

Sobre la osificación intramembranosa: un modelo de aproximación para la calvaria

On intramembranous ossification: an approach model for the calvaria

MD. Luis Fernando Calixto,^I Dra. Angélica María Ramírez Martínez,^{II} Ing. Diego Alexander Garzón-Alvarado^I

^I Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

^{II} Universidad Central de Colombia. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

En este artículo se ha desarrollado un modelo de la aparición y ubicación de los centros primarios de osificación en la calvaria. Este es el primer modelo computacional que determina la ubicación de estas estructuras óseas del cráneo. Se describe un modelo de reacción-difusión de dos moléculas (BMP y Noggin) cuyo comportamiento es del tipo activador-sustrato y su solución produce patrones de Turing, que representan los centros primarios de osificación. Una vez más, el uso de ecuaciones de este tipo posibilita la explicación de fenómenos de morfogénesis antes no dilucidados por otro tipo de teorías, en este caso, teorías de osificación del cráneo. Este tema es de constante investigación, especialmente en la medicina ortopédica y pediátrica.

Palabras clave: cráneo, morfología, morfogénesis.

ABSTRACT

The paper deals with the development of a model for the appearance and location of primary ossification centers in the calvaria. This is the first computational model intended to determine the location of these cranial bone structures. A reaction-diffusion model is described of two molecules (BMP y Noggin) which behave as substrate activators. The solution produces Turing patterns representing primary

ossification centers. Once again the use of these equations makes it possible to explain morphogenesis phenomena not elucidated by other theories, in this case cranial ossification theories. The topic is under permanent research, especially in the fields of orthopedic and pediatric medicine.

Key words: cranium, morphology, morphogenesis.

INTRODUCCIÓN

El neurocráneo membranoso (o calvaria) se desarrolla por osificación intramembranosa. Inicialmente, el tejido mesenquimal reviste el cerebro y experimenta la diferenciación paulatina de células mesenquimales a osteoblastos. En consecuencia, se desarrollan una cierta cantidad de huesos planos que se caracterizan por la presencia de espículas óseas semejantes a agujas. Estas espículas se irradian desde los centros primarios de osificación hacia la periferia. Al proseguir el crecimiento durante la vida fetal y posnatal, estos huesos aumentan en volumen por aposición de capas sobre su superficie externa y por reabsorción osteoclástica desde el interior de cada hueso.^{1,2}

Los sitios donde se lleva a cabo la diferenciación celular se denominan centros primarios de osificación, los que están mediados por señales bioquímicas. *Holleville* y otros realizaron experimentos sobre aves para determinar los factores genéticos involucrados en la formación del neurocráneo membranoso. En especial, se encontró el efecto de diferenciación a osteoblasto que tiene la proteína morfogenética de hueso -2 (BMP2). Adicionalmente se encontró que el gen *Dlx5* se presenta en los frentes de osificación.³

Holleville y otros⁴ llevaron a cabo un estudio del *Dlx5* sobre las suturas durante el desarrollo craneal. *Jiang* y otros estudiaron la expresión molecular en las suturas de *Wnt1-Cre/R26R*; en un estudio realizado, estos autores demostraron que existe una relación directa entre las meninges derivadas de la cresta neural y la osificación intramembranosa.⁵

El origen de los centros primarios de osificación en la calvaria no se ha esclarecido completamente. El objetivo de este artículo es desarrollar un modelo matemático de la aparición de los centros primarios de osificación en la calvaria. Mediante este modelo se logra simular la aparición de los centros primarios de los futuros huesos planos: huesos frontales, parietales y el occipital. La implementación computacional se lleva a cabo mediante elementos finitos, y para el modelo de las señales moleculares se ha utilizado un sistema de reacción-difusión cuyos parámetros se encuentran en el espacio de Turing y, por tanto, desarrolla patrones bien establecidos, denominados de Turing.

