una zona más densa en las imágenes de micro-CT y la coloración roja observada en los especímenes teñidos con Azul de Alcian/Rojo de Alizarina. Adicionalmente, se observan cambios importantes de la morfología de la diáfisis, donde la cresta deltoidea ya se encuentra completamente definida (Figuras 7-4A y B). En contraste, las epífisis aunque de mayor tamaño, aún son completamente cartilagosas sin evidencia de aparición del CSO. Además, tanto en la epífisis proximal como en la distal se observan frentes de osificación con una forma aplanada (Figura 7-4A).

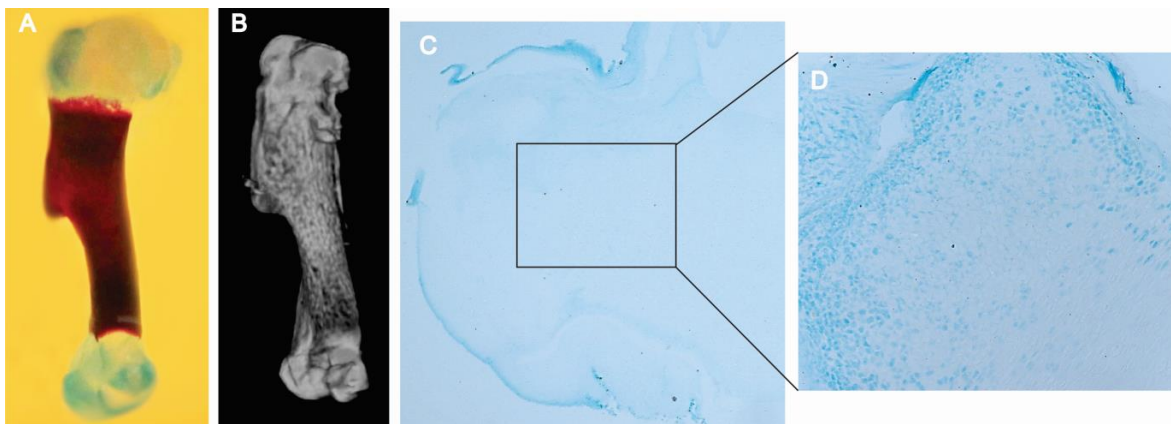


Figura 7-4. Imágenes humero proximal y distal de neonatos de ratón **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología humero proximal, vista 10X **D)** acercamiento condrocitos de reserva y proliferativos, vista 20X.

Los CSOs son evidentes en la epífisis proximal y distal a los días 7 y 14 respectivamente. A 7 días de edad el CSO se observa como una masa redondeada uniforme mientras que a 14 días estos se han alargado horizontalmente hasta unirse (Figs. 7-5A-B, 7-6A-B).

La placa de crecimiento presenta disminución progresiva en su grosor, así como cambios en su morfología, a 7 días de edad la placa de crecimiento es más gruesa y su curvatura es suave, mientras que a 14 días de edad ha disminuido su grosor y la curvatura es mucho más pronunciada como se puede ver en la Figura 7-6D.

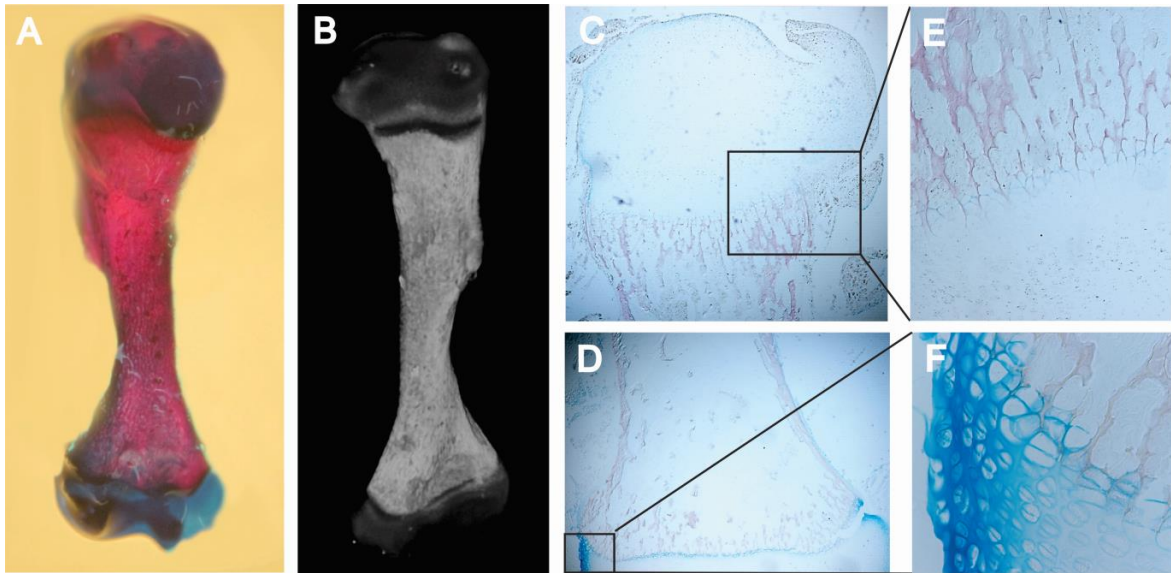


Figura 7-5. Imágenes humero proximal y distal de ratones de 7 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** histología humero proximal, vista 10X **D)** histología humero distal, vista 10X **E)** acercamiento placa de crecimiento proximal, vista 40X **F)** acercamiento placa de crecimiento distal, vista 40X.

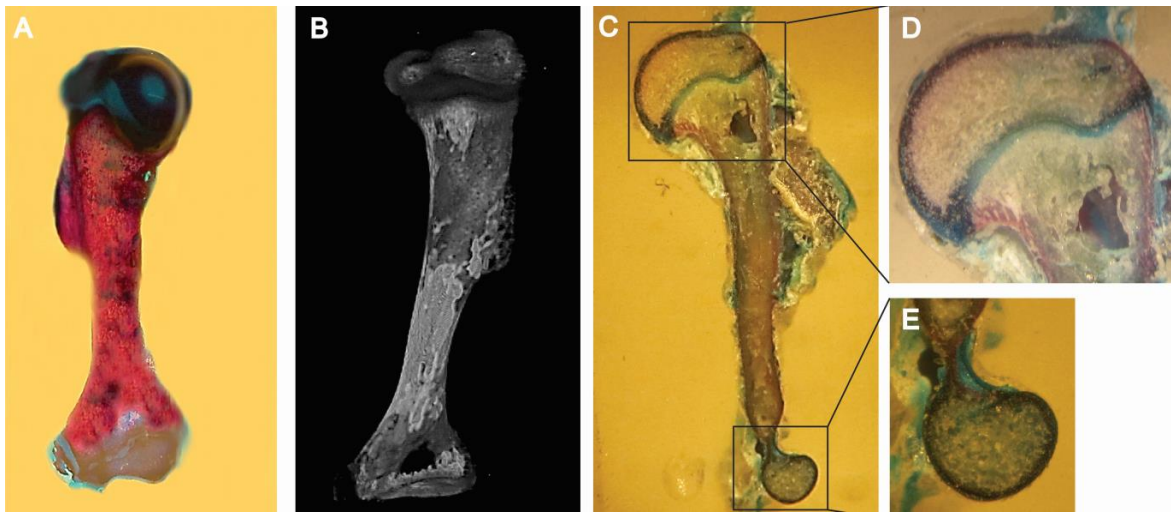


Figura 7-6. Imágenes humero proximal y distal de ratones de 14 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** corte solido del humero **D)** acercamiento humero proximal **E)** acercamiento humero distal.

Para el día 21, tanto la epifisis proximal como la distal se encuentran osificadas y la placa de crecimiento ha cambiado de morfología una vez mas, esta vez se observa como una

estructura en forma de “M”. Estos cambios en la morfología de la placa de crecimiento también se han evidenciado en humanos en trabajos como el de Kandzierski y Matuszewski, 2012.³ Estos cambios pueden verse influenciados por factores mecánicos, bioquímicos o genéticos. Piszczatowski, 2012²² establece en su estudio la importante relación de las cargas mecánicas en la forma del cartílago de crecimiento.

