



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**“ESTUDIO COMPARATIVO DEL ENDOTELIO VASCULAR ENTRE
LESIONES ÓSEAS INFLAMATORIAS Y LESIONES FIBROÓSEAS
NO INFLAMATORIAS”**

TESIS

Que para optar por el grado de:
Maestra en Ciencias

PRESENTA

Ximena Vidal Gutiérrez

TUTOR

Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda
Jefe de Laboratorio de Patología Clínica y Experimental
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Odontología, UNAM.

México D.F., octubre de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
ANTECEDENTES.....	9
TEJIDO ÓSEO.....	9
<i>CÉLULAS ÓSEAS.....</i>	9
FACTORES MODULADORES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA.....	13
<i>LA IMPORTANCIA DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA OSIFICACIÓN.....</i>	16
<i>ANGIOGENESIS.....</i>	17
<i>ENDOTELIO VASCULAR.....</i>	23
<i>DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....</i>	26
LESIONES ÓSEAS INVOLUCRADAS.....	28
<i>LESIONES ÓSEAS INFLAMATORIAS.....</i>	28
<i>LESIONES FIBRO-ÓSEAS NO INFLAMATORIAS.....</i>	33
TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS PARA EL ESTUDIO DE TEJIDO ENDOTELIAL.....	40
<i>HEMATOXILINA Y EOSINA.....</i>	40
<i>TRICROMICA DE MASSON.....</i>	41
<i>TÉCNICA PARA FIBRAS ELÁSTICAS DE GALLEGO.....</i>	42
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	43
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	43
JUSTIFICACIÓN.....	43
HIPÓTESIS.....	44
OBJETIVO GENERAL.....	44
OBJETIVOS PARTICULARES.....	44
DISEÑO METODOLÓGICO.....	44
TIPO DE ESTUDIO.....	44
SISTEMA DE VARIABLES Y CATEGORÍAS DE ANÁLISIS.....	44
POBLACIÓN.....	46
TAMAÑO MUESTRAL.....	46
SELECCIÓN DE MUESTRA.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
PLAN DE ANALISIS.....	48
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	49
RECURSOS.....	49
RESULTADOS.....	50
DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMILÓGICOS DE LA MUESTRA.....	52
ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS.....	53
CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS Y EL TIPO DE LESIÓN.....	54
CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS Y LAS VARIABLES ANTECEDENTES.....	55
ANÁLISIS COMPARATIVO DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS.....	56
ANÁLISIS CON PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	59
DISCUSIÓN.....	60
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXOS.....	73
ANEXO 1. CRITERIOS DE SUFICIENCIA.....	73
ANEXO 2. PROCEDIMIENTO PARA POLY-LISINAR PORTAOBJETOS.....	73
ANEXO 3. MÉTODO DE CONTEO CELULAR MODIFICADO SIN UTILIZAR UN PROGRAMA DE ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	74

“La science, mon garçon, est faite d'erreurs, mais d'erreurs qu'il est bon de commettre, car elles mènent peu à peu à la vérité”

Chapitre XXXI,
Voyage au centre de la Terre,
Jules Verne

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor el Doctor Luis Alberto Gaitán-Cepeda por el apoyo brindado durante el desarrollo y ejecución de este trabajo, a los técnicos Teodomiro Pérez-Salazar y Raquel Guerrero-Alquicira por su ayuda en los procedimientos histológicos.

Igualmente quiero agradecer al Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la Facultad de Odontología, por el espacio brindado para el desarrollo de esta investigación. Así mismo doy las gracias al Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, por darme acceso para realizar técnicas histológicas, así como al Doctor Andrés E. Castell-Rodríguez y la Maestra en Ciencias Katia Jarquín-Yáñez por su apoyo brindado.

Este trabajo fue sustentado por becas brindadas por el Programa de Apoyo a la División de Estudios de Posgrado, UNAM y al Programa Nacional de Posgrados de Calidad, CONACyT, sin los cuales la obtención de este trabajo no hubiera sido posible.

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Células óseas.....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. Señales moleculares que desempeñan un papel clave en la diferenciación y activación osteoblástica).....</i>	<i>10</i>
<i>Figura 3. Microfotografía de la red canículo-lagunar en un corte transversal de hueso femoral</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Control molecular de la diferenciación osteoclástica</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5. Imagen de osteocito en contacto íntimo con la recién formada MEC</i>	<i>12</i>
<i>Figura 6. Remodelación ósea.....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 7. Asociación de vasos sanguíneos con osteocitos</i>	<i>17</i>
<i>Figura 8. Formación de vasos sanguíneos.</i>	<i>18</i>
<i>Figura 9. Microambiente durante la remodelación ósea.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 10. Múltiples funciones del endotelio vascular.....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 11. Aspecto radiográfico de la osteomielitis crónica en la zona de extracción del tercer molar</i>	<i>30</i>
<i>Figura 12. Radiografía de paciente con Osteorradionecrosis</i>	<i>32</i>
<i>Figura 13. Apariencia clínica de Osteonecrosis asociada al uso de medicamentos.....</i>	<i>33</i>
<i>Figura 14. Características clínicas, radiográficas e histológicas de la Displasia Fibrosa</i>	<i>36</i>
<i>Figura 15. Diseño metodológico</i>	<i>46</i>
<i>Figura 16. Análisis histológico.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 17. Distribución de casos por tipo de lesión.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 18. Obtención de la muestra.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 19. Distribución de casos por Diagnostico</i>	<i>51</i>
<i>Figura 20. Apariencia histológica de las lesiones después de aplicar las técnicas histológicas.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 21. Distribución vasos sanguíneos por tipo de lesión.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 22. Distribución de lesiones por técnica histológica utilizada.</i>	<i>54</i>
<i>Figura 23. Diagramas de dispersión para lesiones fibroóseas no inflamatorias</i>	<i>55</i>
<i>Figura 24. Diagramas de dispersión para lesiones óseas inflamatorias</i>	<i>55</i>
<i>Figura 25. Gráficas de barras.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 26. Gráficas de barras.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 27. Gráficas de barras.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 28. Gráficas de barras.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 29. Microfotografías de los controles para VEGF en tejido de intestino grueso.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 30. Microfotografías del resultado de inmunohistoquímica identificando CD34 y VEGF</i>	<i>59</i>
<i>Figura 28. Orden de conteo.....</i>	<i>61</i>

ABREVIATURAS

ALP = (Alkaline Phosphatase) Fosfatasa Alcalina

BF = Bifosfonato

BMP = (Bone Morphogenetic Proteins) Proteínas Morfogenéticas Óseas

CTM = Células Troncales Mesenquimales

DEPeI = División de Estudios de Posgrado e Investigación

DF = Displasia Fibrosa

DII4 = (Delta-like ligand 4) Ligando 4 Delta

FDA = (Federal Drugs Administration) Administración Federal de Fármacos

FGF = (Fibroblastic Growth Factor) Factor de crecimiento Fibroblástico

HIF = (Hipoxia inducible Factor) Factor inducible por Hipoxia

IGF = (Insuline Growth Factor) Factor de Crecimiento Insulínico

IL = (Interleukin) Interlucina

LFO = Lesiones Fibroóseas

MEC = Matriz Extracelular

MMP = Metaloproteasas

NFκB = (Nuclear Factor κ B) Factor Nuclear κ B

OFD = Factor de Diferenciación Osteoclástica

ONM = Osteonecrosis Maxilar

ONMAB = Osteonecrosis Maxilar Asociada al uso de Bifosfonatos

Osx = (Sp7/Osterix) Sp7/Osterix

PA = plasminógeno/plasmina

PDGF = (Platelet Derived Growth Factor) Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PIGF = (Placental Growth Factor) Factor de crecimiento placentario

PPi = Bifosfonatos Simples

PTH = Hormona Paratiroidea

RANK = (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B) Receptor activador del ligando NFκβ

RANKL = (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand) Receptor activador del ligando del Factor Nuclear κB

TGF-β = (Transforming Growth Factor Beta) Factor de Crecimiento Transformante beta

TNF-α = (Tumor Necrosis Factor-α) Factor de Necrosis Tumoral-α

TNF-β = (Tumor Necrosis Factor-β) Factor de Necrosis Tumoral-β

VEGF = (Vascular Endothelial Growth Factor). Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

VEGFR = (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

Wnts = Familia de los Factores Wingless

RESUMEN

La presencia de vasos sanguíneos en lesiones óseas maxilares de origen inflamatorio y lesiones fibro-óseas no inflamatorias, ha sido poco estudiada, a pesar de ser lesiones comunes en la cavidad bucal. Se sabe que uno de los elementos más importantes en el proceso de regeneración ósea son los vasos sanguíneos, por lo que el conocer su papel coadyuvará al mejor entendimiento y al manejo eficiente en este tipo de lesiones.

Nuestro objetivo fue comparar la cantidad y características histomorfológicas de vasos sanguíneos en lesiones óseas inflamatorias contra lesiones fibro-óseas no-inflamatorias.

Se obtuvieron muestras del archivo de diagnóstico histopatológico del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, de la DEPEI, Facultad de Odontología, UNAM, del periodo comprendido de 2003 a 2013 con diagnóstico de lesiones óseas de origen inflamatorio y lesiones fibro-óseas no inflamatorias. Se obtuvieron datos como edad, género y localización. Se analizaron los cortes con técnica hematoxilina y eosina, tricrómica de Masson y tinción de Gallego.

Las lesiones fibro-óseas no inflamatorias representan el 1.48% y las lesiones óseas inflamatorias representan el 0.53% del total de la población estudiada para el período 2003-2013. En ambas lesiones las mujeres mostraron una mayor frecuencia, siendo la mandíbula el sitio de mayor frecuencia para presentar ambas lesiones. Se observó que los vasos sanguíneos son importantes en el desarrollo de lesiones fibro-óseas mediante la proliferación, la osteogénesis y el aumento de matriz extracelular. El análisis histoquímico indicó que el número de vasos sanguíneos es alto en las lesiones fibro-óseas.

Al relacionar los datos clínicos con los datos histológicos obtenidos observamos correlaciones negativas y estadísticamente no significativas ($p > 0.05$).

Nuestros resultados aportan nueva información sobre las características histológicas de los vasos sanguíneos de estas lesiones.

ABSTRACT

The presence of blood vessels in bone inflammatory lesions and non-inflammatory fibro-osseous lesions bone lesions, has been poorly studied, despite being common injuries in oral cavity. It is known that one of the most important elements in the process of bone regeneration are the presence of blood vessels, so that knowing his role will contribute to better understanding and efficient management in this types of injuries.

Our aim was to compare the amount and histomorphological features of blood vessels in inflammatory bone lesions against non-inflammatory fibro-osseous lesions.

Samples were obtain of Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Faculty of Dentistry, UNAM, the period of 2003-2013 with a diagnosis of bone inflammatory lesions and non-inflammatory fibro-osseous lesions. Data such as age, gender and location were obtained. The samples were analyzed by hematoxylin and eosin, Masson trichrome and Gallego's staining.

Noninflammatory fibro-osseous lesions represent 1.48% and inflammatory bone lesions represent 0.53% of the study population for the period between 2003 to 2013. In both lesions, women showed a higher frequency, the jaw being the site more frequently to present both lesions. It was observed that the blood vessels are important in the development of fibro-osseous lesions by proliferation, osteogenesis and increased extracellular matrix. Histochemical analysis indicated that the number of blood vessels is high in the fibro-osseous lesions.

By linking clinical data obtained with histological data we observed negative and statistically significant correlations ($p > 0.05$).

Our results provide new information about the histological features of blood vessels of these lesions.

ANTECEDENTES

TEJIDO ÓSEO

El hueso, o tejido óseo, representa la mayor diferenciación entre los tejidos de sostén. Su peculiaridad reside en que es uno de los pocos tejidos que fisiológicamente se mineralizan(1).

El mineral óseo, cuyo principal componente es la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) está dentro de las fibrillas de colágeno como cristales de apatita(2).

Morfológicamente se distinguen dos tipos de hueso, cortical o compacto y trabecular o esponjoso (3).

La superficie externa del hueso compacto, excepto en las superficies articulares, está cubierta por una capa de tejido conectivo llamada *periostio*. El *endostio* reviste la cavidad medular y cubre al hueso esponjoso que la reviste(4).

CÉLULAS ÓSEAS

Las células osteoprogenitoras son células troncales derivadas del mesénquima, las cuales tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse a osteoblastos. Los factores que estimulan su diferenciación y los mecanismos moleculares, a través de los cuales se lleva a cabo este proceso, continúan siendo parte de las incógnitas por solucionar(4–6).

La diferenciación de las células osteoprogenitoras, es un proceso esencial para la formación, el crecimiento, remodelación y la reparación de los huesos. Estas células son fusiformes con núcleos ovales o alargados y citoplasma escaso. Se encuentran cerca de las superficies óseas en la porción interna del periostio, en el endostio y en los conductos vasculares del hueso compacto, por ello en la literatura en ocasiones son denominadas como: “*bone lining cell*” o células del reborde óseo(4).

Los osteoblastos regulan la mineralización, disponiendo de manera adecuada a las proteínas y formando pequeñas depresiones sobre la matriz extracelular (MEC) rodeadas por parte de su membrana plasmática que posee enzimas como fosfatasa alcalina (ALP) y pirofosfatasa, las cuales aumentan la concentración local de fosfato y calcio, creando así centros de nucleación de las sales que constituyen la fase mineral(7).

Numerosos factores sistémicos y locales regulan la proliferación, diferenciación y metabolismo de los osteoblastos, mediante mecanismos moleculares, entre ellos se encuentran hormonas, como la 1,25 dihidroxivitamina D (1,25 D), la hormona paratiroidea

(PTH), y las citocinas como las interleucinas (IL) 6 y 11, los factores transformantes de crecimiento beta (TGF- β s) y las proteínas morfogénicas óseas (BMPs)(8).

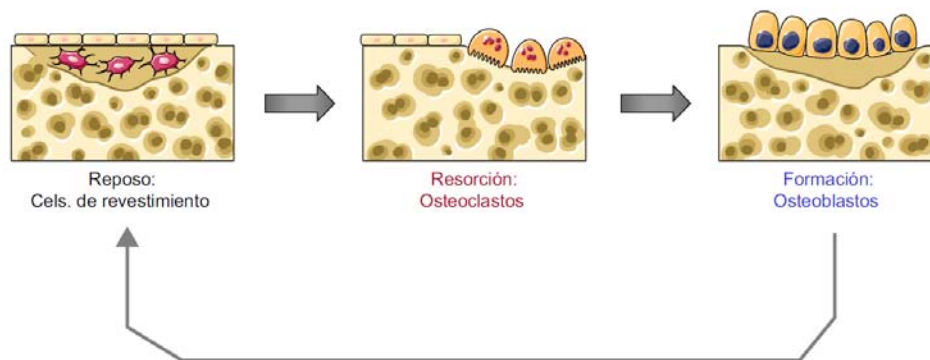


Figura 1. Células óseas. (9)

Los osteoblastos no sólo producen las proteínas de la MEC ósea, sino que influyen en la maduración y la actividad de los osteoclastos. Muchos de los factores que sirven como estímulo primario para la resorción ósea, como la PTH, la IL-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), tienen efecto directo muy escaso o nulo sobre los osteoclastos; de hecho, son los osteoblastos los que poseen receptores para estas sustancias. Bajo la señal adecuada, los osteoblastos liberan un mediador soluble, inductor de la actividad de resorción de los osteoclastos, denominado RANKL u ODF (ligando del receptor activador del factor nuclear κB o factor de diferenciación de osteoclastos) (6,9,10).

