



en

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Validación de defecto crítico en hueso mandibular de rata
en la cepa Wistar.”

TESIS

Para Obtener El Título De Cirujano Dentista

PRESENTA

RAMÍREZ PORRAS MIREYA ESPERANZA

Directora de Tesis

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Jurado:

CD. Rodríguez Montemayor Ana Francisca

Dr. Gómez Clavel José Francisco

Lic. Martínez López Francisco Javier

Dr. Pérez Martínez Isaac Obed

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA201814. “Terapia celular traslacional de células mesenquimales provenientes de tejido adiposo en la regeneración de un defecto crítico mandibular “in vivo”.

Los Reyes Iztacala, Edo. de México a 14 de febrero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	3
JUSTIFICACIÓN	4
HIPÓTESIS	8
Periodos del desarrollo prenatal	9
1. Periodo proliferativo.....	9
2. Periodo embrionario.....	10
3. Periodo fetal	12
Embriología ósea	13
Desarrollo del cráneo:	15
1. Neurocráneo.....	15
2. Viscerocráneo.....	17
Tejido Conectivo	20
1. Tejido cartilaginoso.....	20
2. Tejido óseo	24
ANTECEDENTES	35
OBJETIVOS	39
MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	40
<i>Animales y procedimientos experimentales</i>	40
RESULTADOS	48
<u>Resultados clínicos</u>	48
<u>Resultados Radiográficos</u>	54
<u>Resultados Histológicos</u>	57
<u>Resultados estadísticos</u>	61
DISCUSION	64
CONCLUSIÓN	68
LITERATURA CITADA	69
ANEXOS	73
ANEXO 1.Paraformaldehído al 4%:	73
ANEXO.2 EDTA al 7%	73
ANEXO 3. Plasdona	74
ANEXO 4.Procedimiento histológico estándar	74
ANEXO 5. Técnicas de Tinción	75
ANEXO 5. Campos hendidos y códigos de colores	75
GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS	76

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La remodelación del hueso, después de su daño o pérdida, sigue siendo un problema clínico importante, pues los tratamientos actuales como: trasplantes de injerto óseo (autólogo, homólogo o heterólogo), implantes de diferentes biomateriales o métodos de transporte de hueso, no han demostrado ser completamente satisfactorios. De tal forma, que la validación de nuestro modelo de defecto crítico óseo en rata, persigue ser un modelo confiable para sentar las bases en las futuras opciones terapéuticas que se puedan implementar en el desarrollo de la investigación en Medicina Regenerativa ósea. Los modelos animales nos han permitido el avance científico ya que, en ellos se ponen a prueba las nuevas estrategias terapéuticas que al ser innovadoras y por ello, nunca antes utilizadas, se debe de evaluar su utilidad, viabilidad y bioseguridad antes de ser usadas en el ser humano.

OBJETIVOS: Validar un modelo traslacional de defecto óseo crítico en la cortical mandibular de rata, que nos permita aportar un mayor conocimiento sobre los procesos de osificación propios de la estructura mandibular.

MÉTODO: Se requirieron 20 ratas de la cepa Wistar, machos, adultos, 200-250gr de peso, que se mantuvieron en condiciones estándares; fueron anestesiadas con Clorhidrato de Ketamina (60mg/kg) y Xilazina (7mg/kg). Se realizó una incisión extraoral, y se expuso el hueso cortical mandibular. Con un motor de baja velocidad se realizó un defecto en la hemimandíbula derecha de 3 mm de largo, por 1mm de ancho y 1mm de profundidad. La hemimandíbula izquierda de todos los especímenes fue tomada como control sin defecto. Fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos experimentales: 7, 14, 30 y 60 días. Los modelos se evaluaron clínica, radiográfica e histológicamente.

RESULTADOS: Clínicos: el porcentaje de mortalidad fue de 0% y el de morbilidad de 10%, los especímenes pudieron alimentarse 5 horas después de la intervención quirúrgica. El defecto se encontraba visible clínicamente en todos los grupos experimentales. Radiográficamente se observa bien delimitado en los grupos 7 y 15 días; ya para el grupo 30 días es apenas visible y al experimental 60 ya no se observa. Histológicamente se encuentra evidente en todos los grupos experimentales con una regeneración ósea progresiva pero no completa.

CONCLUSIONES: Esta tesis validó por los medios mencionados previamente, la utilidad de este protocolo de defecto crítico mandibular no invasivo que además de aportar un soporte óseo en la zona de defecto de hueso cortical, permite la evaluación de la regeneración ósea que no implica la fractura. De tal forma que es viable su uso para múltiples fines en la investigación de Medicina Regenerativa y otros campos.

JUSTIFICACIÓN

Una vez terminado el desarrollo humano (ya que sé es un organismo adulto), el esqueleto no permanece inerte, sino que continua renovándose periódicamente, a este proceso se le conoce como remodelación ósea, y requiere de la desmineralización de la matriz por parte de los osteoclastos y de la aposición de nueva matriz por parte de los osteoblastos.

En nuestro país existe un alto índice de pacientes que presentan pérdida de hueso en la región maxilofacial, esto sucede a consecuencia de extracciones dentales, enfermedades periodontales, enfermedades sistémicas, síndromes, traumatismos, entre muchas otras causas. Esto representa uno de los grandes problemas de la Odontología ya que, cuando el hueso se ve dañado conducirá a la formación de tejido diferente al original; en cuanto a la morfología o la función, lo que se conoce como reparación, aunque también puede encaminarse a la restauración completa denominada regeneración. Pero se dirigirá a uno y otro, dependiendo de la naturaleza de la lesión y la edad del paciente.

El Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales en México (SIVEPAB) en su último reporte que data del 2012, nos menciona que los adultos a partir de los 55 años han perdido al menos 6 órganos dentales de en total 32 y que, con el tiempo la cifra sigue aumentando, lo que se traduce en una oclusión disfuncional importante, pérdida ósea continua maxilar y mandibular así como un sin fin de desajustes relacionados con la deglución, digestión, fonación y estética.

Promedio del índice CPOD en adultos por grupo de edad en usuarios de los Servicios de Salud. México, SIVEPAB 2012.

Grupo	N	Cariado	Perdido	Obturado	CPOD
20 a 24	25,038	5.9	0.3	1.7	8.0
25 a 29	24,653	6.7	0.6	2.4	9.7
30 a 34	23,339	7.0	1.4	3.3	11.7
35 a 39	22,086	7.1	2.2	3.7	12.9
40 a 44	19,149	7.0	3.1	3.9	14.0
45 a 49	16,282	6.9	4.2	3.9	14.9
50 a 54	14,118	6.7	5.4	3.7	15.8
55 a 59	11,065	6.6	6.6	3.3	16.6
60 a 64	8,252	6.2	8.1	3.1	17.4
65 a 69	5,856	6.1	9.3	2.8	18.3
70 a 74	3,926	6.1	11.0	2.3	19.3
75 a 79	2,355	5.7	12.3	2.2	20.2
80 y más	1,689	5.4	14.4	1.7	21.6
Total	177,808	6.6	3.4	3.1	13.1

Tabla 1. Promedio de índice de CPOD en adultos donde podemos observar la pérdida de órganos dentarios importante y en ascenso a partir de los 55 años. Fuente: Secretaria de salud. Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) 2012.

También nos señala que del total de pacientes examinados en un rango de edad entre 65 a 79 años el 1.81% de los pacientes resultaron ser edéntulos totales, y entre las personas mayores de 79 años la cifra fue del 8.47%, estos porcentajes son el resultado de una población total de 255,327 pacientes revisados (1). Sin embargo, el SIVEPAB hace la siguiente aclaración:

“Estas cifras son inferiores a las encontradas por otros investigadores en el país, esto quizá se deba por una parte al tipo de población en los estudios (la fase permanente del sistema sólo examina a población usuaria de los servicios de salud) y por otra parte a que la utilización regular a los servicios odontológicos se asocia con el número de dientes remanentes en boca.” (1)

Lo que sugiere que pese a que da un vistazo general de la salud bucal mexicana, no es representativo y además, no toma en cuenta a los pacientes que no tienen servicios de salud o a los que acuden a servicios privados. De acuerdo al Consejo Nacional de Población, México tiene 119 millones 713, 203 habitantes, nuestro país es el onceavo a nivel mundial con mayor población, según los datos de 2013 del Banco Mundial (2). Siendo así, la población

registrada en el reporte “Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) 2012” representa el 0.21% de la población del país.

La pérdida de los órganos dentarios priva al hueso del estímulo de fuerzas oclusales, así la forma de resorción de la apófisis alveolar de los pacientes edentados puede llegar a ser tan severa que el foramen mentoniano (antes localizado en la parte lateral de la mandíbula), se encuentre sobre el reborde alveolar. La reducción de reborde residual (RBR) es un proceso patológico en el cual el hueso que se ha perdido no puede recuperarse (3)

Además de esto, debe considerarse que el hueso mandibular es el más grande y fuerte de los huesos de la cara, así mismo, ocupa una posición prominente y vulnerable(4) y a consecuencia de esto, es el hueso facial que ocupa el segundo lugar en incidencia de fracturas. (5)

Como medidas terapéuticas a las fracturas, enfermedades, pérdida de densidad o altura óseas patológicas entre otras, se han implementado diferentes tipos de tratamientos, entre los que destacan: los mutilantes, como las resecciones óseas; las rehabilitadoras como: prostodoncia, implantes dentales; y las regenerativas como los injertos óseos (autólogos, homólogos, heterólogos o sintético). Sin embargo, todos presentan inconvenientes, en el caso de las prostodoncias, estas requieren un proceso de elaboración largo y aunque disminuyen el proceso de reabsorción no la detiene en su totalidad(3); en cuanto a los implantes, de acuerdo a Bascones Martínez, se puede esperar un fracaso en la osteointegración de los implantes dentales en 3-8%. (6,7) Y en cuanto a los injertos óseos autólogos, que son el estándar de oro,(8) se requerirá que haya suficiente calidad y cantidad de hueso sin olvidar que representan un alto grado de morbilidad para el paciente.(9) En lo que respecta a los homólogos, heterólogos o sintéticos el mayor inconveniente es la respuesta inmunológica a un cuerpo extraño, así como la adaptación de los mismos al individuo en el que son colocados. (10,11)

En respuesta a esta problemática se busca validar terapias innovadoras en cuanto a su utilidad, viabilidad y bioseguridad, utilizando modelos animales que mimeticen lo que sucedería en el ser humano.

Numerosos protocolos han sido desarrollados en propuesta de un modelo de defecto crítico mandibular animal, en su gran mayoría sugieren biomodelos grandes como monos, cerdos o perros, pero esto resulta costoso y complicado. Este proyecto propone un modelo de defecto en hueso cortical mandibular en rata, donde los resultados obtenidos podrán ser comparados con lo que sucede en el humano, y además nos presenta las ventajas de que es accesible y reproducible.

HIPÓTESIS

El modelo de defecto óseo crítico en la cortical mandibular de rata sí cumplirá con las condiciones necesarias para poder evaluar la reparación ósea “*per se*” en los animales de experimentación, por lo que podrá ser validado como un modelo traslacional y científicamente útil para probar nuevas terapias.

INTRODUCCIÓN

Periodos del desarrollo prenatal

Para su estudio minucioso y efectivo, lo dividimos en tres periodos:

1. Proliferativo
2. Embrionario
3. Fetal

1. Periodo proliferativo

Este periodo dura dos semanas, aquí tiene lugar la implantación y crecimiento del blastocito, que contiene el tejido embrionario. Durante este tiempo ocurre la fecundación, la implantación y la formación del disco embrionario. Después de la segunda semana, esta masa de células comienza a tomar forma de un embrión.(12)



Figura 1 a) Oocito humano fecundado con dos pronúcleos. b) Después de la fusión, el núcleo resultante contiene 46 cromosomas.(Ross and Pawlina, 2007)

a) Fecundación, implantación y desarrollo del disco embrionario

Empieza con la fecundación del ovocito, que ocurre cuando el espermatozoide contacta con el ovocito en la parte distal de la trompa uterina. Luego el ovulo fecundado crece y recibe el nombre de cigoto, que origina la mórula, que contiene de 8 a 32 células en la trompa uterina. La mórula crece y comienza a migrar hacia el útero, al cual llega al final de la primera semana. Mientras tanto la cavidad uterina se prepara para la llegada del ovulo fecundado. La mucosa

uterina (endometrio) se engrosa, desarrollándose capilares y glándulas para nutrir al embrión. Este acontecimiento cíclico se ve mediado por estrógenos y progesterona. Después de esto, la mórula aumenta su número de células y se denomina blastocito.

Cuando el blastocito crece, se vuelve hueco y desarrolla una pequeña masa celular interna. Cuando este blastocito alcanza la cavidad uterina, se adhiere a la pared viscosa del útero y llega a incluirse en su superficie. Las células del cigoto digieren el endometrio uterino, permitiendo una penetración más profunda. Este proceso se conoce como implantación.

A cada lado de la masa celular interna se desarrollan dos pequeñas cavidades. Estas contactan en el centro, donde se forma un pequeño disco (el disco embrionario).

El disco embrionario se convierte en el embrión, compuesto por las paredes comunes de los dos sacos adyacentes. Un saco está tapizado con células ectodérmicas, que formarán la cubierta externa del cuerpo (epitelio), el otro saco está tapizado con células endodérmicas. En la superficie dorsal del disco embrionario, el ectodermo forma la placa neural, cuyos límites se elevan para formar el tubo neural que se convertirá en el tracto gastrointestinal. A medida que el tubo se alarga anteriormente desarrolla unas evaginaciones que forman las bolsas faríngeas, los esbozos pulmonares, el hígado, la vesícula biliar, el páncreas y la vejiga urinaria. A continuación, en el disco embrionario se desarrollan células entre las capas ectodérmica y endodérmica. Esta área se convierte en la capa mesodérmica.(12)

2. Periodo embrionario

Abarca de la 2a a la 8va semana, aquí se forman diferentes tipos de tejidos que se desarrollan y organizan para formar los sistemas orgánicos.

Los pliegues neurales aparecen durante la 3ra semana prenatal. Los bordes laterales de placa neural empiezan a elevarse, estos representan el primer

cambio en la forma del cuerpo del embrión a partir de una lámina aplanada de células. Estos pliegues alcanzan la línea media, primero en la región cervical, y luego el tubo neural se cierra anterior y posteriormente.

En la 4ta semana de desarrollo, el embrión humano está formado por un disco plano que se pliega ventralmente en su extremo anterior al mismo tiempo que el encéfalo suprayacente se expande aumentando de tamaño. Esta acción empuja al corazón caudo-ventralmente. En la línea media entre el encéfalo y el corazón se desarrolla una fosa, que se convierte en la cavidad bucal o estomodeo. Caudal a esta fosa se forma el primer arco faríngeo, denominado arco mandibular donde aparece un cartílago llamado “cartílago de Meckel”. Los tejidos maxilares que forman las mejillas crecen a partir de este arco faríngeo, así como el hueso mandibular, los músculos de la masticación, los nervios y el aporte sanguíneo de esta zona.

Tabla 1 . Estructuras cartilagosas y óseas que derivan de los arcos braquiales

Arcos braquiales	Estructura derivada	
1°	Procesos maxilares Procesos mandibulares Cartílago de Meckel (tres porciones)	Maxilar Mandíbula <i>1.Porción dorsal:</i> martillo y yunque (huesos del oído medio) <i>2.Porción intermedia:</i> ligamento esfenomandibular <i>3.Porción ventral:</i> guía de osificación mandibular (intramembranosa)
2°	Huesos	Estribo (oído medio) Apófisis estiloides. Ligamento estilohioideo. Hueso hioides
3°	Cuerno mayor del hioides y parte inferior del cuerpo del hioides	
4°, 5° y 6°	Cartílagos laríngeos	Tiroides Cricoides Aritenoides Corniculado Cuneiforme

Tabla 2. Tabla esquemática de las estructuras óseas derivadas de los arcos braquiales . Tomada de (Ferraris and Muñoz, 2002)

El tejido conectivo se desarrolla a partir de los somitos como fibroblastos que migran desde cada lado del tubo neural. Al inicio de su formación, la porción ventromedial del somito se diferencia en el esclerotomo, la porción dorso lateral se convierte en el dermatomo, y una tercera división, intermedia, se convierte

en el miotomo. El esclerotomo medial se diferencia en células mesenquimales, que se convierten osteoblastos, condroblastos y fibroblastos. Una gran parte del esqueleto del embrión se forma a partir de estas células. Las células del dermatomo forman la dermis, el tejido subcutáneo, mientras que el mesodermo visceral soporta el endodermo del tracto gastrointestinal, así como un sistema de mesenterios que estabilizan y sujetan el tracto gastrointestinal. (12)

El componente esquelético inicial en el embrión es el cartílago. Las células cartilaginosas se originan del esclerotomo y migran alrededor de la notocorda y la medula espinal, formando la columna vertebral. Los condroblastos también forman cartílago en los miembros, el cráneo y la cara, apareciendo primero durante la 5ta semana de gestación. Las células cartilaginosas presentan crecimiento aposicional (exógeno) e intersticial (endógeno). Rápidamente se produce un esqueleto cartilaginoso de sostén para soportar los tejidos blandos del embrión en crecimiento. La mayoría del cartílago se muestra claro y semejante al cristal y se denomina cartílago hialino. El cartílago también puede contener fibras elásticas; de ser así, se denomina cartílago elástico o fibroso. (12)

3. Periodo fetal

Se prolonga hasta el nacimiento. Durante este periodo los tejidos se desarrollan, aumentan de tamaño y pasan a ser funcionales(12)

Embriología ósea

El sistema esquelético se desarrolla a partir del mesodermo paraxial, de la lámina del mesodermo lateral (hoja somática) y la cresta neural. El mesodermo paraxial forma una serie segmentada de bloques de tejido a cada lado del tubo neural, denominados somitómeras en la región cefálica y somitas en la región occipital. Los somitas se diferencian de una porción ventromedial, el esclerotoma, y una parte dorsolateral, el dermomiótoma. Al finalizar la cuarta semana, las células del esclerotoma se tornan polimorfas y constituyen el tejido laxo, el mesénquima, o tejido conectivo embrionario. Las células mesenquimales se caracterizan porque emigran y se diferencian de muchas maneras; pueden convertirse en fibroblastos, condroblastos y osteoblastos (células formadoras de hueso) (13).

