

## **Simulación computacional del crecimiento de huesos largos: un modelo de osificación endocondral**

### **Computer simulation of long bone development: A model of endochondral ossification**

*Diego Alexander Garzón<sup>1\*</sup>, José Manuel García<sup>2</sup>, Manuel Doblare<sup>2</sup>.*

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia, Ciudad Universitaria, Cra. 30 N.º45-03 Bogotá. D.C. Colombia.

<sup>2</sup>Universidad de Zaragoza, Calle Maria de Luna 3, Zaragoza, España

(Recibido el 15 de noviembre de 2007. Aceptado el 9 de mayo de 2008)

#### **Resumen**

Casi todos los huesos del cuerpo se forman a partir de soportes cartilagosos en los que se produce un crecimiento del mismo combinado con un proceso de osificación que se extiende desde el centro del hueso hasta sus extremos, en un proceso denominado osificación endocondral. En este período de la morfogénesis del tejido óseo los principales factores que controlan el proceso son bioquímicos, siendo la influencia mecánica mucho menor. En este trabajo se presenta un modelo que permite simular este proceso de crecimiento y osificación del hueso prenatal controlado fundamentalmente por un bucle interactivo inhibidor-activador, en el que se han identificado la hormona paratiroidea (PTHrP) y el Indian Hedgehog (Ihh), mediante la utilización de ecuaciones de reacción-difusión. La utilización de estas ecuaciones en combinación con la simulación del proceso proliferativo y de crecimiento de las células de cartílago (condrocitos) permiten simular con bastante exactitud el proceso de crecimiento de un hueso largo, prediciendo incluso la aparición de los centros secundarios de osificación en la epífisis.

----- *Palabras clave:* Osificación, hueso. simulación computacional, proceso de crecimiento

#### **Abstract**

Some bones of the body are constituted by cartilaginous supports in which growth is produced both with the ossification process that extends from the center of the bone towards its borders in a process so called endochondral

---

\* Autor de correspondencia: teléfono: + 57 + 1 + 316 53 20 ext. 11216, fax: + 57 + 1 + 316 53 33, correo electrónico: dagarzona@bt.unal.edu.co

ossification. In this period of bone tissue morphogenesis the factors controlling the process are mainly biochemical, and the mechanical influence is much lower. This paper presents a simulation model using reaction-diffusion equations for the growth and ossification process in the prenatal bone. It is primarily controlled by an interactive inhibitor-activator loop associated with the parathyroid hormone (PTHrP) and the Indian Hedgehog (Ihh). These equations in combination with the simulation of the proliferative process and the cartilage cell growth (chondrogenesis) lead to a quite accurate simulation of the growth process of a long bone, even predicting the development of secondary ossification centers in the epiphysis.

----- *Keywords:* Ossification, bone, computer simulation, growth process.

## Introducción

El desarrollo inicial prenatal de un hueso largo se produce como consecuencia de la proliferación y crecimiento (hipertrofia) de un tipo celular denominado condrocito. Estos procesos celulares a los que están sometidos los condrocitos durante el crecimiento óseo inicial se encuentran regulados por diversos factores bioquímicos y receptores que de alguna manera determinan el desarrollo del hueso. En especial, la hormona paratiroidea (PTHrP) y el Indian Hedgehog (Ihh) entre muchas otras [1-4] se cree que controlan fundamentalmente este desarrollo inicial del hueso, configurando un bucle de interacción activador-inhibidor [4-7]. Siguiendo esta hipótesis de partida, en este trabajo se pretende desarrollar un modelo matemático que permita simular el desarrollo prenatal de un hueso largo justo hasta la aparición de los centros de osificación secundarios. Esto correspondería aproximadamente al proceso de morfogénesis de un hueso desde la 9ª semana de la gestación hasta la 32ª. Para conseguir este objetivo se ha decidido, por simplicidad, reducir el modelo completo de la morfogénesis ósea a dos modelos más sencillos que utilizan la misma aproximación, pero analizan fases diferentes del proceso global de desarrollo. De esta forma, en la sección 2 de este trabajo, se presenta un primer modelo que corresponde con la fase inicial de la morfogénesis ósea, en la cual se produce el crecimiento inicial del hueso así como la osificación endocondral en la diáfisis del mismo (centro de osificación primaria). Por otro lado, en la sección 3, utilizando la misma formulación, se presenta un modelo que permite explicar la aparición de los centros secundarios de osificación en la diáfisis del hueso largo, una vez que el frente de osificación primaria ha llegado ya a las proximidades de esta diáfisis. Finalmente, en la sección 4, se realiza una valoración de las conclusiones más importantes obtenidas del desarrollo de esta formulación, así como las hipótesis fundamentales y su implicación en cada uno de los modelos.

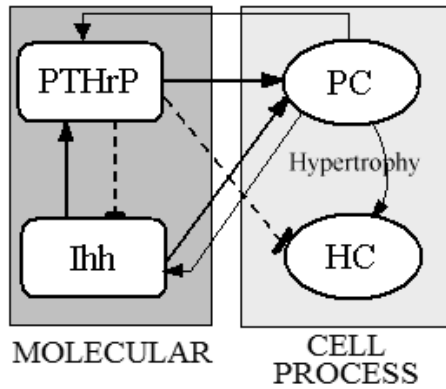
## *Simulación del desarrollo inicial de un hueso largo*