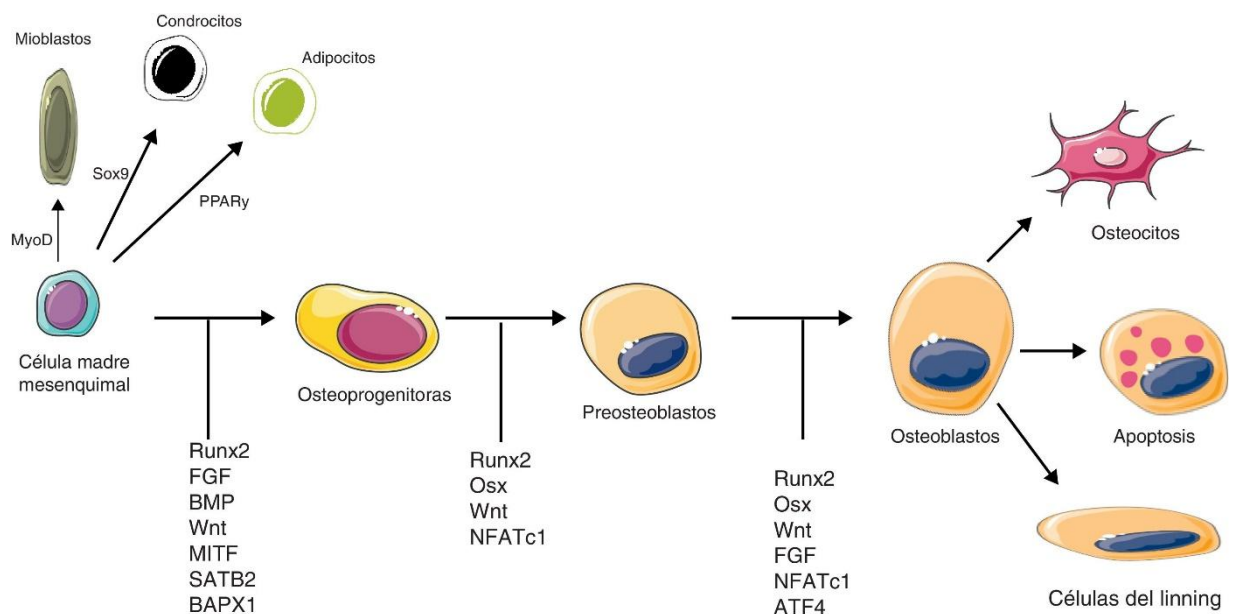


Figura 2. Señales moleculares que desempeñan un papel clave en la diferenciación y activación osteoblástica (7)

Las células óseas maduras u osteocitos son corpúsculos ovales aplanados con prolongaciones muy delgadas que se ramifican, se localizan inmersos en la MEC ósea dentro de espacios llamados lagunas osteocíticas, en donde están bañados por líquido tisular y conectado con otros osteocitos, con osteoblastos en la superficie del tejido óseo y con los conductos de Havers, a través de prolongaciones de su membrana que se extienden por una red de conductos denominados canalículos. Los osteocitos son responsables del proceso de osteólisis osteocítica, en el cual se resorben las sales amorfas de calcio y de fosfato depositadas en la fase mineral de la MEC ósea y de esta forma la actividad de los osteocitos contribuye de manera importante a la homeostasis de calcio(10).

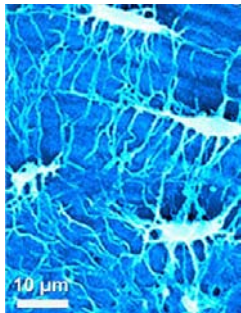


Figura 3. Microfotografía de la red canículo-lagunar en un corte transversal de hueso femoral, utilizando microscopia electrónica con inclusión plástica y contraste ácido.(11)

Los osteoclastos derivan de células troncales de linaje monocito/macrófago usualmente localizadas en la medula ósea y en la sangre. Estas células tienen un papel clave en cicatrización ósea. Son células grandes (de 20 a 100µm de diámetro) y multinucleadas (de 2 a 50 núcleos) consideradas un tipo de macrófago. Como los demás macrófagos, se desarrollan a partir de los monocitos que se originan en el tejido hemopoyético de la médula ósea. Estas células precursoras son liberadas desde el torrente sanguíneo y se reúnen en los lugares de resorción ósea, donde se fusionan para formar los osteoclastos multinucleados, que se fijan a las superficies de la MEC ósea y la degradan (3,4,6).

La parte de la membrana celular del osteoclasto que se encuentra en contacto con la superficie del tejido óseo, forma un espacio autoconteniente, en donde son liberadas enzimas lisosomales, que permiten la lisis de las proteínas, así como ácido, que solubiliza las sales de la MEC ósea(6).

Mediante la resorción, se liberan factores (como TGFbs, ILs y BMPs) previamente depositados por los osteoblastos en la MEC, los cuales junto con algunas hormonas provenientes de otros tejidos (PTH y 1,25(OH) D), estimulan a los osteoblastos a depositar de nuevo MEC ósea en las zonas recién resorbidas, en una proporción similar al hueso que fue removido por los osteoclastos. Esta coordinación, entre las actividades de los osteoclastos y

de los osteoblastos, permite mantener el equilibrio entre los procesos de remodelación (formación y resorción) determinándose así el estado óptimo de la masa esquelética(2).

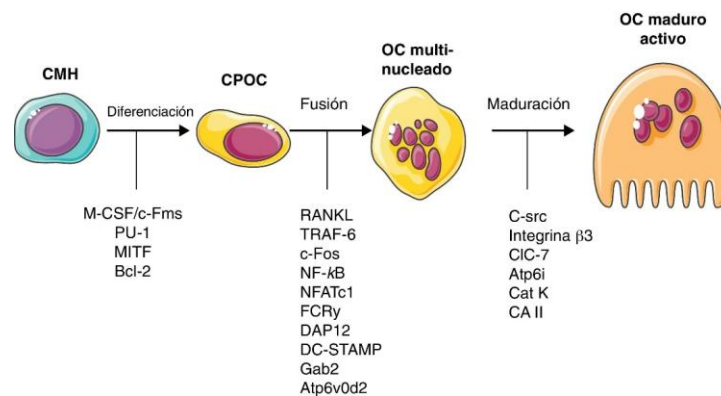


Figura 4. Control molecular de la diferenciación osteoclástica. (12)

Aunque en apariencia la sustancia extracelular del hueso es homogénea, tiene una estructura bien ordenada. Sus dos componentes principales son la MEC orgánica y las sales inorgánicas. La porción orgánica (que representa alrededor de 35%) consta en su mayor parte de fibras de osteocolágeno unidas en haces de unos 5 μm de grueso por una sustancia de cemento, que consta principalmente de glucosaminoglucanos (combinaciones de proteínas y polisacáridos) (6,13).

Las proteínas de la MEC orgánica participan en la regulación de la mineralización, la migración, la proliferación y diferenciación celular, mediante la interacción entre proteínas de la MEC y las células y generando sitios de nucleación para las sales minerales(6).

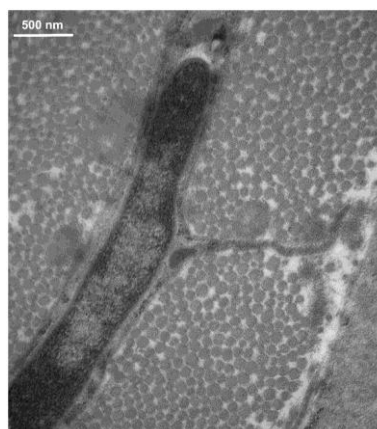


Figura 5. Imagen de osteocito en contacto íntimo con la recién formada MEC, formada por fibras de colágeno están en íntima relación con la membrana celular a lo largo de todo el cuerpo celular del osteocito. (Microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando fijación de acroleína). (6)

FACTORES MODULADORES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA

La remodelación ósea es un proceso extenso que involucra una cascada de complejos eventos biológicos, incluye señalizaciones moleculares que promueven la inducción intracelular y extracelular de formación ósea(14).

Existen muchos factores moduladores locales y sistémicos, incluyendo factores de crecimiento y diferenciación, hormonas, citocinas, MEC y su interacción con muchos tipos celulares, incluyendo células primarias de hueso y cartílago, además de células musculares mesénquimales, reclutadas durante la remodelación ósea mediante la angiogénesis que se produce en la zona, además, recientemente se han identificado miRNAs y siRNAs con actividad osteomoduladoras(15,16).

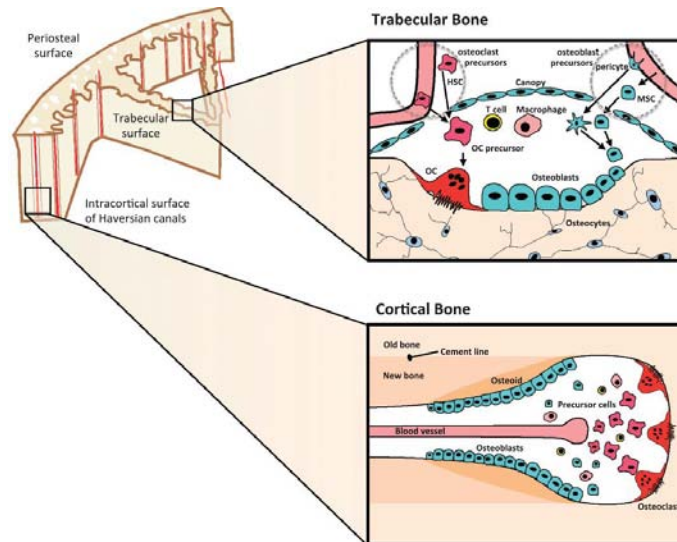


Figura 6. Remodelación ósea. Las células que recubren el hueso trabecular (paneles superiores) y en el hueso cortical (paneles inferiores). Los osteoclastos (AO) se forman a partir de precursoras hematopoyéticas (HSC) suministrados por la médula y el torrente sanguíneo. Los precursoras de osteoblastos provienen de MSCs en la médula ósea, de sangre y a partir de los pericitos; las células T y los macrófagos pueden tener acceso desde el suministro de sangre (17).

Estas señales pueden tener una acción autocrina, paracrina o endocrina, uno solo de estos factores puede afectar a multitud de tipos celulares e inducirlos a diferentes funciones. Estos factores se unen a células blanco receptoras e inducen una señal de transducción intracelular e induce una respuesta biológica. Este sistema es redundante ya que estos factores pueden unirse a diferentes receptores(15).

Estas señales moleculares actúan sobre linajes específicos de células troncales, las cuales se diferencian en diferentes fenotipos celulares y son reclutadas desde el periostio y la médula ósea para diferenciarse en células maduras que producen MEC (17).

La actividad física es imprescindible para el mantenimiento óseo. La acción muscular transmite al hueso una tensión, detectada por los osteocitos. Estos osteocitos producen prostaglandinas, óxido nítrico e IGF, que estimulan tanto su actividad como la de los osteoblastos y originan mayor formación ósea. Por el contrario, la falta de actividad muscular, el reposo o la ingravidez, aceleran la resorción(18).

Tabla 1. Factores de crecimiento relacionados con la remodelación ósea (16,17,19)

Factores de crecimiento	Células que producen	que las	Efecto odontogénico o angiogénico	Función	Influencia sobre otros factores de crecimiento
VEGF	Plaquetas, osteoblastos		Ambos	Quimioatrayente osteoblastos, CTM y Células endoteliales	Mediador central de otros factores de crecimiento
TGF-β	Plaquetas, osteoblastos, condrocitos, endoteliales, macrófagos	CTM, células	Ambos	Quimioatrayente de CTM, diferenciación osteoblástica	FGF, VEGF
PDGF	Plaquetas, osteoblastos, endoteliales, monocitos, macrófagos	células	Ambos	Quimioatrayente y estimulación mitogénica para osteoblastos	VEGF
IGF	Osteoblastos, condrocitos, hepatocitos, endoteliales	células	Ambos	Regulación de hormonas efectoras	Mediador de otros factores de crecimiento
FGF	Macrófagos, monocitos, condrocitos, osteoblastos, endoteliales	CTM, células	Angiogénico	Migración estimulada de osteoblastos, factor mitogénico para células endoteliales, CTM y diferenciación a células parecidas a osteoblastos	VEGF
BMP-2, 4, 7	Células osteoprogenitoras, osteoblastos, condrocitos, endoteliales (BMP-2)	células	Osteogénico	Quimioatrayente de células endoteliales vecinas	VEGF-A

CTM = Células Troncales Mesenquimales
 FGF= Factor de Crecimiento Fibroblástico
 PDGF= Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
 TGF-β= Factor de Crecimiento Transformante Beta
 VEGF= Factor de Crecimiento Endotelio Vascular

Dentro de los factores que actúan sobre la remodelación ósea encontramos a las BMPs, TGF- β , FGF, PDGF, VEGF y el IGF-I. Estos factores interactúan y contribuyen en el proceso de reparación ósea(20).

En 1965, Urist revolucionó lo que hasta ese momento se conocía de la remodelación ósea, formulando la existencia de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) localizadas en la MEC. Los miembros de esta familia están divididos en al menos cuatro subgrupos por su secuencia aminoácida primaria. El primer grupo lo forman las BMP-2, BMP-4, el segundo grupo incluye a BMP-5, -6 y -7, el tercer grupo incluye a la BMP-12,-13 y -14. Finalmente, el cuarto grupo lo forman las BMP-3 (osteogénica) y la BMP-3b. La BMP-1 no es miembro de la superfamilia del TGF- β y juega un papel muy importante en la modulación de las BMPs ya que regula la acción de proteínas proteolíticas de las BMPs como Noggin(20).

Las BMP están estrechamente relacionadas estructural y funcionalmente, sin embargo, cada una tiene un papel único, así como un diferente patrón de expresión durante el proceso de remodelación ósea(3). También pueden estimular la síntesis y secreción de otros factores angiogénicos y osteogénicos como el IGF y el VEGF, respectivamente.