La capacidad de formar hueso que presenta el mesénquima no está limitada a las células de esclerotoma, también tiene lugar en la hoja somática del mesodermo de la pared del cuerpo, que aporta células mesodérmicas para constituir las cinturas escapular y pelviana y los huesos largos de las extremidades. Se ha demostrado, asimismo, que las células de la cresta neural de la región cefálica se diferencian en mesénquima y participan en la formación de los huesos de la cara y el cráneo. Los somitas y somitómeras occipitales contribuyen igualmente a la formación de la bóveda craneana y de la base de cráneo. En algunos huesos, como en los huesos planos de cráneo, el mesénquima de la dermis se diferencia directamente en hueso, proceso que recibe el nombre de osificación intramembranosa. Sin embargo, en la mayoría de los huesos, las células mesenquimales dan origen primero a moldes de cartílago hialino, los cuales, a su vez, se osifican por el proceso de osificación endocondral(13)

Formación del hueso se da por medio de 2 tipos de osificación:

I. Intramembranosa: se realiza a expensas del mesénquima. Los centros de osificación se caracterizan por poseer abundantes capilares, fibras colágenas

y osteoblastos que elaboran sustancia osteoide, que se dispones formando trabéculas que constituyen una red tridimensional esponjosa. En los espacios intertrabeculares el mesénquima se transforma en médula ósea. El tejido mesenquimal circundante externo a las zonas osificadas se diferencia en periostio, estructura a partir de la cual se origina las nuevas trabéculas. A este tejido óseo primario no laminar, lo sustituye después del nacimiento un tejido óseo secundario laminar. En las zonas periféricas del hueso el tejido óseo se dispone como tejido compacto formando las tablas externa e interna. La zona intermedia del tejido óseo es de variedad esponjosa y se denomina díploe o aerolar. Esta osificación es típica de los huesos planos. Este tipo de osificación está estrechamente relacionada con la futura función del hueso. En las zonas de crecimiento expuestas a tensiones, el mecanismo de osificación es intramembranoso. El hueso soporta mejor la tensión ya que crece por aposición. (14)

Endocondral o molde cartilaginoso: el molde de cartílago hialino es el que guía la formación ósea por remoción de cartílago, quien experimenta numerosos cambios histológicos previos: proliferación e hipertrofia celular, calcificación de la matriz cartilaginosa, erosión (invasión vascular), formación de tejido osteoide y posteriormente la mineralización. El cartílago por ser rígido y flexible soporta mejor la presión y el crecimiento es de tipo aposicional e intersticial(14)

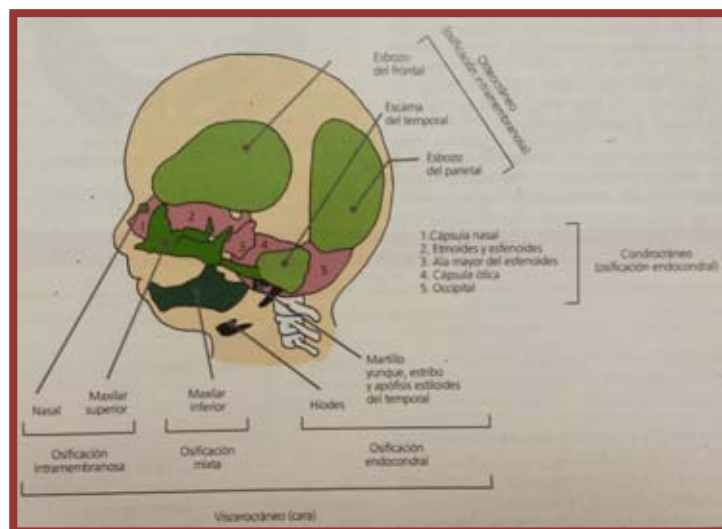


Figura 2 Cráneo y cara de feto de 20 semanas, se menciona el tipo de osificación de acuerdo a la estructura. (Ferraris and Muñoz, 2002)

Desarrollo del cráneo:

El cráneo puede ser dividido en dos partes: el neuro-cráneo, que forma una cubierta protectora del encéfalo, y el viscerocráneo, que constituye el esqueleto de la cara.

1. Neurocráneo

Se divide en dos secciones; a) la porción membranosa formada por los huesos planos alrededor del cerebro como una bóveda; y b) la porción cartilaginosa, o condrocráneo que forma la base cráneo. Ambas partes del neurocráneo se forman de una combinación de mesodermo paraxial y de células de la cresta neural.(13)

a) Neurocráneo membranoso:

Las células que forman la porción membranosa se diferencian de manera directa hacia hueso por un proceso denominado osificación membranosa. Como consecuencia de ello se forman diversos huesos membranosos planos que se caracterizan por la presencia de espículas óseas semejantes a agujas. Estas espículas se irradian progresivamente desde los centros de osificación primaria hacia la periferia. Durante el crecimiento en la vida fetal y el periodo posnatal los huesos membranosos aumentan de volumen por aposición de nuevas capas sobre la superficie externa y por resorción osteoclástica simultánea desde el interior.(13)

Cuando se forman los huesos planos se mantienen separados por costuras estrechas de tejido conectivo denominadas suturas. En algunas áreas, donde se encuentran más de dos huesos, las suturas forman regiones extensas denominadas fontanelas. La más grande de estas es la fontanela anterior, que forma el “punto blando” sobre la parte dorsal de la cabeza del bebé. Las suturas permiten el crecimiento del cráneo, para alojar el desarrollo prenatal y posnatal del cerebro, y la superposición (moldeado) de los huesos cuando él

bebe atraviesa el canal del parto. Poco después del nacimiento los huesos membranosos vuelven a su posición original.(13)

Diversas suturas y fontanelas mantienen estado membranoso bastante tiempo después del nacimiento. El crecimiento de los huesos de la bóveda craneana continúa después del nacimiento y se debe sobre todo al desarrollo del cerebro. Aun cuando el niño de 5 a 7 años tiene casi la totalidad de su capacidad craneana, algunas suturas permanecen abiertas hasta la edad adulta. En los primeros años de vida, la palpación de la fontanela anterior proporcionará datos sobre la normalidad del proceso de osificación del cráneo y la presión intracraneana.(13)

b) Neurocráneo cartilaginoso o condrocráneo.

Este se forma en un principio por varios cartílagos separados. Los que se encuentran por delante del límite rostral de la notocorda, que termina a nivel de la glándula hipófisis en el centro de la silla turca, derivan de las células de la cresta neural.

Los que están por detrás de este límite provienen de los esclerotomas occipitales en el mesoderma paraxial y forman el condrocráneo cordal. Cuando estos cartílagos se fusionan y se osifican mediante el proceso de osificación endocondral, se forma la base de cráneo.

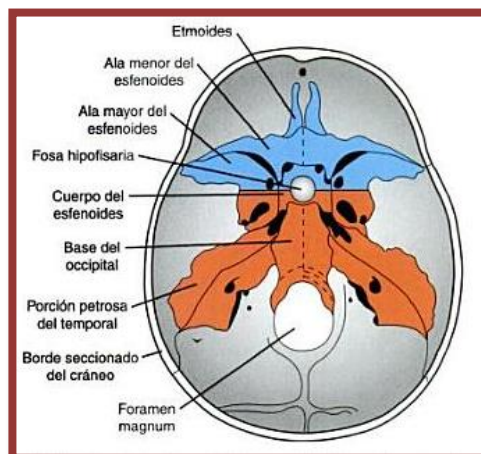


Figura 3 Vista dorsal de base de cráneo del adulto. Huesos por delante de la mitad rostral de la silla turca se originan de la cresta neural y constituyen el condrocráneo precordial (por delante de la notocorda) en azul. Los que se hallan por detrás de esa zona se originan en el mesoderma paraxial (condrocráneo cordal) en rojo.(Sadler and Langman, 2006)

La regulación molecular de la diferenciación del somita se basa en una serie compleja de señales genéticas provenientes de los tejidos que lo rodean. Sonic Hedgehog (SHH), una molécula de señalización secretada que se expresa en la placa del piso del tubo neural y en la notocorda. Inicia la expresión de *PAX1* en las supuestas células del esclerotoma y este factor de transcripción regula la diferenciación de estas células hacia células óseas. La expresión del factor de crecimiento proteína morfogenética del hueso 4 (*BMP4*) por el ectodermo suprayacente provoca la secreción de los factores de crecimiento WNT desde la región dorsal del tubo neural. A su vez, estos factores causan la expresión del gen específico de músculo *MYF5* en la porción dorsomedial del somita, y este gen regula el desarrollo de los músculos epiméricos (espalda). Las proteínas *WNT* expresadas por el ectodermo suprayacente, junto con *BMP4* expresadas por la lámina del mesodermolateral, desencadenan la expresión del *MYOD* en la parte dorsolateral del somita.(13)

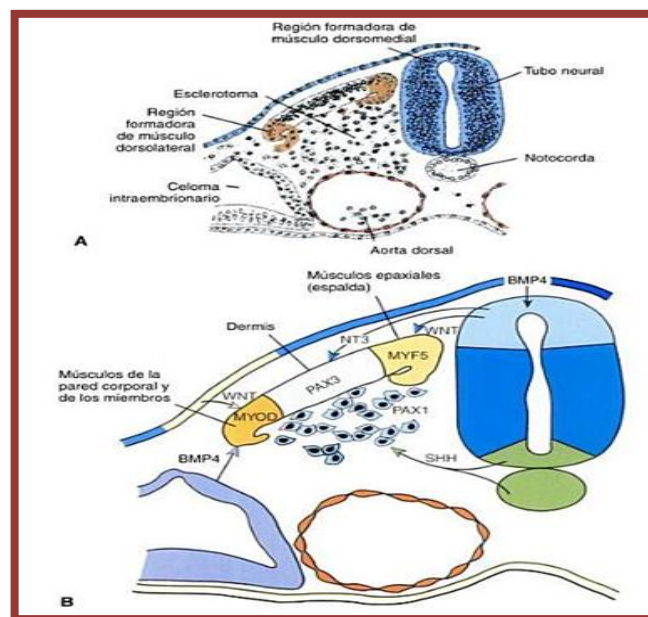


Figura 4 A y B. Diferenciación de somita con por medio de señalización genética iniciada por Sonic hedgehog a células óseas (Sadler and Langman, 2006).

2. Viscerocráneo

Todo lo que forma al viscerocráneo se forma de la cresta neural(13)

Los huesos faciales se desarrollan por encima de la capsula nasal y se denominan premaxilar, maxilar, cigomático y porción petrosa del hueso

temporal. Estos huesos aparecen inicialmente como unos centros de osificación diminutos en la cara; luego incrementan su diámetro, dispersándose anterior, superior y posteriormente en los tejidos que circundan la órbita. Los huesos maxilares también crecen medialmente en el paladar. La altura del maxilar se debe parcialmente al crecimiento en longitud de las raíces de los dientes.

El hueso mandibular se osifica por un mecanismo llamado yuxtaparacondral en el que el cartílago de Meckel, llamado cartílago primario, sirve como guía o sostén, pero no interviene en el proceso. La osificación se efectúa de una estructura paralela y ubicada al lado de cartílago, de ahí su nombre “yuxta= al lado”, “para- paralelo” y “condro=cartílago”. La formación ósea comienza a las 6 o 7 semanas, inicia con la vecindad del ángulo formado por las ramas del nervio mentoniano y del nervio incisivo, al separarse del dentario inferior. Se inicia como un anillo óseo alrededor del nervio mentoniano y posteriormente las trabéculas se extienden hacia atrás y hacia adelante. La porción ventral del cartílago de Meckel es la que sirve de guía al proceso de osificación intramembranoso del cuerpo de la mandíbula. El sector distal de cartílago se encargara de formar los dos huesecillos del oído medio: martillo y yunque en su porción intermedia del ligamento esfenomaxilar. El resto del cartílago involuciona. El hueso embrionario del cuerpo de la mandíbula tiene el aspecto de un canal abierto hacia arriba, donde se alojan el paquete vasculo-nervioso y los gérmenes dentarios en desarrollo.

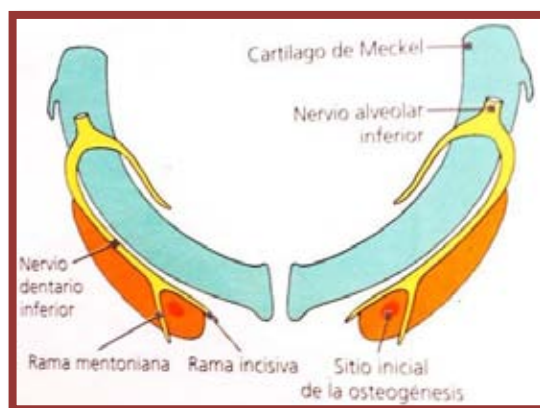


Figura 5 Osificación yuxtaparacondral mandibular. (Ferraris and Muñoz, 2002)

A las doce semanas aparecen en el mesénquima 4 centros de cartílago secundario independientes. La mandíbula se desarrolla en varias unidades; una unidad condilar forma la articulación, permitiendo el movimiento de la mandíbula; el cuerpo es el centro de todo el crecimiento y la función de la mandíbula; el proceso angular se relaciona con los músculos masticadores pterigoideo medial y masetero; el proceso coronoideo se relaciona con el desarrollo e inserción del musculo temporal, y el proceso alveolar se relaciona con el desarrollo de los dientes. Estos procesos en conjunto dan lugar a la mandíbula.(12)

A las doce semanas aparecen en el mesénquima 4 centros de cartílago secundario independientes. La mandíbula se desarrolla en varias unidades; una unidad condilar forma la articulación, permitiendo el movimiento de la mandíbula; el cuerpo es el centro de todo el crecimiento y la función de la mandíbula; el proceso angular se relaciona con los músculos masticadores pterigoideo medial y masetero; el proceso coronoideo se relaciona con el desarrollo e inserción del musculo temporal, y el proceso alveolar se relaciona con el desarrollo de los dientes. Estos procesos en conjunto dan lugar a la mandíbula.(12)

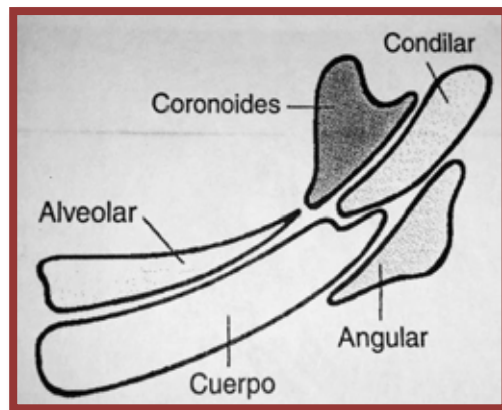


Figura 6 Áreas de desarrollo de la mandíbula. (Avery and Chiego, 2007)

Tejido Conectivo

El tejido conectivo o tejido conjuntivo (TC) agrupa una variedad de tejidos que se caracterizan por conectar o unir y proporcionar nutrición, soporte y protección a otros tejidos. Tienen variadas actividades inductoras de la morfología, diferenciación y la arquitectura los diversos órganos. Forman el estroma de todos los sistemas orgánicos, es decir, la trama o armazón estructural del cuerpo. Sus componentes son importantes no solo para el desarrollo y el funcionamiento normal de los aparatos y sistemas, sino que intervienen también en los procesos de defensa y reparación (ejemplo: cicatrización) que sucede en organismo. Los vasos sanguíneos que transportan células prontas a migrar al TC se encuentran íntimamente vinculados a este con funciones de defensa.

La variedad más dura de TC forma los llamados órganos de sostén, como los huesos, los cartílagos, y las articulaciones. Los tejidos óseo y cartilaginoso (complejos osteocondrales) desempeñan un papel fundamental en el soporte general del cuerpo como tejido esqueletogeno, participan en sus movimientos (sistema musculo esquelético) y sirven de protección a órganos vitales (médula ósea, sistema nervioso central) así mismo el sistema óseo desempeña una función de pivote en la homeostasis osteocálcica

1. Tejido cartilaginoso

El cartílago es un TC muy especializado compuesto por células y abundante Matriz extra celular (MEC) conformada por muchas fibras colágenas sumergidas en una sustancia fundamental, rica en Proteoglicanos (PG) y glicosaminoglicanos (GAG). Esta estructura molecular le confiere al cartílago resistencia, elasticidad y consistencia muy diferente a la que tiene un TC común. (15)

Tabla 2 Variedades de cartílago

Características	Hialino	Elástico	Fibroso
Apariencia macroscópica	Blanco-azulado, opalino y ligeramente translucido	Amarillento, opaco	Blanco grisáceo, opaco con apariencia fibrilar
Localización	Superficies articulares, cartílagos costales, esqueleto del aparato respiratorio (laringe, traquea y bronquios), cartílago de crecimiento	Orejas, conducto auditivo externo y trompa de Eustaquio, epiglotis y otros cartílagos laríngeos.	Discos intervertebrales, meniscos de la rodilla, sínfisis y en la unión de algunos tendones al hueso.
Estructura histológica	Condrocitos redondeados, grupos isógenos (una a cuatro células), fibras colágenas cortas, abundante sustancia intercelular macromatrica y PAS positiva. No hay vasos sanguíneos	Semejante al hialino. Es una apretada red de fibras elásticas que se continúan con las del pericondrio. Las fibras elásticas confieren color amarillo.	Los condrocitos a menudo se disponen en filas paralelas a los haces de fibras colágenas que son de mayor longitud que en el cartílago hialino.
Composición relativa de los componentes microscópicos	Células+ Fibras++ (colágenas) Sustancia intercelular++	Células+ Fibras++ (colágenas y elásticas) Sustancia intercelular++	Células+ Fibras++++ (colágenas) Sustancia intercelular +/-
Histogénesis	Se origina en la capa condrogénica (capa interna del	Se origina en la capa condrogenica (capa interna del	Es semejante a un TC común

	pericondrio)	pericondrio)
Citología del condrocito	Son células ricas en RER y tienen un aparato de Golgi muy desarrollado. Contienen glucógeno (grumos PAS+). Los condrocitos son células especializadas en sintetizar fibras colágenas de tipo II (y elásticas en el cartílago elástico) y los componentes principales de la sustancia intercelular (matriz cartilaginosa). El componente principal de esta son los proteoglucanos, compuestos de proteínas y glucosaminoglucanos (condritin sulfato y queratan sulfato).	
Tabla 2. Tabla esquemática de tipos de cartílago y sus características. (Eynard, 2008)		

1. Células

Condroblastos-condrocitos

Son variedades de un tipo celular que se encuentran más o menos distanciados entre sí, separados por abundante sustancia intercelular. Debido al modo en que se originan, los condrocitos que provienen de la multiplicación de una celular forman los denominados grupos isogénicos o condronas. La forma, el tamaño y la disposición de los condronas pueden cambiar según la variedad del cartílago y, aun dentro del mismo tipo, de acuerdo con su localización. Así, estas estructuras pueden ser redondeadas ó poliédricas en las zonas profundas y elípticas en las zonas más superficiales, por debajo del pericondrio.

Se disponen axialmente en el cartílago de la variedad fibrosa. Por acción del fijador y la deshidratación durante el procesamiento histológico, los condrocitos tienden a retraerse, mientras que la sustancia amorfa circundante no lo hace, de manera que se conforma una cavidad casi vacía, llamada capsular que dificulta la observación de la forma de las células.(15)

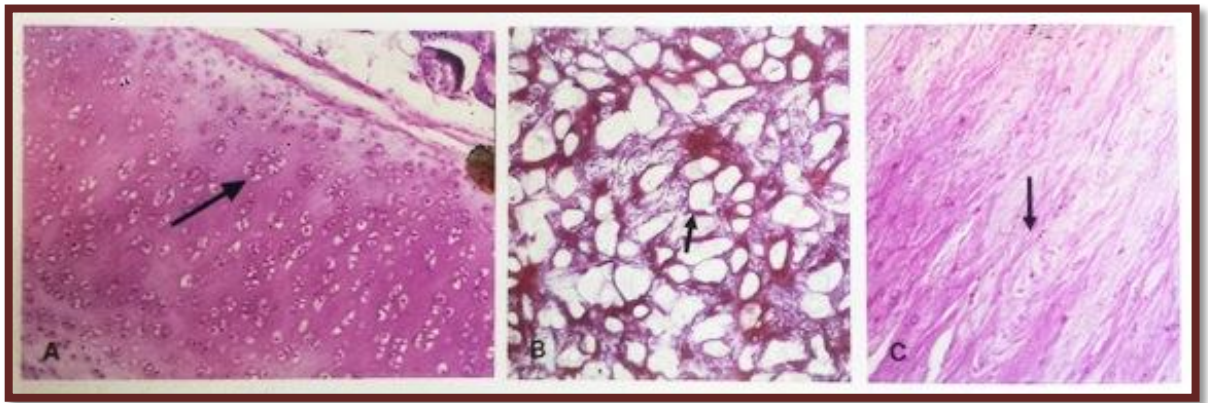


Figura 7 A. Cartilago hialino; H&E, 200X. B. Cartilago elastico; orceina, 150x. C. Cartilago fibroso; H&E, 100x. Las flechas señalan grupos isogenicos (Eynard, 2008)

2. Matriz extracelular

La mayor parte del cartílago contiene fibras de colágeno de tipo II, con un 5-10% de los tipos IX, X y XI. Las variedades más especializadas también contienen fibras elásticas (cartílago elástico) o de colágeno tipo I (cartílago fibroso).