El crecimiento del hueso se inicia con la proliferación e hipertrofia de las células del cartílago hialino, denominadas condrocitos. Siguiendo las hipótesis experimentales descritas por diferentes autores [7-10] se propone en este trabajo un modelo computacional de osificación endocondral que se resume gráficamente en la figura 1. En él se explora la hipótesis de que la osificación endocondral es controlada por un proceso hormonal de reacción-difusión existente entre el Ihh y PTHrP. De esta forma se distinguen dos procesos involucrados en el crecimiento que interactúan continuamente: el proceso hormonal o molecular y el proceso celular. El proceso molecular se produce en cada condrocito prehipertrofo y tiene en cuenta el bucle PTHrP-Ihh, de tal forma que en presencia de PTHrP el condrocito consume (inhibe) Ihh (línea discontinua) y en presencia de Ihh el condrocito produce (activa) PTHrP (línea continua). Además, estos factores moleculares regulan la evolución de las poblaciones celulares, a modo de señales biológicas, de manera que donde existe PTHrP e Ihh se promueve la proliferación de condrocitos (mostrado como línea continua desde el PTHrP e Ihh hacia las células proliferativas (PC)) y donde existe PTHrP se retrasa la hipertrofia (línea discontinua desde PTHrP a células hipertróficas (HC)). Además, en la situación inicial, se supone que el cartílago está fundamentalmente compuesto por células proliferativas [11], y que existe una concentración inicial de PTHrP en la epífisis debida a la producción de este factor por las células pericondriales.

Se considera en este trabajo que el crecimiento del tejido y su cambio de forma y tamaño es consecuencia del proceso de proliferación (hiperplasia) y del aumento de tamaño de las células en su etapa hipertrófica [7 - 10]. El cambio de forma se debe a las diferencias de crecimiento intrínsecas a los procesos de proliferación e hipertrofia y a su diferente ubicación espacial, de modo que la proliferación o mitosis celular es un proceso que ocurre fundamentalmente en la diáfisis y consiste en la producción de más condrocitos como

consecuencia de su división celular. Durante este proceso se constituye la formación columnar de células apiladas, produciéndose un crecimiento principalmente isótropo. Por otro lado, el proceso de hipertrofia celular consiste en el incremento de tamaño de forma anisótropa de cada una de las células apiladas que constituye la formación columnar, implicando por lo tanto un crecimiento claramente anisótropo. Este proceso se produce justamente debajo de la placa de crecimiento.

La figura 1 muestra la relación existente entre el proceso molecular y el celular. Las líneas curvas indican diferenciación. Las líneas continuas indican producción (activación) y las discontinuas el consumo (inhibición).



**Figura 1** Proceso de control del bucle PTHrP - Ihh . PC: Condrocitos proliferativos, HC: Condrocitos hipertróficos, PTHrP: Hormona paratiroidea péptida relacionada, Ihh: Indian Hedgehog

### Descripción del modelo matemático

Las principales variables internas usadas en el modelo son la concentración celular ( $c_i$ ) y la concentración de cada factor molecular ( $S_j$ ), donde  $i$  indica el tipo de célula y  $j$  es el tipo de molécula a analizar. Se distingue entre las siguientes etapas del proceso celular: condrocitos proliferativos, que incluyen a los pre-hipertróficos y mitóticos ( $C_{PC}$ ), y los completamente hipertróficos ( $C_{HC}$ ). En el caso de los factores moleculares se distingue entre la concentración de PTHrP ( $S_{PTHrP}$ ) e

Ihh ( $S_{Ihh}$ ). En las siguientes secciones se definen las variaciones temporales de cada una de las variables enunciadas durante cada evento de la osificación endocondral: el sistema de control molecular, la dinámica poblacional de los condrocitos y el crecimiento del hueso.

### Sistema de control molecular

El balance de los factores hormonales, Ihh y PTHrP se describe mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial s_j(x,t)}{\partial t} + \text{div}(s_j \mathbf{v}) = b_j + \text{div}(D_j \nabla s_j) \quad (1)$$

Donde  $\mathbf{v}$  es la velocidad de crecimiento local del hueso,  $b_j(x,t)$  es la producción neta externa de la  $j$ -ésima sustancia por reacción o inhibición y  $D_j$  es el coeficiente de difusión. Como hipótesis de trabajo inicial se supone que la difusión sigue la ley de Fick [12, 13]. Se considera además que el PTHrP e Ihh son sintetizados por los condrocitos proliferativos [5], por tanto, dependen de su nivel de concentración y del nivel de concentración de cada uno de estos factores moleculares. El término fuente (o reactivo) se supone viene dado por:

$$b_{PTHrP}(x,t) = c_{PC} (\alpha_1 - \beta_1 S_{PTHrP} + \gamma_0 S_{PTHrP}^2 S_{Ihh}) \quad (2a)$$

$$b_{Ihh}(x,t) = c_{PC} (\alpha_2 - \gamma_0 S_{PTHrP}^2 S_{Ihh}) \quad (2b)$$

Donde 1 y 2 son términos fuente constantes, 1 es una constante que cuantifica la tasa de degradación de PTHrP, y 0 es la constante de reacción que indica el control no lineal existente en el interior de la célula por la presencia de los dos factores. Cabe resaltar que todas las constantes anteriores se podrían también considerar funciones de las concentraciones moleculares de otros factores adicionales, tales como BMP (Bone morphogenetic proteins), FGF, RUNX21 y otras [5, 7]. No obstante, esto no se ha considerado en este primer trabajo. Las anteriores ecuaciones son similares a las descritas por Schnakenberg [14, 15, 16], las cuales se han utilizado ampliamente en sistemas biológicos.