La osificación de la calvaria difiere de la base craneal en la forma de osificación y en el origen embrionario. En la primera se da de forma intramembranosa y en la base craneal de forma cartilaginosa. Además, el origen embrionario de la calvaria son las células de la cresta neural.⁶ Estas células forman el ectomenix, que es una membrana fibrosa. En el segundo mes de gestación la osificación se presenta en el ectomenix. Una vez que se presentan los centros primarios de osificación, se

desarrollan los huesos mediante la osificación de sus límites (márgenes) que contienen células especializadas de hueso que permiten la formación de estos. Estas márgenes crecen de forma radial hasta alcanzar los límites de otros huesos, formando así las suturas. Estas suturas le dan flexibilidad al cráneo para permitir su desarrollo y crecimiento. Además, en ellas se presenta un fino balance entre proliferación y diferenciación.⁷ Modelos biomecánicos proponen que las fuerzas ejercidas sobre las suturas por la expansión del cráneo permiten el desarrollo de la calvaria y determinan la localización de la sutura.

Desde el punto de vista bioquímico se han hecho numerosos estudios que demuestran que la osificación depende de los factores genéticos y de las moléculas involucradas en los niveles local y sistémico. Por ejemplo, *Holleville* y otros³ realizaron experimentos donde el gene *Dlx5* fue comparado con otras moléculas involucradas en el proceso de osificación de la calvaria, especialmente la proteína morfogenética de hueso 2 (BMP2), BMP4, BMP7, los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) y sus receptores FGFR1, FGFR2, FGFR4.

En el artículo de *Holleville* y otros se tiene en cuenta el efecto de cada molécula sobre el marcador de osificación intramembranosa denominado osteopontina. Además, estos investigadores³ hallaron que el *Dlx5* se encuentra en frentes osteogénicos y en las suturas mesenquimales, pero no en la sutura misma. De la misma forma, en cultivos celulares de calvaria se encontró que el *Dlx5* es regulado positivamente por el BMP e inhibido por su antagonista, el *Noggin*.³

MÉTODOS

Hipótesis del modelo

La hipótesis de este trabajo se basa en la diferenciación de los osteoblastos a partir del tejido mesenquimal mediante la acción de la proteína BMP2,³ la cual se encuentra regulada en el tejido mesenquimal. Para esto se supone la existencia de un sistema de reacción-difusión de dos moléculas primordiales como son el BMP2 y el *Noggin*³ cuya distribución en el espacio puede conducir a un patrón estable en el tiempo e inestable en el espacio, similar a los patrones de diferenciación de los osteoblastos desde células mesenquimales.

Descripción del modelo

El proceso regulatorio está basado en un sistema de reacción-difusión (de ecuaciones diferenciales parciales) del tipo activador-sustrato (también llamado modelo de agotamiento). El proceso indica que existe un lazo de control entre el *Noggin* (factor activador) y el BMP2 (sustrato), donde el *Noggin* se autorregula y compite con la producción de BMP2. De esta forma, se supone que el BMP2 se autoinhibe pero activa la producción de *Noggin* y, por su parte, el *Noggin* inhibe la producción de BMP2. Esta hipótesis se basa en los resultados obtenidos por *Zhu* y otros,⁸ *Walsh* y otros⁹ y *Plikus* y otros¹⁰ donde se destaca la existencia del bucle regulatorio entre BMP2 y *Noggin*. El BMP2 permite la diferenciación celular de las células mesenquimales a osteoblastos. De esta forma los osteoblastos diferencian y desarrollan patrones altamente repetibles, similares a los hallados en los patrones de Turing.¹¹

La definición de las relaciones indicadas puede ser cuantificada por medio de ecuaciones que establecen cambios locales de los factores que están en el tejido mesenquimal que recubre la calvaria:

$$\frac{\partial S_N}{\partial t} = C(\alpha_1 - \mu S_N + \gamma_0 S_N^2 S_B) + D_N \nabla^2 S_N \quad (1a)$$

$$\frac{\partial S_B}{\partial t} = C(\alpha_2 - \gamma_0 S_N^2 S_B) + D_B \nabla^2 S_B \quad (1b)$$

donde C es la concentración de células del tejido mesenquimal que expresan los factores BMP y Noggin; S_B y S_N representan las concentraciones de BMP y Noggin, respectivamente. Los restantes son parámetros del modelo: α_1 y α_2 son términos que cuantifican la producción de cada factor molecular por los tejidos mesenquimal y epitelial, μ es una constante que cuantifica la inhibición en la producción de Noggin por su exceso, γ_0 regula la interacción no lineal entre la concentración de Noggin - BMP2 y cuantifica la activación o inhibición de cada factor molecular, D_B y D_N son los coeficientes de difusión del BMP2 y Noggin, respectivamente. En la interpretación biológica de las anteriores ecuaciones el término $\gamma_0 S_N^2 S_B$ representa la activación no lineal de S_N (producción de Noggin por la presencia de BMP2) y el consumo no lineal de S_B (por la presencia de Noggin).