El componente principal de la sustancia fundamental es una condromucoproteína, que corresponde al conjunto de carbohidratos complejos del cartílago, PG y GAG, principalmente bajo la forma molecular de condroitin sulfato y queratán sulfato. Son muy ricos en cargas negativas proporcionadas por los grupos carboxilo (COO-) y sulfato(SO₄=) que les confieren la importante propiedad de fijar iones y agua(15)

Estas macromoléculas son responsables de la característica de metacromasia del cartílago cuando se colorea con azul de toluidina. La sustancia fundamental también se tiñe intensamente con la coloración de ácido peryódico de Schiff (PAS), por sus componentes de glucoproteínas (GP). la zona de matriz cartilaginosa que rodea a los condrocitos se colorea con más intensidad por la mayor abundancia de condroitin sulfatos y cargas negativas, que es la base molecular de la apariencia de "capsulas".

Los PG forman agregados macromoleculares o agreganos, al unirse con los hialuronatos. El colágeno tipo II, y diversas proporciones de colágeno de los tipos IX, X y XI, más la presencia de la glucoproteína condronectina, ayudan a estabilizar los agregados de PG. La proporción relativa de estos componentes en la MEC otorga a los diferentes tipos de cartílago sus características y propiedades viscoelásticas.

El cartílago está rodeado por el pericondrio, túnica resistente formada por una capa externa de TC fibroso y por condroblastos en su región interna; estas células, (capa condrogénica) originan nuevos condrocitos por multiplicación y diferenciación. Aunque el tejido cartilaginoso crece de vasos sanguíneos, linfáticos y nervioso tiene sus nutrientes por difusión a través de vasos sanguíneos. (15)

2. Tejido óseo

Es una variedad de TC muy especializada en función de sostén y protección pues su matriz intercelular esta calcificada (mineralizada). Lo que le aporta propiedades como, dureza, rigidez y resistencia con elasticidad y flexibilidad relativas. Los huesos constituyen un gran depósito de minerales, especialmente de calcio, ion que tiene vital importancia en muchos procesos metabólicos y en la transducción de señales del organismo. Son reserva de fosforo, magnesio y manganeso.(15)

Un hueso está compuesto por tejido óseo y otros tejidos conjuntivos como:

- Hematopoyético
- Adiposo
- Vasos sanguíneos
- Nervios
- Cartílago hialino

El tejido óseo se clasifica en compacto o cortical (denso) y trabecular (esponjoso)(16,17). Cuando se examina la superficie del hueso se identifican dos tipos de organización estructural. Una capa densa y compacta forma la

superficie ósea externa (tejido óseo compacto) y una malla de aspecto esponjoso formado por trabéculas (delgadas espículas de tejido óseo anastomosadas). Estos espacios están comunicados y en los seres vivos contienen la médula y vasos sanguíneos.

Según la forma los huesos se clasifican en 4 grupos:

- 1.Huesos largos: longitud mayor que las otras dos dimensiones, compuestos por una diáfisis y dos epífisis. Ej. tibia.
- 2.Huesos cortos: tres dimensiones casi iguales. Ej. Huesos de carpo.
- 3.Huesos planos: son delgados y anchos. Ej. Esternón.
- 4.Huesos irregulares: que poseen una forma que no permite clasificarlos dentro de ninguno de los grupos anteriores, de forma compleja. Ej. Vertebras.(18)

1. El hueso inmaduro y el hueso maduro

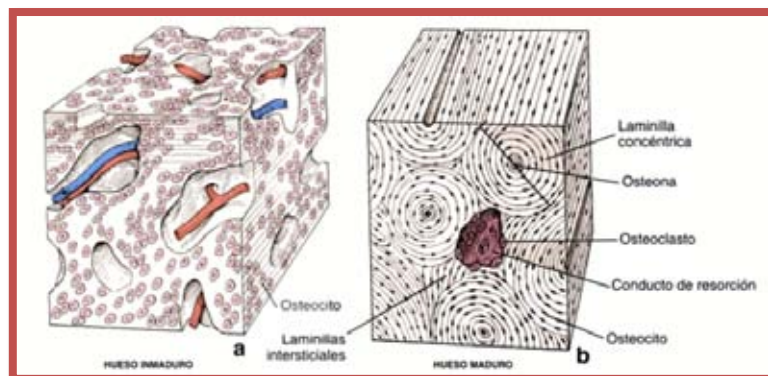


Figura 8. a. El hueso inmaduro: presenta una disposición entrelazada de fibras colágenas. Las células están distribuidas al azar. b. El hueso maduro: células se disponen siguiendo un modelo circular que refleja la estructura laminar del sistema de Havers. Los conductos de resorción del hueso maduro orientan sus ejes longitudinales en la misma dirección que los conductos de Havers. Imagen tomada de (Ross, 2007)

Hueso inmaduro

Va a presentar las siguientes características:

- No muestra un aspecto laminillar organizado. Es llamado no laminar por la disposición de las fibras colágenas.
- Contiene una cantidad relativamente mayor de células por unidad de volumen que el hueso maduro

- Las células suelen estar distribuidas al azar.
- La matriz del hueso inmaduro posee más sustancia fundamental que la del hueso maduro.
- El hueso inmaduro se forma con mayor rapidez que el maduro.

En cortes histológicos puede no resultar evidente que el hueso inmaduro no se mineraliza completamente. Si bien el hueso inmaduro es típico del feto en desarrollo, con frecuencia aparece en el adulto, sobre todo en regiones donde el hueso se encuentra en remodelación.(17)

Hueso maduro

- El hueso maduro tiene las siguientes características:
- Aspecto laminar organizado
- Cantidad de células menor a hueso maduro
- Células orientadas con su eje mayor
- Sufre mineralización secundaria prolongada
- Formación más lenta que el hueso inmaduro

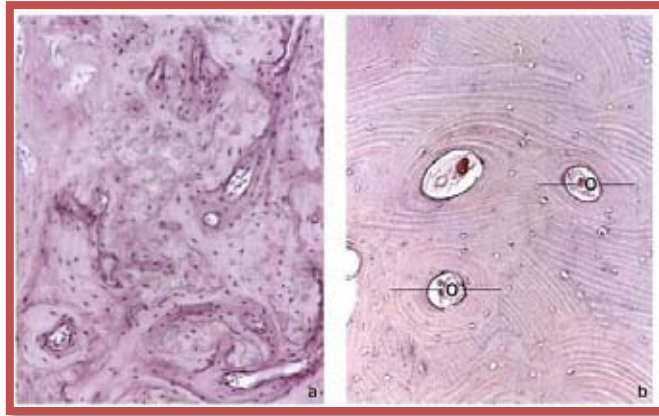


Figura 9. Microfotografías de hueso inmaduro y maduro descalcificados. **a.** Hueso inmaduro: descalcificado, teñido con H&E, aumento al 130x, muestra la relación de las células con la matriz extracelular. Presenta más células que el hueso maduro y la matriz no se organiza en células osteónicas. **b.** Corte transversal de hueso compacto maduro descalcificado, teñido con H&E, aumento a 160x, aparecen varias osteonas (O) con sus láminas. El hueso maduro tiene menos osteocitos por unidad de columna que el hueso inmaduro. Imagen tomada de (Ross, 2007)

2. Estructura ósea

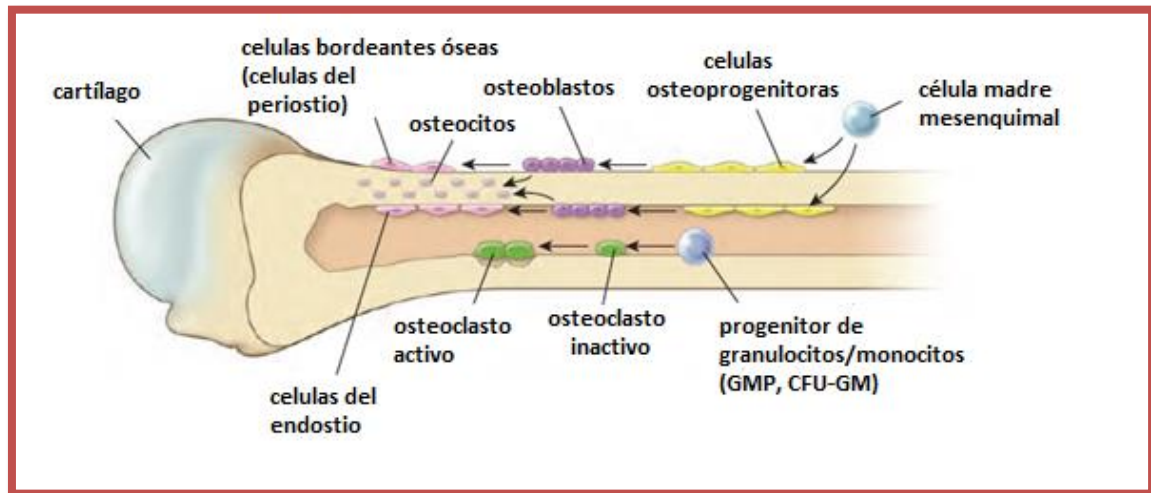


Figura 10. Imagen esquemática de las células asociadas al hueso. Todas las células excepto los osteoclastos se originan de las células madre mesenquimales, que se diferencian a osteoprogenitoras, osteoblastos y finalmente osteocitos y células bordeantes del hueso. Las células bordeantes en la zona externa ósea son parte del periostio. Es importante mencionar que las células osteoprogenitoras y las bordeantes óseas tienen una apariencia microscópica muy similar, lo que vuelve difícil diferenciar una de otra. Las células bordeantes óseas que se encuentran dentro del hueso son llamadas frecuentemente células endostales. Los osteoclastos se originan en la línea de diferenciación celular hematopoyética. Imagen editada y traducida al español tomada de (Ross, 2007)

Superficie externa de los huesos

Los huesos se encuentran recubiertos por periostio, excepto en áreas donde articulan con otro hueso, donde la superficie ósea se encuentra recubierta por cartilago.

El periostio que recubre a un hueso en crecimiento activo consiste en una capa densa fibrosa externa e internamente una capa celular, que incluirá células osteoprogenitoras. Por el otro lado, cuando el hueso no se encuentra en crecimiento activo, el periostio es mayormente fibroso, y su capa interna no se encuentra definida.

Cavidades óseas

Las cavidades óseas se encuentran recubiertas por endostio, que es una lámina de tejido conectivo que contiene células osteoprogenitoras.

3. Células del tejido óseo

Células osteoprogenitoras

Friedenstein (1973) dividió las células osteoprogenitoras en células precursoras osteogénicas determinadas e inducibles. Las células osteoprogenitoras determinadas están presentes en la médula ósea, en el endostio y periostio que recubre la superficie de huesos. Esas células tienen la capacidad intrínseca de proliferar y de diferenciarse en osteoblastos. Por otro lado, las células precursoras osteogénicas inducibles representan células mesenquimales presentes en otros órganos y tejidos. Que se pueden diferenciar en células formadoras de hueso cuando son expuestas a estímulos específicos. (19)

Osteocitos

Células de forma estrellada o almendrada atrapadas dentro de la matriz ósea mineralizada pero que permanecen en contacto con otras células del hueso por medio de delgadas prolongaciones citoplasmáticas. Los osteocitos están organizados como un sistema canalicular labrado en la matriz mineralizada (los osteocelos o lagunas) que alberga al cuerpo celular y los conductos. Sus prolongaciones suministran un área de contacto muy grande entre células y la parte no celular del tejido óseo. Esta disposición permite que los osteocitos:

- ❖ participen en la regulación de la homeostasis del calcio en la sangre (calcemina).
- ❖ perciban la carga mecánica y señalicen esta información para otras células del hueso.

Los osteocitos sintetizan condroitín sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico; tienen un papel fundamental en la homeostasis fosfocálcica y en la transducción de señales biomecánicas para que inicien los procesos de recambio y remodelación ósea.(12,19)

Células de revestimiento óseo y osteocitos de superficie.

Se encuentran revistiendo las superficies internas y externas de los huesos. Son estimulados para eliminar la delgada capa no mineralizada de osteoide, de tal forma que se pueda llevar a cabo la remodelación ósea.(12)

Osteoblastos

Los osteoblastos son las células primarias responsables de la formación del hueso, sintetizan los componentes de la matriz extracelular (MEC) y controlan la mineralización de la matriz. Son células plenamente diferenciadas y carecen de capacidad para migrar y reproducirse. Por ende, para que pueda formarse hueso en un sitio dado, deben migrar hacia este sitio células progenitoras mesenquimales indiferenciadas (células osteoprogenitoras) para proliferar y convertirse en osteoblastos.(12)

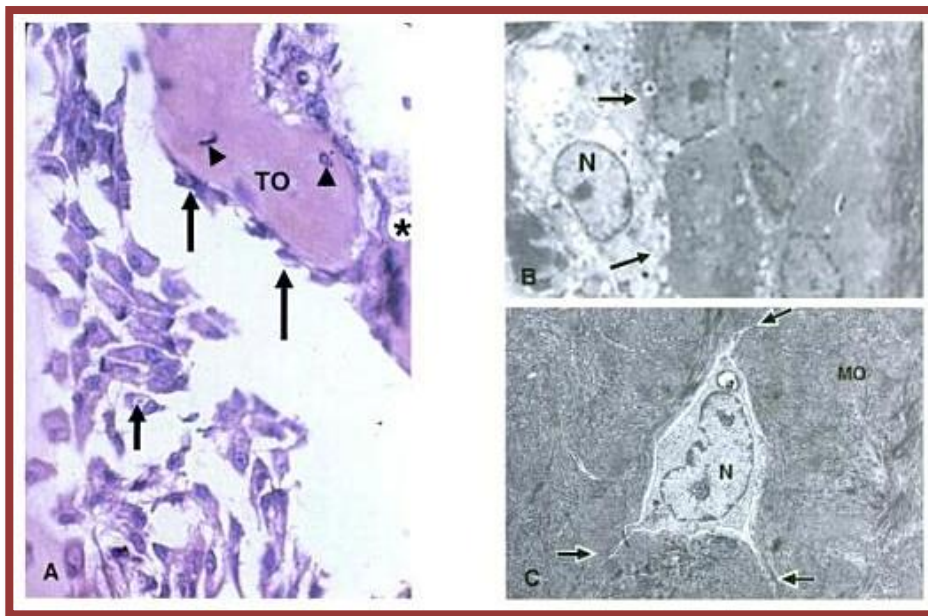


Figura 11 A.Zona de osteogénesis en la superficie de una trabécula ósea (TO) donde se ordenan los osteoblastos, sus vacuolas citoplasmáticas corresponden al voluminoso aparato de Golgi (flechas). En el interior de la trabécula se alojan osteocitos (cabeza de flecha). H&E 400x. B. Aspecto ultraestructural de osteoblastos. C. Un osteocito encerrado en la matriz ósea (MO); prolongaciones citoplasmáticas en los canaliculos óseos (flechas). Núcleo (N) . ME. 4.000x. (Lindhe, 2009)

Los osteoblastos son células poligonales que se agrupan en una capa de aspecto epitelioide sobre las trabéculas (ò espículas) óseas en formación (19) y finalmente se pueden transformar en dos tipos de células diferentes: células del revestimiento óseo y osteocitos. Las células de revestimiento óseo son células

alargadas que cubren una superficie de tejido óseo y no tienen actividad sintética. (12)

El citoplasma de los osteoblastos es intensamente basófilo por su abundante ergastoplasma. El aparato de Golgi, muy desarrollado es yuxtannuclear y aparece como una vacuola citoplasmática poco teñida, orientada hacia la trabécula. La ultraestructura del osteoblasto es característica de las células secretoras que sintetizan proteínas de exportación. Los osteoblastos poseen receptores para la parathormona (PTH) que los induce a liberar un factor estimulante de los osteoclastos, que los activa para que produzcan resorción ósea. Ante este estímulo, los osteoblastos a su vez activan las colagenasas, para despolimerizar la sustancia osteoide no calcificada. De esta manera favorece la resorción ósea, lo que permite que los osteoclastos vecinos accedan a la superficie ósea mineralizada. La vitamina D activada desempeña un papel importante en el metabolismo del tejido óseo. Los osteoblastos son las células que se activan ante el estímulo de parathormona (PTH), la vitamina D y los estrógenos, también por leptinas, para la síntesis de la matriz orgánica del hueso compuesto por colágeno (90%) GP y PG que en conjunto conforman el osteoide. Este posteriormente se mineralizara con la participación trascendente de las fosfatasas alcalinas, la formación de las vesículas de matriz o matriciales y la secreción de GP específica. Transcurridos dos o tres meses de su activación bio-sintética quedan incorporados a la matriz neoformada y pasan a denominarse osteocitos o bien persisten en su ubicación superficial pero en estado quiescente como células bordeantes del hueso. (19)

Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas que presentan un citoplasma acidófilo y vacuolado; poseen de 4 a 6 núcleos. Estas células se activan durante la remodelación normal del hueso y constituyen una fuente de calcio en circulación. (20)

Esta célula es eosinófila. La gran cantidad de lisosomas permite que sea observable con tinciones histoquímicas como la fosfatasa ácida.

El osteoclasto neoformado tiene que activarse para poder llevar a cabo la resorción ósea. Durante este proceso sufre una polarización muy bien definida. Cuando se encuentran activos muestran tres regiones especializadas:

- * Borde festoneado (borde desflechado): que es la porción de la célula en contacto directo con el hueso. Contiene muchos pliegues profundos de la membrana plasmática que forman estructuras del tipo de microvellosidades encargadas de aumentar la extensión de superficie de exocitosis de las enzimas hidrolíticas.
- * Zona clara (zona de sellado): delimita la superficie ósea en resorción. Es la zona donde se produce la resorción y degradación de la matriz.
- * Región basolateral: interviene en la exocitosis de material digerido. Las vesículas de transporte con material óseo degradado que sufrió endocitosis.(17)

Los osteoclastos poseen una bomba de protones (H – ATPasa) en la porción rugosa de la membrana plasmática que está en contacto con el hueso, esta región se llama borde rugoso. El osteoclasto se une al hueso formando una cavidad entre la superficie del hueso y la membrana celular. La bomba en el borde rugoso bombea protones hacia ese espacio, creando una solución ácida que disuelve la matriz mineral del hueso. (20)

Como consecuencia de su actividad, en el hueso situado exactamente por debajo del osteoclasto se forma una concavidad poco profunda llamada bahía

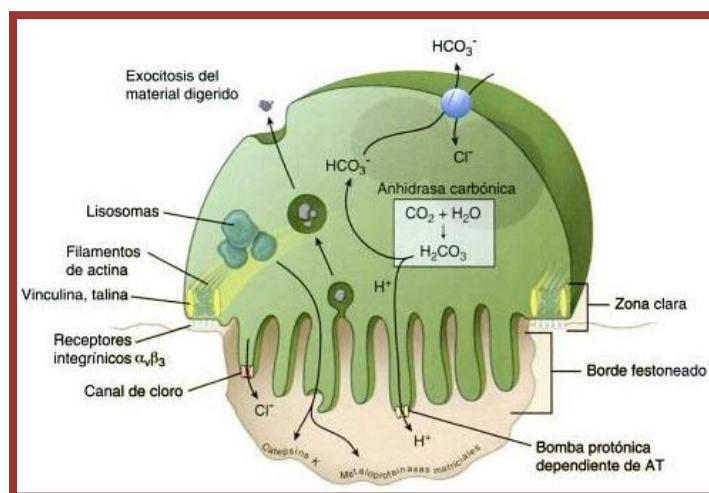


Figura 12. . Estructura esquemática del osteoclasto. (Ross and Pawlina, 2007)

o laguna de resorción (antes llamada laguna de Howship) que presentara un pH de 4 a 5. Este medio ácido es imprescindible para el funcionamiento adecuado de colagenasa ácida y otras hidrolasas.