### Dinámica de condrocitos

#### Proliferación

Durante el desarrollo endocondral, los condrocitos exhiben una clara proliferación direccional como se puede observar en la figura [11], en donde se muestra la distribución anisotrópica de las células mitóticas en esta zona. Como una primera aproximación se supone que la distribución puede ser descrita como un tensor estructural de segundo orden, dado por:

$$R_{PC} = \sqrt[3]{\frac{c_{PC}}{r_{PC}}} (1 + (r_{PC} - 1)n \otimes n) \quad (3)$$

Obsérvese que  $c_{PC} = \det(R_{PC})$  y  $r_{PC}$  es la relación existente entre el número de células en la dirección de mitosis preferencial  $\mathbf{n}$  y cualquier dirección ortogonal a la misma.

La derivada temporal de la dirección preferencial  $\mathbf{n}$  se establece en términos del gradiente de los factores moleculares como:

$$\frac{\partial \mathbf{n}}{\partial t} = \mathbf{n} \times (\mathbf{w} \times \mathbf{n}) \quad (4)$$

con  $\mathbf{w}$ :

$$\mathbf{w} = b_{11} \nabla s_{PTHrP} - b_{12} \nabla s_{Ihh} \quad (5)$$

Donde  $b_{11}$  y  $b_{12}$  son constantes que cuantifican la influencia del gradiente de cada uno de los factores moleculares, PTHrP e Ihh, sobre la formación columnar de los condrocitos.

Además, se conoce que los condrocitos apenas migran, por lo cual su único movimiento se da por el crecimiento del entorno local donde se encuentra. Por tanto, la concentración celular de células proliferativas viene dada por la siguiente expresión:

$$\frac{\partial c_{PC}}{\partial t} + \text{div}(c_{PC} \mathbf{v}) = f_{PROLIFERACION}(c_{PC}, s_{Ihh}, s_{PTHrP}) - f_{HIPERTROFIA}(c_{PC}, s_{Ihh}, s_{PTHrP}) \quad (6)$$

Donde,  $\mathbf{v}$  es la velocidad local de crecimiento del hueso,  $f_{PROLIFERACION}$  es la función de proliferación que depende de la concentración de PTHrP

e Ihh y la concentración de células proliferativas, y  $f_{HIPERTROFIA}$  es la función de hipertrofia que tiene en cuenta la evolución de los condrocitos desde la etapa proliferativa hasta la completamente hipertrofiada.

$f_{PROLIFERACION}$  se considera similar a la ley de Ludwig [17], lo cual se puede escribir como:

$$f_{PROLIFERACION} = c_{PC} \left( a_0 p_1(s_{Ihh}, s_{PTHrP}) \left( 1 - \frac{p_1(s_{Ihh}, s_{PTHrP})}{p_{o1}} \right) \right) \quad (7)$$

Donde  $a_0$  es la frecuencia de mitosis,  $p_{o1}$  es un parámetro adimensional que representa la capacidad límite para proliferar y  $p_1$  es un factor de activación relacionado con el nivel de concentración de los factores moleculares presentes en el tejido:

$$p_1(s_{Ihh}, s_{PTHrP}) = a_1 s_{PTHrP} + a_2 s_{Ihh} \quad (8)$$

Donde  $a_1$  y  $a_2$  son constantes que cuantifican la influencia del PTHrP e Ihh sobre la proliferación, respectivamente.

Además,  $f_{HIPERTROFIA}$  viene dada por:

$$f_{HIPERTROFIA} = c_{PC} \left( f \frac{d^n}{s_{PTHrP}^n + d^n} \right) \quad (9)$$

Donde  $f$  es la frecuencia de diferenciación de células proliferativas a hipertrofiadas,  $d^n / (s_{PTHrP}^n + d^n)$  es una función que define la concentración a la cual se produce la hipertrofia (definida por el valor umbral  $d$ ), en términos de la concentración de PTHrP y de la constante  $n$ .

Por otro lado, el factor de proliferación preferencial (que cuantifica la formación columnar) es similar a la ley anterior, pero se considera que el término proliferativo (o de aparición de columnas) depende del gradiente de PTHrP e Ihh:

$$\frac{\partial r_{PC}}{\partial t} + \text{div}(r_{PC} \mathbf{v}) = g_{FORMACION}(s_{Ihh}, s_{PTHrP}) - g_{HIPERTROFIA}(s_{Ihh}, s_{PTHrP}) \quad (10)$$

Donde  $g_{FORMACION}$  cuantifica la formación columnar debido al gradiente de cada molécula presente y

$\mathcal{G}_{HIPERTROFIA}$  representa el nivel de transformación de las células columnares desde la etapa proliferativa a la hipertrófica.

$\mathcal{G}_{FORMACIÓN}$  se supone definido mediante:

$$\mathcal{G}_{FORMACIÓN} = b_0 p_2 (s_{Ihh}, s_{PTHrP}) \left( 1 - \frac{p_2 (s_{Ihh}, s_{PTHrP})}{p_{o2}} \right) \quad (11)$$

Donde,  $b_0$  es una constante,  $p_{o2}$  es un término adimensional que representa la capacidad de carga y  $p_2$  es un factor de activación relacionado con el gradiente de los factores moleculares en el tejido dado por:

$$p_2 (s_{Ihh}, s_{PTHrP}) = b_1 \nabla s_{PTHrP} + b_2 \nabla s_{Ihh} \quad (12)$$

con  $b_1$  y  $b_2$  constantes que cuantifican la influencia de cada uno de los factores moleculares sobre la formación columnar.