Adicionalmente, se tiene en cuenta la maduración de las células mesenquimales. Esta suposición se basa en la teoría de *Ruch* y otros¹² quienes han postulado que solo las células que han cumplido un determinado número de ciclos celulares pueden diferenciarse. De igual forma, esta suposición es confirmada por *Schmitt y Ruch*.¹³ Estos hallazgos fueron establecidos en la diferenciación de células mesenquimales a odontoblastos, y aquí se *hace* una extensión a lo que puede ocurrir con osteoblastos. En este artículo se tiene en cuenta que la posición de las células en la calvaria determina su diferenciación. Por tanto la diferenciación depende de la concentración de BMP que señala el proceso y la maduración celular que depende de la posición especial, dada por:

$$\frac{\partial c_o}{\partial t} = \eta \frac{S_B^n}{S_B^m + S_T^n} \cdot \frac{T_a^r}{T_a^r + t^r} f(\mathbf{x}_{rel}) \quad (2)$$

La ecuación (2) representa el término de diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos por la presencia de BMP2, la cual se regula a medida que transcurre el tiempo T y depende de la maduración celular que depende de la posición espacial $f(\mathbf{x}_{rel})$. En esta ecuación η es una constante que regula la

diferenciación celular, S_{π}^n representa el valor de la concentración de BMP2 con la cual comienza el proceso de diferenciación. T_a es el tiempo requerido para que se lleve a cabo la diferenciación y t^r representa el tiempo límite de acción de la BMP2.

Por su parte, $f(x_{rel})$ depende de la posición relativa x_{rel} que determina la distancia entre la parte más superior de la calvaria y el límite rostral y la base del cráneo. Esta suposición se basa en que las partes rostrales y la base del cráneo diferencian con mayor rapidez (séptima semana) que la calvaria (octava a novena semana).⁷ Por tanto, la cercanía al rostro podría determinar la maduración celular, que está dada por:

$$f(x_{rel}) = \begin{cases} 1 & x_{rel} \leq r \\ 0 & \text{other case} \end{cases} \quad (3)$$

Donde r determina el valor umbral desde el límite rostral para el cual, las células ubicadas debajo de él son lo suficientemente maduras para diferenciar en el centro primario de osificación (figura 1).

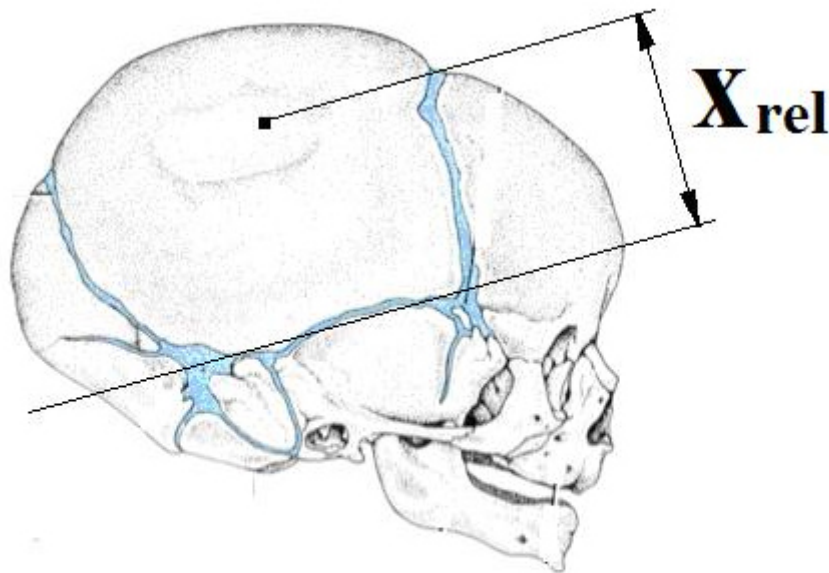


Fig. 1. Valor de la distancia relativa que determina la madurez de las células mesenquimales para diferenciar a osteoblastos en los centros primarios de osificación de la calvaria.