4. Sustancia intercelular

Componentes moleculares de la sustancia intercelular		
GAG	Condroitin sulfato, heparán sulfato y ácido hialurónico	
PG	Biglucano PGI	Se incrementa en el proceso de síntesis y depósito de la matriz ósea en la proximidad de las células endoteliales
	Decorina PGII	Se observa aumentado en la proximidad de los tendones
GP	Osteopontina	Mediador de migración celular
	Osteonectina	Gran afinidad por el colágeno, inicia el crecimiento de los cristales.
	Sialoproteína ósea	Asociada con la osteopontina, participa en la mineralización
	Proteína morfogenética ósea (BMP)	Induce la proliferación celular
P-Gla	Osteocalcina, P-Gla ósea	Enlaza el calcio al colágeno, requiere de cofactores (vit. K, B y C)
	P-Gla de la matriz	Se asocia con la regulación de la homeostasis del calcio; su concentración se ve estimulada por la vitamina D al inicio de la mineralización.

Tabla 3. PG:proteoglucanos;GP: glucoproteínas; P-GI:proteínas con ácido gamacarboxiglutámico (17)

5. Modelado y remodelado óseo

La remodelación ósea es el proceso por el cual el hueso se recambia; se produce por la actividad de las células del hueso en la superficie ósea, principalmente en la superficie del endostio (que incluye todas las superficies trabeculares). Tradicionalmente se lo clasifica en dos tipos: remodelación Haversiana dentro del hueso cortical y la remodelación endóstica a lo largo de la superficie trabecular del hueso. Esta diferencia es más bien morfológica, ya que fisiológicamente los procesos celulares siguen exactamente la misma secuencia.

El tejido óseo osteonal se encarga de llevar a cabo el mantenimiento del hueso (10 % de su masa anualmente). En estos procesos participan todas las células óseas haciéndolo de forma coordinada, se distinguen de manera general dos grupos: los llamados unidades de remodelación ósea (URO) y la unidad multicelular básica (UBM). (12,17)

Una URO tiene dos componentes distintos: un cono de corte o cono perforante (también llamado conducto de resorción) que avanza y crea el túnel, y un cono de cierre que le sigue. El cono de corte presenta osteoclastos activos a los que les siguen un asa capilar y perocitos. También contiene muchas células en proceso de mitosis que dan origen a osteoblastos, perocitos adicionales y células endoteliales. Los osteoclastos perforan un conducto.

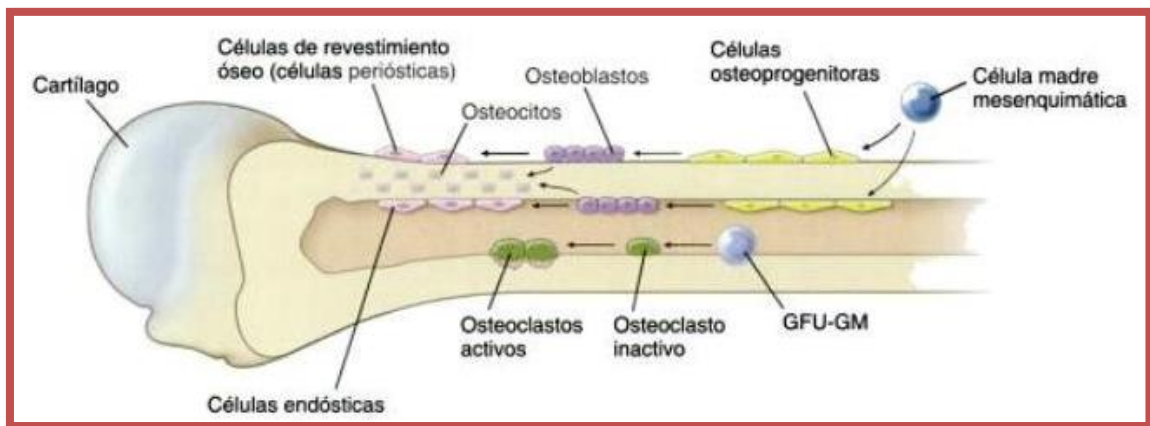


Figura 12. Células asociadas con el hueso. Todas las células, excepto los osteoclastos, tienen su origen en las células madre mesenquimales, las cuales se diferencian en células osteo-progenitoras, osteoblastos y por último, osteocitos y células de revestimiento óseo. Las células de revestimiento óseo se encuentran en la superficie externa ósea y forman parte del periostio, es por esto que se llaman periósticas. En cambio las células de revestimiento óseo en las superficies internas reciben el nombre de endósticas.. Las células osteoprogenitoras y de revestimiento óseo tienen un aspecto microscópico semejante, y suele ser difícil distinguir unas de otras. (Ross, 2007)

La formación de una osteona nueva en el hueso comprende al principio la creación de un túnel en la cavidad de resorción de unos 200micrómetros de diámetro, por actividad de los osteoclastos. Esta cavidad de resorción tendrá dimensiones de la osteona nueva. Cuando los osteoclastos han producido un túnel cilíndrico de tamaño adecuado por resorción del hueso, su luz es ocupada por vasos sanguíneos junto con si tejido conjuntivo circundante. Cuando el túnel ha sido ocupado comienza casi inmediatamente la nueva

formación ósea en su pared. Este conducto establece el diámetro del futuro sistema (osteónico) de Havers. Posterior a esto, los osteoblastos comienzan a sintetizar la matriz orgánica del hueso (osteóide) y a depositarla sobre las paredes del conducto en laminillas sucesivas. Con el tiempo la matriz ósea de cada una de las laminillas se mineraliza. Ya que las laminillas óseas sucesivas se depositan de la periferia al centro, el conducto se va estrechando hasta alcanzar finalmente el diámetro angosto del conducto de Havers maduro. (8,17). El ciclo completo de remodelación tarda alrededor de 3 meses en los seres humanos. (8)

ANTECEDENTES

En la investigación traslacional de la regeneración de defecto mandibular encontramos una variedad de modelos animales que se han empleado para investigar nuevos enfoques en la regeneración de defectos óseos.

El uso de un modelo animal preclínico es un paso imprescindible en el estudio de la regeneración del hueso. Proporciona información científica útil de la forma más eficiente y eficaz para el tratamiento de diferentes condiciones clínicas (21), además representa un elemento crucial en la Medicina Regenerativa (22)

Modelos grandes: ovejas

Las ovejas son un modelo animal grande que no implican problemas éticos complicados.(23) Para los estudios de defectos mandibulares un modelo de oveja es ventajoso ya que es un mamífero grande con un tamaño mandibular similar a la de los seres humanos, además que poseen una tasa similar la formación de hueso(24) .Sin embargo, a pesar de sus ventajas son rumiantes y poseen un patrón diferente de la masticación comparados con los seres humanos(25) Esto influye en el cuidado postoperatorio óptimo, ya que es importante que la dieta de las ovejas no permanezca suave para un período largo de tiempo.(26)

Modelos grandes: perros

Los modelos caninos se han utilizado para evaluar la cicatrización del hueso mandibular en múltiples modelos de defectos. Sin embargo suelen ser defectos realmente grandes o segmentarios. No se ha realizado un consenso sobre el tamaño del defecto mandibular-crítico para el modelo, ya que hay una variación inter-raza en la cicatrización ósea. Esto hace difícil la reproductibilidad debido a la naturaleza heterogénea de la cría mestizo (22).El modelo canino ofrece ventajas para la investigación in vivo de defectos mandibulares, pero conlleva

inconvenientes como la baja tasa de falta de unión y una mayor tasa de fusión ósea sólida en comparación con los seres humanos.(23) .Además, el uso de modelos caninos está cargado de problemas éticos, dada la naturaleza de su alta consideración social y la dificultad en el manejo.

Modelos medianos: conejos

El modelo de conejo tiene un perfil similar al modelo de roedor al ser relativamente barato, y poseer una remodelación ósea relativamente rápida(21,26).Son útiles para el estudio inicial de la remodelación ósea en el hueso mandibular(27). Desafortunadamente, poseen médula grasa que es claramente diferente en propiedades físicas a la medula ósea humana haciendo la evaluación de la cicatrización ósea difícil de extrapolar.(22)

Modelos pequeños: ratas y ratones

Las ventajas que presentan los modelos pequeños son variadas: son relativamente costeables en lo que se refiere a mantenimiento y poseen tasas de recambio celular rápido.(28,26). Además de esto, los animales pequeños tienen ciclos reproductivos realmente cortos comparados con modelos animales grandes, permitiendo así grupos más numerosos de estudio.(26,29)

Estudio	Especie Número de modelos	Tamaño del defecto y característi cas	Tiempos de estudio	Tratamiento	Resultado
Nolff. M.C. et.al 2009	*Ovejas alemanas cabeza negra -12	Resección segmentari a del hemi derecha mandíbula	12 semanas: 12 ovejas	cilindros de fosfato (β -TCPB) perfundidos con β - tricálcico adicionalmen te cargado con el hueso esponjoso y la médula ósea (β -TCPB / BM / CB)	Injertos compuestos de médula ósea y hueso esponjoso (beta-TCPB / BM / CB) exhibieron formación de hueso significativament e mayor

Forriol. F. et. Al 2009	*Ovejas -15	Defecto de 6mm en mandíbula derecha. Corte de bloque completo	2 meses : 15 ovejas	Plasma rico en plaquetas (PRP) Proteína morfogénica a ósea rhOP- 1 (rh BMP-7) y aloinjerto congelado de costilla	La aplicación simultánea de aloinjerto congelado de costilla y proteína morfogénica ósea rhOP-1 (rh BMP-7) demostró formación ósea superior.
De Santis. E. Et.al. 2014	*Perro labrador -6	Extracción dental y formación de defecto en caja	6 meses: 6 perros	Autoinjerto y andamio Bio- Oss " Block	Auto injerto completamente osteointegrado. Bloques de DBBM se encuentra separado del hueso por tejido conectivo fibroso
Chiu H-C. Et. Al. 2013	*Perro Beagle -11 hembras	Defecto supra alveolar mandibular de 4-5 mm de profundidad	8 semanas: 11 perros	BMP-6 polipéptido sintético con colágeno esponjoso absorbible	BMP-6 estimulo formación de hueso nuevo así como ligamento periodontal funcional
Joong- Hyun Kim. Et. Al. 2013.	* Conejo New Zeland -5 machos	Resección de 1.5 cm de longitud y 0.7 cm de altura desde el bode inf. de la mandíbula	4 semanas : 5 conejos	hBMSCs bajo estimulación eléctrica con rhBMP-2	Mejor formación ósea se presenta con la inoculación directa de rhBMP-2 después de estimulación eléctrica
Gu Cheng. Et. Al. 2014	*Conejo -72	Defecto bicortical que incluye extracción de primer premolar mandibular.	-4 semanas y 12 semanas: 72 conejos	Implante de andamio de β - TCP/CS CON o sin BMSCs	Grupo tratado con andamio β - TCP/CS y BMSCs muestran mayor formación ósea y resistencia a la compresión.
Len Chin. Et.al. 2013	* Ratas -40 Espontaneame	Un círculo de 5mm de diámetro perforando el hueso de	Día 2: 5 Día 3: 5 Día 5 :5 Día 10: 5	ninguno	Defectos de 5mm de diámetro y 2mm de diámetro presentan

	n te diabéticas -40 Kioto	bucal a lingual del lado izquierdo. Defect 2 mm de diámetro de lado derecho	Día 15:5 Día 30: 5 Día 60: 5 Día 90: 5		cicatrización similar en ambos grupos. Ninguno de los defectos cierra completamente al día 90
Streckbein, P. Et. Al 2013	*Ratas -30 machos athymicos	Un circulo de 5mm de diámetro perforando el hueso de bucal a lingual del lado izquierdo y derecho.	8 semanas: 30 ratas	Células troncales de tejido adiposo humano (ADSC) y auto injerto óseo recolocando el hueso cortado del defecto	Tratamiento con ADSC muestra osificación mejor a grupo de auto injerto.
Requicha Joao F. Et. Al 2014	*Rata Wistar -12 machos	Defecto bicortical en la rama de 5mm diámetro	8 semanas: 12 ratas	Andamio osteoinductivo o de SPCL, (polymerization of e-caprolactone)	SPCL estimula la formación de hueso y andamio presenta infiltrado celular
Tabla 4. Tabla comparativa de experimentos representativos de defectos óseos críticos realizados "in vivo" en hueso mandibular.					

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la respuesta de reparación-regeneración ósea de un modelo traslacional de defecto óseo crítico en la cortical mandibular de rata a los tiempos de estudio de 7, 14, 30 y 60 días.

Objetivos particulares:

- * Evaluar clínicamente la viabilidad del modelo.
- * Evaluar radiográficamente el área del defecto.
- * Evaluar histológicamente la reparación-regeneración presente en el defecto a los diferentes tiempos de estudio.
- * Analizar y comparar, los datos clínicos, radiográficos e histológicos para así ,validar la utilidad del modelo propuesto en futuras investigaciones.

MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

Animales y procedimientos experimentales

Se requirieron 20 ratas de la cepa Wistar, machos, adultos, de un peso que oscilo entre los 200-250gr, su manipulación y cuidado se apegó a la “**NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio**”, durante el periodo de experimentación se mantuvieron en el Bioterio de la FES Iztacala con una temperatura de entre 21° - 27°, una humedad relativa de 45 – 55% en un fotoperiodo de 12/12 horas con acceso *ad libitum* al agua y alimento. Para el procedimiento quirúrgico fueron anestesiados con un coctel de Clorhidrato de Ketamina (60mg/kg) y Xilazina (7mg/kg), mediante una inyección intramuscular. Utilizando la siguiente tabla de dosificación:

Relación de dosificación	
Dosis de Clorhidrato de Ketamina	
60ml-----1000ml “X”-----peso del animal	→ 100ml-----1ml Resultado----“X” ml
Dosis de Xilazina	
7ml-----1000ml “X”-----peso del animal	→ 20ml-----1ml resultado----“X” ml

Tabla 5. Tabla utilizada para el cálculo de la dosificación del analgésico y el sedante.

Para la protección personal se utilizó:

Material	Uso
Bata de laboratorio	Protege de contaminación desde y hacia la ropa.
Calzado	Cerrado y anti-derrapante. Protegiendo de impactos y salpicaduras
Gafas de seguridad	Protección ocular contra salpicaduras
Cubrebocas y mascarillas	Protección de contaminación al hablar. Protección a aerosoles.
Guantes desechables de látex	Protección ante agentes irritantes cutáneos. Protección para manipulación de modelos animales.
Guantes desechables estériles	Durante intervención quirúrgica.

Tabla 6. Material de seguridad utilizado durante la manipulación de los especímenes.

Y el material utilizado se detalla en la tabla 7. Se realizó un lavado previo de la superficie donde se llevó a cabo el procedimiento quirúrgico, con agua, jabón y solución desinfectante. Se cubrió el área con una cama de papel periódico y

cinta canela, y sobre éste se colocó un campo de tela de 60x30 estéril. Se colocó el instrumental de disección y sutura previamente esterilizado sobre otro campo estéril. En cuando al micromotor y en otro campo el micromotor, este fue cubierto también con paños estériles. Y la jeringa de 20ml para la humectación ocular con solución fisiológica de los modelos se mantuvo fuera de los campos.

A continuación, se pesó a los especímenes. Siguiendo la tabla de dosificación se preparó la jeringa con el coctel anestésico. Después de que el anestésico hizo efecto, se depiló la zona inframentoniana y yugal de los especímenes. Tomamos al animal por la cola en la zona más proximal al cuerpo y se colocó sobre el campo estéril previamente mencionado. Se inmovilizó boca arriba, las 4 patas fueron fijadas a la tabla con masking tape. Se cubrió con un campo estéril hendido (los campos empleados contenían un código de colores según el tiempo experimental, se explica más a detalle en el anexo 5) como lo muestra la figura número 13.

Material	Uso
Papel Periódico	Aísla la superficie del campo estéril
Cinta Canela	Fijación de papel periódico a superficie
Lámpara	Iluminación de campo quirúrgico
Campos quirúrgicos estériles	Colocación de instrumental estéril
Campos quirúrgicos hendidos estériles	Mantener el campo quirúrgico aislado y delimitado
Gasas	Limpieza de la herida durante intervención
Alcohol	Limpieza de zona de punción
Isodyne o antiséptico de elección	Para la zona donde se incide con bisturí
Soporte de trabajo para modelo	Superficie donde se inmoviliza modelo
Masking tape	Inmovilizar extremidades de modelo
Jeringas de tuberculina 1 ml	Administración de coctel Ketamina+Xilazina
Ketamina 1000mg/10ml (anesket) y Xilazina 20mg/1ml (procin)	Anestésico y sedante
2 Campos de 60x30 cm	Para manipulación de modelo durante la administración del coctel
Rastrillo o crema para depilar	Depilación de la zona a incidir
Instrumental quirúrgico de disección y sutura estéril.	Acto quirúrgico
Hoja de bisturí	Herida quirúrgica
Micromotor Strong 210. De la marca	Realizar defecto por medio de movimiento

Saeshin.	rotatorio
Fresa de bola de tamaño ½ y 1	Punta activa
Adaptadores para pieza de baja velocidad	Adaptar la punta activa al motor rotatorio
Cloruro de sodio (solución inyectable)	Solución para irrigación
Jeringa de 20 ml con aguja	Utilizado para solución de irrigación
Nylon 3-4 ceros Vicryl 4-3 ceros	Sutura de herida quirúrgica por planos
Cobija para rata 60x60cm	Para colocación de modelo posterior al acto quirúrgico para evitar hipotermia
Cámara fotográfica	Record de información de procedimientos realizados

Tabla 7. Material empleado durante acto quirúrgico



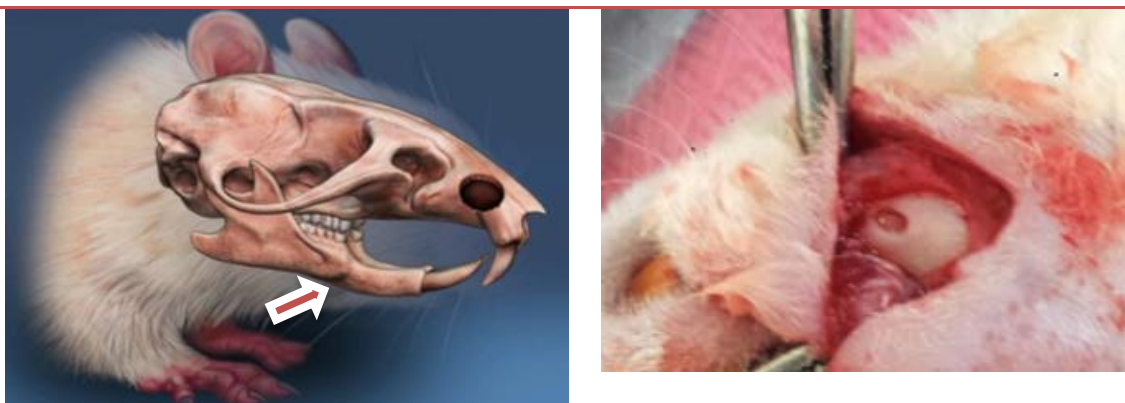
Figura 13. Campo quirúrgico al momento de la intervención, modelo sedado, depilado y zona de herida desinfectada.