$\mathcal{G}_{HIPERTROFIA}$  es similar a la ecuación (9), donde:

$$\mathcal{G}_{HIPERTROFIA} = r_{pc} \left( f \frac{d^n}{s_{PTHrP}^n + d^n} \right) \quad (13)$$

### Hipertrofia

Los condrocitos proliferativos sufren apoptosis antes de que el cartílago sea reemplazado por hueso. Durante este proceso de apoptosis, las células incrementan su tamaño y cambian su forma desde la forma cuasi ovoide de la célula proliferativa a la forma esférica de los hipertróficos [11]. Por tanto, esto también implica un cambio en la concentración de este tipo de células. Para cuantificar esto de nuevo se utiliza un tensor de segundo orden definido como:

$$R_{HC} = \sqrt[3]{\frac{c_{HC}}{r_{HC}}} (1 + (r_{HC} - 1) n \otimes n) \quad (14)$$

Donde  $c_{HC}$  es la concentración de células hipertróficas y  $r_{HC}$  es la relación existente entre el número de células en la dirección de crecimiento preferencial  $\mathbf{n}$  y cualquier dirección ortogonal a la misma. De forma similar al tensor  $R_{PC}$ , la evo-

lución temporal del tensor  $R_{HC}$  se evalúa a través del cambio temporal de los escalares  $c_{HC}$  y  $r_{HC}$  y de la dirección de crecimiento  $\mathbf{n}$ . Así, se supone que la concentración de células en etapa hipertrófica viene dada por la ley:

$$\frac{\partial c_{HC}}{\partial t} + \text{div}(c_{HC} \mathbf{v}) = c_{pc} \left( f \frac{d^n}{s_{PTHrP}^n + d^n} \right) = f_{HIPERTROFIA}(c_{PC}, s_{PTHrP}) \quad (15)$$

que se corresponde con la ecuación (9).

Mientras, la evolución del factor de diferenciación preferencial se define como:

$$\frac{\partial r_{HC}}{\partial t} + \text{div}(r_{HC} \mathbf{v}) = r_{pc} \left( f \frac{d^n}{s_{PTHrP}^n + d^n} \right) = \mathcal{G}_{HIPERTROFIA}(r_{PC}, s_{PTHrP}) \quad (16)$$

que se corresponde con la ecuación (13).

modelo de crecimiento de hueso

Se supone que el crecimiento del hueso se debe a la proliferación e hipertrofia celular durante la osificación endocondral [5, 7, 9, 18, 19], lo que se puede escribir como:

$$d^{CRECIMIENTO}(x, R_{PC}, R_{HC}, t) = d^{PROLIFERACIÓN}(x, R_{PC}, t) + d^{HIPERTRÓFICO}(x, R_{HC}, t) \quad (17)$$

donde  $d^{PROLIFERACIÓN}$  y  $d^{HIPERTRÓFICO}$  son los tensores de velocidad de deformación debida a proliferación y a hipertrofia, respectivamente.

crecimiento por proliferación

Por comodidad, se escribe la ecuación (10) en coordenadas materiales, obteniéndose:

$$\frac{Dc_{PC}}{Dt} + c_{PC} \text{div}(\mathbf{v}) = c_{pc} \left( a_0 p_1 \left( 1 - \frac{p_1}{p_{o1}} \right) \right) \quad (18)$$

Se considera que en la zona proliferativa el crecimiento se debe a la proliferación celular manteniéndose una concentración de saturación  $c_{pc} = c_{pcSATURACIÓN}$ , es decir, al alcanzarse este valor, las células pueden seguir proliferando a expensas de un incremento de volumen para mantener una concentración celular constante ( $Dc_{pc} / Dt = 0$ ).



Por lo tanto, cuando  $c_{pc} = c_{pcSATURACIÓN}$ , el proceso de crecimiento por proliferación viene dado por:

$$tr(\mathbf{d}^{PROLIFERACIÓN}) = div(\mathbf{v}) = \left( a_0 p_1 \left( 1 - \frac{p_1}{p_{o1}} \right) \right) \quad (19)$$

crecimiento por hipertrofia

Por otra parte, el crecimiento por hipertrofia se debe a que, como se ha comentado anteriormente, las células prehipertróficas o proliferativas apiladas en las columnas de condrocitos presentan en esta fase una forme ovoidal creciendo hacia una forma principalmente esférica [11], por lo que el crecimiento se produce fundamentalmente en la dirección preferencial de crecimiento de columnas  $\mathbf{n}$ :

$$d^{HIPERTRÓFICO}(x, R_{HC}, t) = \begin{cases} \frac{1}{t_{ALARGAMIENTO}} \left( \left( \frac{R(t)}{s} - 1 \right) \mathbf{n} \otimes \mathbf{n} \right) & n^T R_{HC} n \geq d_1 \\ 0 & \text{otro caso} \end{cases} \quad (20)$$

donde  $2s$  [11] es la distancia entre vértices del eje menor de la elipse (que representa a la célula) antes de alcanzar la hipertrofia,  $2R(t)$  es la distancia entre vértices del eje menor de la elipse (célula) que se encuentra en crecimiento,  $d_1$  es la menor concentración lineal (células/mm) de condrocitos hipertróficos en la dirección de crecimiento celular,  $t_{ALARGAMIENTO}$  es el tiempo de maduración que representa el tiempo requerido para que un condrocito proliferativo progrese a uno completamente hipertrofiado,  $R(t)$  es la función de crecimiento que se define:

$$R(t) = s + \frac{R - s}{t_{ALARGAMIENTO}} t \quad (21)$$

implementación numérica

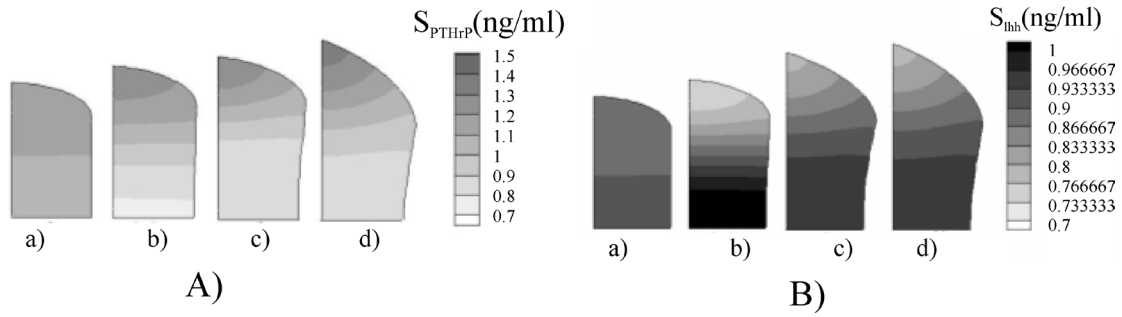
Se ha utilizado el método de los elementos finitos, en concreto el programa comercial ABAQUS, para solucionar las ecuaciones antes descritas. Suponiendo simetría rotacional sin flujo en la dirección circunferencial y simetría alrededor del

centro del hueso, se simula un cuarto del cartílago hialino. Las dimensiones del modelo se obtuvieron de datos experimentales correspondientes a la forma y tamaño de un fémur fetal [20-23]. El diámetro de la diáfisis es de 9,6 mm y la longitud de 16 mm [21]. El conjunto de ecuaciones presentado anteriormente corresponde a un sistema acoplado, donde los factores moleculares se analizan de forma similar a las ecuaciones de reacción difusión [14] con inestabilidad de Turing, y las ecuaciones de proliferación e hipertrofia corresponden a ecuaciones de población. Para obtener información de los parámetros y el comportamiento de la solución (bifurcaciones) del sistema molecular acoplado (PTHrP-Ihh) se realiza un análisis de estabilidad cerca al estado estable del conjunto de ecuaciones de reacción difusión (para más detalles véase por ejemplo la referencia [14]).

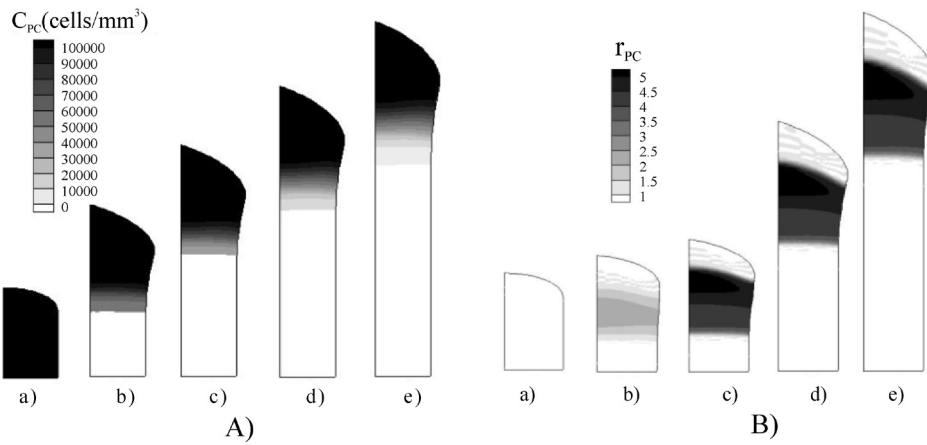
## Resultados

Como el sistema reacción-difusión entre PTHrP e Ihh ocurre únicamente en la epífisis, sólo se muestran los resultados de las concentraciones moleculares en la cabeza femoral, donde PTHrP se expresa inicialmente en el pericondrio articular (ver figura 2A) e Ihh se expresa en el centro del cartílago hialino (ver figura 2B). En este proceso, estos factores moleculares difunden a través del hueso, donde Ihh alcanza su máximo valor en la zona distal y PTHrP en la proximal. Tanto PTHrP como Ihh se encuentran presentes en toda la epífisis alcanzando un equilibrio estable frente a los cambios de tamaño y forma del hueso.

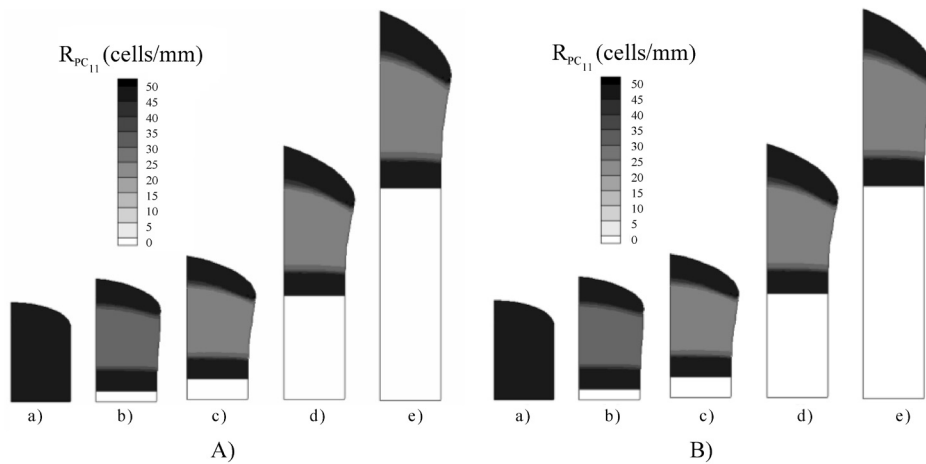
En la figura 3A se observa la concentración de condrocitos proliferativos. Además, se muestra la relación  $r_{pc}$  (figura 3B) que mide el número de condrocitos proliferativos en la dirección preferencial  $z$  sobre la dirección  $r$ ; en otras palabras, se muestra la formación columnar de condrocitos en el hueso. Con estos valores se puede evaluar el tensor  $\mathbf{R}_{pc}$  (ver figuras 4A y 4B, respectivamente). Se observa que en la zona columnar, existe una mezcla de células proliferativas e hipertróficas, por lo cual se considera una zona prehipertrófica [10].