Implementación numérica

El conjunto de ecuaciones (1) fueron implementadas y numéricamente solucionadas mediante el método de los elementos finitos con un esquema Newton-Raphson; para su solución se hizo un programa en FORTRAN. Los ejemplos propuestos se solucionaron en un laptop de 4096 MB y 800 MHz de velocidad de procesador. La simulación computacional se llevo realizó en un esquema iterativo incremental que permite solucionar, computacionalmente, la evolución tanto de la concentración de los factores moleculares como la aparición de los osteoblastos. Inicialmente el tejido mesenquimal se supone como una matriz estructural con una concentración inicial de células mesenquimales (cuya concentración es $4(10^6)$ cél/mm³). Las concentraciones iniciales de Noggin y BMP2 se distribuyen aleatoriamente en el tejido mesenquimal, con una perturbación del 10 % sobre la concentración de estado estable dada por $(S_N^*, S_B^*) = (0.1, 0.09) [ng/mm^3]$.

RESULTADOS

En la figura 2 se muestran los resultados para el estado estable del sistema de reacción difusión. Nótese la formación de patrones de los reactantes (BMP2-Noggin) que interactúan de forma química, por intermedio de las células mesenquimales, en la calvaria. En sitios de mayor concentración de BMP2 (en negro, figura 2 a)) existe una menor concentración de Noggin (figura 2 b)). Se debe recordar que el BMP2 señala la formación de los centros primarios de osificación, por tanto, en aquellos sitios de mayor concentración se hallará ubicado estos centros.

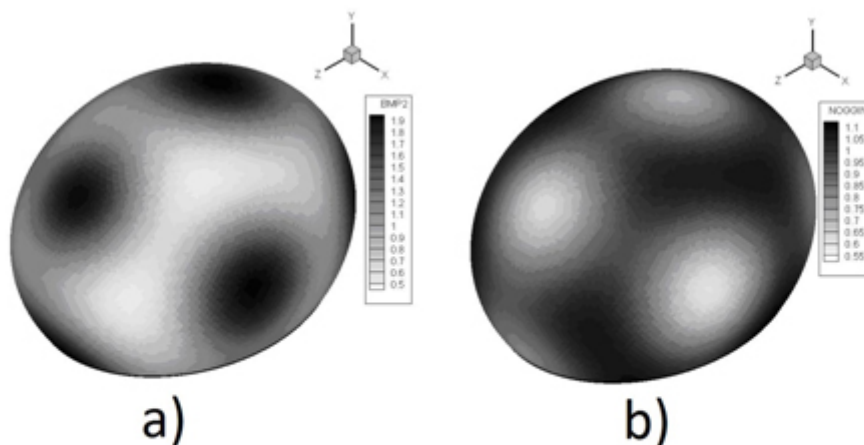


Fig. 2. Resultados del sistema de reacción difusión BMP2-Noggin. a) resultados para BMP2 (encargada de la diferenciación celular a osteoblastos), b) resultados para Noggin (regulador negativo de la diferenciación).

En la figura 3 se muestran los resultados para los centros primarios de osificación. En la parte superior derecha está una vista isométrica de la calvaria. En las demás vistas se observa ubicación de los centros de osificación así: dos en la parte frontal (uno a cada lado de la línea media); dos parietales (uno a cada lado de la calvaria) y dos centros en el futuro hueso occipital. Nótese que en la calvaria se obtienen dos centros uno por encima del otro. El centro de osificación cercano a la región condrocraNeal fusionará con aquellos centros que emergen del proceso de osificación endocondral.