Los TGF- β , tienen cinco isoformas descubiertas., es producido por osteoblastos y condrocitos, además es almacenado en la MEC ósea. Este efecto es producido por receptores cinasa tipo uno y dos serina/treonina, que activan la vía Smad (Smad 2 y 3).

TGF- β es un potente estimulador quimiotáctico de CTM y aumenta la proliferación de preosteoblastos, condrocitos y osteoblastos, también induce la producción de proteínas de la MEC como la colágena, proteoglicanos, osteopontina, osteonectina y ALP. (21)

El factor de crecimiento derivado de plaquetas es un polipéptido homo o heterodimérico. La IL-1, TNF α , el TGF- β 1 afectan la unión de PDGF, es sintetizada por plaquetas, monocitos, macrófagos, células endoteliales y osteoblastos, también como un potente mitógeno para células de origen mesenquimales(22).

La familia del FGF consiste estructuralmente en nueve polipéptidos. Durante la remodelación ósea, este factor es sintetizado por monocitos, macrófagos, células mesenquimales, osteoblastos y condrocitos. FGF fue identificado durante etapas tempranas en la remodelación ósea y juega un papel crítico en el proceso de angiogénesis(16).

El IGF-I promueve la formación de la MEC (colágena tipo I y proteínas no colágenas) secretadas por osteoblastos diferenciados. Además promueve la síntesis de MEC cartilaginosa y proliferación celular(8).

También encontramos a las metaloproteasas (MMPs), la PTH y la hormona de crecimiento (GH). La PTH tiene un efecto catabólico sobre el tejido óseo, estimula de manera intermitente a los osteoblastos lo cual resulta en el incremento del tejido óseo. Se ha mostrado que la PTH aumenta la formación del callo y estimula la temprana proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras, incrementando la producción de proteínas de la MEC y aumentando la osteoclastogénesis. Por otro lado, la GH es una hormona sistémica y tiene efecto mediador de IGF. Además, se ha observado que estimula y acelera la osificación en los procesos de regeneración(23).

LA IMPORTANCIA DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA OSIFICACIÓN

La angiogénesis constituye el primer paso para la osificación: los vasos sanguíneos invaden el MEC y se produce la reabsorción ósea por los osteoclastos, procedentes de los vasos próximos. La neoformación vascular tiene un papel importante en la reparación de fracturas o de la regeneración ósea, ya que la presencia de oxígeno es fundamental para que se produzca una regeneración íntegra. Hamen en 1952 constató este fenómeno al observar que los osteocitos se mueren cuando están lejos de un capilar (la distancia máxima es de 0.1 mm) (7).

Los huesos adultos están bajo continua remodelación para mantener su integridad y estabilidad biomecánica. La remodelación ósea ocurre en dos fases importantes: Los osteoclastos regulan la resorción ósea y los osteoblastos median la nueva formación de hueso. Este proceso toma lugar en estructuras vascularizadas llamadas unidades de remodelación ósea. Estas unidades facilitan la interacción, célula-célula entre osteoblastos y precursores de osteoclastos(19)

Recientes estudios han sugerido que el desarrollo de los vasos sanguíneos en los hueso y la osteogénesis van de la mano, lo que indica la presencia de una comunicación molecular entre células endoteliales y células osteoblástica (19). Kusumbe et.al.,(17) identificó un nuevo subtipo capilar presente en el sistema óseo, procesando distintas propiedades morfológicas, moleculares y funcionales. Estos investigadores, demostraron que estos vasos sanguíneos, son capaces de generar un microambiente metabólico y molecular, mediando el crecimiento de la vasculatura ósea, manteniendo células osteoprogenitoras perivasculares y ensamblando osteogénesis con angiogénesis a través del HIF-1 y la activación de las vías Notch(17,24).

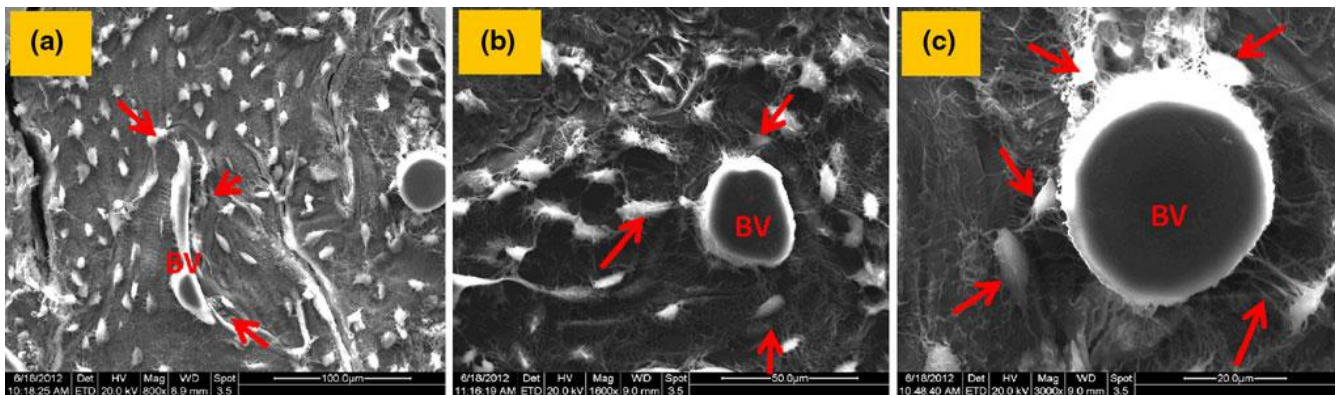


Figura 7. Asociación de vasos sanguíneos con osteocitos. (a) El osteocito muestra una estrecha relación con los vasos sanguíneos. La imagen es de un hueso cortical humano (flechas rojas señalan osteocitos, (BV) vasos sanguíneos). Observe la conexión del canalículo con el vaso sanguíneo (barra=100 lm) (b) que observa abajo (barra=50 lm) en un mayor acercamiento en c (barra=10 lm) utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) (25).

Sus resultados también demostraron que la abundancia de estos vasos y su asociación con las células osteoprogenitoras reducen considerablemente conforme avanza la edad. Además, un segundo estudio de este grupo de investigación estableció una conexión con la angiogénesis y osteogénesis, demostraron que la actividad de la vía de señalización Notch sobre el endotelio juega un papel crucial en promover la angiogénesis y la osteogénesis. La interrupción de la señalización Notch no solo produce una morfología anormal en vasos sanguíneos del hueso, sino también una reducción en la osteogénesis, defectos en condrocitos, acortamiento de huesos largos, pérdida de hueso trabecular y reducción de la masa ósea(17).

ANGIOGENESIS

Angiogénesis es el proceso mediante el cual el organismo produce nuevos vasos sanguíneos, a partir de células endoteliales de vasos pre-existentes, insertando pilares tisulares en los capilares existentes para formar nuevos vasos.

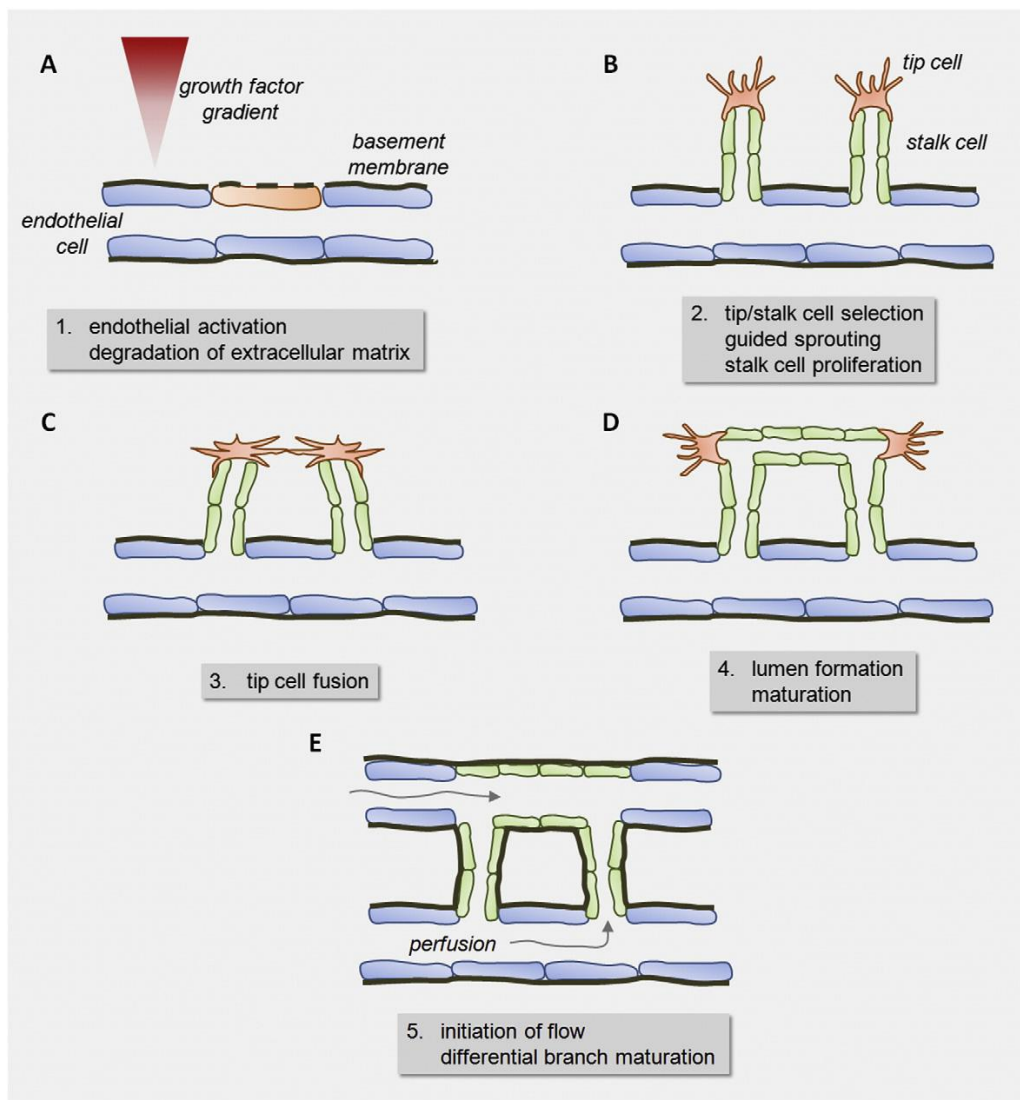


Figura 8. Formación de vasos sanguíneos. El primer paso de la angiogénesis es la presencia de factores de crecimiento angiogénicos que activan las células endoteliales para degradar la membrana basal (A) y seleccionar las células tope y tallo. Las células tope migran hacia el estroma de tejido mientras que las células tallo proliferan (B). Un lumen se forma por fusión de células tope (C-D) y el flujo la maduración (E) (26).

Muchas investigaciones se han enfocado en los mecanismos de angiogénesis después de que Judah Folkman propusiera la inhibición de la angiogénesis como tratamiento tumoral (27). Basados en estudios de arreglos genéticos, se sabe que la angiogénesis es una serie coordinada de eventos centrados en células endoteliales.

Se presentan "brotes" de vasos sanguíneos, los cuales son guiados por células endoteliales "células del tope" especializadas que son sensibles a estímulos angiogénicos (25), conectándose a células endoteliales de tallo que forman el tubo. La progresión de la angiogénesis se inicia por la destrucción local de la membrana basal y la disociación de los pericitos del capilar, seguida por la migración de células del tope hacia un estímulo

angiogénico. La proliferación y la alineación de las células endoteliales forman el tubo, estableciendo el lumen. Los pericitos, su asociación con células del músculo liso y la deposición de la membrana basal median estabilización del proceso (27).

Por lo tanto, la aparición de células endoteliales es el primero de una la secuencia de eventos durante la angiogénesis. Cuando un nuevo vaso sanguíneo es necesario en un tejido en crecimiento, la producción local de factores de crecimiento angiogénicos incrementa, lo que desencadena la degradación de células endoteliales en la base de MEC, un proceso mediado por MMPs. La acción de estas MMPs aumenta la respuesta angiogénica aumentando los factores pro-angiogénicos que se generan en la MEC. Atraídas por la señales angiogénicas, algunas células endoteliales se convierten en motiles y expresan filopodios(28).

Las llamadas células del tope forman un frente en el desarrollo del vaso; las células endoteliales organizadas son llamadas células de tallo. La llave es el VEGF que estimula a las células del tope induciéndolas y formando filopodia estimulando la vía de señalización del receptor VEGF (VEGFR). Esta filopodia en las células del tope censan el ambiente, guiándose a través del estroma. Las células de tallo están equipadas para formar tubos y puentes, mediante su alta capacidad proliferativa y la habilidad de estabilizar el recién formado lumen(15,27). Las células endoteliales en el tope o en las paredes son también dependientes de la vía Notch, en estrecha intimidad con la vía de señalización de VEGFR. En las células del tope, la señalización VEGF aumenta la expresión del ligando Delta-like 4 (DII4), un ligando Notch. Este ligando activa la señalización Notch alrededor de las células endoteliales, lo que impide su activación como células tope y favorece un fenotipo de células de tallo. Nuevos circuitos vasculares son creados por la interacción de dos células de tope vecinas (ejemplo: anastomosis). Estas conexiones son estabilizadas por muchos procesos incluyendo la deposición de MEC, el reclutamiento de pericitos, la reducción de la proliferación de células endoteliales y el incremento de la formación de uniones celulares. Además de la maduración del endotelio, los puentes vasculares son remodelados para hacerse más rígidos, tanto como el tejido lo necesite(28).

Durante los últimos años, varios investigadores han descubierto una gran cantidad de factores de crecimiento estimuladores de la angiogénesis que son importantes durante el desarrollo óseo y durante la reparación de fracturas. Muchos de estos factores estimulan la angiogénesis directamente por la inducción de factores incluyendo, VEGF, factor de

crecimiento placentario (PIGF), FGF y miembros de la familia del TGF β . Otros tienen propiedades angiogénicas y regulan muchas de las moléculas angiogénicas, por ejemplo BMPs, angiopoyetina, PDGF y miembros de la familia del factor de crecimiento parecido a la insulina(28).

El VEGF ha sido sugerido como el actor principal en la reparación ósea ya que frecuentemente se encuentra estimulado por la mayoría de factores osteoinductores. Se ha reportado que la inhibición de VEGF bloquea la actividad angiogénica de FGF y BMP-2 así como la inducción de diferenciación osteoblástica y la formación ósea por BMPs. La expresión de VEGF juega un papel importante en la movilización y reclutamiento de células endoteliales progenitoras, la diferenciación y proliferación de células endoteliales, así como el reclutamiento y supervivencia de osteoblastos, osteoclastos. La expresión de VEGF ha sido también reportada como la responsable del incremento directo de la hipoxia en osteoclastos. La vía del factor inducible por hipoxia (HIF) ha sido reportada como la responsable de incrementar directamente la expresión de VEGF. Los osteoblastos también expresan componentes de HIF-1 e inducen hipoxia lo cual puede incrementar la expresión de VEGF por parte de estas células pudiendo promover la angiogénesis y la osteogénesis(18).