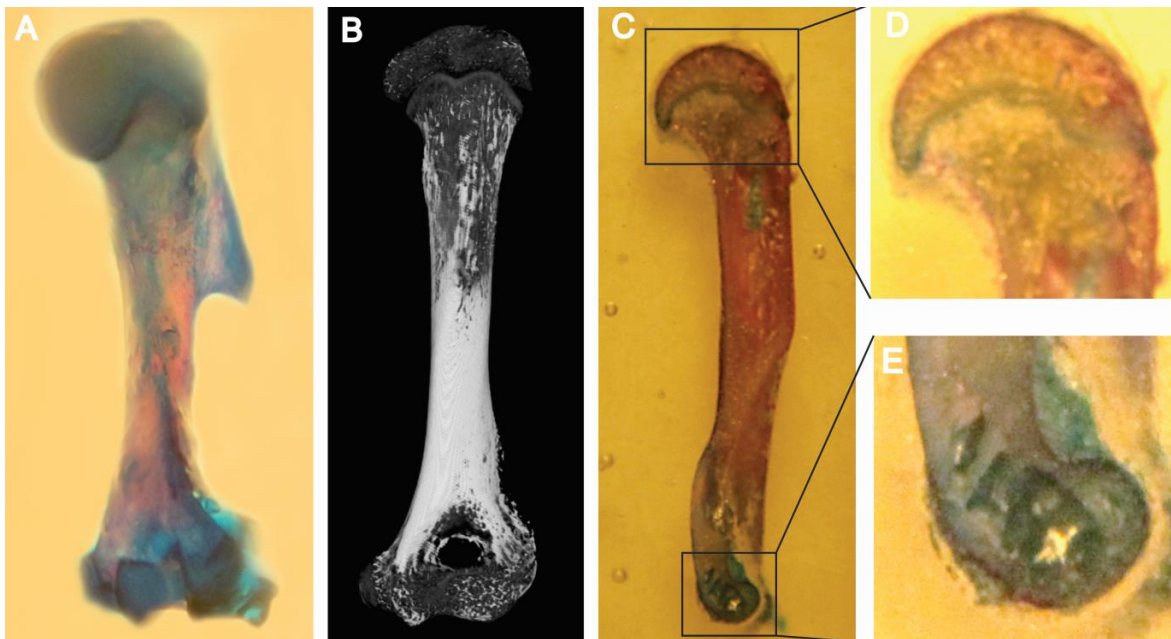


Figura 7-7. Imágenes humero proximal y distal de ratones de 21 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** reconstrucción 3D **C)** corte solido del humero **D)** acercamiento humero proximal **E)** acercamiento humero distal.

A 35 días de desarrollo posnatal el humero muestra una placa de crecimiento casi cerrada, sin embargo aún se puede observar algo de tinción con Azul Alcian, lo que evidencia la presencia de tejido cartilaginoso, sin embargo a lo largo del desarrollo se ha observado como esta estructura disminuye en grosor progresivamente. La morfología varía en cada etapa del desarrollo, en este punto la placa es irregular con curvas pronunciadas (Fig. 7-8) al igual que el humero de 46 días, en el cual aunque la placa de crecimiento sigue activa, su morfología se torna más irregular.

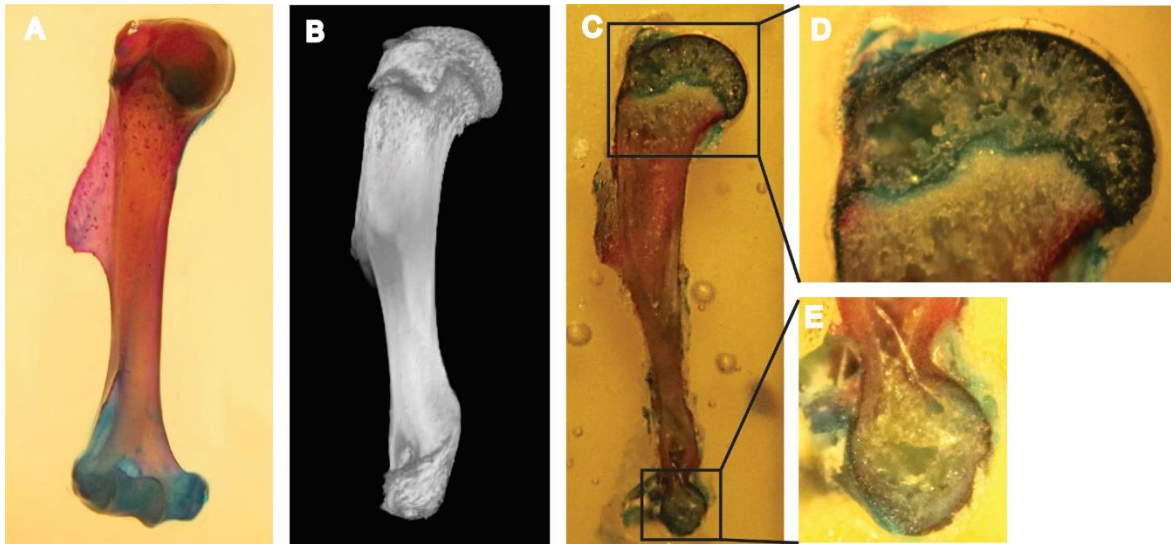


Figura 7-8. Imágenes humero proximal y distal de ratones de 35 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** corte solido del humero **D)** acercamiento humero proximal **E)** acercamiento humero distal.

El frente de osificación de la placa de crecimiento proximal tiene una forma aplanada en el neonato, hacia los 7 días se observa la adquisición de una forma arqueada en cortes coronales, la cual progresa a una formas ondulada al día 14 y a los 21 días adquiere una forma irregular que se mantiene hasta los 46 días (Figs. 7-6 y 7-7) . Esto contrasta con la apariencia lineal constante que se observa en el plano sagital entre la etapa neonatal y los 21 días.

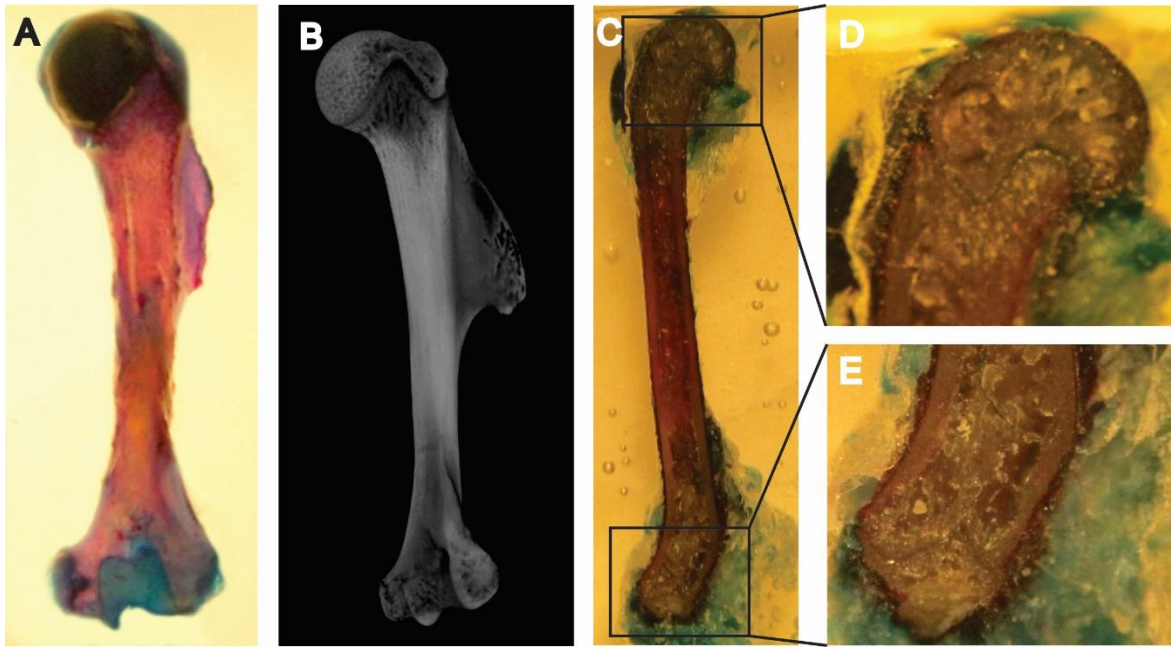


Figura 7-9. Imágenes humero proximal y distal de ratones de 46 días de edad **A)** Tinción con Azul Alcian y Rojo de Alizarina **B)** corte solido del humero **D)** acercamiento humero proximal **E)** acercamiento humero distal.