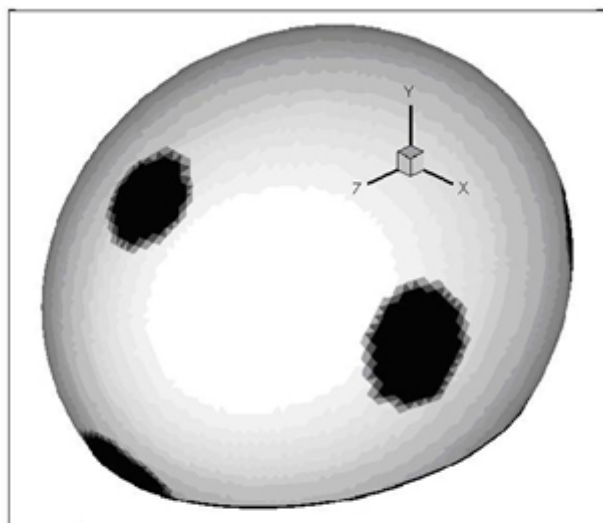


Fig. 3. En el cuadro superior derecho está un isométrico que determina la formación de los centros primarios de osificación en la calvaria.

DISCUSIÓN

Se han propuesto diferentes teorías para comprender los mecanismos que regulan el crecimiento y desarrollo prenatal y postnatal del cráneo. Sin embargo, estas teorías han generado gran controversia. Por ejemplo, *Weinmann y Sicher*¹⁴ establecen la teoría de la dominancia sutural. En aquel artículo se afirma que el crecimiento de la bóveda craneal es causado por patrones de crecimiento "intrínsecos" y "proliferativos". Además, establece que la responsabilidad del crecimiento craneofacial recae en las suturas, el cartílago y el periostio, que son controlados genéticamente. *Scott*^{15,16} supone que los huesos de la calvaria se separan en sentido transverso tanto por el crecimiento del cerebro como por el cartílago localizado entre el cuerpo y las alas mayores del esfenoides, la sutura media palatina y la lámina cribiforme. De otro lado, *Moss*¹⁷ afirma que el medio ambiente es quien regula el crecimiento esquelético, especialmente en relación con el crecimiento expansivo del cerebro y los huesos de la bóveda craneana. De igual forma, *Moss*¹⁸ corrobora su trabajo utilizando los avances de las ciencias biomédicas, bioingeniería y computacionales, incluyendo dos tópicos nuevos: los mecanismos de la mecanotransducción y la teoría de la red biológica. En aquel artículo afirma que existe una interacción entre los factores epigenéticos y genómicos (intrínsecos) que aporta las causas necesarias y suficientes para la morfogénesis. *Van Limborgh*¹⁹ supone que el crecimiento craneofacial posnatal es controlado por un sistema multifactorial: factores genéticos intrínsecos, epigenéticos locales y generales, además de factores medioambientales. Asimismo, considera la importancia de los centros de osificación primarios en el crecimiento craneal y supone que la formación de estos es, también, multifactorial. Como se puede notar, la aparición y crecimiento de los centros primarios de osificación en el cerebro es aún un tema de constante investigación que no ha sido elucidado

completamente. Las teorías aceptadas^{15,18,19} suponen que estos centros se desarrollan por causas multifactoriales, siendo la más importante, la genética.

En este artículo, la hipótesis propuesta radica en la existencia de dos moléculas (BMP2-Noggin) que interactúan de forma no lineal por intermedio de las células mesenquimales. Además, se completa el modelo con la maduración celular localizada en el neurocráneo membranoso, pues son aquellas células maduras, las que diferencian en primera instancia gracias a la existencia de la BMP2.