Diseño quirúrgico

Limpiamos la zona a incidir con el antiséptico. Todas las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas por el mismo cirujano.

Se realizó una incisión justo por delante de la línea muscular del musculo esternocleidomastoideo, siguiendo los principios de la Cirugía: tan grande como sea necesario y tan pequeña como sea posible, es decir de 1 a 2 centímetros de longitud; nítida y de una sola intención que solo involucre la dermis; y de arriba hacia abajo. Se utilizaron pinzas mosco para realizar la

disección roma y poco a poco se descubrió el hueso mandibular. El defecto óseo se realizó con una fresa de bola de $\frac{1}{2}$ e irrigación constante (para evitar necrosar el hueso) a una velocidad menor a 1000 revoluciones por minuto (rpm), el defecto se midió con el apoyo de una sonda periodontal universal milimetrada a un tamaño de 3 milímetros de largo siguiendo el cuerpo de la mandíbula, por debajo de la línea oblicua externa, con un milímetro de ancho y un milímetro de profundidad. Como se puede observar en la figura 14.



Modificada para su uso. (Raposo-Amaral et al., 2014)

Defecto realizado en el cuerpo de la mandibular, por arriba del borde y delante de la inserción del musculo masetero.

Figura 14. Lado izquierdo muestra el lado y la zona del defecto marcado con una flecha. Lado derecho. Fotografía de defecto realizado justo por debajo de la línea oblicua externa.

Posterior a esto, se afrontaron los tejidos realizando suturas por planos utilizando la técnica de puntos separados para evitar en la medida de lo posible la dehiscencia en la herida.

Se intervinieron 4 ratas por sesión y se asignaron aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales: 7 días, 15 días, , 30 días y 60 días.

Parámetros de evaluación

1. Evaluación clínica

Posterior a la intervención quirúrgica experimental se evaluó la mortalidad, morbilidad y presencia de infección; así como la capacidad para alimentarse. Transcurridos los tiempos experimentales se realizó el sacrificio de los modelos por sobreexposición a CO₂. Se tomaron fotos inmediatas *post mortem* para la evaluación de la inflamación de la zona de intervención quirúrgica, así como la cicatrización cutánea en el área.

Para evaluar el grado de inflamación revisamos los signos:

Calor, rubor, tumefacción y pérdida de la función de la siguiente manera:

- *Inflamación severa*: presencia de calor o elevación de la temperatura corporal. Rubor: el grado mayor de enrojecimiento en el área de la herida con los bordes de la misma en una gama del rojo al magenta; así como, pérdida de la función es decir, que el espécimen no pudiese masticar o mover la mandíbula
- *Inflamación moderada*: presencia de calor pero solo en el área de la herida. Rubor: presencia de enrojecimiento leve en el área de la herida y presencia de tumefacción que aumentara el volumen del tejido y que a la digito presión el tejido se presentaba sésil.
- *Inflamación leve*: presencia de tumefacción ligera que aumentara levemente el volumen sin ser sésil.
- *No presentó inflamación*: en todos aquellos especímenes en los cuales la herida se encontrara intacta, sin aumento de volumen ni enrojecimiento y que mantenía sus funciones normales de masticación y movimiento mandibular.

Número de rata	Grado de inflamación			
	Inflamación severa	Inflamación moderada	Inflamación leve	No presenta inflamación
Tabla 8. Tabla utilizada para la evaluación del grado de inflamación.				

En cuanto a la evaluación de la cicatrización del tejido se realizó de la siguiente manera: inspección y observación. Y evaluamos el porcentaje de reepitelización y cierre de la herida tomando en cuenta si esta estaba cerrada en un 1 al 50% se denominó “Menos del 50% de cicatrización”; cuando la herida se encontró cerrada entre un 51 y 90% se denominó “Entre el 50% y el 90%”; por último, cuando encontramos cierre de la herida en más del 91% se denominó “Totalmente cicatrizado”

Número de rata	Cicatrización extraoral		
	Menos del 50% de cicatrización	Entre el 50% y el 90%	Totalmente cicatrizado
Tabla 9. Tabla utilizada para evaluación del grado de cicatrización			

Justo después de la disección y toma del hueso mandibular se realizó la medición del defecto óseo presente con ayuda de una sonda periodontal donde se evaluó: de 2 a 3 milímetros cuando el defecto se encontraba casi intacto y al ser medido mantenía su longitud inicial; de 1 a 2 milímetros cuando ya no mantenía la forma inicial y su longitud había disminuido y por último de 1 a 0 cuando el defecto ya se encontraba tan pequeño que ya no era posible medirlo.

Número de rata	Longitud de defecto		
	De 2 a 3mm	De 1 a 2 mm	De 1mm a 0
Tabla 10. Tabla utilizada para evaluación de la longitud del defecto			

2. Evaluación radiográfica

Se obtuvieron ambas hemi- mandíbulas y se colocaron en paraformaldehído al 4%. Se tomaron 2 radiografías por muestra en relación 1:1 y con angulación a 45 grados a la zona de la lesión experimental. Con el aparato CCX digital de la marca Trophy, con una dosis de radiación de 2.10 milisievert (mSv) en .2 t/s., en una película periapical “Dental Intraoral E-Speed Film” de la marca Kodak.

Los parámetros que asignamos fueron en un puntaje del 0 al 4: 0 cuando no hubo evidencia de formación ósea; 1 cuando la formación ósea ocupó desde el 1 al 25% del defecto; 2 cuando la formación ósea ocupó desde el 26 al 50%; 3 cuando la formación ósea ocupó desde el 51 al 75% del defecto: 4 cuando la formación ósea ocupó desde el 76 al 100% del defecto. Estos parámetros se reflejan en el tabla

Hallazgos radiográficos	Puntaje
Remodelado	
No hay evidencia de formación ósea	0
Formación ósea ocupando un 25% del defecto	1
Formación ósea ocupando un 50% del defecto	2
Formación ósea ocupando un 75% del defecto	3
Formación ósea ocupando un 100% del defecto	4
Puntaje máximo total	
Remodelado óseo	4
Puntaje máximo	4

Tabla 11. Tabla utilizada para la evaluación radiográfica.

3. Evaluación histopatológica

Inmediatamente posterior a la evaluación radiológica se comenzó la descalcificación de las muestras en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de la marca J.T. Baker al 7% cuya preparación se presenta en los anexos. Las muestras se mantienen durante una semana en agitación, para el procedimiento histológico estándar. Se realizaron cortes histológicos seriados de 7 micrómetros de grosor con el micrótomo Leica RM2125 RTS. Se realizó la tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E), protocolo que se encuentra descrito en el anexo. Las secciones fueron evaluadas y el puntaje se realizó en base al sistema de Heiple`s, con modificaciones para fines de esta investigación.

Se utilizó microscopio óptico "MOTIC BA310" con el programa "IMAGES MOTIC 2.0". Se utilizaron los aumentos 4x y 10x para la toma de fotografías panorámicas y en la zona del defecto, 40x para conteo celular que se realizó manualmente.

Se eligieron 15 campos por muestra utilizando un aumento de 40X, de manera aleatoria siempre tocando el borde del defecto óseo. El estudio histológico se enfocó al hueso cortical presente justo por debajo de la línea oblicua externa del hueso mandibular, debido a que los tiempos experimentales son muy amplios y los modelos crecen rápidamente no se pueden utilizar otras estructuras como guía. Se contó el número de células totales en un campo y posterior a esto se volvieron a contar las células que tuviesen características microscópicas de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. También se realizó el conteo de las lagunas vacías.

Tabla x. Hallazgos histopatológicos para cicatrización en defecto óseo.

Hallazgo histopatológico	Calificación
Hueso trabecular	
No hay actividad celular ósea	0
Aposición temprana de neo formación ósea	1
Aposición activa de hueso neo formado	2
Reorganización de hueso trabecular	3

Completa reorganización de hueso trabecular	4
Hueso cortical	
Inexistente	0
Presencia temprana	1
Formación encaminada	2
Casi completamente reorganizada	3
Completamente formada	4
Puntaje máximo por categoría	
Hueso Cortical	4
Hueso trabecular	4
Puntaje máximo total por modelo	8
Tabla 12. Tabla de hallazgos histopatológicos en cuanto a la formación visual de hueso trabecular y cortical evaluada por puntaje	

4. Resultados estadísticos

Los resultados histológicos fueron registrados en en una hoja de Excel y transferidos a la hoja de cálculo estadístico Prisma Graph para un análisis de varianza con la prueba de "ANOVA con Bonferroni".

RESULTADOS

Resultados clínicos

De los 20 sujetos experimentales intervenidos, ninguno murió durante o después de la intervención quirúrgica. Por lo que el porcentaje de mortalidad fue 0%.

Dos de los 20 sujetos experimentales presentaron procesos infecciosos que incluían tejidos blandos y duros por lo que el porcentaje de morbilidad fue del 10%. Los modelos infectados se encuentran representados en los cuadros que muestran “inflamación” y “cicatrización” con una diagonal “/”, los modelos infectados no fueron considerados ni evaluados en otro rubro.

En lo que respecta al tiempo en que se alimentaron después de ser intervenidos quirúrgicamente el promedio fue de 5 horas.

Inflamación presente en zona de intervención quirúrgica:

Grupo 7 días:

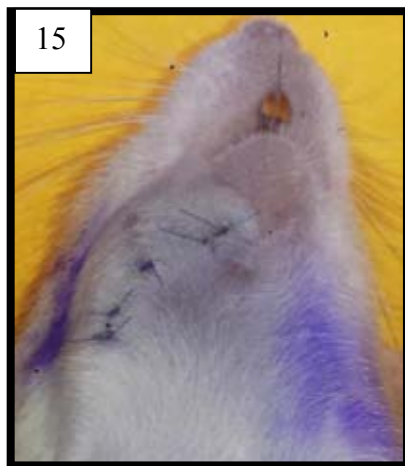


Figura 15 Imagen representativa del grupo 7 días. Se puede observar el edema así como los puntos de sutura, la cicatrización de los tejidos se encuentra en un 90%.

Número de rata	Grado de inflamación			
	Inflamación severa	Inflamación moderada	Inflamación leve	No presenta inflamación
1			*	
2			*	
3		*		
4	/	/	/	/
5		*		

Número de rata	Cicatrización extraoral		
	Menos del 50% de cicatrización	Entre el 50% y el 90%	Totalmente cicatrizado
1		*	
2			*
3		*	
4	/	/	/
5			*

En el grupo 7 días es evidente la presencia de inflamación leve y moderada en la zona de intervención quirúrgica. Donde solo uno de los especímenes

presento inflamación moderada y tres más inflamación leve. En cuanto a la cicatrización la mitad de los especímenes presento cicatrización en las del 50% mientras que la otra mitad estaba completamente cicatrizada.

Grupo 14 días:

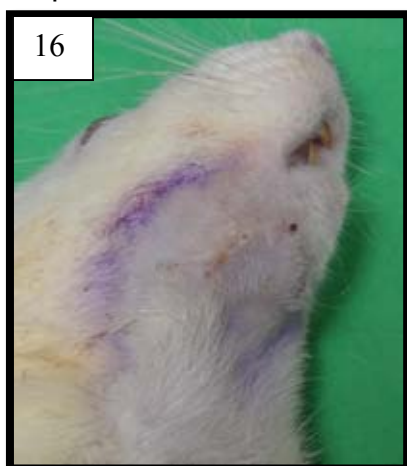


Figura 16 Imagen representativa del grupo 14 días. Se puede observar el edema así como los puntos de sutura, la cicatrización de los tejidos se encuentra en un 90%.

Número de rata	Grado de inflamación			
	Inflamación severa	Inflamación moderada	Inflamación leve	No presenta inflamación
1			*	
2		*		
3	/	/	/	/
4			*	
5		*		

Número de rata	Cicatrización extraoral		
	Menos del 50% de cicatrización	Entre el 50% y el 90%	Totalmente cicatrizado
1			*
2		*	
3			*
4	/	/	/
5			*

En el grupo 14 días, podemos ver que solo un modelo presento inflamación leve en la zona de la intervención y periférica a esta, mientras que los otros 3 modelos ya no la presentaron. En comparación con el grupo de 7 días la inflamación disminuyó.

Grupo 30 días:

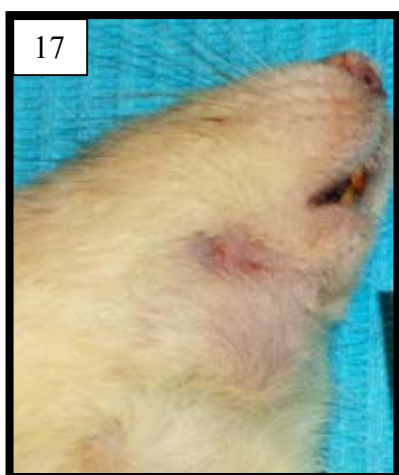


Figura 17 Imagen representativa del grupo 30 días. Se puede observar el edema así como los puntos de sutura, la cicatrización de los tejidos se encuentra en un 90%.

Número de rata	Grado de inflamación			
	Inflamación severa	Inflamación moderada	Inflamación leve	No presenta inflamación
1				*
2				*
3			*	
4			*	
5				*

Número de rata	Cicatrización extraoral		
	Menos del 50% de cicatrización	Entre el 50% y el 90%	Totalmente cicatrizado
1		*	
2		*	
3			*
4			*
5			*

Se observó que 2 de los 5 especímenes presentaron tumefacción ligera que aumentaba levemente el volumen de los tejidos sin llegar a ser sésil; mientras que los otros 3 no presentaron signos de inflamación, así en comparación con los 2 grupos anteriores de 7 y 15 días, la inflamación casi desapareció.

Grupo 60 días:



Figura 18 Imagen representativa del grupo 7 días. Se puede observar el edema así como los puntos de sutura, la cicatrización de los tejidos se encuentra en un 90%.

Número de rata	Grado de inflamación			
	Inflamación severa	Inflamación moderada	Inflamación leve	No presenta inflamación
1				*
2				*
3				*
4				*
5				*

Número de rata	Cicatrización extraoral		
	Menos del 50% de cicatrización	Entre el 50% y el 90%	Totalmente cicatrizado
1			*
2			*
3			*
4			*
5			*

A los 60 días los especímenes en su totalidad presentaron cierre de la herida con reepitelización completa de la epidermis así como crecimiento de pelo en la zona periférica que hacía apenas perceptible que ahí hubo una herida.

Porcentaje de defecto mandibular observado clínicamente

Grupo 7 días:

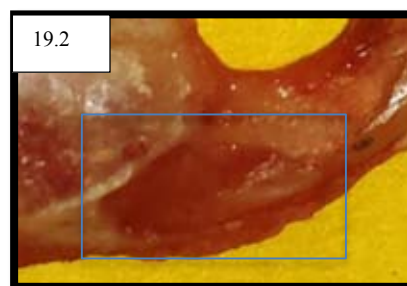
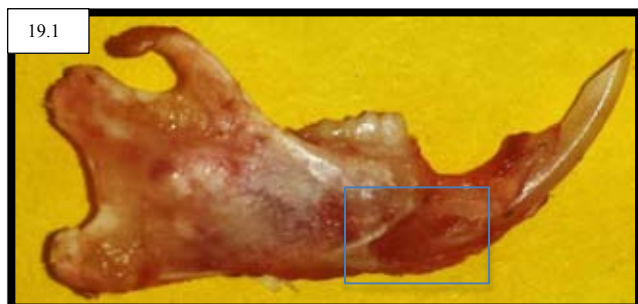


Figura 19.1 y 19.2. Figuras 19.1 y 19.2 del grupo 7 días. En la figura 19.1 se observa la mandíbula en una vista sagital donde ya se ha descubierto la zona del defecto óseo y se puede observar la regeneración pobre existente a los 7 días. En la figura 19.2 se observa a mayor aumento la profundidad y el tamaño del defecto que se encuentra justo por debajo de la línea oblicua mandibular.

Número de rata	Longitud de defecto		
	De 2 a 3mm	De 1 a 2 mm	De 1mm a menos
1	*		
2	*		
3	*		
4	/	/	/
5	*		

En el grupo 7 días logramos observar en la mandíbula *postmortem* que en todos los especímenes, la regeneración ósea fue realmente pobre ya que el defecto se encontró como un hueco rojizo que mantiene las dimensiones y la forma como cuando se realizó el acto quirúrgico; hecho que se refleja en el cuadro de continuidad ósea.

Grupo 14 días:

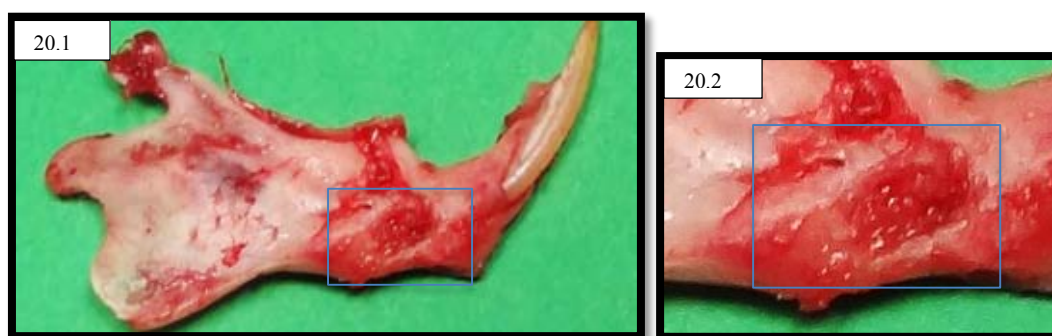


Figura.20.1 y 20.2. Figuras 20.1 y 20.2 del grupo 14 días. En la figura 20.1 se observa la mandíbula donde ya se ha descubierto la zona del defecto óseo y se puede observar el defecto óseo mandibular aun delimitado con tejido de apariencia granular en el interior. En la figura 20.2 se observa a mayor aumento la profundidad y el tamaño del defecto que se encuentra justo por debajo de la línea oblicua mandibular.

Número de rata	Longitud de defecto		
	De 2 a 3mm	De 1 a 2 mm	De 1mm a menos
1	*		
2	*		
3	*		
4	/		
5	*		

En la evaluación *postmortem* mandibular a 14 días se observó el defecto óseo aun delimitado como en el acto quirúrgico con la única diferencia con respecto al grupo anterior de que había la presencia de un tejido de apariencia granular en el interior del mismo que probablemente era tejido conectivo de

cicatrización. En el cuadro se refleja que el defecto mantenía las dimensiones de 2 a 3 mm de longitud.

Grupo 30 días:

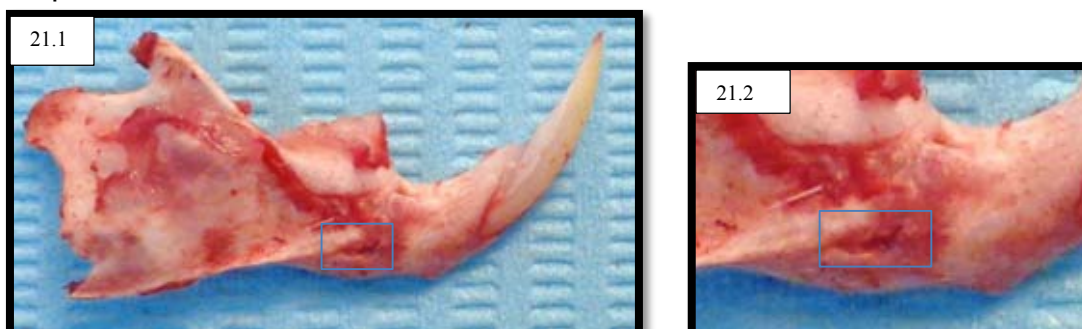


Figura.21.1 y 21.2. Figuras 21.1 y 21.2 del grupo 30 días. En la figura 21.1 se observa la mandíbula en una vista sagital donde ya se ha descubierto la zona del defecto óseo y se puede observar la regeneración que se encuentra ya en un porcentaje aproximado del 80%. En la figura 21.2 se observa a mayor aumento la profundidad y el tamaño del defecto que se encuentra aún visible clínicamente justo por debajo de la línea oblicua mandibular.