7.4. Conclusiones

El desarrollo del humero en ratones es un proceso que sigue los parámetros del desarrollo óseo en humanos, de esta manera los datos obtenidos en este estudio se podrían extrapolar al desarrollo del humero en humanos. Este hueso sufre importantes cambios, iniciando con un molde cartilaginoso en los primeros días de gestación y finalizando con la osificación completa aproximadamente cuarenta y seis días después de nacimiento. Las técnicas utilizadas son eficaces en el estudio del desarrollo de estructuras como los centros de osificación y la placa de crecimiento, sin embargo es necesario desarrollar técnicas que permitan realizar cortes histológicos a tejidos solidos sin perder la tinción.

8. Conclusiones y recomendaciones

8.1. Conclusiones

En el presente trabajo se presenta una descripción detallada de la influencia de algunos aspectos mecánicos y bioquímicos, así como una descripción experimental del desarrollo pre y postnatal de huesos largos en ratones, según los resultados de esta investigación y según trabajos previos se presenta evidencia computacional que podría ser concluyente respecto a que tanto factores mecánicos como bioquímicos están estrechamente relacionados en la formación y dinámica de la placa de crecimiento y la epífisis de huesos largos en humanos. Sin embargo, aún existen muchos vacíos de conocimiento en relación a los diferentes mecanismos que toman lugar en la osificación endocondral y el crecimiento de huesos largos y como estos factores interactúan. Aunque se han realizado diferentes aproximaciones computacionales y experimentales es necesario implementar modelos que permitan esclarecer en qué medida cada uno de estos factores actúa en la funcionalidad de las diferentes estructuras del hueso.

En relación a la distribución de esfuerzos mecánicos y como estos intervienen en la dinámica de estructuras como la placa de crecimiento, este estudio es un intento inicial por entender la influencia mecánica en la biología ósea. El modelo planteado, aunque simple, revela información importante relacionada con los esfuerzos mecánicos en la epífisis y en la placa de crecimiento y en el proceso de osificación. Los resultados del estudio pueden ser útiles para entender los mecanismos subyacentes a la influencia de estímulos mecánicos en el desarrollo óseo, en particular para formular hipótesis en relación a las patologías óseas que resultan de condiciones genéticas o adquiridas. No obstante, es necesario considerar trabajos adicionales para considerar factores como la forma epifisaria, diferentes condiciones de carga, y la morfología de la placa de crecimiento en huesos específicos.

Debido a que los factores bioquímicos se han reconocido anteriormente como un aspecto importante de regulación de la dinámica del crecimiento de huesos largos este trabajo constituye una primera aproximación al desarrollo de modelos computacionales integrales

que permiten estudiar efectos conjuntos entre estímulos físicos y bioquímicos en los distintos procesos biológicos que tienen lugar dentro de la placa de crecimiento. Los resultados descritos en este capítulo, permiten predecir el efecto de las cargas mecánicas sobre el tamaño de la placa de crecimiento y sobre la velocidad de crecimiento, tal como se describe en estudios experimentales.

El desarrollo del humero y el fémur en ratones es un proceso que sigue los parámetros de la osificación endocondral en humanos, de esta manera los datos obtenidos en este estudio se podrían extrapolar al desarrollo de huesos largos en mamíferos superiores. Estos huesos sufren importantes cambios, iniciando con un molde cartilaginoso en los primeros días de gestación y finalizando con la osificación completa aproximadamente cuarenta y seis días después de nacimiento. Durante la etapa embrionaria se presentan variaciones importantes en la organización de la placa de crecimiento, mientras que en el periodo postembrionario los cambios se dan a nivel macroscópico en la morfología de la placa.

8.2. Recomendaciones

Debido a que la distribución de esfuerzos mecánicos en un hueso largo se ve ampliamente influenciado por la forma de este, es necesario llevar a cabo la implementación de modelos computacionales que incorporen factores como la forma epifisaria, diferentes condiciones de carga, y la morfología de la placa de crecimiento en huesos específicos.

A pesar de que los resultados obtenidos en relación a la influencia del bucle regulatorio Ihh-PTHrP, pueden reproducir satisfactoriamente el proceso de hipertrofia y revelan información importante acerca de los efectos a corto plazo del bucle regulatorio y las cargas mecánicas sobre los condrocitos de una columna, no es posible realizar inferencias sobre tasas de crecimiento en un individuo. Por esto es necesario realizar modelos que incluyan la zona de reserva y el proceso de proliferación, elementos importantes para la regulación de dichas tasas. Además es necesario considerar las interacciones entre el bucle bioquímico y las cargas, como sugieren algunos autores que han reportado cambios en la síntesis de Ihh y PTHrP asociados a estímulos mecánicos.

Las técnicas utilizadas son eficaces en el estudio del desarrollo de estructuras como los centros de osificación y la placa de crecimiento, sin embargo es necesario desarrollar técnicas que permitan realizar cortes histológicos a tejidos sólidos sin perder la tinción.

Anexo A:

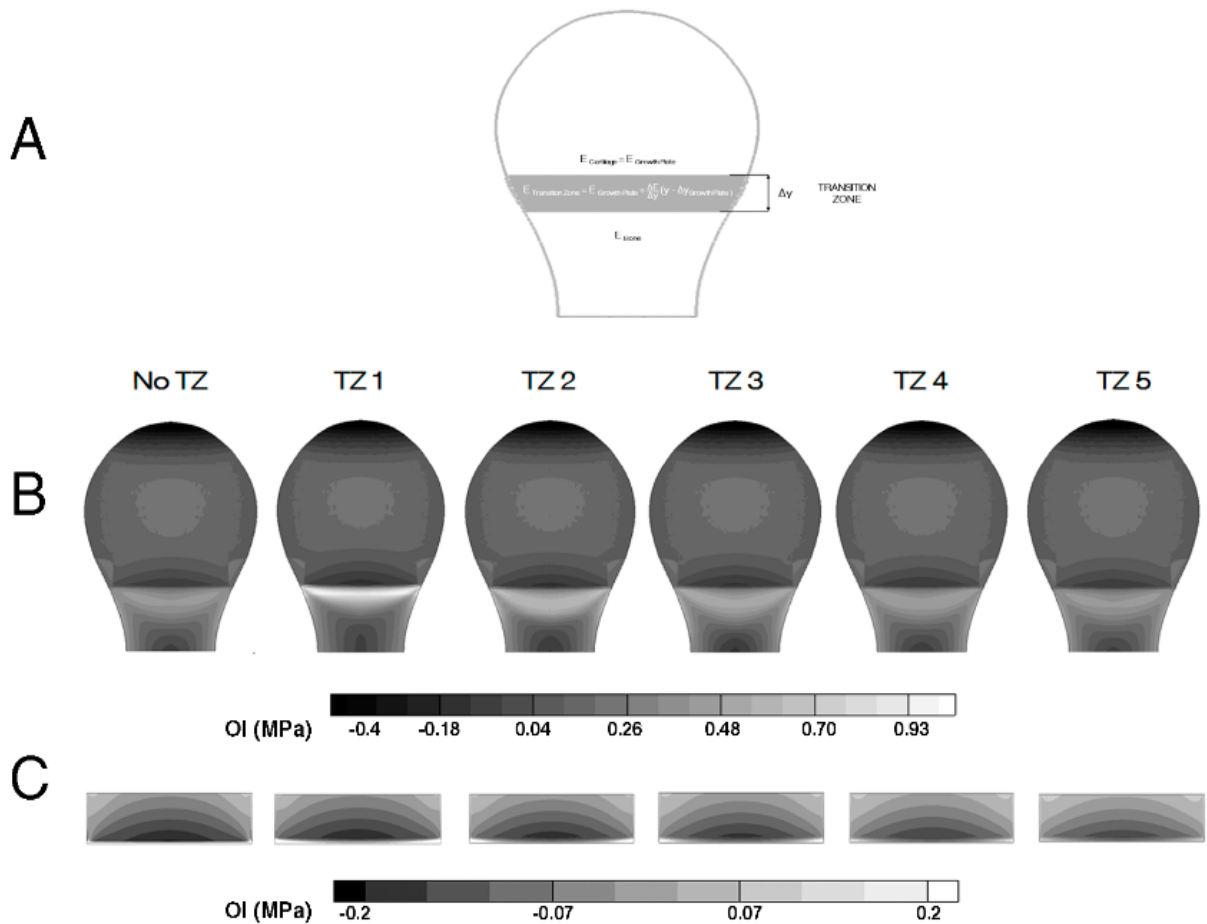


Fig. 3-1S. Análisis del efecto de la transición de las propiedades de material en la distribución de esfuerzos mecánicos. **A)** en gris se marca la zona de transición denotada como Δy . **B-C)** Resultados de la distribución de IO en ausencia o presencia de zona de transición (TZ) en la epífisis (B) y en la placa de crecimiento (C). TZ1: $\Delta y=1$ mm TZ2: $\Delta y=3$ mm TZ3: $\Delta y=5$ mm TZ4: $\Delta y=8$ mm TZ5: $\Delta y=11$ mm.