**Figura 2** A) Concentración de PTHrP y B) concentración de Ihh. a) t=56 días; b) t=63 días; c) t=70 días; d) t=210 días (días de gestación)



**Figura 3** A) Concentración de condrocitos y B)  $r_{PC}$  a) t=56 días; b) t=96 días; c) t=136 días; d) t=176 días; e) t=210 días (días de gestación)

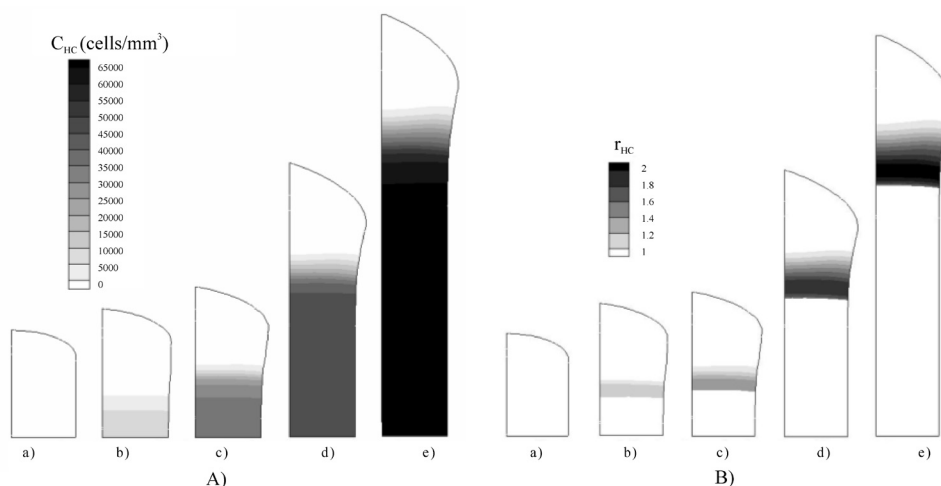


**Figura 4** A) Componente  $R_{PC11}$  y B) componente  $R_{PC22}$  a) t=56 días; b) t=63 días; c) t=70 días; d) t=130 días; e) t=210 días (días de gestación)

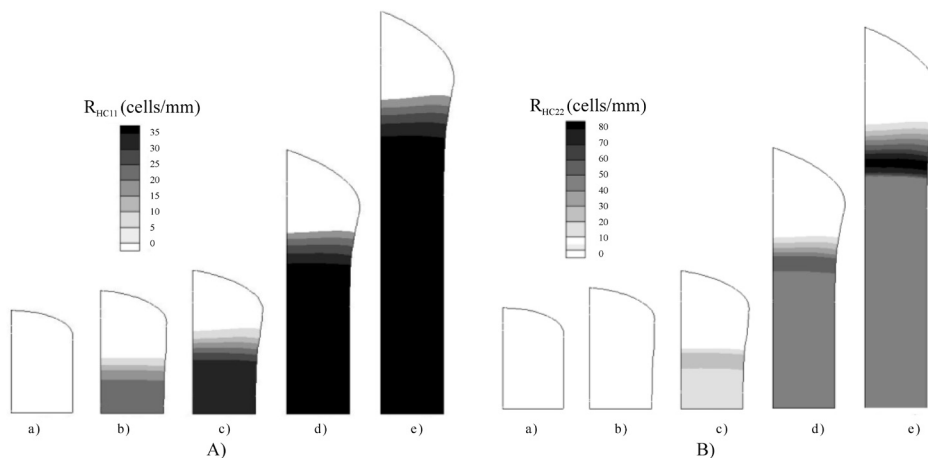


Las células hipertróficas (Figura 5A) aparecen en la parte media del hueso. Los condrocitos se convierten en células hipertróficas cuando el nivel de concentración de PTHrP es más bajo que un valor umbral. En ese momento, las células hipertrofian en el centro del cartilago hialino, donde el PTHrP es bajo. En la figura 5B se muestra la formación columnar de estas células hipertrofiadas, obteniéndose un máximo de  $r_{HC}$

en el frente de hipertrofia, Las figuras 6A y 6B muestran el valor del número de células por mm. Se observa la anisotropía en la zona columnar, siendo mayor la concentración lineal de células en la dirección axial del hueso, mientras en la zona totalmente hipertrófica se observa una distribución isotrópica que se debe al crecimiento de las células hasta alcanzar una forma, aproximadamente, esférica.