Número de rata	Longitud de defecto		
	De 2 a 3mm	De 1 a 2 mm	De 1mm a menos
1	*		
2	*		
3		*	
4		*	
5			*

A la observación post mortem de la mandíbula del grupo 30 días observamos que por debajo de la línea sagital 2 de los defectos presentaban aún las características quirúrgicas como cuando se realizó el defecto, es decir, 2 o 3 milímetros de longitud y con tejido de apariencia granular como relleno. Otros 2 de los 5 especímenes presentaban una longitud del defecto disminuida a 1 y 2 mm donde los bordes del mismo ya no se presentaban nítidos pues estaban cubiertos por tejido aparentemente conectivo. Solo uno de los especímenes presentó el defecto de relleno casi en su totalidad.

Grupo 60 días:

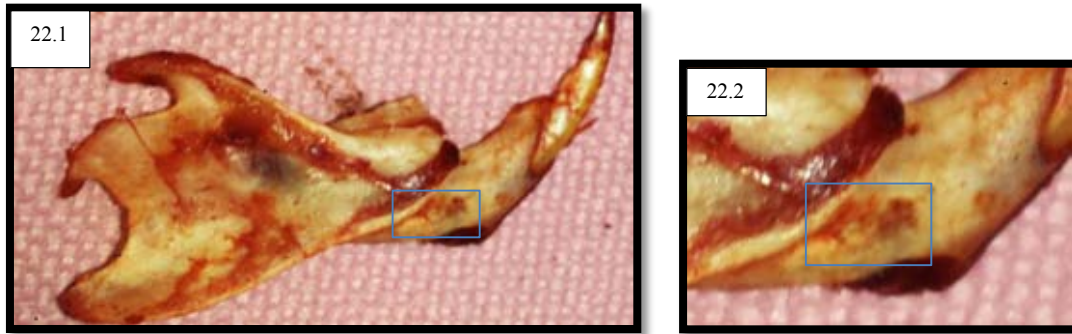


Figura.22.1.y 22.2. Figuras 22.1 y 22.2 del grupo 60 días. En la figura 22.1 se observa la mandíbula en una vista sagital donde ya se ha descubierto la zona del defecto óseo y se puede observar la regeneración completa del defecto, ya solo se puede observar una zona de ligera depresión ósea comparada con la periferia así como una diferencia de coloración que tiende al púrpura en el tejido presente en la zona del defecto. En la figura 22.2 se observa a mayor aumento la depresión ósea.

Número de rata	Longitud de defecto		
	De 2 a 3mm	De 1 a 2 mm	De 1mm a menos
1		*	
2			*
3			*
4			*
5			*
6			*

En la revisión *postmortem* del hueso mandibular observamos el relleno casi total del defecto que solo dejaba menos de un milímetro al descubierto, área que se observaba como una ligera depresión con un cambio de coloración que tendía al color púrpura en 4 de los 5 especímenes. En el espécimen restante el defecto estaba relleno solo en un aproximado del 50% con un tejido que presentaba coloración rojiza.

Resultados Radiográficos

Grupo 7 días

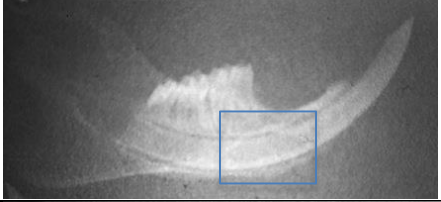
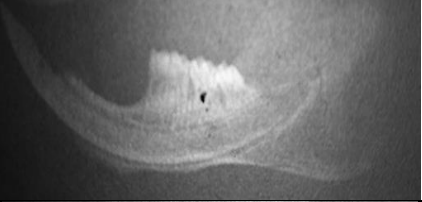
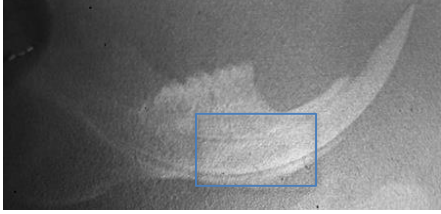
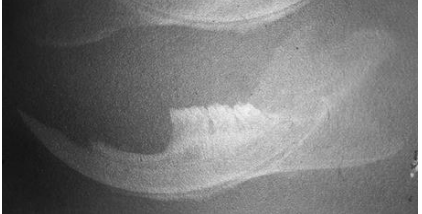
EXPERIMENTAL		CONTROL	
			
			

Tabla 13. Relación de radiografías tomadas con relación 1:1 experimentales y controles. Del grupo 7 días. Podemos notar el defecto óseo perfectamente delimitado justo por debajo de la línea oblicua que se observa como una línea radioopaca que va del borde basal mandibular y llega justo por debajo de las raíces de los molares inferiores. La zona del defecto se encuentra delimitada en un rectángulo azul.

En este grupo pudimos notar que se observa claramente delimitada la zona del defecto, que se observa radiolúcida con respecto al control donde toda el área del hueso mandibular se encuentra radioopaca, nítida y con bordes continuos. cabe mencionar que en este grupo hay mucha homogeneidad entre las imágenes obtenidas. Este grupo promedio una puntuación de "0".

Grupo 15 días


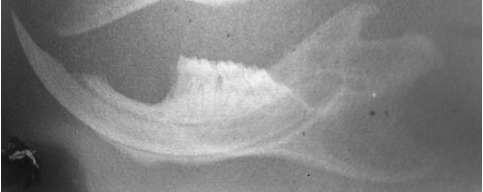
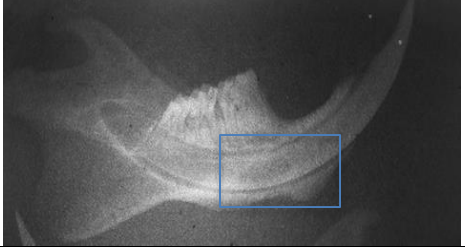



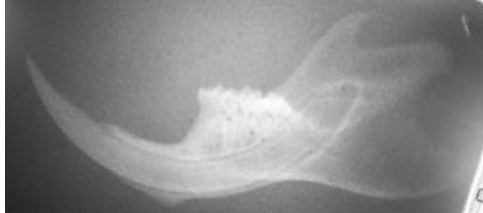
EXPERIMENTAL		CONTROL	
			
			

Tabla 14 Relación de radiografías tomadas con relación 30° y 1:1 del grupo 15 días- La zona del defecto se encuentra delimitada en un rectángulo azul.

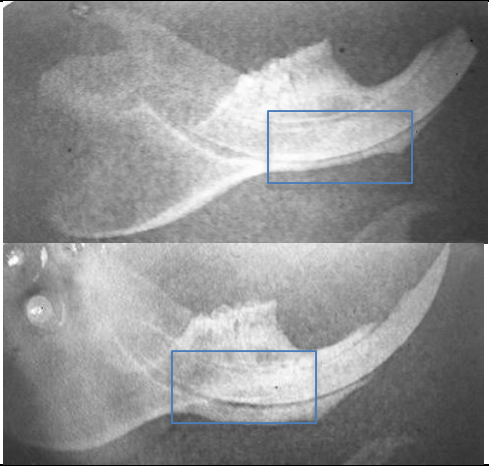
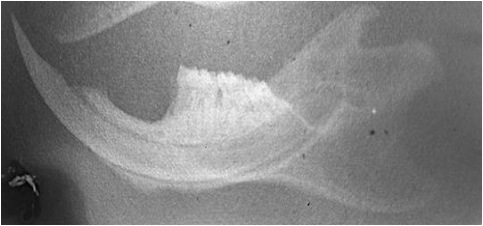
En este grupo aunque hay una regeneración ósea, ya que el defecto se ve disminuido en su tamaño (la sombra radioopaca es más pequeña) aún podemos observar claramente la zona donde se realizó el defecto y comparada con el control es una zona que se observa más radioopaca. Este grupo promedio una puntuación de “1”.

Grupo 30 días

EXPERIMENTAL	CONTROL
	
	
<p>Tabla 15 Relación de radiografías tomadas con relación 1:1 experimentales y controles del grupo 30 días. La zona del defecto se encuentra delimitada en un rectángulo azul.</p>	

La zona del defecto presente en este grupo es poco evidente y solo el ojo experto puede determinar que aun existe un halo radioopaco en la zona a evaluar. Comparado con el grupo 15 días, la evidencia es que hay mayor regeneración ósea pero esta aún no se ha completado. Este grupo tuvo un puntaje promedio de “2”

Grupo 60 días

EXPERIMENTAL	CONTROL
	
<p>Tabla 16. Relación de radiografías tomadas con relacion 1:1 experimentales y controles del grupo 60 días. La zona del defecto se encuentra delimitada en un rectángulo azul.</p>	

Este grupo presenta características homogéneas de regeneración. Las diferencias entre el grupo experimental y el control en la radiografía son apenas perceptibles. Lo que nos indica el cierre del defecto. Este grupo promedio una puntuación de "3.6".

Resultados Histológicos

Grupo 7 días:

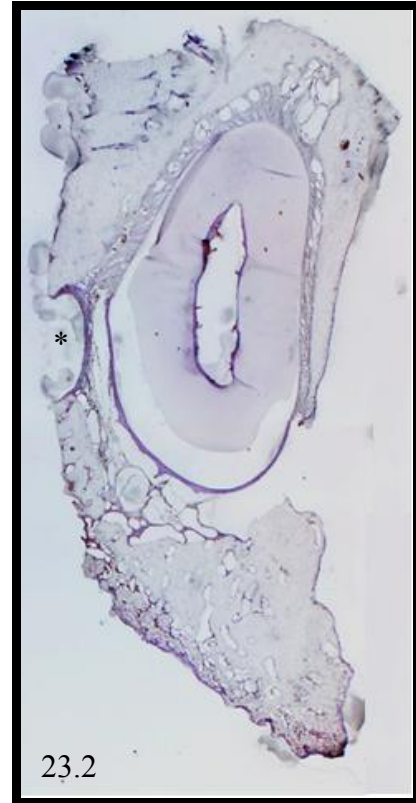
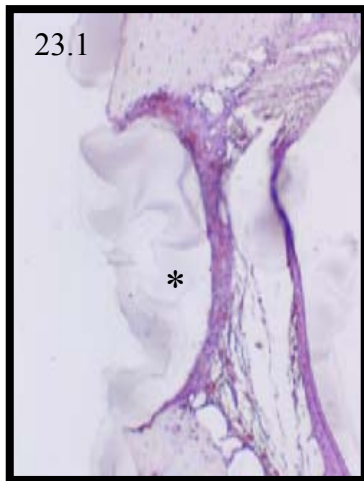


Figura 23.1 y 23. 2. Imágenes de corte histológico frontal de 7 días teñido con H&E. Figura 23.1: imagen panorámica a un aumento 4x de la zona ósea donde se observa el defecto realizado perfectamente delimitado. Figura 23.2: imagen a 10x de zona del defecto marcada con un asterisco.

A 7 días podemos observar que el defecto no ha cicatrizado, que se observan los bordes circunscritos, el hueso cortical se encuentra ausente, lo mismo que el hueso trabecular. Se observa tejido conectivo en los bordes del defecto donde el hueso está ausente, en los bordes del hueso cortical hay presencia células de aspecto osteocítico, de apariencia normal dentro de sus lagunas, en el tejido fibroso-conectivo hay presencia de infiltrado inflamatorio con algunas células de apariencia linfoide.

Grupo 14 días:

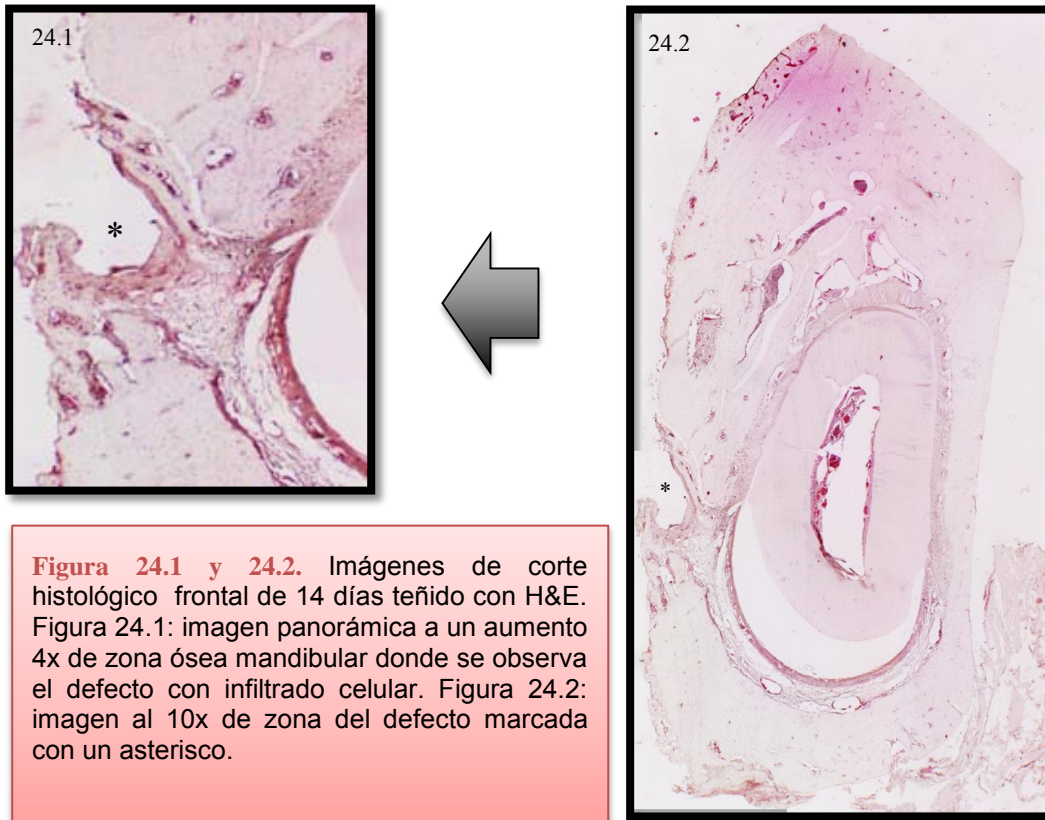
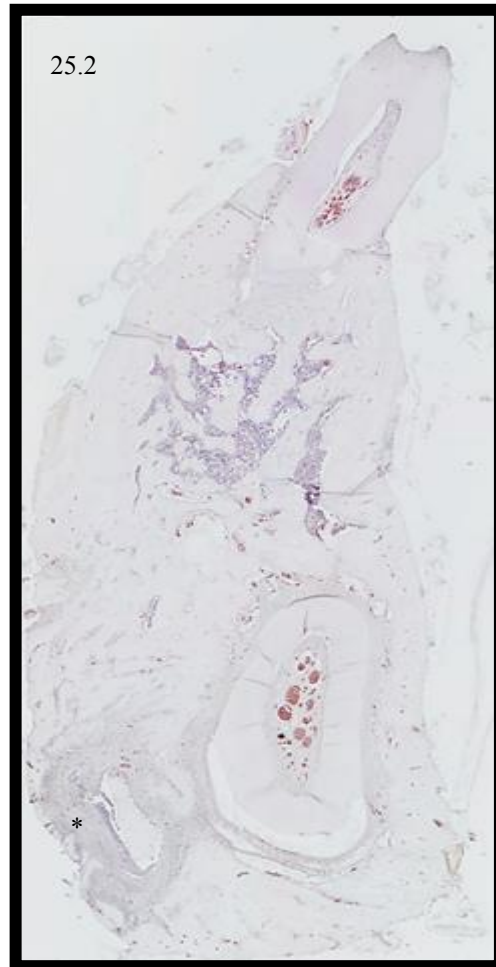
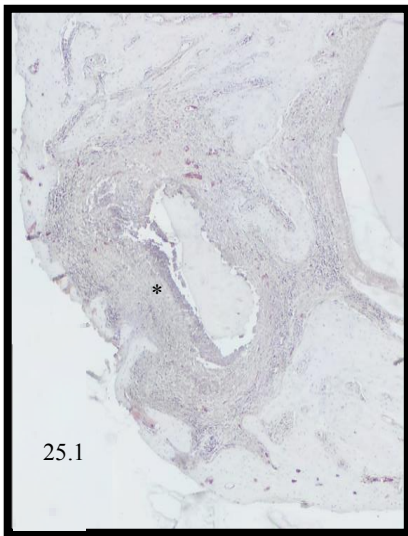


Figura 24.1 y 24.2. Imágenes de corte histológico frontal de 14 días teñido con H&E. Figura 24.1: imagen panorámica a un aumento 4x de zona ósea mandibular donde se observa el defecto con infiltrado celular. Figura 24.2: imagen al 10x de zona del defecto marcada con un asterisco.

Se observa al igual que en el grupo a 7 días discontinuidad del tejido óseo a causa del defecto, podemos observar el hueso cortical de los bordes con osteocitos de apariencia normal, lo que nos permite descartar osteonecrosis, sin embargo, el hueso cortical y trabecular se encuentran ausentes y en su lugar, podemos ver tejido de tipo conectivo fibroso con infiltrado inflamatorio en algunas áreas. Por otro lado, en el hueso cortical adyacente al defecto se observan áreas de remodelación con apariencia de reabsorción de algunas trabéculas óseas.

Grupo 30 días:

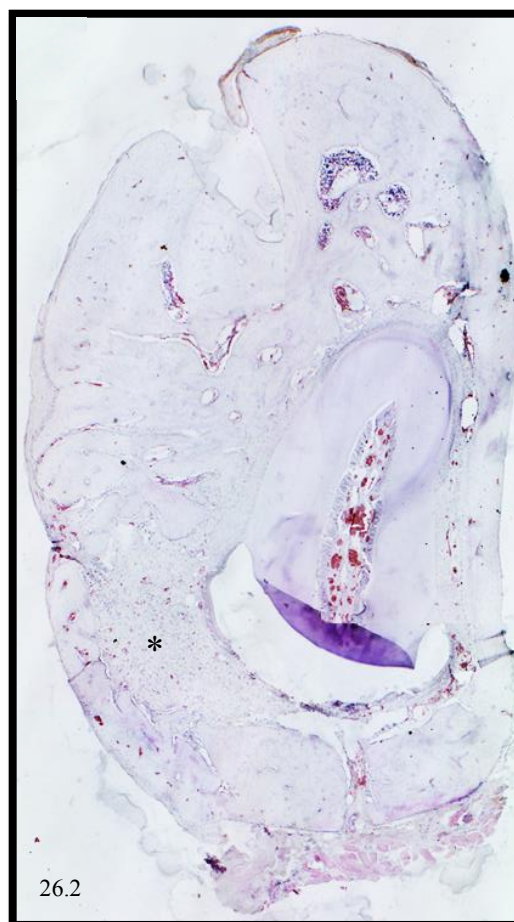
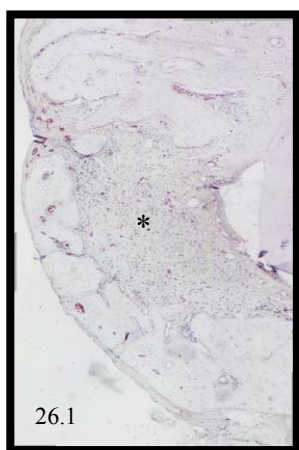
Figura 25.1 y 25.2. Imágenes de corte histológico frontal de 30 días teñido con H&E. Figura 25.1: imagen panorámica con aumento 4x donde se observa la reparación ósea con tejido de apariencia conectivo fibroso e infiltrado inflamatorio. Figura 25.2: imagen al 10x de zona del defecto marcada con un asterisco.