Anexo B:

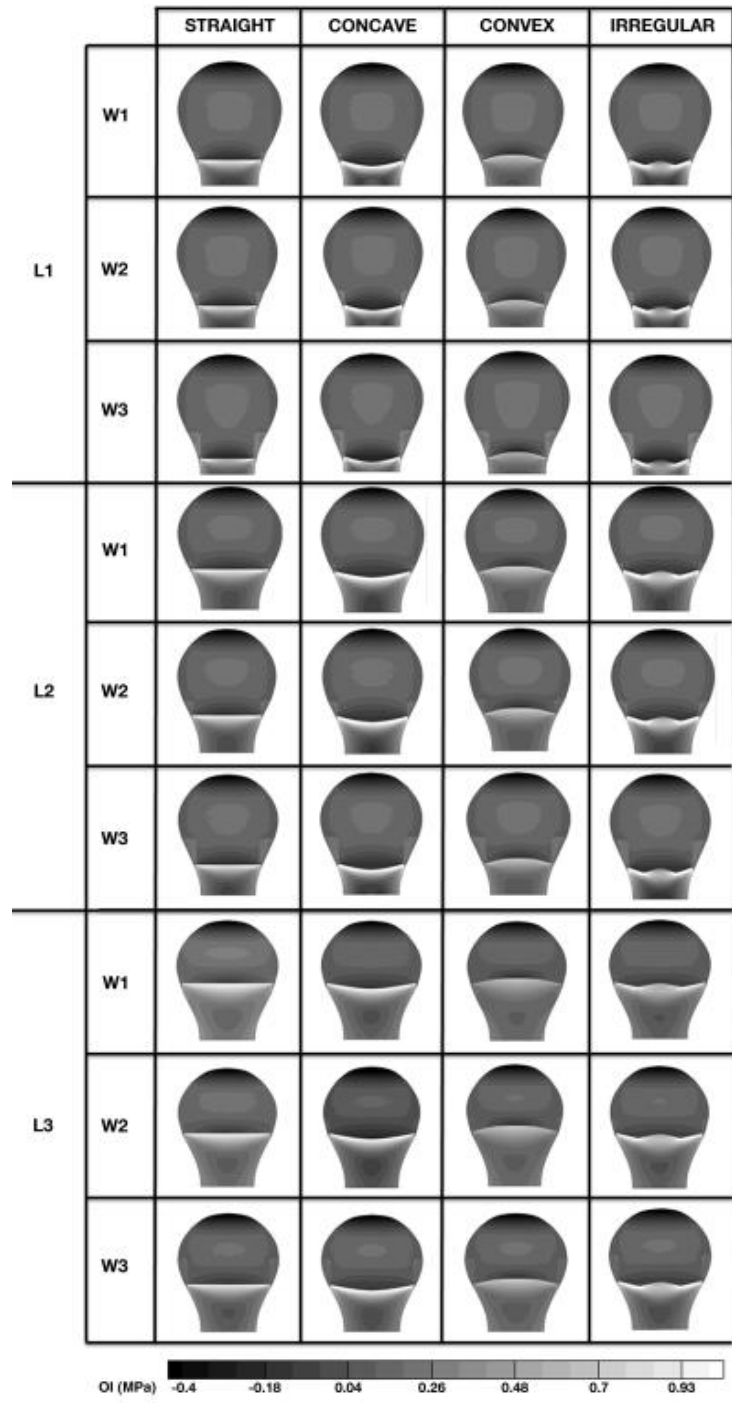


Fig. 3-2S. Distribución del IO en la epífisis cartilaginosa (Caso 1) para todas las simulaciones realizadas.

Anexo C:

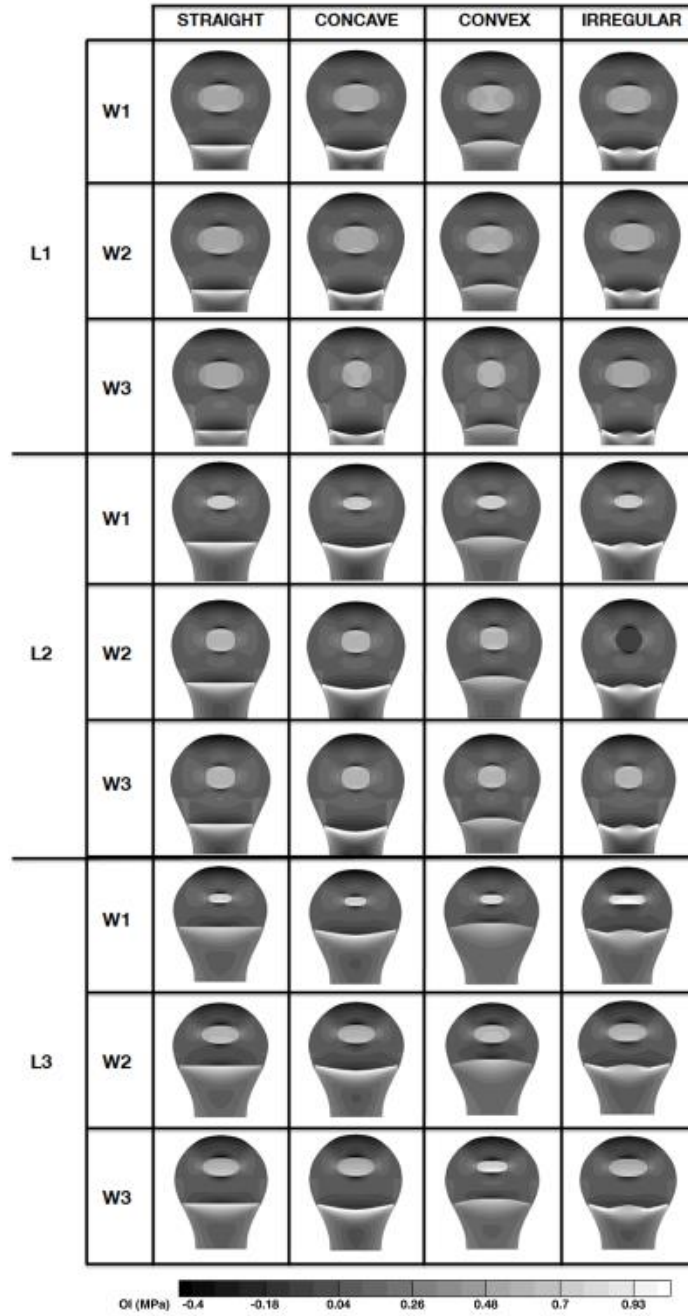


Fig. 3-3S. distribución del Índice Osteogénico en una epífisis con CSO (Caso 2) para todas las simulaciones.

Anexo D:

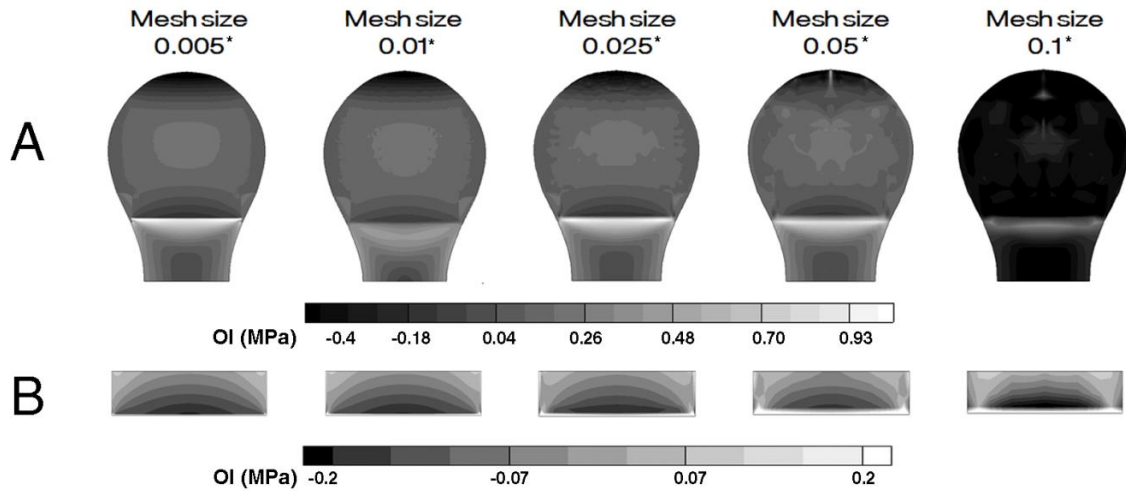


Fig. 3-4S. Análisis de convergencia de malla. Los resultados muestran la distribución del IO usando diferentes tamaños de malla correspondientes a 66.050 elementos (0.005 tamaño de malla); 16.404 elementos (0.01 tamaño de malla); 2711 elementos (0.025 tamaño de malla); 676 elementos (0.05 tamaño de malla); 192 elementos (0.1 tamaño de malla). *el tamaño de la malla se refiere a las unidades de longitud de mallado.