**Figura 5** A) Concentración de condrocitos hipertróficos y B) Factor adimensional a) t=56 días; b) t=63 días; c) t=70 días; d) t=130 días; e) t=210 días (días de gestación)

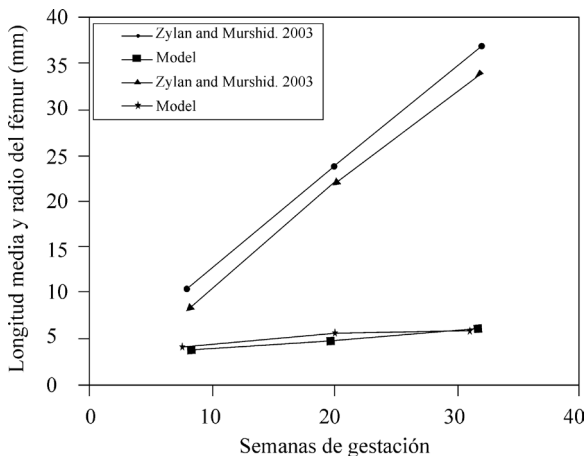


**Figura 6** A) Componente  $R_{HC11}$  y B) componente  $R_{HC22}$  a) t=56 días; b) t=63 días; c) t=70 días; d) t=130 días; e) t=210 días (días de gestación)

Se observa que durante la etapa de crecimiento la elongación de las células desde la proliferación hasta la hipertrofia genera el crecimiento del hueso, como se ve en el cambio de concentración lineal de células (ver figuras 6A y 6B). La proliferación en la dirección radial en la epífisis causa el crecimiento en diámetro de la cabeza femoral.

## Discusión y conclusiones

El principal objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un modelo de elementos finitos para simular el crecimiento prenatal y la formación de la epífisis en un hueso largo durante el período embrionario (9a a 32ava semana de gestación), cuando el control molecular hormonal central, autocrino y paracrino son fundamentales. Las simulaciones numéricas realizadas se comparan bien con los diferentes datos experimentales existentes. De esta forma, el modelo es capaz de reproducir la evolución temporal de la longitud y tamaño de la cabeza de un fémur humano con resultados clínicos (Figura 7). Además, la distribución celular de condrocitos proliferativos e hipertróficos es similar a la distribución que se presenta en los diferentes análisis histológicos [7, 9, 5].



**Figura 7** Comparación entre los resultados del modelo aquí presentado y los datos experimentales [21]

En la formulación aquí presentada para ambos modelos se han supuesto dos hipótesis básicas

que definen el comportamiento del mismo. En primera instancia se supone que el crecimiento del hueso se debe a la proliferación e hipertrofia de los condrocitos. De hecho, existe una mayor concentración de células en la epífisis, lo cual concuerda con los datos de la literatura [11]. Además, el crecimiento en la diáfisis viene dado principalmente por la hipertrofia celular, proceso en el cual la célula crece de manera anisótropa, lo que genera un crecimiento longitudinal en dirección axial del hueso. Por tanto, en este trabajo se muestra que esta hipótesis puede explicar el crecimiento prenatal inicial de un hueso largo. La segunda hipótesis tiene en cuenta que el proceso se desarrolla en el periodo gestacional, donde se supone que el crecimiento es controlado fundamentalmente por reactantes químicos (Ihh-PTHrP), los cuales interactúan en un bucle regulatorio en la epífisis ósea. Esta segunda hipótesis garantiza una alta estabilidad de la morfogénesis ósea durante el proceso y permite justificar la aparición de los centros secundarios de osificación.

Adicionalmente, es interesante resaltar que las constantes y coeficientes de difusión de PTHrP y Ihh no han sido medidas experimentalmente durante este proceso evolutivo. De hecho, el experimento computacional muestra la relación que han de tener los factores moleculares para que se produzca un correcto patrón en el desarrollo del hueso.

Como todos los modelos, el que se presenta en este estudio está basado en numerosas simplificaciones, las cuales pueden limitar las conclusiones obtenidas, requiriéndose una explicación adicional. La primera limitación se basa en los datos exactos de las condiciones iniciales: la distribución celular y forma del cartílago hialino. No obstante, hay que tener en cuenta que la distribución inicial de los factores moleculares no influye gracias a la alta estabilidad asegurada en el sistema de reacción-difusión.

En segundo lugar, el valor exacto de los parámetros más importantes del modelo es desconocido. Es así como los valores han sido estimados para predecir un adecuado crecimiento en tamaño y

forma en la etapa fetal. Los parámetros más significativos del sistema de reacción-difusión son: la relación existente entre el coeficiente de difusión del activador-inhibidor, el cual determina el patrón característico de la placa de crecimiento, los parámetros que regulan la proliferación y los parámetros de crecimiento de los condrocitos hipertróficos.

Como tercera limitación se puede considerar la acción realista de los reactantes moleculares del proceso. Aunque se considera que el sistema Ihh-PTHrP [7] es el más importante durante el desarrollo, existen otras moléculas adicionales (p.ej. BMP, TGF- $\beta$ , FGFs, etc.) que pueden interactuar con las anteriores y entre sí formando un sistema altamente complejo [5], lo cual debe ser tema de investigaciones futuras.

En cuarto lugar, hasta donde los autores tienen conocimiento, la relación experimental exacta entre los factores moleculares y el comportamiento celular es desconocida. En este trabajo se considera que la principal producción de PTHrP e Ihh es determinada por la concentración de condrocitos proliferativos y pre-hipertróficos. Sin embargo, las células hipertróficas también podrían segregar factores moleculares que incidieran en la aparición del centro primario y secundario de osificación.

Se ha considerado como condición inicial que el PTHrP es generado por las células pericondriales ubicadas en la parte articular de la epífisis, mientras el Ihh es generado en el frente de osificación del centro primario y en el centro del hueso (en el caso de centro primario). Sin embargo, el tipo de patrón molecular es independiente de las condiciones iniciales; de hecho, los patrones de cada uno de los modelos se dirigirá a una y sólo una condición de estado estable, el cual se denomina estado atractor [17]. Esto permite concluir que el modelo es altamente estable.