Este factor juega un papel fundamental en la angiogénesis, promocionando la proliferación celular y el aumento de permeabilidad vascular. Es inducido por situaciones de hipoxia y se une a receptores tirosinquinasa (VEGFR) para estimular a factores angiogénicos(25).

El VEGF participa en procesos de osificación endocondral e intramembranosa, además no sólo está implicado en la angiogénesis ósea, sino también en otros procesos como la diferenciación a condrocitos y osteoblastos además del reclutamiento de osteoclastos(18,27,29). Los osteoblastos y osteoclastos afectan el mantenimiento y la movilización de células madre hematopoyéticas, además los osteoblastos controlan la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas. El crecimiento mal regulado o excesivo de VEGF tiene un impacto significativo en el sistema óseo produciendo patologías como artritis, sinovitis, osteomielitis y formación de osteocitos (osteoartritis, espondilosis deformante), en cambio cuando la expresión de VEGF se encuentra alterada o es insipiente produce osteoporosis o una deficiente regeneración ósea, así queda claro que la osteogénesis y la angiogénesis se regulan entre sí en condiciones fisiológicas y patológicas(18,30,31).

En la etapa temprana de la angiogénesis, la degradación de la MEC se produce en respuesta a estímulos angiogénicos. Dos clases de enzimas proteolíticas están principalmente involucradas en la degradación de la matriz: el sistema activador del plasminógeno/plasmina (PA) y las MMPs (26).

Una vez liberado, el VEGF puede unirse a sus receptores en las células endoteliales, osteoclastos y osteoblastos, al hacerlo, puede estimular su migración y actividad en el sitio de la lesión(25).

El VEGF también ha sido reportado como un regulador de la expresión del receptor RANK en células endoteliales, aumentando su reactividad al RANKL(30).

Se ha mostrado la importancia del RANKL en mantener la supervivencia de las células endoteliales vía de señalización Pi3K/Akt además de su fuerte estimulación a la angiogénesis.

Miembros de la familia del VEGF como el VEGF-A se considera uno de los mediadores más importantes en el proceso de angiogénesis, por otro lado encontramos al VEGF-C y VEGF-E que junto con PIGF incrementan y aceleran de manera importante la cicatrización ósea(25).

Los receptores VEGF (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, neuropilin-1 y -2) son expresados en células de linaje osteoblástico(17).

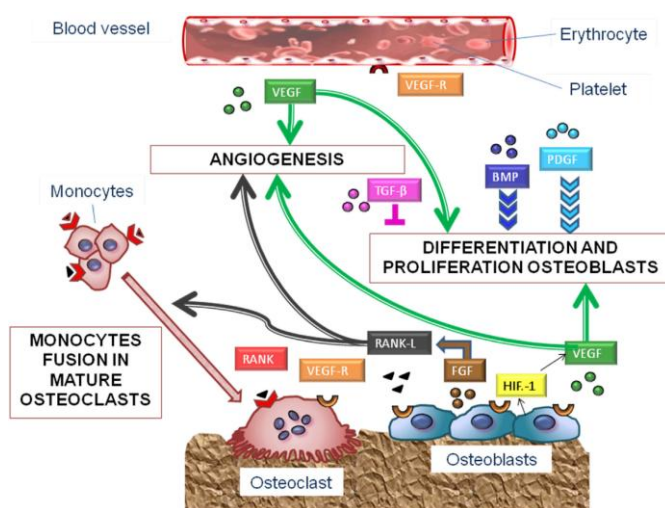


Figura 9. Microambiente durante la remodelación ósea(19)

El FGF es otro importante factor de crecimiento que induce la angiogénesis, contribuye significativamente al desarrollo, remodelación y reparación ósea. Es también un potente factor mitógeno para la diferenciación de células como fibroblastos, células endoteliales, células mesenquimales y osteoblastos. FGF es producido por una gran variedad de células

incluidas las células endoteliales, fibroblastos y osteoblastos. Los osteoblastos secretan FGF en respuesta a la estimulación de prostaglandina E2 y TGF- β . Este factor de crecimiento también induce la osteoclastogénesis regulando la producción de factores de la diferenciación osteoclástica como RANKL y COX-2(18,28).

Tanto el TGF- β y el PDGF son liberados en la degranulación de las plaquetas durante la cicatrización de fracturas. PDGF es capaz de estimular las vías angiogénicas y osteogénicas directamente o por el incremento de la vía de VEGF y posteriormente promoviendo las señales quimiotácticas y mitogénicas de los osteoblastos(17,19).

El TGF- β es un potente quimioatrayente para el reclutamiento y proliferación de CTMs y en posteriores etapas, es capaz de regular la diferenciación osteoblástica(28).

Diferentes estudios han mostrado que las BMPs (BMP-2,-4 y -7, proteína osteogénica 1) expresadas por células osteoprogenitoras, osteoblastos y MEC ósea, son capaces de promover la reparación ósea estimulando la proliferación y diferenciación de CTMs y células osteoprogenitoras. Además se ha reportado que la BMP-2, -4 y la proteína osteogénica 1 inducen angiogénesis estimulando la vía de VEGF(28,32).

La angiogénesis y la inflamación son procesos distintos que pueden ocurrir de manera independiente, sin embargo en algunos casos son codependientes, debido a que la angiogénesis puede estimular e intensificar la respuesta inflamatoria aportando nutrientes y oxígeno en sitios inflamatorios, y algunos factores angiogénicos ejercen actividad proinflamatoria. Por el contrario, en la inflamación crónica, las células inflamatorias producen citocinas y factores de crecimiento que puede afectar las funciones de las células endoteliales(26,33,34).

La angiogénesis y la inflamación están asociadas a la proteína TIE2 (receptor tirosin-cinasa) involucrada con las vías de señalización del factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la angiopoyetina (Ang). TIE2 es expresada casi exclusivamente por células endoteliales, promoviendo su migración, germinación y supervivencia; además promueve el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas. Existen dos tipos de angiopoyetina la Ang-1 inhibe la permeabilidad vascular y ejerce efectos antiinflamatorios, puede actuar en células no endoteliales como monocitos y macrófagos. La Ang-2 tiene un efecto antagónico, ya que no se incorpora a la MEC e interrumpe la formación de vasos sanguíneos(26,33).

ENDOTELIO VASCULAR

Se pensaba que el endotelio solo era una cubierta vascular, sin una función específica, más que poseer permeabilidad selectiva para agua y electrólitos. Sin embargo los enormes avances desde 1980 han permitido comprender las complejas funciones de este tejido (29).

Las células del endotelio vascular cubren a todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta los pequeños capilares. Entre sus funciones podemos encontrar la filtración de fluidos, como en el caso de los glomérulos en los riñones, el sostén de los vasos sanguíneos, la homeostasis, el reclutamiento de neutrófilos y el acarreo de hormonas. Además se sabe que tienen la habilidad de tener capacidades sensitivas y efectoras (25,29).

El papel del endotelio se ve afectado por la unión a numerosas moléculas incluidas proteínas, partículas transportadoras de lípidos, metabolitos, hormonas, así como a través de interacciones célula-célula y célula-matriz(28).

Las células endoteliales también juegan un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo, esto se lleva a cabo por la capacidad quiescente que tienen estas células al generar una superficie antitrombótica que facilita el tránsito de plasma y constituyentes celulares a través de la vasculatura. El flujo sanguíneo es regulado también, a través de la secreción de sustancias vasoactivas que actúan de manera paracrina para contraer o dilatar de manera específica los vasos sanguíneos en respuesta a un estímulo(28,35).

Actualmente se sabe que el endotelio controla la trombosis y trombolisis, la interacción de plaquetas y leucocitos con la pared del vaso sanguíneo, la regulación del crecimiento y tono vascular(28,36).

Bajo condiciones fisiológicas, las células endoteliales previenen la trombosis a partir de diferentes mecanismos anticoagulantes y antiplaquetarios. Estas células están involucradas en la activación de todas las vías de mantenimiento hemostático, por ejemplo, una vez que se ha perdido la integridad vascular a través de algún daño, las células endoteliales limitan estas áreas promoviendo la formación de un coagulo para restaurar la integridad vascular. Si se llega a romper este complejo balance entre los sistemas pro-cuagulante y anti-coagulantes por daños genéticos o adquiridos puede resultar en hemorragias o trombosis(36).

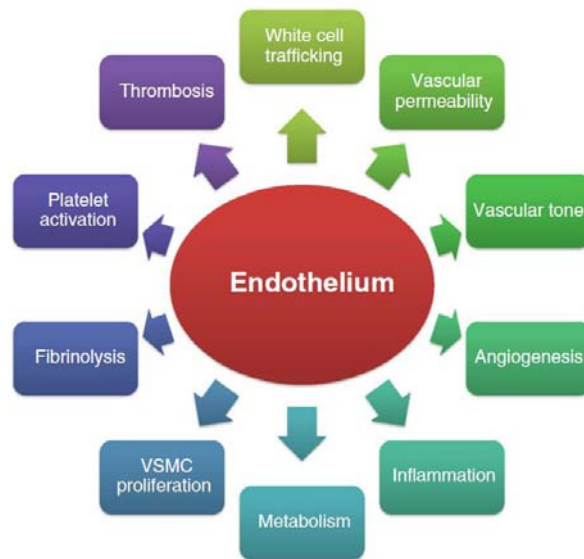


Figura 10. Múltiples funciones del endotelio vascular (36)

La heterogeneidad endotelial asegura una adecuada homeostasis en diferentes órganos y partes del sistema vascular. Esta heterogeneidad también explica las diversas respuestas patológicas que afectan la integridad vascular(29).

La gran mayoría de las células endoteliales están localizadas en los microvasos, por lo tanto no es sorpresa que estas células jueguen un papel importante en las enfermedades microcirculatorias como microangiopatías y coagulación difusa intravascular en la que el endotelio se encuentra en una interface entre la inflamación y la activación inapropiada del sistema de coagulación(35).

En el estado quiescente de estas células, mantienen el flujo sanguíneo promoviendo la actividad de numerosas vías anticoagulantes, incluidas la vía proteína C/proteína S. El TNF suprime la formación de trombomodulina, un cofactor endotelial anticoagulante e induce la expresión del factor tisular, que es un cofactor procoagulante. Estos cambios pueden permitir la formación de fibrina permitiendo la formación de un foco de inflamación pero seguir manteniendo un flujo sanguíneo en el área subyacente(18).

Desde hace más de 100 años fue descrito la interacción de leucocitos en las paredes vasculares y su incremento en procesos inflamatorios. Actualmente se sabe que la adhesión plaquetaria y el rodamiento leucocitario sobre el endotelio vascular representan el inicio del proceso de extravasación de células del sistema inmune a los sitios de inflamación o infección, la interacción plaqueta-leucocito y la agregación en la superficie trombogénica y finalmente la oclusión vascular(28,37).

El reclutamiento de plaquetas y leucocitos a los sitios de daño vascular es una respuesta rápida mediada por el aumento de componentes elaborados en el endotelio, incluyendo a los cuerpos Weibel-Palade y sus constituyentes: el factor Willebrand y la P-selectina, que son los promotores más activos de adhesión plaquetaria y leucocitaria(37).

Las células endoteliales también juegan un papel importante como barrera física y como una reserva de una gran variedad de sustancias regulatorias. El óxido nítrico y la prostaciclina derivados del endotelio son liberados en respuesta a estímulos físicos, hormonas y sustancias derivadas de la degranulación plaquetaria e inducen la relajación vascular e inhiben la función plaquetaria. Algunas sustancias pueden producir la hiperpolarización de las células musculares, además las células endoteliales pueden aumentar muchos otros factores que inducen la contracción, por ejemplo, la endotelina, el tromboxano A₂, la angiotensina II, etc. También pueden ser fuente de heparin y heparin sulfatos, factor de crecimiento derivado de plaquetas y trombospodina(28,38).

El endotelio vascular está involucrado en la formación de vasos sanguíneos. El desarrollo de una red vascular funcional requiere de diferentes grados de coordinación entre diferentes tipos celulares que producen complejos cambios siguiendo señales específicas entre ellas(37).

Como se mencionó anteriormente el VEGF es un factor de crecimiento que actúa casi específicamente sobre el endotelio vascular, además tenemos a la angiopoyetina (Ang) y algunos miembros de la familia de las efrinas, las cuales permiten la formación, remodelación y maduración del endotelio vascular, de las células músculo-liso y los pericitos(19,37).

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Cualquier perturbación que afecte la capacidad y equilibrio del endotelio vascular en su actividad metabólica puede causar una disfunción endotelial, lo cual contribuye al desarrollo y progresión de diferentes enfermedades.

Las células endoteliales producen mediadores inmunológicos y provocan cambios morfológicos en respuesta a un estímulo inflamatorio. Los mediadores inflamatorios incrementan la permeabilidad y promueve la adhesión leucocitaria a las células endoteliales y su interacción con receptores permitiendo la migración transendotelial de los leucocitos a los sitios inflamados(36,37).

La inflamación induce disfunción endotelial, lo cual fue observado en algunas enfermedades autoinmunes, ya que anticuerpos anti-endoteliales causan una activación anormal del sistema inmune que activa células endoteliales, aumentando la adhesión molecular y citocinas, produciendo inflamación, incrementando la permeabilidad del endotelio, trombosis y apoptosis celular, que son en parte, responsables de la disfunción endotelial(36).

En algunos casos, una sobre producción de ON ocurre como respuesta inflamatoria, producida por un shock séptico asociado a infecciones severas y sepsis, caracterizadas por presencia de hipotensión, daño endotelial, falla multiórganica y muerte. Los productos bacterianos, incluyendo a las endotoxinas de bacterias gram negativas y moléculas análogas en las paredes de las bacterias gram positivas y hongos, activan dramáticamente a las células mononucleares aumentando las citocinas que incrementan a los receptores de la bradiquinina B1, al ON sintetasa y al COX-2, que incrementan al ON y a la prostaglandina E2(26,36,38).

La edad avanzada consiste en una serie de complejas modificaciones estructurales y funcionales del sistema vascular, provocando una disfunción del endotelio y de las células musculo-liso. La edad en las células endoteliales está asociada con la disminución de síntesis de ON y una gran sensibilidad a la apoptosis (11,39).