Anexo E:

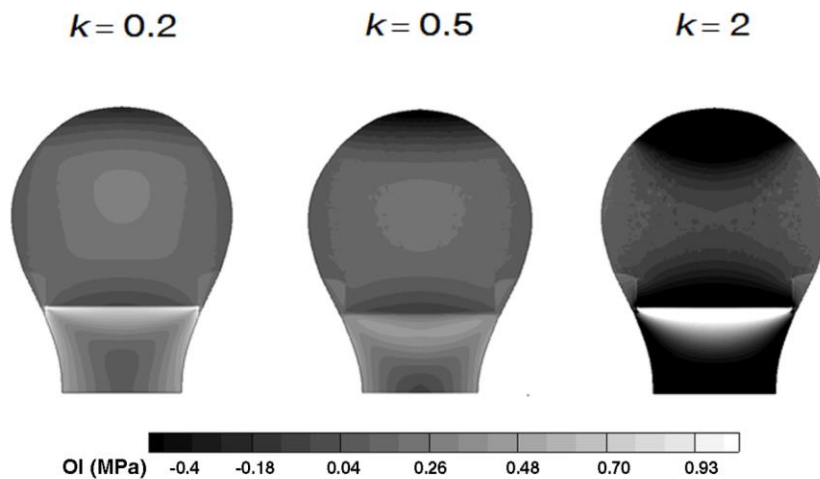


Fig. 3-5S. Distribución de IO usando diferentes valores de K.

Anexo F:

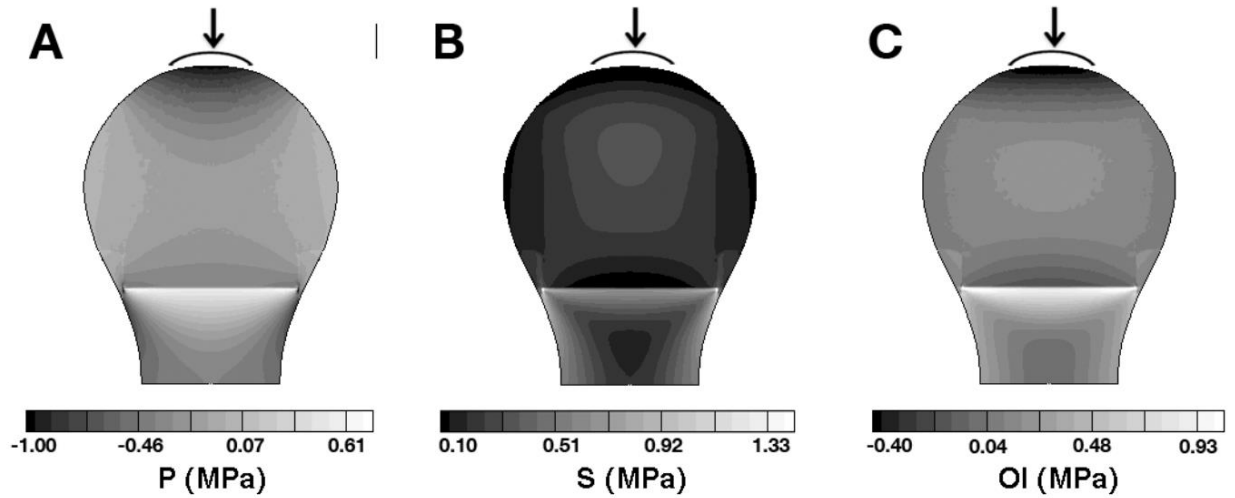


Fig. 3-6S. Distribución de estrés en la epífisis cartilaginosa (Caso 1). Ejemplo representativa para la placa recta en localización intermedia y grosor (L2, W2 caso 1). El área cargada se muestra con una flecha **A)** estrés octaédrico normal. **B)** estrés octaédrico cortante **C)** índice osteogénico.

Anexo G:

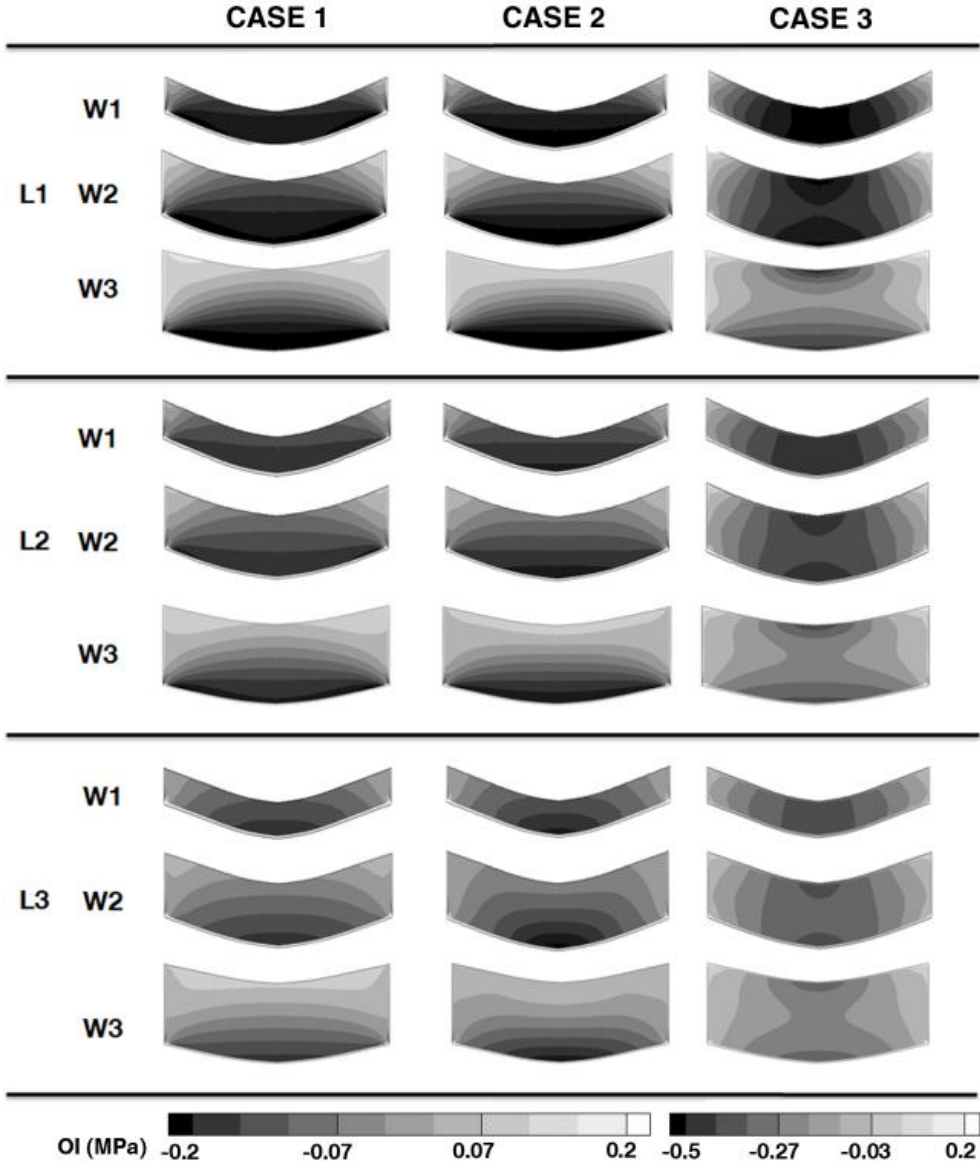


Fig. 3-7S. Distribución de IO en una placa de crecimiento cóncava en tres diferentes localizaciones, para todos los estadios del desarrollo de la epífisis y todos lo grosores de la placa de crecimiento.