En conclusión, el modelo aquí presentado es capaz de simular la morfogénesis de un hueso, en etapa fetal, bajo el control de las sustancias moleculares segregadas por los condrocitos proliferativos, lo cual puede predecir la formación de los

centros primarios de osificación. El potencial de éste modelo es alto por lo que permite evidenciar la evolución temporal de la forma y tamaño del hueso, así como la distribución celular y molecular en un hueso largo, con resultados similares a los presentados por [7, 11, 21]. Sin embargo, este modelo es sólo un primer paso en la simulación del crecimiento de un hueso largo. En el futuro, será necesario incluir la influencia del factor de crecimiento endotelial vascularizante (VEGF), con objeto de simular la aparición de la cavidad medular, y la influencia de las cargas mecánicas para obtener la exacta forma del hueso.

## Referencias

1. E. Minina, C. Kreschel, M. Naski, D. Ornitz, and A. Vortkamp. "A Interaction of fgf, ihh/ptlh, and bmp signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation". *Developmental Cell*. Vol. 3. 2002. pp. 439-449.
2. B. Gao, J. Guo, C. She, A. Shu, M. Yang, Z. Tan, X. Yang, S. Guo, G. Feng, L. He. "Mutations in IHH, encoding Indian hedgehog, cause brachydactyly type A-1". *Nat Genet*. Vol. 28. 2001. pp. 386-388,
3. S. Karp, E. Schipani, B. St-Jacques, J. Hunzelman, H. Kronenberg, A McMahon. "Indian Hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-Protein-dependent and -independent pathways". *Development*. Vol. 127. 2000. 543-548.
4. J. M. Kindblom, O. Nilsson, T. Hurme, C. Ohlsson, J. Savendahl. "Expression and localization of Indian Hedgehog (Ihh) and parathyroid hormone related protein (PTHrP) in the human growth plate during pubertal development". *Journal of Endocrinology*. Vol. 174. 2002. pp. R1-R6.
5. S. Provot, E. Schipani. "Molecular mechanisms of endochondral bone development". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 328. 2005. pp. 658-665.
6. F. Forriol, F. Shapiro. "Bone development". *Clinical Orthopaedics and related research*. Vol. 43. 2005. pp. 214-33.
7. H. Kronenberg. "Development regulation of the growth plate". *Nature*. Vol. 423. 2003. pp. 332-336.
8. J. Brouwers, C. VanDonkelaar, B. Sengers, R. Huiskes. "Can the growth factors PTHrP, Ihh and VEGF, together

- regulate the development of a long bone?”. *Journal of Biomechanics*. Vol. 39. 2006. pp. 2774-2782.
9. B. DeCrombrughe, V. Lefebvre, K. Nakashima. “Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation”. *Current Opinion in Cell Biology*. Vol. 13. 2001. pp. 721-728.
  10. T. Kobayashi, D. W. Soegiarto, Y. Yang, B. Lanske, E. Schipani, A. P. McMahon, H. M. Kronenberg. “Indian Hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP”. *J. Clin. Invest.* Vol. 115. 2005. pp. 1734-1742.
  11. C. E. Farnum, R. Lee, K. Ohara, J. P. G Urban. “Volume increase in growth plate chondrocytes during hypertrophy: the contribution of organic osmolytes”. *Bone*. Vol. 30. 2002. pp. 574-581.
  12. J. E. Marsden, T. J. Hughes. *Mathematical Foundations of Elasticity*. Courier Dover Publications. New York. 1983. pp. 120-180.
  13. T. J. R. Hughes. *The Finite Element Method—Linear Static and Dynamic Finite Element Analysis*. Dover Publishers. New York. 2000. pp. 459-488
  14. A. Madzvamuse. *A Numerical approach to the study of spatial pattern formation*, D. Phil Thesis. Oxford University. UK. 2000. pp. 5-125.
  15. A. Madzvamuse, “Time-stepping schemes for moving grid finite elements applied to reaction-diffusion systems on fixed and growing domains”. *Journal of Computational Physics*. Vol. 214. 2006. pp. 239-263.
  16. P. K. Maini. “Using Mathematical Models to help understand biological pattern formation. C”. *R. Biologies*. Vol. 327. 2004. pp. 225-234.
  17. J. D. Murray. *Mathematical Biology I*. 3 ed. Ed. Springer. New York. 2001. pp. 44-75
  18. U. Chung, E. Schipani, U. McMahon, H. M. Kronenberg. “Indian Hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development”. *J. Clin. Invest.* Vol. 107. 2001. pp. 295-304.
  19. M. C. Fisher, C. Meyer, G. Garber, C. Dealy. “Role of IGFBP2, IGF-I and IGF-II in regulating long bone growth”. *Bone*. Vol. 37. 2005. pp. 741–750.
  20. S. L. Johnsen, T. Wilsgaard, S. Rasmussen, R. Sollien, T. Kiserud. “Longitudinal reference charts for growth of the fetal head, abdomen and femur”. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and reproductive Biology*. Vol. 127. 2006. pp. 172-185.
  21. T. Zylan, K. W. Murshid. “An assesment of femur growth parameters in human fetuses and their relationship to gestational age”. *Turk J Med Sci*. Vol. 33. 2003. pp. 27-32.
  22. L. S. Chitty, D. G. Altman. “Charts of fetal size: limb bones”. *BJOG: An international Journal of Obstetrics and Gynecology*. Vol. 109. 2002. pp. 919-929.
  23. W. Floyd, D. Zaleske, A. Schiller, C. Trahan, H. Mankin. “Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine distal femoral epiphysis”. *Journal of Bone and Joint Surgery*. Vol. 69A. 1987. pp. 185-190.