Los métodos utilizados en la práctica clínica para evaluar la disfunción endotelial incluye métodos invasivos utilizando angiografía y sistema Doppler intra-coronario, por otro lado contamos con los métodos no invasivos incluyendo la pletismografía de oclusión venosa para medir el flujo sanguíneo en el antebrazo y la tonometría arterial periférica que mide los cambios de volumen pulsátil en el dígito distal. Además se pueden evaluar algunos biomarcadores como la endotelina-1, E-selectina, factor Von Willebrand, trombomodulina,

moléculas de adhesión intracelular y moléculas de adhesión celular sin embargo ninguna de ellas suele ser específica(36).

LESIONES ÓSEAS INVOLUCRADAS

Obtener una clasificación y terminología de las lesiones óseas de la mandíbula y del maxilar ha sido difícil. Es por eso que, para nuestros fines, los trastornos incluidos se han clasificado en dos apartados: Lesiones óseas inflamatorias y Lesiones fibro-óseas no inflamatorias.

LESIONES ÓSEAS INFLAMATORIAS

Las lesiones óseas inflamatorias (LOI) son un grupo de enfermedades intraóseas que se caracterizan por la inflamación de sus espacios medulares y comparten características microscópicas similares. La inflamación que las caracteriza no necesariamente se debe a una infección bacteriana del hueso o de la medula ósea. Sin embargo, muchas de estas lesiones están relacionadas con infecciones bacterianas que afectan al hueso maxilar o mandibular a través de un diente no vital, lesiones periodontales, o lesiones traumáticas. Esto, acompañado con los factores locales de los pacientes, determina la apariencia clínica, la extensión del proceso inflamatorio y la velocidad con que la infección se desarrolla. La Osteomielitis agrupa por definición a la mayoría de estas lesiones, su división consiste esencialmente en las diferentes formas de abordaje, tratamiento y pronóstico de cada una. Es importante tener en claro sus características clínicas y radiográficas para elaborar apropiadamente diagnósticos diferenciales con otras lesiones óseas. La patogenia de estas lesiones está bien resuelta, sin embargo, la patogénesis sigue siendo un enigma. Puede estar relacionado con la interrupción del suministro de sangre al hueso, bien por el bloqueo, el trauma, o la presión intraósea mayor(40,41).

OSTEOMIELITIS AGUDA

Es una inflamación aguda del hueso y de la medula ósea de la mandíbula y la maxila resultado común de la extensión de abscesos periapicales. La segunda causa más común son las lesiones físicas como fracturas o cirugías. La osteomielitis también puede ser resultado de una bacteremia. La mayoría de los casos de osteomielitis aguda son infecciones. A pesar de que casi todos los microorganismos pueden ser parte de la etiología de esta lesión, el *staphylococco* y el *estreptococco* son identificados con frecuencia(41).

El dolor es la primera característica de este proceso inflamatorio. La presencia de pirexia, linfadenopatía, leucocitosis y otros signos y síntomas de infección aguda son comunes. La

parestesia del labio inferior puede ocurrir en lesiones mandibulares. Se deben tomar en cuenta las neoplasias malignas mandibulares en el diagnóstico(41).

Para ser visible en una radiografía convencional, la lesión debe encontrarse un 60% desmineralizada. Histológicamente se puede observar la presencia de exudado purulento en los espacios medulares, el hueso trabeculado muestra una disminución en la actividad osteoblástica e incrementa la resorción osteoclástica, se observan zonas de necrosis (secuestros óseos), osteocitos ausentes y la médula ósea en proceso de licuefacción(31,41). La osteomielitis es tratada con antibióticos y drenaje. Idealmente, el agente causal es identificado por estudios de laboratorio facilitando la selección del antibiótico a través de pruebas de sensibilidad. Es común que al llevar a cabo una simple secuestromía de excisión y remplazo por hueso autólogo(41).

OSTEOMIELITIS CRÓNICA

La osteomielitis crónica puede ser una secuela de la osteomielitis aguda (no tratada o inadecuadamente tratada) o puede ser el resultado de una reacción inflamatoria de bajo grado que ha tenido una larga duración que nunca tuvo una notable fase aguda. La localización, el estado inmunológico, el estado nutricional, la edad del paciente, así como también la presencia de factores pre-existentes sistémicos, como la enfermedad de Paget y la osteoporosis son otros factores que afectan la presentación y el curso de esta lesión (42,43).

La identificación de los agentes infecciosos específicos involucrados en la osteomielitis crónica es difícil a través de microscopía o microbiológicamente, ya que las lesiones son pequeñas, es difícil buscar el foco bacteriano, o simplemente por la contaminación con la flora bacteriana residente. Antibióticos previamente ingeridos pueden reducir la posibilidad de cultivar el agente causal. A pesar de que aún no se ha confirmado un agente causal, muchos investigadores creen que las bacterias como, *staphylococco*, *streptococco*, *bacteriodes*, *actinomyces*, son los responsables de la osteomielitis crónica (42,44).



Figura 11. Aspecto radiográfico de la osteomielitis crónica en la zona de extracción del tercer molar

OSTEONECROSIS

La osteonecrosis se refiere a la muerte *in situ* de hueso, es una enfermedad causada por la disminución de flujo sanguíneo en los huesos, la falta de sangre deteriora y destruye el hueso (7). En la osteonecrosis, el hueso se deteriora más rápidamente y la regeneración ósea se retrasa por lo que las células óseas no son capaces de formar hueso nuevo a la misma velocidad del que se está perdiendo. La osteonecrosis también puede ocurrir sin motivo aparente, aún si la persona no presenta otros problemas de salud(40). Actualmente el interés de los estudiosos de esta patología, se centra en mutaciones genéticas que conducen a una falla endotelial, produciendo hipercoagulación, la cual se traduce en microtrombosis y osteonecrosis cuando actúan ciertos factores ambientales (epigenéticos). Los pacientes que sufren la llamada osteonecrosis idiopática, son quienes probablemente tienen algún tipo de alteración de la coagulación que no ha sido identificada(45).

Al comienzo, es posible que estas lesiones no presenten síntomas, a medida que la enfermedad avanza el dolor puede ser de leve a moderado. El tiempo que transcurre entre el comienzo de los síntomas y la pérdida de la función puede ser de meses o más de un año(41). La enfermedad se sospecha en base a la historia clínica del paciente, la exploración física, y radiografías. Radiográficamente se observa el signo de la media luna, que consiste en el colapso del segmento necrótico(40). Esta media luna se provoca debido a la poca densidad que presenta el hueso, haciendo visible la pérdida ósea en la zona(46). La resonancia magnética es un método especialmente sensible. Exploraciones iniciales muestran una deficiencia de fotones en el sitio de la necrosis con hiperemia circundante. En cuestión de semanas, esto se convierte en un señal uniforme. Con el tiempo, esta señal puede variar para reflejar que la revascularización se está produciendo(41). El diagnóstico de

estas lesiones se confirma mediante biopsia, aunque no es del todo necesaria. El hueso necrótico se identifica por trabéculas óseas anucleadas a menudo en el contexto de infarto de médula(40).

El tratamiento consiste en la remoción quirúrgica del tejido afectado, esto ayuda disminuir las posibilidades de que el hueso se destruya. Sin tratamiento, la mayor parte de los pacientes que padecen este tipo de lesiones, sufren de dolor fuerte. A corto plazo el tratamiento implica terapia antibiótica, anti-inflamatorios, ejercicios, y la limitación de movimiento

La perforación del segmento dañado se ha intentado en un esfuerzo para "descomprimir" la zona, y para llevar el suministro vascular a ella. Esto se puede combinar con una biopsia, entonces se considera que ambas medidas como diagnósticas y terapéuticas. A pesar de la popularidad de este procedimiento, hay muy poco beneficio en él (42).

OSTEORRADIONECROSIS

El hueso irradiado como parte del tratamiento de cáncer en cabeza y cuello es particularmente susceptible a infección. Debido a que se reduce la vascularidad y produce la destrucción osteocítica, la osteoradionecrosis puede ocurrir en más del 20% de pacientes que se encuentran bajo radiación; generalmente una infección secundaria la acompaña. Comúnmente necesita un evento desencadenante como la inflamación periapical de dientes no vitales, extracciones, enfermedad periodontal y eventos que ulceren la mucosa. Radiográficamente se observa como una lesión radiolúcida que muestra zonas opacas focales. Los patrones radiolúcidos se caracterizan por una apariencia moteada. Las lesiones pueden ser muy extensas y sus márgenes pueden ser muy diferentes (41,44).

El tratamiento consiste en la selección apropiada del antibiótico y la adecuada intervención quirúrgica. Ocasionalmente la combinación antibiótica es mejor que utilizar un solo antibiótico. Cuando el secuestro óseo se desarrolla, la remoción quirúrgica es mejor para promover el proceso de cicatrización. En los casos de que la lesión fuera muy extensa y exista posibilidad de fractura patológica, la inmovilización es requerida (42,44).

Se ha observado que el uso de oxígeno hiperbárico ha proporcionado un beneficio para los pacientes, estimulando la proliferación vascular, síntesis de colágena y osteogénesis (41).



Figura 12. Radiografía de paciente con Osteorradionecrosis (41)

OSTEONECROSIS ASOCIADA CON EL USO DE MEDICAMENTOS

Esta lesión fue definida por la Asociación Americana de Cirujanos Orales y Maxilofaciales (por sus siglas en inglés, AAOMS), como un área expuesta de hueso en la región maxilofacial que no sana en un lapso de 8 semanas después del diagnóstico médico, en un paciente que recibía o había estado expuesto a medicamentos antirresortivos o antiangiogénicos, sin antecedentes de radioterapia en cabeza y cuello(47).

Los fármacos relacionados con la Osteonecrosis Asociada con uso de Medicamentos (OAM), son los antirresortivos, como el Denosumab y Bifosfonatos, mientras que encontramos al Bevacizumab como medicamento antiangiogenico(48,49).

Se han propuesto hipótesis que tratan de explicar porque la localización específica en los huesos maxilares de la OAM, incluyendo la remodelación ósea alterada, inhibición de la angiogénesis, microtrauma constante, inmunosupresión, toxicidad de tejidos blandos y la respuesta inflamatoria ante infección(49–51).

La diferenciación y función osteoclástica juega un papel vital en la cicatrización y remodelación esquelética, sin embargo la OAM se ve afectada. Esto puede deberse a que el rango de remodelación ósea en estos huesos está incrementada debido a que se encuentra sometida a fuerzas de masticación continuas (51).

Histológicamente, es parecida a la que se observa en la osteorradionecrosis, la producida por BFs alterna zonas muertas con nidos residuales de hueso vital. Existe infiltrado inflamatorio, fibrosis en los espacios medulares y obliteración de vasos sanguíneos. También se observa una transformación pseudoepiteliomatosa en lugar del hueso necrótico(52,53).

El tratamiento consiste en debridación quirúrgica, resección ósea, terapia antibiótica y extracción de órganos dentarios sintomáticos(53).



Figura 13. Apariencia clínica de Osteonecrosis asociada al uso de medicamentos. Notese la exposición ósea (41)

LESIONES FIBRO-ÓSEAS NO INFLAMATORIAS

Las lesiones fibro-óseas (LFO) son un grupo de enfermedades intraóseas que comparten características microscópicas similares como la presencia de un estroma fibroblástico que contiene combinaciones de tejido parecido a hueso o cemento además de presentar otras estructuras calcificadas. Algunas LFO son únicas en su localización ya que no se presentan en otros huesos del cuerpo (54).

Por definición todas las LFO poseen un componente óseo y fibroso- Estas variantes son únicas en cada lesión por lo que no solo pueden ser catalogadas por su apariencia clínica. Esencialmente el componente estromal de las LFO puede ser bastante homogéneo conteniendo gran cantidad de fibroblastos con apariencia monomórfica, conteniendo otras áreas con un estroma maduro o colaginoso presentando otros patrones fibroblásticos. La osificación que presentan puede ser bastante heterogénea dependiendo del tipo de lesión. Muchas LFOs muestran MEC trabecular irregular dependiendo también del tiempo de la lesión, ya que el proceso de formación en etapas tempranas presenta osteoblastos rodeando las trabéculas óseas de manera más prominente que en lesiones antiguas o con una larga evolución en donde el estroma también se observa maduro(54,55).

Tabla 2. Patrones clínicos, radiográficos y microscópicos que distinguen a las lesiones fibroósas benignas(54,56)

Tipo de lesión	Características clínicas	Características radiológicas	Histopatología
Displasia Fibrosa	Presenta expansión ósea unilateral, dolor, puede presentarse de manera mono o poliostótica	Apariencia de vidrio esmerilado o patrón radiolúcido difuso	Apariencia trabeculada “de letras chinas/hebreas”
Fibroma osificante no especificado	Presenta expansión ósea, dolor, rara vez se presenta multifocal	Se observan áreas radiolúcidas circunscritas o desencadenadas por divergencia de raíces	Apariencia trabecular cementificada
Fibroma osificante variante trabecular	Presenta expansión ósea, dolor, divergencia radicular, agresiva	Se observan áreas radiolúcidas circunscritas con opacidades foculares	Apariencia trabecular con presencia de células gigantes y fibroplasia
Fibroma osificante psamomatoide	Presenta expansión ósea, se presenta solo en huesos faciales, agresiva	Se observa circunscrita con zonas de opacidades foculares densas	Se observan cuerpos de psamoma

DISPLASIA FIBROSA

La Displasia Fibrosa (DF) es una anomalía displásica esquelética en donde el hueso normal es modificado, reemplazado por un hueso inmaduro inadecuadamente mineralizado y tejido fibroso. Este padecimiento puede afectar uno (monostótico) o varios huesos (poliostótico)(54).

La DF es una condición no hereditaria provocada por la mutación dominante que activa la subunidad α de la proteína G (GS α) de manera temprana en el desarrollo óseo. La activación de la mutación poscigótica de la subunidad de la GS/ α permite una distribución tipo mosaico de las células que activan de manera constitutiva la adenil-ciclase. La mutación del gen GNAS1 localizada en el loci 20q 13.2–13.3 que transcribe para la proteína GS/ α ha sido localizada en todos los pacientes reportados. La mutación puntual resulta en una sustitución de los residuos de arginina en la posición 201 por histidina o cisteína. Esta mutación es identificada en el síndrome McCune-Albright, en la DF poliostótica así como también en la DF monostótica (54). La displasia fibrosa también ha sido asociada con mixomas intramusculares, reconocido como el síndrome Mazabraud.

Tabla 3. Presentación de la Displasia Fibrosa (56)

	Huesos involucrados		Pigmentaciones Café au Lait	Desordenes Endocrinos	Masas de tejido blando
	Uno	Varios			
Monostotico	X				
Poliostotico		x			
Síndrome McCune- Albright		x	x	x	
Síndrome Mazabraud		x			x

La historia natural de la displasia fibrosa depende de la forma en la que la enfermedad se presente. Las lesiones monostoticas son las más frecuentes, a comparación de las lesiones poliestoticas que son menos comunes. En la adolescencia temprana los pacientes que tienen DF poliestotica pueden presentar deformidades severas y fracturas patológicas. El desarrollo precoz de las características sexuales secundarias es común en pacientes que presentan el síndrome McCune-Albright, las lesiones óseas en estos pacientes suelen ser más grandes, persistentes y asociadas a más complicaciones. Las pigmentaciones café au lait, relacionadas con estos pacientes, frecuentemente se encuentran en el área troncal o en las extremidades.