Se observa de afuera hacia adentro: una lámina de tejido cortical delgada con presencia de algunas células con apariencia de osteocitos, por debajo de esta donde debería de estar el hueso trabecular encontramos tejido conectivo fibroso con infiltrado inflamatorio abundante en células, que rellena todo el defecto creado, y que se encuentra a modo de cápsula alrededor de unas espículas óseas, una de ellas prácticamente acelular que está siendo reabsorbida por las células a su alrededor. El otro secuestro óseo aún con células también, se encuentra en este proceso de reabsorción. No hay evidencia aún de formación de tejido osteoide.

Grupo 60 días:

Figura 26.1 y 26.2. Imágenes de corte histológico frontal de 60 días teñido con H&E. Figura 26.1: imagen panorámica con aumento 4x donde se observa la regeneración del área circunscrita al defecto que está totalmente rellena de tejido conectivo muy rico en células, ya guarda la apariencia de tejido osteoide. Figura 26.2: imagen al 10x de la zona de regenerada marcada con un asterisco.



Aún podemos observar el área circunscrita al defecto que está totalmente rellena de tejido conectivo muy rico en células, este tejido ya guarda la apariencia de un tejido osteoide en formación por la organización de sus células. De afuera hacia adentro el defecto se encuentra casi cerrado por una delgada lamina de hueso cortical neoformado, dejando solo evidencia de una pequeña porción de entrada rellena de tejido fibroso. Solo queda una pequeña espícula ósea dentro del defecto que está siendo rodeada de lo que parecen ser células de tipo osteoclastoide. Al aumento de 40x los osteocitos en este grupo parecían poco maduros pues se observaban más alargados dentro de su laguna.

Resultados estadísticos

Análisis del conteo celular al que se realizó la prueba de ANOVA con Bonferroni.

El código de colores se mantiene en las barras de estadística donde amarillo corresponde a 7 días, verde a 15 días, azul a 30 días y rosa a 60 días. El grupo control esta representado con azul turquesa.

Células totales:

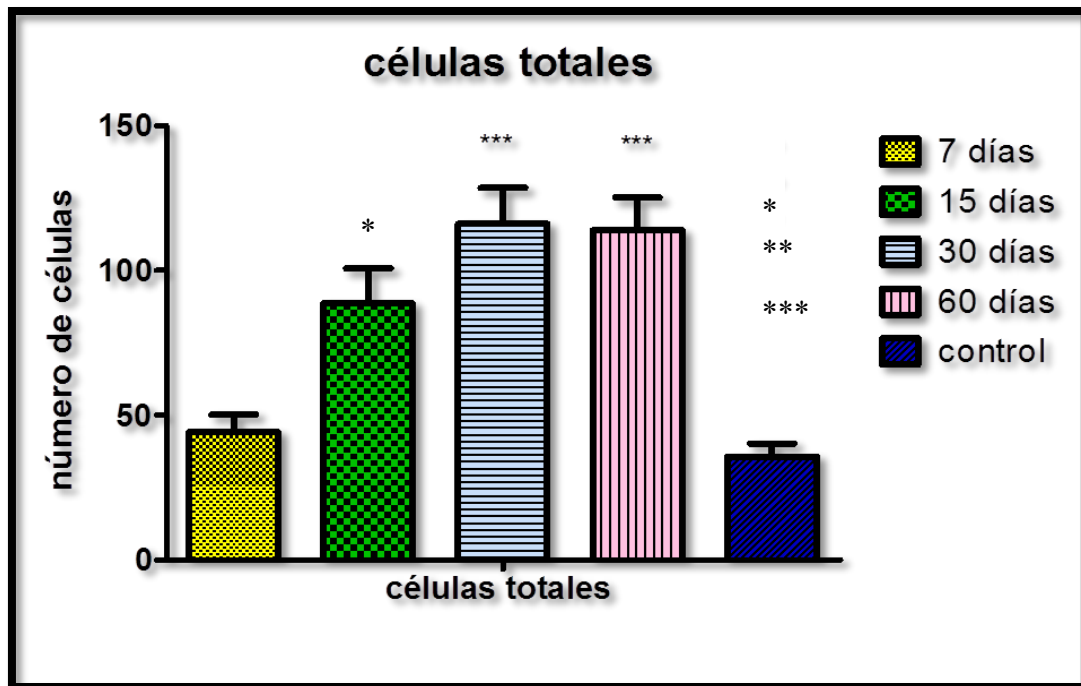


Figura 27. Grupos 15, 30 y 60 días diferencias significativas con respecto al control (marcado con *, ** y ***), no así para 7 días

El conteo de células totales que se realizó de 10 campos por muestra incluyó todas las células presentes con un núcleo visible y delimitado. En este cuadro solo se consideraron los valores significativos de todos los grupos con respecto al grupo control. Resultaron significativos los grupos 15*, 30*** y 60***, no así con respecto a 7 días. Ejemplificado en la figura 27.

Osteocitos

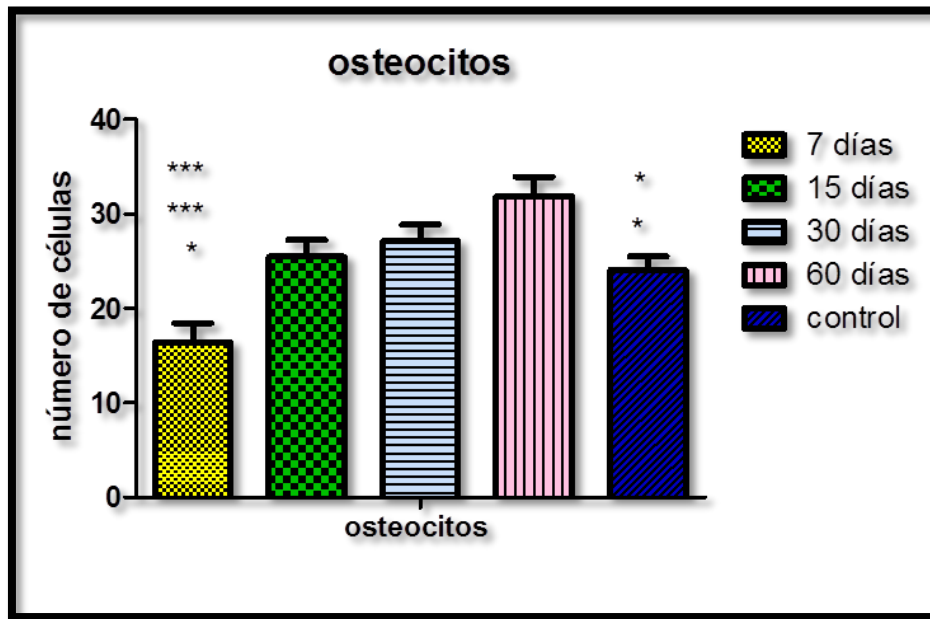


Figura 28. Grupo 7 días significativo con respecto a todos los demás. Grupos 7 y 60 significativos con respecto al grupo control.

Los osteocitos resultaron tener diferencias significativas en el grupo 7 días con respecto a los otros grupos experimentales y el control. En este rubro también resultó significativo el grupo 7 días vs control y 60 días versus control. Ejemplificado en la figura 28.

Osteoblastos

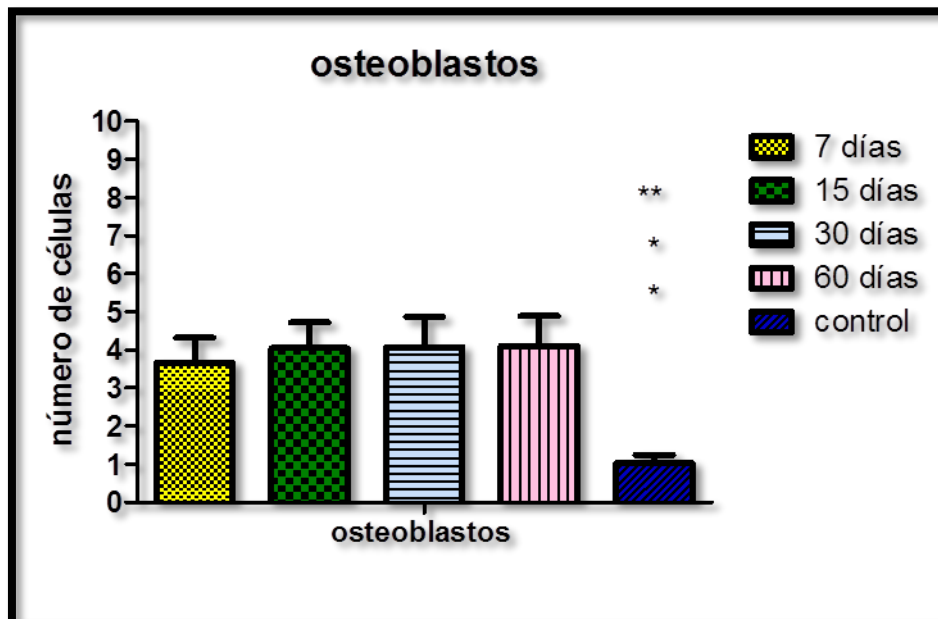


Figura 29. Grupo 7 días significativo con respecto a todos los demás. Grupos 7 y 60 significativos con respecto al grupo control.

El conteo de osteoblastos solo mostro diferencias significativas en los grupos 15* días, 30* días y 60** días con respecto al grupo control.

Osteoclastos

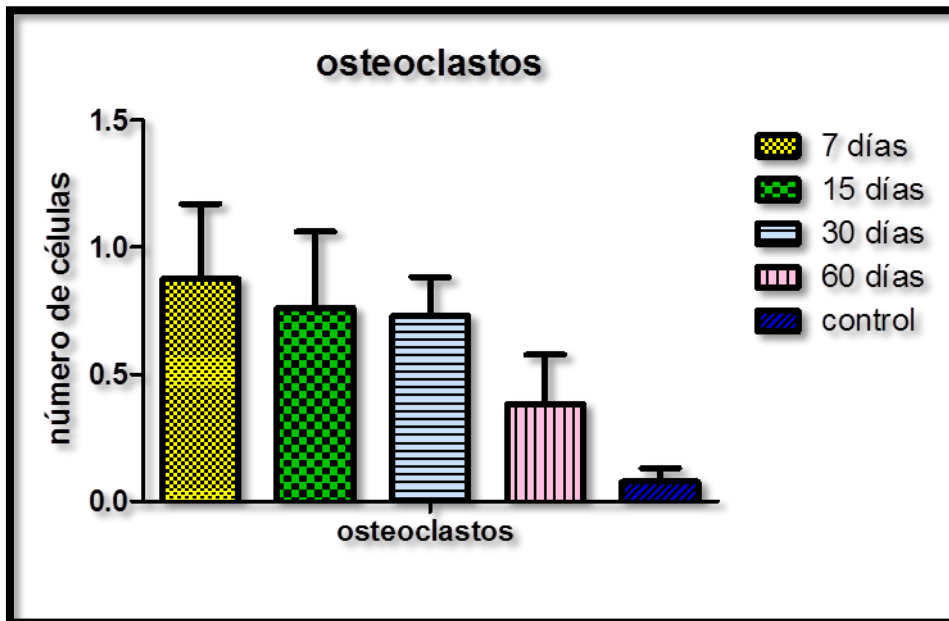


Figura 30. Ningun grupo mostro diferencias significativas con respecto a otro.

En este rubro no hubo diferencias significativas en ningun grupo.

Lagunas vacías

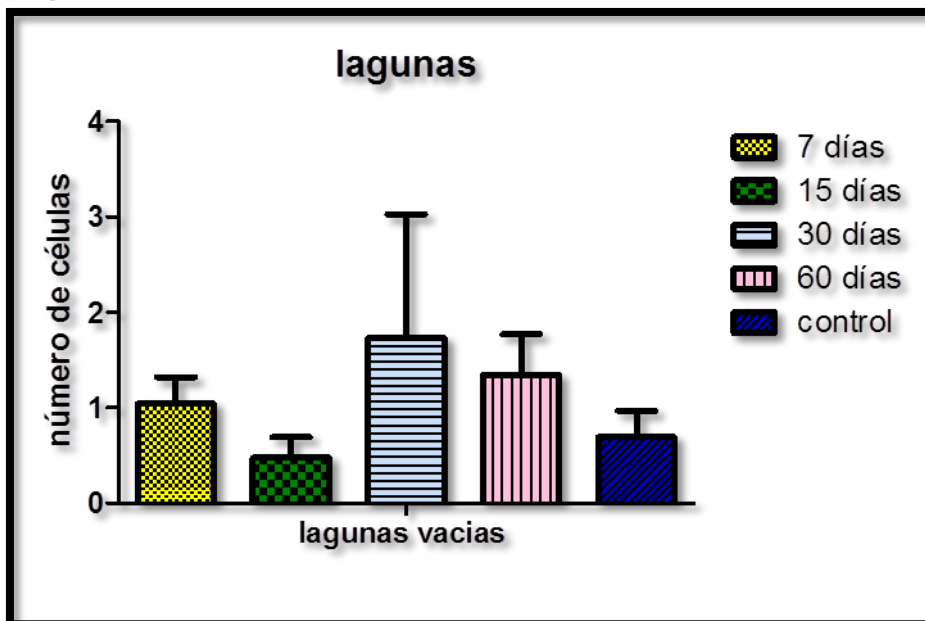


Figura 30. Ningun grupo mostro diferencias significativas con respecto a otro.

En este rubro no hubo diferencias significativas en ningun grupo.

DISCUSION

Un defecto crítico es por definición el defecto intra-óseo más pequeño posible realizado o presente en una especie animal que no se repara por sí mismo durante el tiempo de vida de este (30). En un estudio realizado en el 2013 por Len Chin y colaboradores mencionó que en ratas un defecto debe tener al menos 4 mm de longitud para considerarse como crítico(31). Sin embargo, en los resultados de su experimento encontraron que el defecto que realizó de 2 mm de longitud a los 90 días experimentales en su grupo control ratas Wistar Kyoto aún presentaba todas las características de un defecto crítico, lo que concuerda con los resultados de este protocolo, donde realizamos defectos de 3mm de longitud y que para el tiempo experimental 60 días, aun presentó características que nos permiten considerarlo crítico.

Otros protocolos sugieren modelos en animales más grandes para el estudio de defectos óseos como por ejemplo: ovejas (32,33), perros (34,35), conejos (36,37) entre otros. Sin embargo, el uso de modelos pequeños presenta múltiples ventajas como son: la reproducción del espécimen que se da rápidamente y en tasas de natalidad que son mayores comparadas con modelos más grandes, (29,38) así como el bajo costo que su mantenimiento implica(28,38). De la misma manera, la manipulación es relativamente sencilla y la sedación se consigue rápida y efectivamente por medio de infiltración intramuscular o intraperitoneal. Todas estas ventajas permiten que los protocolos que proponen modelos pequeños sean más accesibles y altamente reproducibles.(28)

Algunos artículos emplean el hueso maxilar para investigación en huesos craneofaciales (37,39,40) sin embargo, sabemos que el hueso del maxilar es considerablemente más poroso que el hueso mandibular y es rico en médula ósea (17,18) por lo que presenta mayor eficacia en su reparación y cicatrización; se ha demostrado que la irrigación vascular de la zona siempre será un factor determinante para la cicatrización ya que el tejido vascular endotelial contribuye a crear un microambiente propicio para la formación de

tejido óseo(41–43), lo que también podría aumentar el número de variables que se ven involucrados en la investigación. Es por eso que esta tesis se realizó en la cortical mandibular que presenta un déficit mayor de autoregeneración.

En los artículos de los doctores; Len Chin, et.al., 2013 (31); Requicha et. Al. 2014 (44) y Streckbein et. Al., 2014 (45) utilizaron un abordaje extraoral en las mejillas del espécimen o siguiendo la línea basal del hueso mandibular y posterior a esto, realizaron la disección del músculo masetero. De la misma forma, esta tesis sugiere un abordaje extraoral para elaboración del defecto mandibular ya que, aporta múltiples ventajas: permite la adecuada manipulación de la zona de trabajo aportando una visibilidad amplia; evita la comunicación directa de la zona del defecto con la cavidad oral, que es un reservorio natural de bacterias (46) y por último, permite al modelo continuar con su alimentación habitual, incluso a pocas horas después de la intervención quirúrgica. Es por ello que en nuestro modelo pudimos comprobar que nuestros especímenes se podían alimentar normalmente en un promedio de 4 a 6 horas después de la anestesia. Este proyecto propone que al realizar la exposición del músculo masetero (cuya inserción se encuentra justo por arriba de la línea oblicua externa) esté se mantiene intacto, ya que al disecarlo los animales perderían la inserción del musculo más importante de la masticación, lo que podría reflejarse en un postoperatorio largo y una alimentación pobre del modelo.

Algunos artículos sugieren que las ratas y los ratones son los menos apropiados para los estudios de cicatrización ósea en comparación con animales grandes (21,29,47) debido a su estructura ósea más primitiva sin un sistema de Havers ya que las ratas y los ratones utilizan cavidades de resorción para la remodelación ósea (47).Sin embargo, se ha demostrado que el proceso de remodelación es similar al sistema de Havers en animales más grandes (21) y por lo tanto, la ausencia de éste no debería ser la única razón para la exclusión de roedores de estudios experimentales en hueso(28) ya que deben de ser tomados en cuenta en cuenta los múltiples beneficios descritos anteriormente en esta tesis .

Hablando específicamente del organismo rata, el doctor Gibbs RA. y colaboradores en su artículo “Genome sequence of the Brown Norway yields insights into mammalian evolution” (48) publicado en la revista Nature en el 2004 mencionó que la rata, el ratón y el humano codifican un número similar de genes: el ratón codifica 2.5 gigabases, la rata codifica 2.75 gigabases y el ser humano 2.9 gigabases. Lo que hace evidente, que pese a que la rata codifica menor cantidad de genes que el humano, se acerca mucho más a éste que el ratón (48). Además de esto, casi todos los genes humanos conocidos por estar asociados con enfermedades tienen homólogos en el genoma de la rata y parecen altamente conservados a través de la evolución de mamíferos, lo que confirma que la rata es un modelo excelente para la investigación médica(49) .

En este protocolo se hizo uso de ratas macho para mantener la menor cantidad de variables posibles, ya que otros estudios han reportado que las hembras presentan una cicatrización ósea menor comparada con machos (50,51) y sugieren que es debido a la menor cantidad de células mesenquimales *in situ* (50) así como la probable interferencia de los cambios hormonales presentes en las hembras. (52)

El doctor Requicha et, al en su artículo “Evaluation of Starch- Based Doble layer scaffold for bone Regeneration in Rat Model” publicado en el 2014, explicó que para el defecto óseo crítico mandibular realizó una osteotomía circular bicortical de 5mm de diámetro en la rama mandibular. Lo que dejó comunicación de la cara labial de la rama de la mandíbula con la cara lingual de la misma.(44) Naturalmente, para poder abordar esta zona ósea, fue necesario la disección del músculo masetero, y aunado a esto, el espacio sin soporte óseo que se provocó al realizar un defecto bicortical fue grande, lo que complicaría el uso de este modelo para investigación Biomédica, como por ejemplo la terapia celular sin el uso de biomateriales o andamios. El tamaño y la forma del defecto de nuestro trabajo cumple ciertos fines, ya que no solo es menos traumático, sino que al no ser seccional ni bicortical, se mantiene un soporte óseo que puede ser utilizado para múltiples fines. Consideramos que la fractura no es la única forma de defecto óseo que debe ser estudiado. La profundidad establecida de 1mm pretendía evitar el contacto íntimo con el

ligamento periodontal del incisivo, y aunque clínicamente se consideró que se había mantenido esta finalidad, en los cortes histológicos se observa que si hubo contacto con el ligamento periodontal de la raíz en casi todos los modelos.