Anexo H:

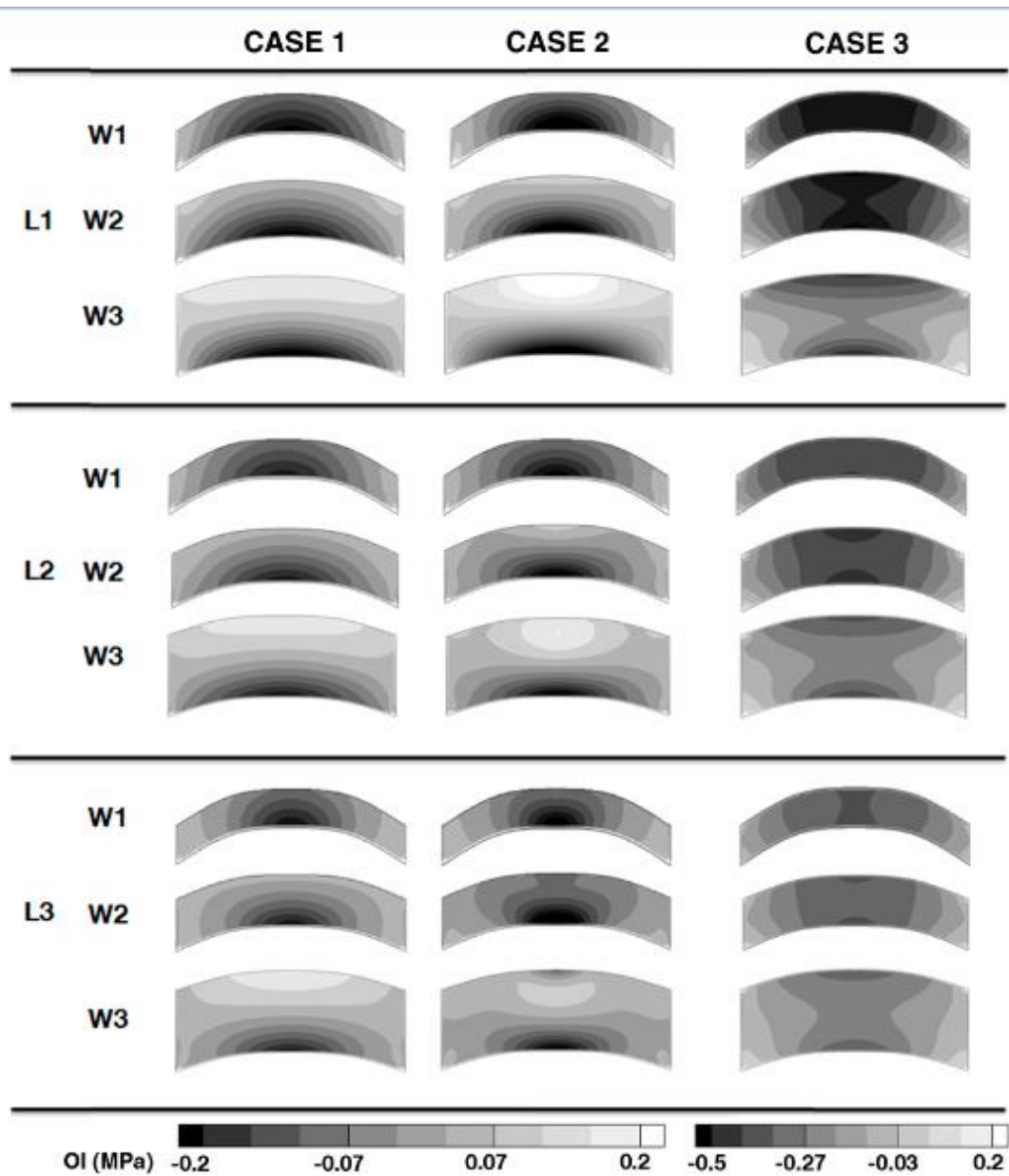


Fig. 3-8S. Distribución de IO en una placa de crecimiento convexa en las tres diferentes localizaciones, para todas los estadios del desarrollo de la epífisis y todos los grosores.

Anexo I:

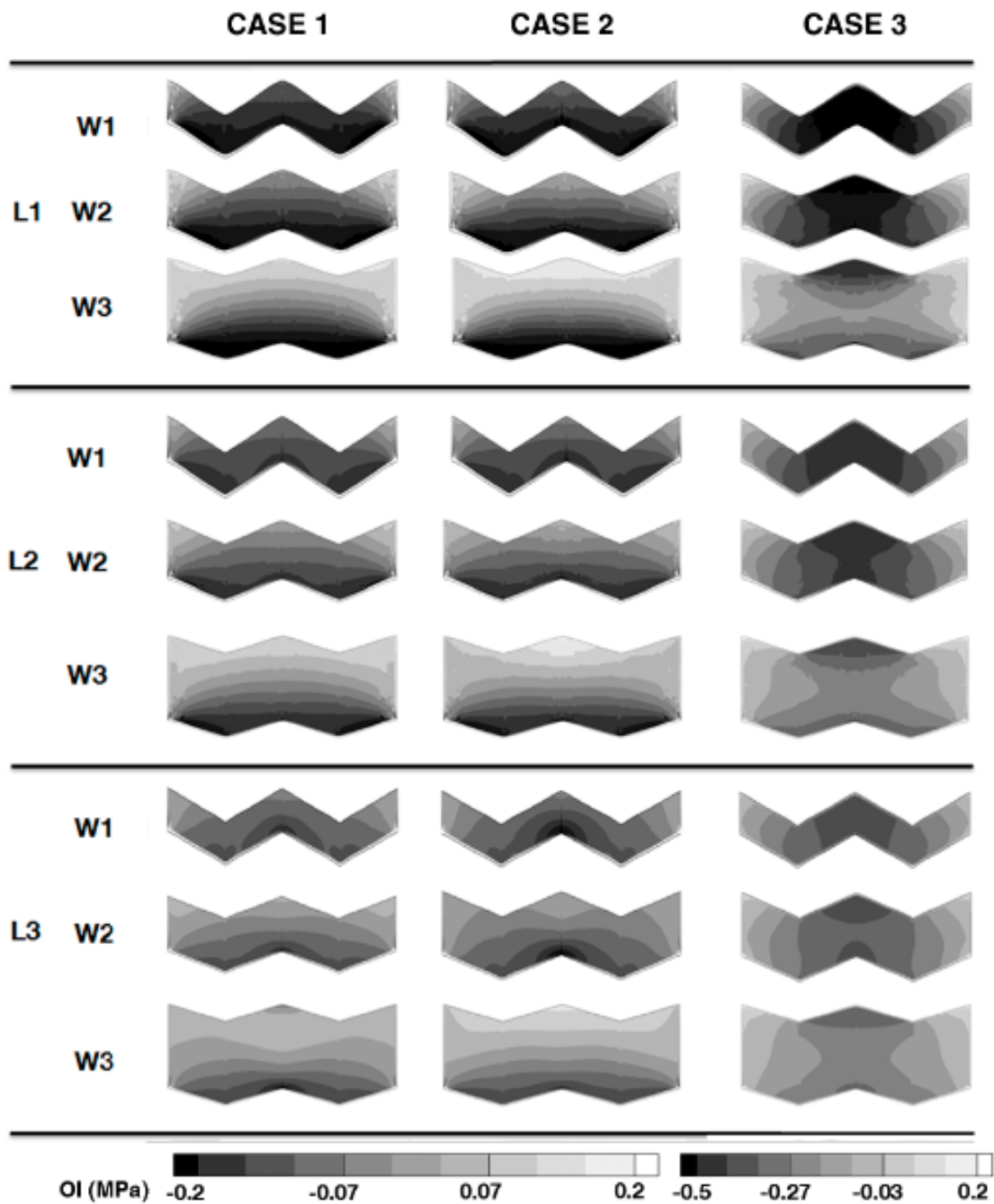


Fig. 3-9S. Distribución de IO en una placa de crecimiento irregular en las tres diferentes localizaciones, para todas los estadios del desarrollo de la epífisis y todos los grosores.