La mayoría de lesiones monostoticas son asintomáticas y son descubiertas cuando se realizan radiografías por otras indicaciones que involucraban la región(57).

Clínicamente, el paciente presenta dolor óseo, deformidad, algunas veces fractura, a la exploración el hueso afectado es compresible, de color blanco grisáceo que tiene una textura arenosa cuando se corta. La apariencia radiográfica de las lesiones depende del estadio de la enfermedad. En lesiones tempranas tiene una apariencia radiolúcida con presencia de calcificaciones difusas que se presentan radiopacas. Estas lesiones son típicamente una mezcla de radiopaco/radiolúcido con apariencia característica de “ground glass” o vidrio esmerilado(57).

Histológicamente, el hueso es reemplazado con células fibroblásticas que contienen patrones dispersos, usualmente se observa presencia de hueso trabecular interactuando directamente con el estroma fibroso. Atípicamente se pueden encontrar nodulos de cartílago hialino. Se observa hueso trabecular inmaduro, sin la presencia de células osteoblasticas a su alrededor, inmerso en un estroma fibroso de células displasicas sin presentar características de malignidad. La impresión general es de un invariable número de inmadura, no orientada, desconectada trabecula displasica inmersa en células mesenquimales inmaduras con poca

colágena. El patrón ha sido descrito como “sopa de letras” o “letras chinas/hebreas”. También se logran observar una multitud de delicados capilares atravesando la lesión y cuando son lesionados incitan un proceso de reactividad célula-gigante(54).

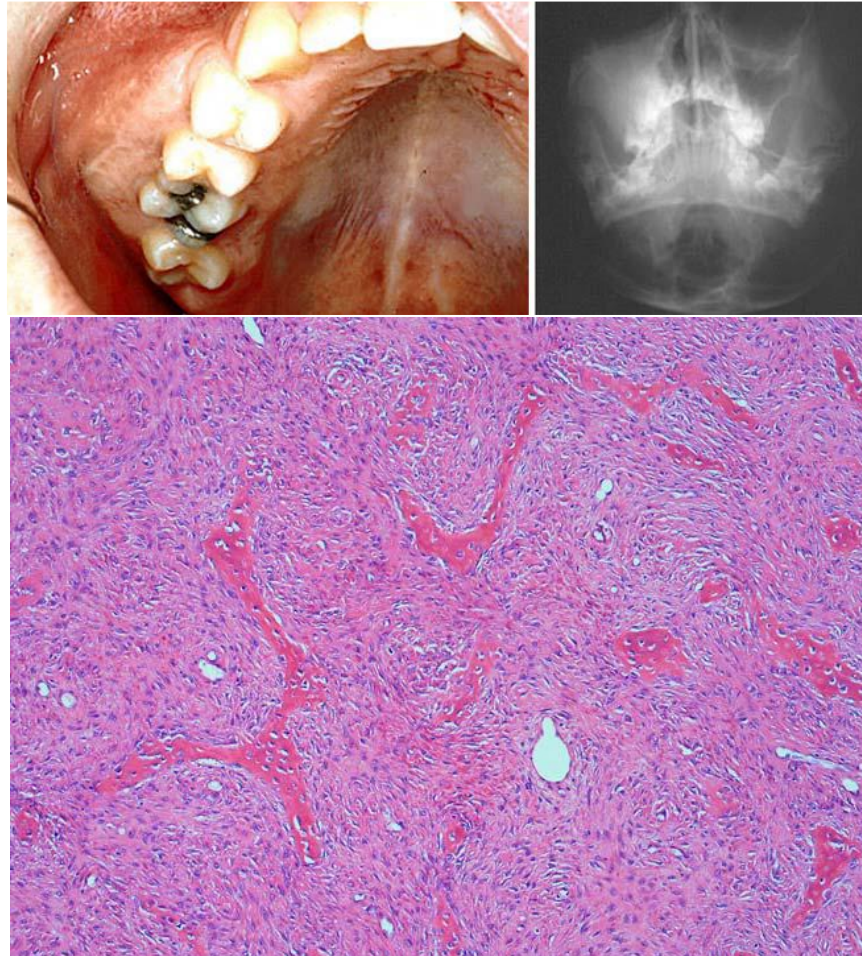


Figura 14. Características clínicas, radiográficas e histológicas de la Displasia Fibrosa, mostrando el patrón característico de trabéculas óseas rodeadas de un primitivo y bizarro estroma mesenquimal (57)

La DF afecta a niños y a jóvenes adultos, no como el fibroma cemento-osificante que ocurre solo en adultos mayores, además radiográficamente, la DF presenta bordes poco definidos(41,54).

Muchos casos de DF craneofacial se convierten en quiescentes después de la pubertad. Sin embargo, el crecimiento persistente en la edad adulta según se ha reportado. El contorno del hueso afectado vuelve a su dimensión original. La repetición del tratamiento puede ser necesaria en un pequeño porcentaje de pacientes. La escisión parcial seguida de injerto óseo o implantes autólogos pueden lograr una reducción en la tasa de recurrencia.

La malignización se ha reportado en algunos casos de DF, la mayoría de los cuales son el osteosarcoma y con menor frecuencia, fibrosarcoma, o condrosarcoma (54).

FIBROMA OSIFICANTE

El fibroma osificante término que se utiliza para describir una lesión benigna fibrosa productora de hueso. Las lesiones pueden diferir en su presentación clínica, lugar de predilección, sexo, distribución por edad y apariencia microscópica(57).

En 1968, Hammer analizó 249 casos de lesiones fibroóseas provenientes de la membrana periodontal y las clasificó. En 1973, Waldron y Giansanti reportaron 65 casos y concluyeron que este grupo de lesiones podrían provenir de células del ligamento periodontal. En 1985, Eversole, describió las características radiográficas del fibroma osificante central, y sus dos patrones, patrones uniloculares y multiloculares radiolucidos(55).

El fibroma osificante es clasificado como una lesión benigna que puede afectar tanto a la mandíbula como a la maxila. Esta lesión presenta una alta celularidad, tejido fibroso y varias formas de tejido calcificado parecido a hueso, cemento o ambos(56).

Radiográficamente estas lesiones aparecen como defectos radiolúcidas que pueden ser uni o multiloculares. La mayoría de estas lesiones se observan en adultos mayores con una marcada predilección por mujeres. Existe una considerable variación en el comportamiento clínico.

El fibroma osificante se separan en dos principales entidades clínicas:

Fibroma osificante de origen Odontogénico:

A. Fibroma trabecular óseo juvenil

B. Fibroma óseo juvenil psamomatoide.

La familiaridad con estas entidades no es sólo de interés académico, ya que su clasificación puede influir en su adecuada intervención y tratamiento(56).

El fibroma óseo juvenil afecta principalmente a niños y adolescentes. Se presenta principalmente entre los 8.5-12 años, hombres y mujeres se ven igualmente afectados. Clínicamente la lesión se caracteriza por la progresión a veces rápida del hueso afectado. En la maxila es común la obstrucción de los pasajes nasales y epistaxis (55,56).

La lesión es expansiva y bien marcada, con engrosamiento cortical y posible perforación. La lesión muestra diferentes grados de radiolucidez u opacidad dependiendo de la calcificación

del tejido que contiene. En esta lesión está bien descrita la apariencia radiográfica parecida a vidrio esmerilado multilocular(54,57).

Histológicamente se caracteriza por presentar un patrón de estroma que rodea al hueso, se observa la pérdida de arquitectura con estroma hiper celular compuesto de células alargadas con producción de colágena. Constituye una MEC osteoide directamente del estroma fibroso que ha sido descrita como manchas de pintura. La mineralización irregular resulta de la producción de hueso inmaduro de los osteoblastos que no muestran evidencia de maduración, además se observan agregados de células gigantes osteoclasticas inmersas en el estroma. Ocasionalmente se observan mitosis y quistes de hueso aneurismal. En casos en los que se han reportado múltiples recurrencias se recomienda la escisión conservativa(58).

El fibroma óseo juvenil psamomatoide afecta a los huesos craneofaciales. La lesiones están particularmente afectando huesos periorbitales, frontales y etmoides. La incidencia varía de los 16 a los 33 años. Sin embargo se han reportado casos fuera de estas edades desde 3 meses de edad hasta 72 años, y no muestra una predilección por género(56).

Clínicamente, esta lesión se manifiesta como una expansión ósea que puede involucrar los huesos de la órbita, los huesos nasales y los senos nasales. La expansión del tumor puede resltar en presencia de proptosis, síntomas visuales y obstrucción nasal(55).

Radiograficamente, se presenta como una lesión osteolítica bien definida, cambios escleróticos con apariencia de vidrio esmerilado. Esta lesión puede medir de 2 a 8 cm de diámetro y tener una apariencia multilocular a la evaluación con tomografía computarizada.

Histologicamente se observan multiples pequeñas y uniformes formas de osificación (cuerpos psamomatoides) embebidos en un estroma celular compuesto por células alargadas. Los cuerpos psamomatoides son basofílicos y tienen una apariencia de cemento dental. A la periferia de la lesión estas estructuras pueden coaleser y formar hueso trabecular. La degeneración cística y la formación de quistes óseos aneurismales pueden ocurrir. Se ha observado que existen múltiples recurrencias después de una cirugía con escisión completa (56).

Las lesiones óseas tienen un impacto altamente nocivo en la calidad de vida de los sujetos que las padecen, por lo tanto, entender los mecanismos de reparación ósea es importante. La regeneración de tejidos óseos requiere la participación oportuna de CTM al sitio de la lesión, la diferenciación de estas células, y el restablecimiento de una red vascular para

mantener la viabilidad celular, además de otros factores como la presencia de un andamio (hidroxiapatita, moléculas de la MEC), la expresión de moléculas solubles (citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, iones, vitaminas) y estímulos mecánicos(2,26,32). Cualquier disturbio en estos eventos puede tener un efecto perjudicial en el proceso de reparación ósea. Se sabe que el potencial de regeneración del hueso humano es limitado, ya que si la extensión de la lesión es amplia éste no se lleva a cabo(32). Aunque los aspectos morfológicos son bien conocidos, son menos entendidos los procesos moleculares y celulares involucrados en la reparación ósea. Posterior a que se produce una lesión ósea, la hipoxia e inflamación resultante inducen la vascularización, estimulando el crecimiento vascular dentro del tejido lesionado, mientras que las CMM's perivasculares pueblan el sitio de la herida bajo condiciones hipóxicas(26,59).

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS PARA EL ESTUDIO DE TEJIDO ENDOTELIAL

Las herramientas histológicas han sido muy útiles en el estudio del endotelio vascular, entre ellas podemos encontrar técnicas como: Hematoxilina y Eosina, tricrómica de Masson, tinción de Gallego, tinción de Van Giesson, pentacrómica de Movat, entre otras. Además métodos más específicos como la inmunohistoquímica y la inmofluorescencia pueden ser utilizados para identificar proteínas relacionadas con los vasos sanguíneos como CD31, CD34, actina α de músculo liso y VEGF.

Entre los que fueron de nuestro interés por su accesibilidad se encuentran:

HEMATOXILINA Y EOSINA

Esta tinción es ampliamente usada en procedimientos histológicos. Su popularidad se basa en simplicidad y capacidad de demostrar claramente un enorme número de diferentes estructuras tisulares. La hematoxilina puede ser preparada de diferentes formas y cuenta con una amplia aplicabilidad en tejidos de diferentes sitios. Esencialmente, los componentes de la hematoxilina tiñen los núcleos celulares de azul-negro, llegando a mostrar detalles intracelulares, mientras que la eosina tiñe el citoplasma celular y fibras de tejido conectivo en una variedad de intensidades que abarcan el rosa, anaranjado y rojo (5).

Tabla. 4 Procedimiento de rutina para tinción con Hematoxilina y Eosina (5)

Método	
<ol style="list-style-type: none">1. Desparafinar los cortes, rehidratar a través de alcoholes descendientes hasta llegar a agua.2. Remover los pigmentos de fijación si es necesario3. Teñir con hematoxilina de Harris. El tiempo en este paso dependerá del tamaño y tipo de tejido.4. Realizar lavados rápidos con agua hasta observar los cortes azules por menos de 5 minutos.5. Diferenciar en 1% de alcohol ácido (1% HCl en 70% alcohol) de 5-10 segundos.6. Lavar bien dejando los cortes en agua (10-15 minutos) ó7. Sumergiendo los cortes en una solución alcalina (por ejemplo, agua amoniacal), seguido de un lavado de 5 minutos en agua.8. Teñir en 1% eosina por 10 minutos, o hasta lograr el contraste deseado.9. Lavar en agua corriente de 1-5 minutos.10. Deshidratar a través de alcoholes, limpiar y montar.	
Resultados	
Núcleo:	Azul/negro
Citoplasma:	Variedad de sombras rosas
Fibras musculares:	Rosa/Rojo oscuro
Células sanguíneas:	Anaranjado/Rojo
Fibrina	Rosa intenso
Notas:	
Se pueden observar estructuras y otras sustancias que pueden ser hematoxilínicas y variar en su intensidad, por ejemplo: hifas fúngicas y depósitos de calcio que tiñen de un azul-negro intenso.	

TRICROMICA DE MASSON

Este método provee resultados topográficos de fácil acceso del tejido conectivo y sus patologías; es más precisa que las hematoxilinas dando mayor realce a la tinción del citoplasma resultando en un mayor detalle, además de su tinción selectiva por el tejido conectivo. Es ampliamente utilizada para la visualización histológica de fibras de colágena en tejido conectivo. La técnica tiñe de color negro-azul al núcleo, la colágena de azul y el tejido conectivo maduro de rojo. Es preferible utilizar como método de fijación previa la solución de Bouin (5).

Tabla. 5 Procedimiento de rutina para tinción Tricrómica de Masson (5,60)

Material	
Solución a Fushina ácida Ácido acético Glacial Agua destilada	
Solución b Ácido Fosfomolibdico	
Solución c Azul metileno Ácido acético Glacial Agua destilada	
Método	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Desparafinar los cortes, rehidratar a través de alcoholes descendientes hasta llegar a agua. 2. Remover los pigmentos de fijación si es necesario 3. Teñir con hematoxilina de Harris. El tiempo en este paso dependerá del tamaño y tipo de tejido. 4. Lavar con agua corriente. 5. Teñir los nucleos con hematoxilina. 6. Diferenciar con 1% de alcohol ácido. 7. Lavar bien con agua. 8. Teñir en la solución a, 5 minutos. 9. Reposar en agua destilada. 10. Tratar con la solución b, 5 minutos. 11. Drenar 12. Teñir con la solución c, 2-5 minutos. 13. Reposar en agua destilada. 14. Tratar con 1% de ácido acético, 2 minutos. 15. Deshidratar a través de alcoholes ascendentes. 16. Aclarar con xilol y montar. 	
Resultados	
Núcleo:	Azul/negro
Citoplasma:	Rojo
Colágena	Azul
Notas:	
El verde claro puede sustituir al azul metileno.	