Este protocolo no hizo uso de antibióticos o analgésicos en el postoperatorio, ya que esto podría aumentar las variables experimentales, (28) sin embargo, durante el acto quirúrgico se evitó el trauma excesivo y se tuvo cuidado en el manejo de las técnicas quirúrgicas a fin de evitar el sufrimiento innecesario en nuestros especímenes, es por ello que una vez diagnosticada la presencia de una infección generalizada, los animales no solo fueron excluidos del estudio sino que además fueron inmediatamente sacrificados.

CONCLUSIÓN

Se comprobó la presencia del defecto que se encontró visible clínica, radiográfica e histológicamente en todos los grupos experimentales evaluados, aunque cabe mencionar, que en el tiempo experimental de 60 días el hueso regeneró en gran parte, por lo que esta tesis propone este modelo de defecto para experimentos que tengan como meta un tiempo igual o menor a 30 días.

Este protocolo, después de ser evaluado clínicamente, demostró que ofrece la posibilidad de crear un defecto crítico, sin ser excesivamente traumático; ya que la técnica empleada es menos agresiva durante el acto quirúrgico y en el post operatorio. También permite la alimentación casi inmediata y normal de los especímenes. El abordaje extraoral permitió mantener los tejidos periodontales insertados en el hueso y los tejidos blandos intactos (músculos, piel y mucosas), lo que evitó contaminación de la zona del defecto óseo con flora y carga bacteriana de la cavidad bucal.

En conclusión, este modelo experimental puede ser utilizado para múltiples finalidades en la investigación como un modelo de regeneración ósea menos cruenta que no implica la fractura, ya que se mantiene un área de soporte óseo, consideramos que puede ser útil en: terapia celular (53–55) colocación de andamios (56–58), constructos (59–61), plasma rico en plaquetas(62,63), Ingeniería de tejidos (56,64) ,biomateriales reabsorbibles(65–67) y no reabsorbibles (68,69).

Todo lo descrito anteriormente nos permite elevar nuestra hipótesis a la categoría de tesis quedando así:

“El modelo de defecto óseo crítico en la cortical mandibular de rata sí cumple con las condiciones necesarias para poder evaluar la reparación ósea “*per se*” en los animales de experimentación, por lo que es validado como un modelo científicamente útil para probar nuevas terapias”

LITERATURA CITADA

1. SECRETARÍA DE SALUD. Resultados del Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) [Internet]. 2012. Recuperado a partir de: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol_sivepab/SIVEPAB-2012.pdf
2. José Roberto Cisneros Duarte. ¿Cómo es la población de México? Su presente y futuro en 15 claves. CNN México [Internet]. México; 11 de julio de 2014; Recuperado a partir de: <http://mexico.cnn.com/nacional/2014/07/11/como-es-la-poblacion-de-mexico-su-presente-y-futuro-en-15-claves>
3. Winkler S. Protopodencia total. Editorial Limusa S.A. De C.V.; 1999. 576 p.
4. Gray H. Anatomy of the human body. Philadelphia: Lea & Febiger; 2000.
5. A. Singh DM. Rigid internal fixation of mandibular fractures using autologous bone grafts: the autologous bone plate. 2010;33(3)(European Journal of Plastic Surgery):163-7.
6. Martínez AB. Periodoncia clínica e implantación oral. Avances Médicos-Dentales; 2001. 704 p.
7. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. Eur J Oral Implantol. 2014;7 Suppl 2:S203-17.
8. Fitzgerald RH, Kaufer H, Malkani AL. Ortopedia. Ed. Médica Panamericana; 2004. 1146 p.
9. Cirugía AM de. Cirugía y Cirujanos. Academia Mexicana de Cirugía; 2006. 94 p.
10. Miller MD, Hart JA. Ortopedia y traumatología. Revisión sistemática + Expert Consult, 5a ed. Elsevier España; 2009. 788 p.
11. Vila CN. Cirugía oral. Arán Ediciones; 2008. 630 p.
12. Avery JK, Chiego DJ. Principios de histología y embriología bucal con orientación clínica. Elsevier España; 2007. 260 p.
13. Sadler TW, Langman. Langman fundamentos de embriología médica. Ed. Médica Panamericana; 2006. 178 p.
14. Ferraris MEG de, Muñoz AC. Histología y embriología bucodental: bases estructurales de la patología, el diagnóstico, la terapéutica y la prevención odontológica. Editorial Medica Panamericana Sa de; 2002. 482 p.
15. Eynard AR, Valentich MA, Rovasio RA. Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. Ed. Médica Panamericana; 2008. 700 p.
16. Baechle TR, Earle RW. Principios del entrenamiento de la fuerza y del acondicionamiento físico. Ed. Médica Panamericana; 2007. 676 p.
17. Ross MH, Pawlina W. Histología. Ed. Médica Panamericana; 2007. 998 p.
18. Pérez ML, Merí A, Ruano D. Manual y atlas fotográfico de anatomía del aparato locomotor. Ed. Médica Panamericana; 2004. 460 p.
19. Lindhe. Periodontología Clínica E Implantología Odontológica. Ed. Médica Panamericana; 2009. 820 p.
20. Jimenez. Biología Celular y Molecular. Pearson Educación; 2002. 900 p.
21. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. Clin Orthop. octubre de 1998;(355 Suppl):S56-65.
22. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. Tissue Eng Part B Rev. febrero de 2010;16(1):123-45.

23. Reichert JC, Saifzadeh S, Wullschleger ME, Epari DR, Schütz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. abril de 2009;30(12):2149-63.
24. Wittenberg JM, Mukherjee DP, Smith BR, Kruse RN. Biomechanical evaluation of new fixation devices for mandibular angle fractures. *Int J Oral Maxillofac Surg*. febrero de 1997;26(1):68-73.
25. Kontaxis A, Abu-Serriah M, Ayoub AF, Barbenel JC. Mechanical testing of recombinant human bone morphogenetic protein-7 regenerated bone in sheep mandibles. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2004;218(6):381-8.
26. MichaelI Siegel, MarkP Mooney. Animal Models for Bone Tissue Engineering of Critical-sized Defects (CSDs), Bone Pathologies, and Orthopedic Disease States. *Bone Tissue Engineering [Internet]*. CRC Press; 2004 [citado 10 de febrero de 2015]. p. 217-44. Recuperado a partir de: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203495094.ch9>
27. Ren J, Ren T, Zhao P, Huang Y, Pan K. Repair of mandibular defects using MSCs-seeded biodegradable polyester porous scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(5):505-17.
28. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. octubre de 2011;49(4):591-9.
29. Schliephake H, Zghoul N, Jäger V, van Griensven M, Zeichen J, Gelinsky M, et al. Bone formation in trabecular bone cell seeded scaffolds used for reconstruction of the rat mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg*. febrero de 2009;38(2):166-72.
30. Hollinger JO, Schmitz JP. Restoration of bone discontinuities in dogs using a biodegradable implant. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. julio de 1987;45(7):594-600.
31. Chin VKL, Shinagawa A, Naclério-Homem M da G. Bone healing of mandibular critical-size defects in spontaneously hypertensive rats. *Braz Oral Res*. octubre de 2013;27(5):423-30.
32. Forriol F, Longo UG, Concejo C, Ripalda P, Maffulli N, Denaro V. Platelet-rich plasma, rhOP-1 (rhBMP-7) and frozen rib allograft for the reconstruction of bony mandibular defects in sheep. A pilot experimental study. *Injury*. diciembre de 2009;40 Suppl 3:S44-9.
33. Nolff MC, Gellrich N-C, Hauschild G, Fehr M, Bormann K-H, Rohn K, et al. Comparison of two beta-tricalcium phosphate composite grafts used for reconstruction of mandibular critical size bone defects. *Vet Comp Orthop Traumatol VCOT*. 2009;22(2):96-102.
34. Chiu H-C, Chiang C-Y, Tu H-P, Wikesjö UME, Susin C, Fu E. Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing/regeneration in supraalveolar periodontal defects in dogs. *J Clin Periodontol*. junio de 2013;40(6):624-30.
35. De Santis E, Lang NP, Favero G, Beolchini M, Morelli F, Botticelli D. Healing at mandibular block-grafted sites. An experimental study in dogs. *Clin Oral Implants Res*. 12 de junio de 2014;
36. Cheng G, Li Z, Wan Q, Lv K, Li D, Xing X, et al. A novel animal model treated with tooth extraction to repair the full-thickness defects in the mandible of rabbits. *J Surg Res*. 14 de noviembre de 2014;
37. Kim J, Yang HJ, Cho TH, Lee SE, Park YD, Kim HM, et al. Enhanced regeneration of rabbit mandibular defects through a combined treatment of electrical stimulation and rhBMP-2 application. *Med Biol Eng Comput*. diciembre de 2013;51(12):1339-48.

38. Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *BioMed Res Int.* 2014;2014:348635.
39. Uraz A, Gultekin SE, Senguven B, Karaduman B, Sofuoglu IP, Pehlivan S, et al. Histologic and histomorphometric assessment of eggshell-derived bone graft substitutes on bone healing in rats. *J Clin Exp Dent.* 1 de febrero de 2013;5(1):e23-9.
40. Caria PHF, Kawachi EY, Bertran CA, Camilli JA. Biological assessment of porous-implant hydroxyapatite combined with periosteal grafting in maxillary defects. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* mayo de 2007;65(5):847-54.
41. Parfitt AM. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone.* abril de 2000;26(4):319-23.
42. Prasadam I, Zhou Y, Du Z, Chen J, Crawford R, Xiao Y. Osteocyte-induced angiogenesis via VEGF-MAPK-dependent pathways in endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* enero de 2014;386(1-2):15-25.
43. Enoki Y, Sato T, Tanaka S, Iwata T, Usui M, Takeda S, et al. Netrin-4 derived from murine vascular endothelial cells inhibits osteoclast differentiation in vitro and prevents bone loss in vivo. *FEBS Lett.* 27 de junio de 2014;588(14):2262-9.
44. Requicha JF, Moura T, Leonor IB, Martins T, Muñoz F, Reis RL, et al. Evaluation of a starch-based double layer scaffold for bone regeneration in a rat model. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* julio de 2014;32(7):904-9.
45. Streckbein P, Jäckel S, Malik C-Y, Obert M, Kähling C, Wilbrand J-F, et al. Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Cranio-Maxillofac Surg.* septiembre de 2013;41(6):496-503.
46. Graves DT, Fine D, Teng Y-TA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* febrero de 2008;35(2):89-105.
47. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* enero de 1990;1(1):60-8.
48. Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ, Scherer S, et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature.* 1 de abril de 2004;428(6982):493-521.
49. Release: Scientists Compare Rat Genome [Internet]. 2004 [citado 12 de febrero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.genome.gov/11511308>
50. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, et al. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone.* diciembre de 2009;45(6):1065-72.
51. Mehta M, Duda GN, Perka C, Strube P. Influence of gender and fixation stability on bone defect healing in middle-aged rats: a pilot study. *Clin Orthop.* noviembre de 2011;469(11):3102-10.
52. Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest.* mayo de 2006;116(5):1186-94.
53. Rodrigues MT, Gomes ME, Viegas CA, Azevedo JT, Dias IR, Guzón FM, et al. Tissue-engineered constructs based on SPCL scaffolds cultured with goat marrow cells: functionality in femoral defects. *J Tissue Eng Regen Med.* enero de 2011;5(1):41-9.
54. Yu B-H, Zhou Q, Wang Z-L. Periodontal ligament versus bone marrow mesenchymal stem cells in combination with Bio-Oss scaffolds for ectopic and in situ bone formation: A comparative study in the rat. *J Biomater Appl.* 30 de enero de 2014;29(2):243-53.

55. Zavatti M, Bertoni L, Maraldi T, Resca E, Beretti F, Guida M, et al. Critical-size bone defect repair using amniotic fluid stem cell/collagen constructs: Effect of oral ferutinin treatment in rats. *Life Sci.* 15 de enero de 2015;121:174-83.
56. Li W, Fan J, Chen F, Yang W, Su J, Bi Z. Construction of adipose scaffold for bone repair with gene engineering bone cells. *Exp Biol Med* Maywood NJ. diciembre de 2013;238(12):1350-4.
57. Yu H-S, Won J-E, Jin G-Z, Kim H-W. Construction of mesenchymal stem cell-containing collagen gel with a macrochanneled polycaprolactone scaffold and the flow perfusion culturing for bone tissue engineering. *BioResearch Open Access.* junio de 2012;1(3):124-36.
58. Zong C, Qian X, Tang Z, Hu Q, Chen J, Gao C, et al. Biocompatibility and bone-repairing effects: comparison between porous poly-lactic-co-glycolic acid and nano-hydroxyapatite/poly(lactic acid) scaffolds. *J Biomed Nanotechnol.* junio de 2014;10(6):1091-104.
59. Jeon JE, Vaquette C, Theodoropoulos C, Klein TJ, Hutmacher DW. Multiphasic construct studied in an ectopic osteochondral defect model. *J R Soc Interface R Soc.* 6 de junio de 2014;11(95):20140184.
60. Liu X, Wang P, Chen W, Weir MD, Bao C, Xu HHK. Human embryonic stem cells and macroporous calcium phosphate construct for bone regeneration in cranial defects in rats. *Acta Biomater.* octubre de 2014;10(10):4484-93.
61. Yang P, Huang X, Shen J, Wang C, Dang X, Mankin H, et al. Development of a new pre-vascularized tissue-engineered construct using pre-differentiated rADSCs, arteriovenous vascular bundle and porous nano-hydroxyapatite-polyamide 66 scaffold. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013;14:318.
62. Cho A-R, Kim H-K, Kwon J-Y, Kim T-K, Choi Y-M, Kim K-H. The Incorporation of Platelet-rich Plasma into Calcium Phosphate Cement Enhances Bone Regeneration in Osteoporosis. *Pain Physician.* diciembre de 2014;17(6):E737-45.
63. Nagata MJH, de Campos N, Messora MR, Santinoni CS, Bomfim SRM, Fucini SE, et al. Platelet-rich plasma derived from bone marrow aspirate promotes new cementum formation. *J Periodontol.* diciembre de 2014;85(12):1702-11.
64. Perez RA, Kim M, Kim T-H, Kim J-H, Lee JH, Park J-H, et al. Utilizing core-shell fibrous collagen-alginate hydrogel cell delivery system for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* enero de 2014;20(1-2):103-14.
65. Kinard LA, Dahlin RL, Lam J, Lu S, Lee EJ, Kasper FK, et al. Synthetic biodegradable hydrogel delivery of demineralized bone matrix for bone augmentation in a rat model. *Acta Biomater.* noviembre de 2014;10(11):4574-82.
66. Sun D, Chen Y, Tran RT, Xu S, Xie D, Jia C, et al. Citric acid-based hydroxyapatite composite scaffolds enhance calvarial regeneration. *Sci Rep.* 2014;4:6912.
67. Yu N, Oortgiesen DAW, Bronckers ALJJ, Yang F, Walboomers XF, Jansen JA. Enhanced periodontal tissue regeneration by periodontal cell implantation. *J Clin Periodontol.* julio de 2013;40(7):698-706.
68. Jamshidi Adegani F, Langroudi L, Ardeshiryajimi A, Dinarvand P, Dodel M, Doostmohammadi A, et al. Coating of electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibers with willemite bioceramic: improvement of bone reconstruction in rat model. *Cell Biol Int.* noviembre de 2014;38(11):1271-9.
69. Lee JH, Ryu MY, Baek H-R, Lee KM, Seo J-H, Lee H-K, et al. Effects of porous beta-tricalcium phosphate-based ceramics used as an E. coli-derived rhBMP-2 carrier for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med.* septiembre de 2013;24(9):2117-27.

ANEXOS

ANEXO 1. Paraformaldehído al 4%:

El paraformaldehído (que es el polímero sólido del paraformaldehído) es un fijador no coagulante que permite conservar detalles estructurales finos. Debe usarse máximo 15 días posteriores a su preparación.

Procedimiento de preparación:

- | | |
|--|---|
| * Paraformaldehído (Sigma) | 4mg |
| * solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o H ₂ O | 80ml (posterior a ajuste de Ph, aforar a 100ml) |

Calentar a 60°C con agitación, al alcanzar la temperatura adicionar más gotas de hidróxido de Sodio (NaOH) al 1M acuoso hasta que se disuelva el paraformaldehído y dejar enfriar.

Ajustar pH con ácido clorhídrico (HCL) 1N o Hidróxido de sodio (NaOH) 1N según el caso para ajustar pH 7.4 y aforar a 100ml.

Guardar a 4°C.

ANEXO.2 EDTA al 7%

Mezclar y poner en agitación, adicionar NaOH 1N hasta que se disuelva e EDTA. Ajustar el pH con HCL 1N y 7.4 y aforar al 100ml.

Después de fijado el tejido lavar con agua mínimo por 1hr para eliminar el fijador, colocar la muestra en un mínimo de 20 volúmenes en la solución

descalcificante y hacer cambios cada 24 o 48 hrs hasta que el hueso este con consistencia de tejido blando. Lavar profusamente con agua corriente mínimo 2hrs.

ANEXO 3. Plasdon

De la marca CALBIOCHEM preparando 100gr en 10ml del agua bidestilada hasta que se encuentre completamente disuelto. Esperar a que repose y se liberen las burbujas.

ANEXO 4. Procedimiento histológico estándar

Fijación: Fijación del tejido en paraformaldehído al 4% durante 24 horas.

EDTA: Colocación en agitación 24hrs al día durante 7 días

Tren de deshidratación	
Alcohol 70%	1hr
Alcohol 80%	1hr
Alcohol 90%	1hr
Alcohol 96%	1hr
Alcohol 100%	1hr

ANEXO 5. Técnicas de Tinción

Hematoxilina y Eosina



Reactivo	Tiempo
Xilol I	5 min
Xilol II	5 min
OH 100%	3 min
OH 90%	2 min
OH 80%	2 min
OH 70%	1 min
Agua corriente	3 min
Hematoxilina de Harris	8 min
Agua corriente	2 min
Alcohol ácido	lavado
Agua corriente	2 min
Agua amoniacal	lavado
Agua corriente	1 min
Eosina alcohólica	5 min
Agua corriente	lavado

Montaje con plasdona

ANEXO 5. Campos hendidos y códigos de colores

Se fabricaron campos de 30x 15 cm de tela de cabeza de indio y se realizó una hendidora orientada a la parte superior de 5cm.

Se asignó un código de colores para operar e identificar los diferentes grupos de estudio.

GRUPO	COLOR
7 días	Amarillo
14 días	Verde
30 días	Azul
60 días	Rosa

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

URO	Unidad de remodelación ósea
UBM	Unidad multicelular básica
TC	Tejido conectivo
MEC	Matriz extra celular
PG	Proteoglicanos
GAG	Glucosaminoglicanos
H&E	Hematoxilina y Eosina
PAS	Ácido peryódico de Schiff
PBS	Solución salina amortiguada con fosfato
SIVEPAB	Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales
GP	Glucocoproteínas
P-GI	Proteínas con ácido gamacarboxiglutámico
URO	Unidades de remodelación ósea
UBM	Unidad multicelular básica
EDTA	Etilendiaminotetraacético
NaOH	Hidróxido de Sodio
HCL	Ácido Clorhídrico