Bibliografía

1. Karsenty, G., Kronenberg, H.M. & Settembre, C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 629-648 (2009).
2. Ballock, R.T. & O'Keefe, R.J. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am* **85-A**, 715-726 (2003).
3. Kandzierski, G., Matuszewski, L. & Wojcik, A. Shape of growth plate of proximal femur in children and its significance in the aetiology of slipped capital femoral epiphysis. *Int Orthop* **36**, 2513-2520 (2012).
4. WSS, J. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. . in *Bone Mechanics Handbook* (ed. SC, C.) 1-68 (CRC Press, Florida, 2001).
5. Doblaré, M., García, J.M. & Gómez, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics* **71**, 1809-1840 (2004).
6. Michel Latarjet, A.R.L. *Anatomía Humana*, (Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2004).
7. Kronenberg, H.M. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336 (2003).
8. GAMBOA MARQUEZ, A.y.G.-A., Diego Alexander. Factores mecánicos en enfermedades osteocondrales. *Rev Cubana Invest Bioméd [online]* **30**, 171-192 (2011).
9. Burdan, F., *et al.* Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol* **47**, 5-16 (2009).
10. Villemure, I. & Stokes, I.A. Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *J Biomech* **42**, 1793-1803 (2009).
11. Stokes, I.A. Mechanical effects on skeletal growth. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **2**, 277-280 (2002).
12. Stokes, I.A., Aronsson, D.D., Dimock, A.N., Cortright, V. & Beck, S. Endochondral growth in growth plates of three species at two anatomical locations modulated by mechanical compression and tension. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **24**, 1327-1334 (2006).
13. Stokes, I.A., Clark, K.C., Farnum, C.E. & Aronsson, D.D. Alterations in the growth plate associated with growth modulation by sustained compression or distraction. *Bone* **41**, 197-205 (2007).
14. Sundaramurthy, S. & Mao, J.J. Modulation of endochondral development of the distal femoral condyle by mechanical loading. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **24**, 229-241 (2006).
15. Mackie, E.J., Tatarczuch, L. & Mirams, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *J Endocrinol* **211**, 109-121 (2011).
16. Brouwers, J., van Donkelaar, C., Sengers, B., and Huiskes, R. Can the growth factors pthrp, ihh and vegf, together regulate the development of a long bone? *Journal of Biomechanics* **39**, 2774–2782 (2006).

17. Garzon-Alvarado, D.A., Garcia-Aznar, J.M. & Doblare, M. Appearance and location of secondary ossification centres may be explained by a reaction-diffusion mechanism. *Comput Biol Med* **39**, 554-561 (2009).
18. Henderson, J.H. & Carter, D.R. Mechanical induction in limb morphogenesis: the role of growth-generated strains and pressures. *Bone* **31**, 645-653 (2002).
19. Stevens, S.S., Beaupre, G.S. & Carter, D.R. Computer model of endochondral growth and ossification in long bones: biological and mechanobiological influences. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **17**, 646-653 (1999).
20. Shefelbine, S.J., Tardieu, C. & Carter, D.R. Development of the femoral bicondylar angle in hominid bipedalism. *Bone* **30**, 765-770 (2002).
21. Shefelbine, S.J. & Carter, D.R. Mechanobiological predictions of growth front morphology in developmental hip dysplasia. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **22**, 346-352 (2004).
22. Piszczatowski, S. Material aspects of growth plate modelling using Carter's and Stokes's approaches. *Acta Bioeng Biomech* **13**, 3-14 (2011).
23. Piszczatowski, S. Geometrical aspects of growth plate modelling using Carter's and Stokes's approaches. *Acta Bioeng Biomech* **14**, 93-106 (2012).
24. Garzon-Alvarado, D.A. Can the size of the epiphysis determine the number of secondary ossification centers? A mathematical approach. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* **14**, 819-826 (2011).
25. Peinado Cortes, L.M., Vanegas Acosta, J.C. & Garzon Alvarado, D.A. A mechanobiological model of epiphysis structures formation. *J Theor Biol* **287**, 13-25 (2011).
26. Fasano, A., Herrero, M.A., Lopez, J.M. & Medina, E. On the dynamics of the growth plate in primary ossification. *J Theor Biol* **265**, 543-553 (2010).
27. Narvaez-Tovar, C.A. & Garzon-Alvarado, D.A. Computational modeling of the mechanical modulation of the growth plate by sustained loading. *Theor Biol Med Model* **9**, 41 (2012).
28. Provot, S. & Schipani, E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 658-665 (2005).
29. Ham, A.W. & Cormack, D.H. *Ham's histology*, (Lippincott, Philadelphia, USA. Chapter 12. Bone, 1987).
30. Scheuer, L. & Black, S. *The Juvenile Skeleton*, (Elsevier Science, San Diego, USA. Chapters 8-10 pp. 263 - 408, 2004).
31. Nemec, U., *et al.* Human long bone development in vivo: analysis of the distal femoral epimetaphysis on MR images of fetuses. *Radiology* **267**, 570-580 (2013).
32. Varich, L.J., Laor, T. & Jaramillo, D. Normal maturation of the distal femoral epiphyseal cartilage: age-related changes at MR imaging. *Radiology* **214**, 705-709 (2000).
33. Ross, M.H. & Pawlina, W. *Histology: A Text and Atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology*, (Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA., 2006).

34. Byers, S., Moore, A.J., Byard, R.W. & Fazzalari, N.L. Quantitative histomorphometric analysis of the human growth plate from birth to adolescence. *Bone* **27**, 495-501 (2000).
35. Fitzgerald, R.H., Kaufer, H. & Malkani, A.L. *Orthopaedics*, (C V MOSBY Company, 2002).
36. van der Meulen, M.C. & Huiskes, R. Why mechanobiology? A survey article. *J Biomech* **35**, 401-414 (2002).
37. Sergerie, K., *et al.* Growth plate explants respond differently to in vitro static and dynamic loadings. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **29**, 473-480 (2011).
38. Carter, D.R. & Wong, M. The role of mechanical loading histories in the development of diarthrodial joints. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **6**, 804-816 (1988).
39. Garzon-Alvarado, D.A., Peinado Cortes, L.M. & Cardenas Sandoval, R.P. A mathematical model of epiphyseal development: hypothesis of growth pattern of the secondary ossification centre. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* **14**, 23-32 (2011).
40. Carter, D.R. & Wong, M. Modelling cartilage mechanobiology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1461-1471 (2003).
41. Heegaard, J.H., Beaupre, G.S. & Carter, D.R. Mechanically modulated cartilage growth may regulate joint surface morphogenesis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **17**, 509-517 (1999).
42. Garzón-Alvarado, D.A., Narváez-Tovar, C.A. & Silva, O. A mathematical model of the growth plate. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology* **11**, 1213-1240 (2011).
43. Ross MH, P.W. in *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 198 – 205 (Editorial Médica Panamericana, 2007).
44. Roach, H.I., Mehta, G., Oreffo, R.O., Clarke, N.M. & Cooper, C. Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despite presence of a physis. *J Histochem Cytochem* **51**, 373-383 (2003).
45. Abad, V., *et al.* The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology* **143**, 1851-1857 (2002).
46. Goldring, M.B., Tsuchimochi, K. & Ijiri, K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **97**, 33-44 (2006).
47. Karimian, E., Chagin, A.S. & Savendahl, L. Genetic regulation of the growth plate. *Frontiers in endocrinology* **2**, 113 (2011).
48. Nilsson, O., *et al.* Gradients in bone morphogenetic protein-related gene expression across the growth plate. *J Endocrinol* **193**, 75-84 (2007).
49. Karsenty, G. & Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* **2**, 389-406 (2002).
50. Xu, T., *et al.* Regulation of PTHrP expression by cyclic mechanical strain in postnatal growth plate chondrocytes. *Bone* **56**, 304-311 (2013).
51. Shao, Y.Y., Wang, L., Welter, J.F. & Ballock, R.T. Primary cilia modulate Ihh signal transduction in response to hydrostatic loading of growth plate chondrocytes. *Bone* **50**, 79-84 (2012).