TÉCNICA PARA FIBRAS ELÁSTICAS DE GALLEGO

Esta técnica es utilizada en histología e histopatología para teñir tejido conectivo, en donde el citoplasma epitelial se observa rojo-amarillo, el tejido conectivo se tiñe de verde brillante, el musculo en verde olivo y, el epitelio queratinizado y la sangre en verde claro. Esta técnica fue modificada por el mexicano Reyes-Mota, obteniendo una tinción brillante realzando el color de la fushina. El método para diferenciar fibras elásticas, permite una completa diferenciación entre el tejido conectivo elástico y colaginoso. El tejido elástico se tiñe de un color rojo por la fushina, mientras que la colágena se tiñe de un verde brillante. Esta técnica es utilizada en el estudio de displasias y para observar vasos sanguíneos en caso de neoplasias utilizado muchas veces como indicador pronostico independiente(61).

Tabla 6. Procedimiento de rutina para tinción de fibras elásticas de Gallego (5,61)

Material	
Solución a Agua destilada Formaldehido concentrado Cloruro de hierro Ácido nítrico	
Solución b Agua destilada Ácido acético Glacial Fushina de Ziehl	
Método	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Desparafinar los cortes, rehidratar a través de alcoholes descendientes hasta llegar a agua. 2. Remover los pigmentos de fijación si es necesario 3. Sensibilizar los cortes en la solución a. 4. Sin lavar, colocar los cortes en la solución b. 5. Lavar los cortes en agua destilada. 6. Diferenciar colocando de nuevo la solución a de 1-5 min. 7. Lavar en agua destilada. 8. Secar del exceso de agua. 9. Contrateñir con piero-indigo por 1 minuto. 10. Deshidratar a través de alcoholes. 11. Aclarar con xilol y montar. 	
Resultados	
Fibras elásticas:	Rojo brillante
Colágena:	Verde brillante
Núcleo:	Lavanda-verde
Citoplasma:	Variedad de sombras rosas-amarillas
Fibras musculares:	Rosa/Rojo obscuro
Células epiteliales y glándulas sebáceas:	Amarillo

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mecanismo de reparación ósea postinflamatoria es un proceso complejo que involucra enzimas proinflamatorias, así como mediadores químicos que tienen una influencia directa sobre la MEC. Dentro de este proceso una parte fundamental lo constituyen los factores que promueven la angiogénesis. La angiogénesis es necesaria para la migración y colonización osteoblástica, así como para la modulación del proceso de calcificación. El crecimiento mal regulado o excesivo de los vasos sanguíneos tiene un impacto significativo en el sistema óseo produciendo diversas patologías como artritis, sinovitis, osteomielitis, etcétera; en cambio cuando la angiogénesis es incipiente se producen patologías como osteoporosis o una deficiente regeneración ósea, así queda claro que la osteogénesis y la angiogénesis se regulan entre sí en condiciones fisiológicas. A pesar de este hecho, la influencia que tiene la presencia de vasos sanguíneos en diversas lesiones inflamatorias de los maxilares ha sido poco estudiada, sus conclusiones escasas y poco concluyentes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las características histológicas y la cantidad de vasos sanguíneos en lesiones óseas inflamatorias en comparación con lesiones fibro-óseas no-inflamatorias obtenidas del archivo de diagnóstico histopatológico del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, de la DEPeI, Facultad de Odontología, UNAM, en un periodo de enero de 2003 a diciembre de 2013?

JUSTIFICACIÓN

La presencia de vasos sanguíneos en lesiones óseas inflamatorias y en lesiones fibroóseas no inflamatorias, han sido poco estudiado, a pesar de ser lesiones comunes dentro la patología ósea de los maxilares.

Varios factores pueden influir de una manera positiva o negativa en la organización y resultado final del proceso de reparación del hueso, como lo es la presencia o ausencia de vasos sanguíneos, es por eso que aún existen incógnitas sobre el papel que tienen los mecanismos de formación ósea y vascular además de la interacción de estos procesos (2). Por lo que es necesario entender la relación entre las células óseas y los vasos sanguíneos, en lesiones óseas inflamatorias y lesiones fibroóseas no inflamatorias, esto sin duda revelará

mecanismos claves implicados en la regeneración del hueso y ofrecerá perspectivas en el desarrollo de nuevas estrategias para tratar a individuos en riesgo.

HIPÓTESIS

Las lesiones óseas de origen inflamatorio presentan diferencias en la frecuencia de vasos sanguíneos y en las características histomorfológicas en comparación a las lesiones fibro-óseas.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la presencia de vasos sanguíneos y en las características histomorfológicas en lesiones óseas inflamatorias en comparación con las lesiones fibro-óseas no-inflamatorias.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar las técnicas histoquímicas utilizadas para determinar la presencia de vasos sanguíneos.
- Comparar la frecuencia de la presencia de vasos sanguíneos en lesiones óseas inflamatorias en comparación con las lesiones fibro-óseas no inflamatorias.
- Comparar las características presentes en los vasos sanguíneos entre las lesiones óseas inflamatorias y las lesiones fibro-óseas no inflamatorias.

DISEÑO METODOLÓGICO

TIPO DE ESTUDIO

Estudio Transversal Descriptivo

SISTEMA DE VARIABLES Y CATEGORÍAS DE ANÁLISIS

Tabla 7. Mapa conceptual

Variables antecedentes	Variables independientes	Variables dependientes
Edad Sexo Localización de la lesión	Características y números de vasos sanguíneos con: Hematoxilina y Eosina. Tricrómica de Masson. Técnica para fibras elásticas de Gallego.	Lesiones óseas inflamatorias Lesiones fibro-óseas no inflamatorias.

Tabla 8. Operacionalización de Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable y escala de clasificación
Edad	La edad es el tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo, hasta el momento actual.	Edad en años al momento de toma de la muestra en la Historia Clínica. Análisis documental.	Variable cuantitativa continua. Se categorizará de acuerdo a la distribución de la variable
Sexo	Conjunto de peculiaridades que caracterizan a los individuos de una especie dividiéndolos en masculinos y femeninos.	Sexo registrado en la Historia Clínica. Análisis documental	Variable cualitativa dicotómica nominal. Femenino/ Masculino
Localización de la lesión	Zona anatómica donde se ubica la lesión.	Zona anatómica reportada en la que se presentó la lesión, según la Historia Clínica. Análisis documental.	Variable cualitativa dicotómica nominal Maxila/Mandíbula
Lesiones óseas inflamatorias	Lesiones de los maxilares caracterizadas por presentar un proceso inflamatorio agudo o crónico en espacios medulares o en corticales óseas	Diagnóstico de lesiones óseas inflamatorias, reportadas en la Historia clínica. Análisis documental	Variable cualitativa nominal Categorizada después de la aplicación de los criterios de inclusión, exclusión y eliminación
Lesiones fibro-óseas	Lesiones de los maxilares caracterizadas por la presencia de tejido fibroso con varias formas de osificación	Diagnóstico de lesiones fibro-óseas no inflamatorias, reportadas en la Historia clínica. Análisis documental	Variable cualitativa nominal Categorizada después de la aplicación de los criterios de inclusión, exclusión y eliminación
Conteo de vasos sanguíneos con técnica H y E		Número de vasos sanguíneos identificados con técnica H y E en la zona de interés	Variable cuantitativa continua #vasos/zona de interés con programa Leica LAS-EZ
Características histomorfológicas con técnica H y E		Describir las características histomorfológicas de las células del endotelio vascular con técnica H y E en la zona de interés	Variable cualitativa nominal
Conteo de vasos sanguíneos con técnica Tricrómica de Masson		Número de vasos sanguíneos identificados con técnica Tricrómica de Masson en la zona de interés	Variable cuantitativa continua #vasos/zona de interés con programa Leica LAS-EZ
Características histomorfológicas con técnica Tricrómica de Masson		Describir las características histomorfológicas de las células del endotelio vascular con técnica Tricrómica de Masson en la zona de interés	Variable cualitativa nominal
Conteo de vasos sanguíneos con técnica para fibras elásticas de Gallego		Número de vasos sanguíneos identificados con técnica para fibras elásticas de Gallego en la zona de interés	Variable cuantitativa continua #vasos/zona de interés con programa Leica LAS-EZ
Características histomorfológicas con técnica para fibras elásticas de Gallego		Describir las características histomorfológicas de las células del endotelio vascular con técnica para fibras elásticas de Gallego	Variable cualitativa nominal

POBLACIÓN

Para tal fin se revisó el archivo de casos del servicio de diagnóstico histopatológico del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, de la DEPI, Facultad de Odontología, UNAM, del periodo comprendido de enero de 2003 a diciembre de 2013.

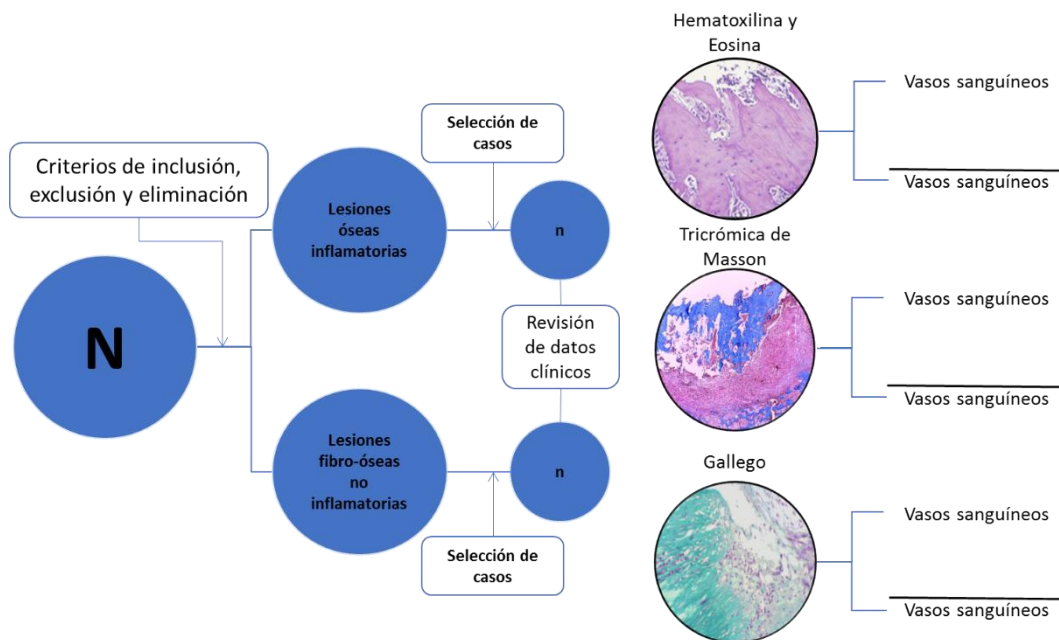


Figura 15. Diseño metodológico

TAMAÑO MUESTRAL

Se realizó un muestreo por conveniencia.

SELECCIÓN DE MUESTRA

Se incluyeron los casos con diagnósticos, clínico y/o histopatológico, de lesiones óseas de origen inflamatorio como: actinomicosis, osteítis, osteomielitis y osteonecrosis. Para fines de comparación se utilizaron lesiones fibro-óseas no inflamatorias como displasia fibrosa, fibroma osificante central, provenientes del mismo archivo. Los casos identificados, inflamatorios y no inflamatorios, fueron incluidos en el estudio siempre y cuando existiera laminilla histológica y material biológico suficientes embebido en parafina, según lo recomienda la Asociación Americana en Investigación ósea y mineral (62) (Anexo 1). Los casos seleccionados fueron revisados por dos revisores, buscando por lo menos cuatro zonas de tejido óseo y estroma a 40x, con fines exclusivamente del presente proyecto de investigación. Los casos que no coincidieran con los diagnósticos anteriormente mencionados, cuando hubo discrepancias diagnósticas entre los revisores ($\kappa < 80$), así como cuando los cortes se desprendieran después de aplicar las técnicas de histoquímica,

fueron eliminados del estudio. De los casos finalmente seleccionados se revisaron las Historias Clínicas registrándose las variables: edad, sexo y localización de la lesión (Figura 15).

Tabla 9. Criterios de selección de muestra

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión	Criterios de Eliminación
<p>Casos con diagnóstico clínico y/o histopatológico de: Lesiones óseas inflamatorias: actinomicosis, osteítis, osteonecrosis y osteomielitis. Lesiones fibro-óseas no inflamatorias: displasia fibrosa y fibroma osificante central.</p> <p>Exista laminilla histológica y material biológico suficiente embebido en parafina, según lo recomienda la Asociación Americana en Investigación ósea y mineral.</p> <p>Positivo a la revisión ($\kappa > 80$).</p>	<p>Casos con diagnóstico clínico y/o histopatológico que no correspondan a Lesiones óseas inflamatorias y Lesiones fibro-óseas no inflamatorias</p>	<p>Casos en los que el material biológico embebido en parafina no sea suficiente. Casos que presenten discrepancias diagnósticas entre los revisores ($\kappa < 80$). Desprendimiento de tejido después de aplicar las técnicas histoquímicas.</p>

MATERIALES Y MÉTODOS

Las laminillas fueron tratadas con Poly-L-Lysina (Anexo 2) para evitar desprendimiento del tejido al realizar las pruebas histoquímicas, se obtuvieron cortes adicionales de los casos seleccionados con el microtomo de rotación motorizado Leica RM2255, fueron procesadas dentro de la rutina histológica en el procesador de tejidos Leica tp1040 Rotary Tissue Process Carrusel Histokinette, para ser teñidas con la técnica histoquímica tricrómica de Masson; la técnica para fibras elásticas de Gallego se realizó dentro de la rutina histológica del Hospital General de México. Se observaron las laminillas y se tomaron microfotografías con ayuda del microscopio óptico de campo claro Leica DM750 en el campos definidos de áreas de tejido estromal perióseo a 4x, donde se seleccionaron las zonas de interés de cada área, las cuales fueron fotografiadas a 10x y donde se realizó el conteo de vasos a 40x (Figura 16), los parámetros histomorfométricos fueron evaluados con la ayuda del software Leica LAS-EZ y el conteo se llevó a cabo con la técnica modificada de conteo descrita por Molina et. al. (63) (Anexo 3). Adicionalmente se llevó a cabo la identificación de VEGF y CD34.