El modelo predice la formación de los centros secundarios de osificación así: dos parietales, dos frontales y uno o dos occipitales (uno en cada lado de la línea media del cráneo). Estos resultados son acordes con la experiencia médica.²⁰ Sin embargo, en el caso del desarrollo del hueso occipital, no existe consenso en el número de centros primarios. La literatura reporta que se pueden presentar 1, 2, 4 y más centros^{21,22} del tipo intramembranoso. Estos centros dependen del tamaño del cráneo en formación y de la maduración de las células mesenquimales.^{5,20} Con el modelo matemático aquí propuesto, se encontró que el número y ubicación de los centros primarios de osificación depende de los parámetros utilizados en el modelo y de la geometría. Los parámetros se encuentran en un espacio especial (de Turing), donde se forman patrones,²³ que representarán los centros de osificación. Fuera de este espacio, la difusión será dominante y no permitirá la acumulación espacial de BMP, que será la encargada de señalar la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gruber D. Pediatric Skull Base Surgery: Embryology and Developmental Anatomy. *Pediatr Neurosurg*. 2003; 38: 2-8.
2. Sadler TW. Langman's medical embryology, 9th edition. Baltimore, Maryland: Ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
3. Holleville N, Quilhac A, Bontoux M, Monsoro-Burq AH. BMP signals regulate Dlx5 during early avian skull development. *Dev Biol*. 2003; 257(1): 177-89.
4. Holleville N, Matéos S, Bontoux M, Bollerot K, Monsoro-Burq AH. Dlx5 drives Runx2 expression and osteogenic differentiation in developing cranial suture mesenchyme. *Dev Biol*. 2007; 304(2): 860-74.
5. Jiang X, Iseki S, Maxson RE, Sucov HM, Morriss-Kay GM. Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol*. 2002 Jan 1; 241(1): 106-16.
6. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of anatomy and physiology. 11th Ed. Danvers, MA, USA: Ed. John Wiley and Sons; 2006.
7. Tubbs RS, Bosmia AN, Cohen-Gadol A. The human calvaria: a review of embryology, anatomy, pathology, and molecular development. *Childs Nerv Syst*. 2012 Apr; 28(4): 23-31.

8. Zhu W, Kim J, Cheng C, Rawlins BA, Boachie-Adjei O, Crystal RG, et al. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. *Bone*. 2006;39(1):61-71.
9. Walsh DW, Godson C, Brazil DP, Martin F. Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol*. 2010;20(5):244-56.
10. Plikus MV, Zeichner-David M, Mayer JA, Reyna J, Bringas P, Thewissen JG, et al. Morphoregulation of teeth: modulating the number, size, shape and differentiation by tuning Bmp activity. *Evol Dev*. 2005;7(5):440-57.
11. Murray JD. Parameter space for Turing instability in reaction diffusion mechanisms: a comparison of models. *J Theor Biol*. 1982;98(1):143-63.
12. Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C. Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1995; 39(1):51-68.
13. Schmitt R, Ruch JV. In vitro synchronization of embryonic mouse incisor preodontoblasts and preameloblasts: repercussions on terminal differentiation. *Eur J Oral Sci*. 2000;108(4):311-9.
14. Weinmann JP, Sicher H. Bone and bone: fundamentals of bone biology. St Louis, USA: The C.V. Mosby Company; 1947.
15. Scott JH. The growth in width of the facial skeleton. *American Journal of Orthodontics*. 1957;43(5):366-71.
16. Scott JH. The analysis of facial growth from fetal life to adulthood. *American Journal Orthodontics*. 1963;33(2):110-13.
17. Moss ML. The primacy of functional matrices in orofacial growth. *Dent Pract Dent Rec*. 1968 Oct;19(2):65-73.
18. Moss ML. The functional matrix hypothesis revisited. 2. The role of an osseous connected cellular network. *American Journal of Orthodontics and dentofacial orthopedics*. 1997;112(2):221-26.
19. Van Limborgh J. The role of genetic and local environmental factors in the control of postnatal craniofacial morphogenesis. *Acta Morphol Neerl Scand*. 1972 Oct;10(1):37-47.
20. Delezoide AL, Benoist-Lasselín C, Legeai-Mallet L, Le Merrer M, Munnich A, Vekemans M, et al. Spatio-temporal expression of FGFR 1, 2 and 3 genes during human embryo-fetal ossification. *Mech Dev*. 1998 Sep;77(1):19-30.
21. Matsumura G, England MA, Uchiumi T, Kodama G. The fusion of ossification centres in the cartilaginous and membranous parts of the occipital squama in human fetuses. *Journal Anatomy*. 1994;185:295-300.
22. Shapiro R, Robinson F. Embryogenesis of the human occipital bone. *American Journal of Roentgenology*. 1976;126(5):1063-68.

23. Garzón-Alvarado DA, García-Aznar JM, Doblaré M. Appearance and location of secondary ossification centers may be explained by a reaction-diffusion mechanism. *Comput Biol Med.* 2009; 39(6):554-61.

Recibido: 12 de octubre 2011.

Aprobado: 25 de octubre 2011.

Luis Fernando Calixto. Departamento de Cirugía y Ortopedia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Correo electrónico: lufercalixto@yahoo.com