52. Montagne, K., Uchiyama, H., Furukawa, K.S. & Ushida, T. Hydrostatic pressure decreases membrane fluidity and lipid desaturase expression in chondrocyte progenitor cells. *J Biomech* **47**, 354-359 (2013).
53. Nowlan, N.C., Sharpe, J., Roddy, K.A., Prendergast, P.J. & Murphy, P. Mechanobiology of embryonic skeletal development: Insights from animal models. *Birth Defects Res C Embryo Today* **90**, 203-213 (2010).
54. Nowlan, N.C., Murphy, P. & Prendergast, P.J. A dynamic pattern of mechanical stimulation promotes ossification in avian embryonic long bones. *J Biomech* **41**, 249-258 (2008).
55. Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.P. & Roughley, P.J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**, 351-384 (2008).
56. Staines, K.A., Pollard, A.S., McGonnell, I.M., Farquharson, C. & Pitsillides, A.A. Cartilage to bone transitions in health and disease. *J Endocrinol* **219**, R1-R12 (2013).
57. Mao, J.J. & Nah, H.D. Growth and development: hereditary and mechanical modulations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* **125**, 676-689 (2004).
58. Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.S. & Mirams, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 46-62 (2008).
59. Nilsson, O., Marino, R., De Luca, F., Phillip, M. & Baron, J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res* **64**, 157-165 (2005).
60. Wu, Q., Zhang, Y. & Chen, Q. Indian hedgehog is an essential component of mechanotransduction complex to stimulate chondrocyte proliferation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 35290-35296 (2001).
61. Ueki, M., *et al.* The effect of mechanical loading on the metabolism of growth plate chondrocytes. *Ann Biomed Eng* **36**, 793-800 (2008).
62. Shefelbine, S.J. Thesis, Stanford University (2002).
63. Tanck, E., *et al.* Why does intermittent hydrostatic pressure enhance the mineralization process in fetal cartilage? *J Biomech* **32**, 153-161 (1999).
64. Tanck, E., Blankevoort, L., Haaijman, A., Burger, E.H. & Huijkes, R. Influence of muscular activity on local mineralization patterns in metatarsals of the embryonic mouse. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **18**, 613-619 (2000).
65. Wong, M., Siegrist, M. & Goodwin, K. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. *Bone* **33**, 685-693 (2003).
66. Smith, R.L., Carter, D.R. & Schurman, D.J. Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review. *Clin Orthop Relat Res*, S89-95 (2004).
67. Ikenoue, T., *et al.* Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**, 110-116 (2003).
68. Stoltz, J.F., *et al.* Mechanobiology and cartilage engineering: the underlying pathophysiological phenomena. *Biorheology* **43**, 171-180 (2006).

69. Lee CR, G.S., Wimmer MA, Alini M. . The influence of mechanical stimuli on articular cartilage tissue engineering. in *Topics in tissue engineering*, Vol. 2 (ed. Ashammakhi N, R.R., Sun W) (2006).
70. Ramage, L., Nuki, G. & Salter, D.M. Signalling cascades in mechanotransduction: cell-matrix interactions and mechanical loading. *Scand J Med Sci Sports* **19**, 457-469 (2009).
71. Mizuno, S. & Ogawa, R. Using changes in hydrostatic and osmotic pressure to manipulate metabolic function in chondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C1234-1245 (2011).
72. Nilsson, O. & Baron, J. Fundamental limits on longitudinal bone growth: growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 370-374 (2004).
73. Niehoff, A., Kersting, U., Zaucke, F., Morlock, M., and Bruggerman, G.-P. Adaptation of mechanical, morphological, and biochemical properties of the rat growth plate to dose-dependent voluntary exercise. *bone* **35**, 899–908 (2004).
74. Ohashi, N., Robling, A., Burr, D., and Turner, C. The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *Journal of Bone and Mineral Research* **17**, 284–292. (2002).
75. Apte, S.a.K., J. Physeal distraction and cell proliferation in the growth plate. *Journal of Bone & Joint Surgery* **76-B**, 837–843. (1994).
76. Lee, C., Grad, S., Wimmer, M., and Alini, M. The influence of mechanical stimuli on articular cartilage tissue engineering. In Reis, N. A. . R., editor, *Topics in tissue engineering* **2**(2006).
77. Tanaka, N., Ohno, S., Honda, K., Tanimoto, K., Doi, T., Ohno-Nakahara, M., Tafolla, E., & Kapila, S., and Tanne, K. Cyclic mechanical strain regulates the pthrp expression in cultured chondrocytes via activation of the ca²⁺ channel. *Journal of Dental Research*, **84**, 64–68. (2005).
78. van Donkelaar, C.a.W., W. . Mechanics of chondrocyte hypertrophy. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* **11**, 655–664. (2012).
79. Hunziker, E.B. & Schenk, R.K. Physiological mechanisms adopted by chondrocytes in regulating longitudinal bone growth in rats. *J Physiol* **414**, 55-71 (1989).
80. Abad, V., et al. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*. **143**, 1851-1857. (2002).
81. Forriol, F.a.S., F. . Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clinical orthopaedics and related research* **432**, 14–33 (2005).
82. Chau, M., Forcinito, P., Andrade, A. C., Hegde, A., Ahn, S., Lui, J. C., Baron, J., and Nilsson, & O. Organization of the indian hedgehog - parathyroid hormone-related protein system in the postnatal growth plate. *Journal of Molecular Endocrinology* **47**, 99–107 (2011).

83. Tryfonidou, M.A., Hazewinkel, H. A. W., Riemers, F. M., Brinkhof, B., Penning, L. C., & Karperien, M. Intraspecies disparity in growth rate is associated with differences in expression of local growth plate regulators. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **299**, E1044–E1052. (2010).
84. Buckwalter, J.A., Mower, D., Ungar, R., Schaeffer, J. & Ginsberg, B. Morphometric analysis of chondrocyte hypertrophy. *J Bone Joint Surg Am* **68**, 243-255 (1986).
85. Bush, P.G., Parisinos, C.A. & Hall, A.C. The osmotic sensitivity of rat growth plate chondrocytes in situ; clarifying the mechanisms of hypertrophy. *J Cell Physiol.* **214**, 621-629 (2008).
86. Zienkiewicz, O.a.T., R. The Finite Element Method. The Basis. *Butterworth-Heinemann, Oxford* **1**(2000).
87. Moss-Salentijn, L., Moss, M.L., Shinozuka, M. & Skalak, R. Morphological analysis and computer-aided, three dimensional reconstruction of chondrocytic columns in rabbit growth plates. *J Anat* **151**, 157-167 (1987).
88. Weise, M., De-Levi, S., Barnes, K.M., Gafni, R. I., Abad, V., and Baron, J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 6871–6876. (2001).
89. H, G. Anatomy of the Human Body. *Philadephia: Lea y Febiger* (2000).
90. Hyman, L., Wake, MH. Settembre, C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**, 629-648 (2009).
91. Liebschner, M. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* **25**, 1697-1714 (2004.).
92. Adams, B., Crabtree, PJ. Comparative Osteology: A Laboratory and Field Guide of Common North American Animals. *Academic Press* (2011).
93. Connolly, S., Jaramillo, D, Hong, JK, Shapiro, F. . Skeletal development in fetal pig specimens: MR imaging of femur with histologic comparison. *Radiology* **233**, 505-514. (2004.).
94. Redfern, B.G., David Wise, L. & Spence, S. An alternative Alcian Blue dye variant for the evaluation of fetal cartilage. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* **80**, 171-176 (2007).
95. Schatz, O., Golenser, E. & Ben-Arie, N. Clearing and photography of whole mount X-gal stained mouse embryos. *BioTechniques* **39**, 650, 652, 654 passim (2005).
96. McLeod, M.J. Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology* **22**, 299-301 (1980).
97. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K. & Behringer, R. Alizarin red staining of post-natal bone in mouse. *Cold Spring Harbor protocols* **2009**, pdb prot5171 (2009).
98. Patton, J., Kaufman, MH. . The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. *Journal of anatomy* **186** 175-185 (1995).

99. Rodan, G. The development and function of the skeleton and bone metastases. . *Cancer* **97**, 726-732. (2003.).
100. Nemeč, S., Nemeč, U, Brugger, PC Skeletal development on fetal magnetic resonance imaging. . *Topics in magnetic resonance imaging : TMRI* **22**, 101-106. (2011.).
101. Schilling, A., Priemel, M, Timo Beil, F. Transgenic and knock out mice in skeletal research. Towards a molecular understanding of the mammalian skeleton *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **1**, 275-289. (2001).
102. Eri Arikawa-Hirasawa, H.W., Hiroya Takami, John R. Hassell & Yoshihiko Yamada. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *nature genetics* **23**, 354-358 (1999).