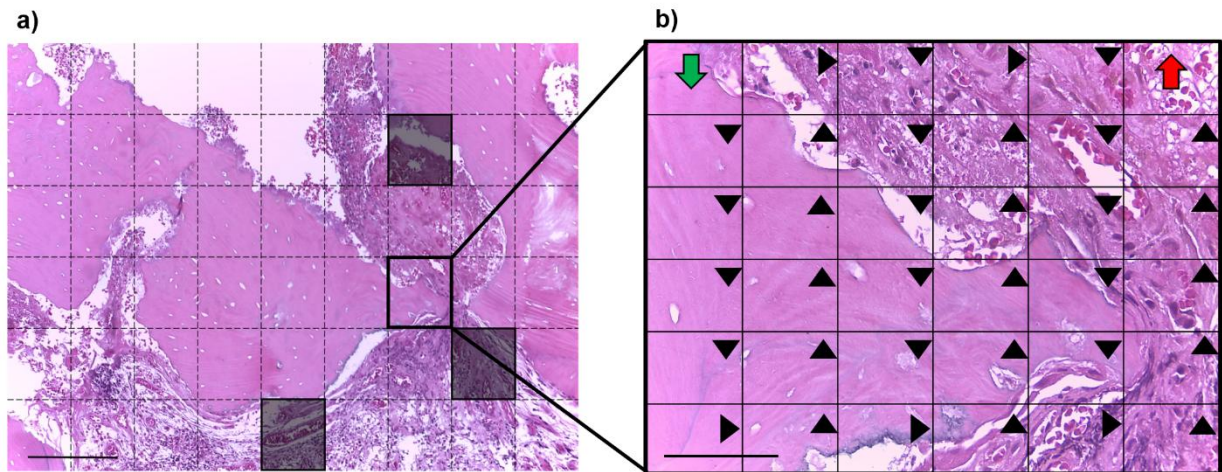


Figura 16. Análisis histológico. a) Zona de interés con cuatro campos elegidos (Barra 100µm) b) campo para conteo de vasos sanguíneos (Barra 50µm).

PLAN DE ANALISIS

Una vez recabados los datos se llevó a cabo un análisis descriptivo, además se construyeron tablas de contingencia para organizar, analizar la relación de dependencia o independencia entre variables y calcular las medidas de asociación correspondiente.

La distribución normal y la homocedasticidad de las mediciones fueron determinadas mediante el análisis de sesgo y curtosis, antes del análisis estadístico. Los datos fueron analizados utilizando las pruebas estadísticas U Mann-Whitney, Kruskal Wallis y la prueba pos hoc de Tukey. Para determinar la correlación que existía entre las variables se utilizó la correlación de Spearman. Utilizando la siguiente tabla para especificar su interpretación:

Tabla 10. Interpretación de correlación de Spearman (64)

Correlación negativa perfecta	-1
Correlación negativa fuerte moderada débil	-0.5
Ninguna correlación	0
Correlación positiva moderada Fuerte	0.5
Correlación positiva perfecta	1

Para identificar relaciones de dependencia entre variables nominales se utilizó la prueba exacta de Fisher. La significancia estadística se estableció al 95% confianza ($p < 0.05$) utilizando el software SPSS® 22 para Windows (IBM, SPSS Statistics 22.0 Inc., IL, USA 2014.)

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto de investigación se apega a la Ley General de Salud y su Reglamento en materia de investigación para la salud promulgada en 1984 y a las normas éticas elaboradas de Helsinki de 1972 y modificado en 1989. La información será confidencial y se protegerá la privacidad de los involucrados en el estudio.

El estudio es descriptivo, transversal sin implicación de riesgos para la salud, intimidad y derechos individuales de los participantes. Además, se ajusta a las normas e instructivos institucionales en materia de investigación científica.

RECURSOS

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, de la DEPEl, Facultad de Odontología, UNAM.

Tabla 11. Recursos Humanos

Participante	Función	Adscripción
C.D. Ximena Vidal Gutiérrez	Elaboración del protocolo de investigación, recolección de muestras, procesamiento histológico de muestras, recolección y análisis de datos.	Alumna del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológica y de la Salud.
Dr. Luis Alberto Gaitán Cepeda	Tutor principal de la investigación.	Jefe del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, Facultad de Odontología, UNAM.
Técnico Teodomiro Pérez Salazar	Asesor en procedimientos histológicos.	Histotécnico. Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, Facultad de Odontología, UNAM.
Técnico Raquel Guerrero Alquicira	Asesor en procedimientos histológicos.	Histotécnico. Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.

RESULTADOS

Se revisó el archivo de casos del servicio de diagnóstico histopatológico del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental, de la DEPI, Facultad de Odontología, UNAM, con un total de 8,633 casos del periodo comprendido de enero de 2003 a diciembre de 2013. De ese total, se obtuvieron 46 casos (0.53%) con diagnóstico de lesiones óseas de origen inflamatorio (actinomicosis, osteítis, osteomielitis y osteonecrosis) y 128 casos (1.48%) lesiones fibro-óseas no inflamatorias (displasia fibrosa y fibroma osificante central) (Fig.17).

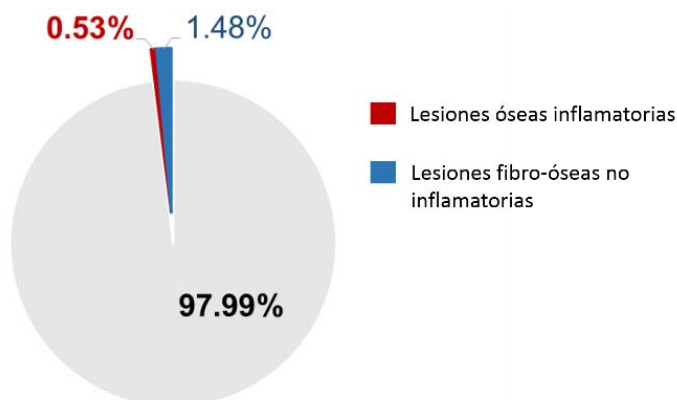


Figura 17. Distribución de casos por tipo de lesión

Los casos anteriores fueron evaluados por dos revisores y se seleccionaron los casos que obtuvieron un índice kappa >80 (Buena) obteniendo 23 casos de lesiones óseas inflamatorias (actinomicosis y osteomielitis) y 17 casos de lesiones fibro-óseas no inflamatorias (displasia fibrosa y fibroma osificante). (Fig. 18).

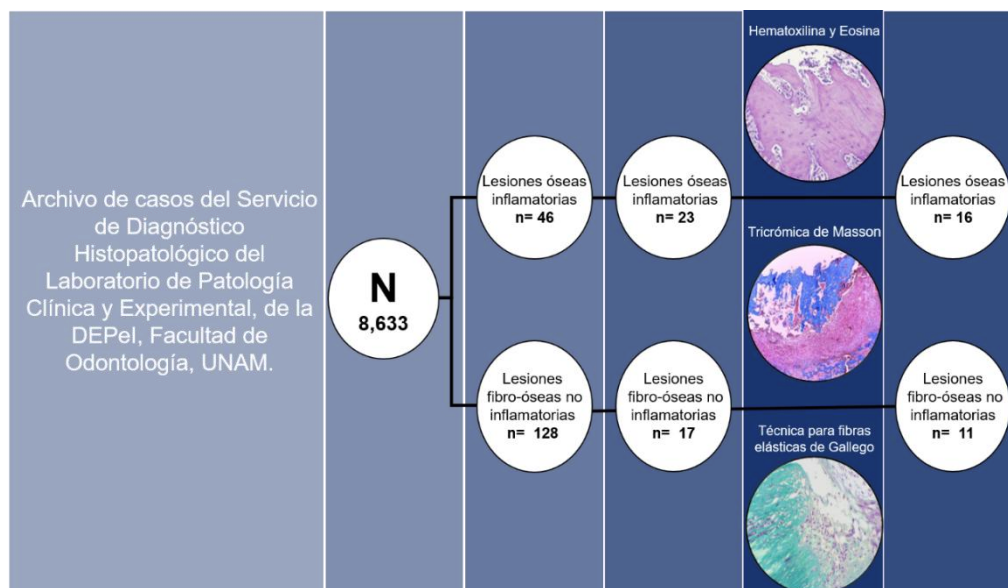


Figura 18. Obtención de la muestra

Después de eliminar los casos en los que hubo desprendimiento de tejido obtuvimos un número total de casos de 27 de los cuales 6 (22%) correspondieron a displasia fibrosa, 5 (18%) a fibroma osificante central, 15 (56%) a osteomielitis y 1 (4%) a actinomicosis. (Figura 19).

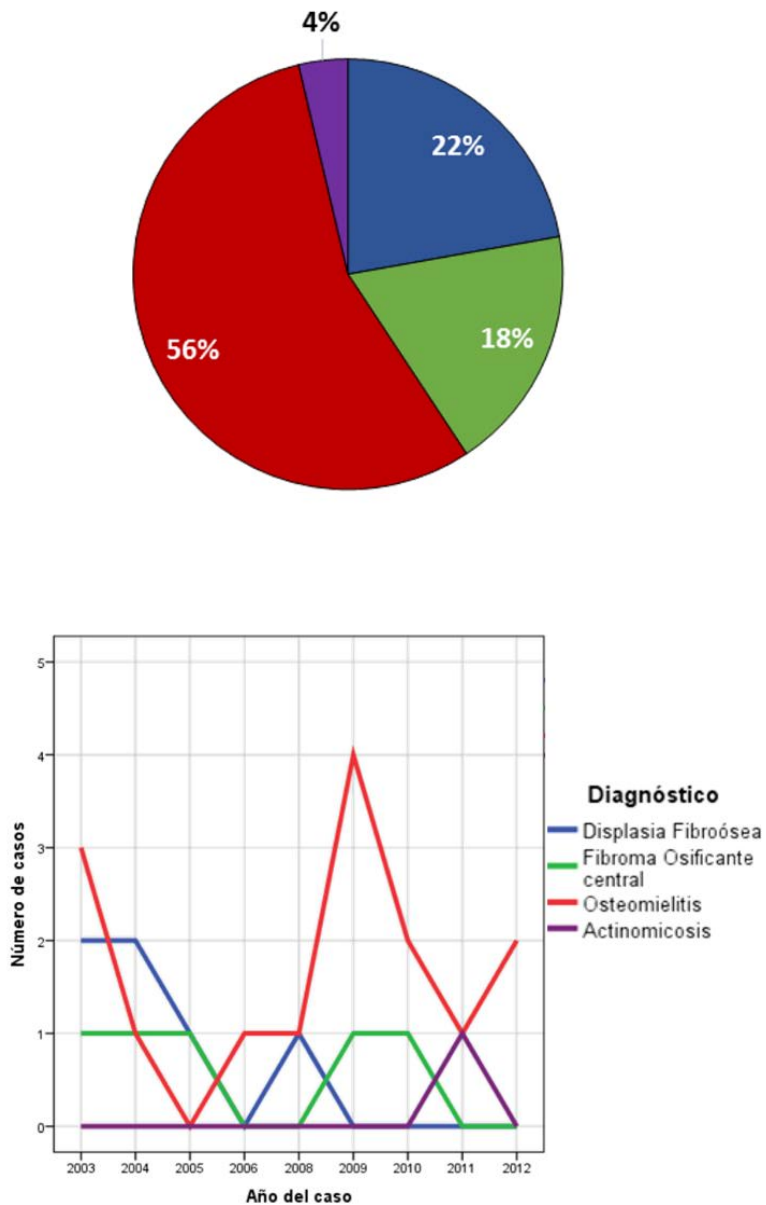


Figura 19. Distribución de casos por Diagnóstico

De los casos seleccionados se revisaron las Historias Clínicas registrándose: fecha, edad, sexo y localización de la lesión.

DATOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA MUESTRA

Los datos clínicos y epidemiológicos se encuentran resumidos en la Tabla 8

Tabla 12. Datos clínicos y epidemiológicos de la muestra

Diagnóstico Característica		Lesiones fibroóseas no inflamatorias n= 11		Lesiones óseas inflamatorias n= 16		Razón de Momios	IC 95%	Valor de P ^a .
		Displasia Fibroósea (22%)	Fibroma osificante central (18%)	Osteomielitis (56%)	Actinomicosis (4%)			
Edad (media ± DE)		27.3±19.73	41.4±15.32	45.2±20.05	57	-	-	0.14 ^b .
Sexo (%)	Mujer	18	46	62	6	.795	(0.157-4.022)	1.00 ^c .
	Hombre	36	*	32	*			
Localización (%)	Mandíbula	18	27	69	*	2.64	(0.539-12.938)	0.264 ^c .
	Maxila	36	19	25	6			
Edad categorizada (%)	Niños-jóvenes	18	*	6	*	-	-	0.230 ^c .
	Adultos	36	46	69	6			
	Adultos mayores	*	*	19	*			

* Cero

a. Lesiones fibroóseas no inflamatorias vs Lesiones óseas inflamatorias. Significancia 0.05

b. Prueba U de Mann Whitney.

c. Prueba Exacta de Fisher.

DE= Desviación Estándar

IC=Intervalo de Confianza

En cuanto a edad, en las lesiones fibroóseas no inflamatorias (n=11), se encontró un promedio de edad para displasia fibroósea de 27 años y para fibroma osificante central de 41 años. En las lesiones óseas inflamatorias (n=16), se encontró un promedio de edad para osteomielitis de 45 años y el caso con diagnóstico de actinomicosis tuvo una edad de 57 años. Las diferencias de edad entre estas lesiones presentaron una p=0.23

En la variable sexo encontramos que de las lesiones fibroóseas no inflamatorias el 64% se presentaron en mujeres y 36% en hombres, mientras que las lesiones óseas inflamatorias 68% ocurrieron en mujeres y 32% en hombres. Se obtuvo una razón de momios de 0.79 con un intervalo de confianza de 0.15 - 4.02 al 95% de confianza. Las diferencias de sexo entre las lesiones presentaron una p=1.00.

La localización más común de las lesiones fibroóseas no inflamatorias se encontró en la maxila (55%), a diferencia de las lesiones óseas inflamatorias donde se encontró en la mandíbula (69%). Las diferencias de localización entre las lesiones presentaron una p=0.26

ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS PARA CONTEO DE VASOS SANGUÍNEOS EN LESIONES ÓSEAS INFLAMATORIAS Y LESIONES FIBRO-ÓSEAS NO INFLAMATORIAS

Después de realizar la tinción con las técnicas histoquímicas Hematoxilina y Eosina (HyE), Tricrómica de Masson (TM) y Técnica para fibras elásticas de Gallego (TG) se contaron los vasos sanguíneos de ambas lesiones como refiere la metodología. (Fig.20)

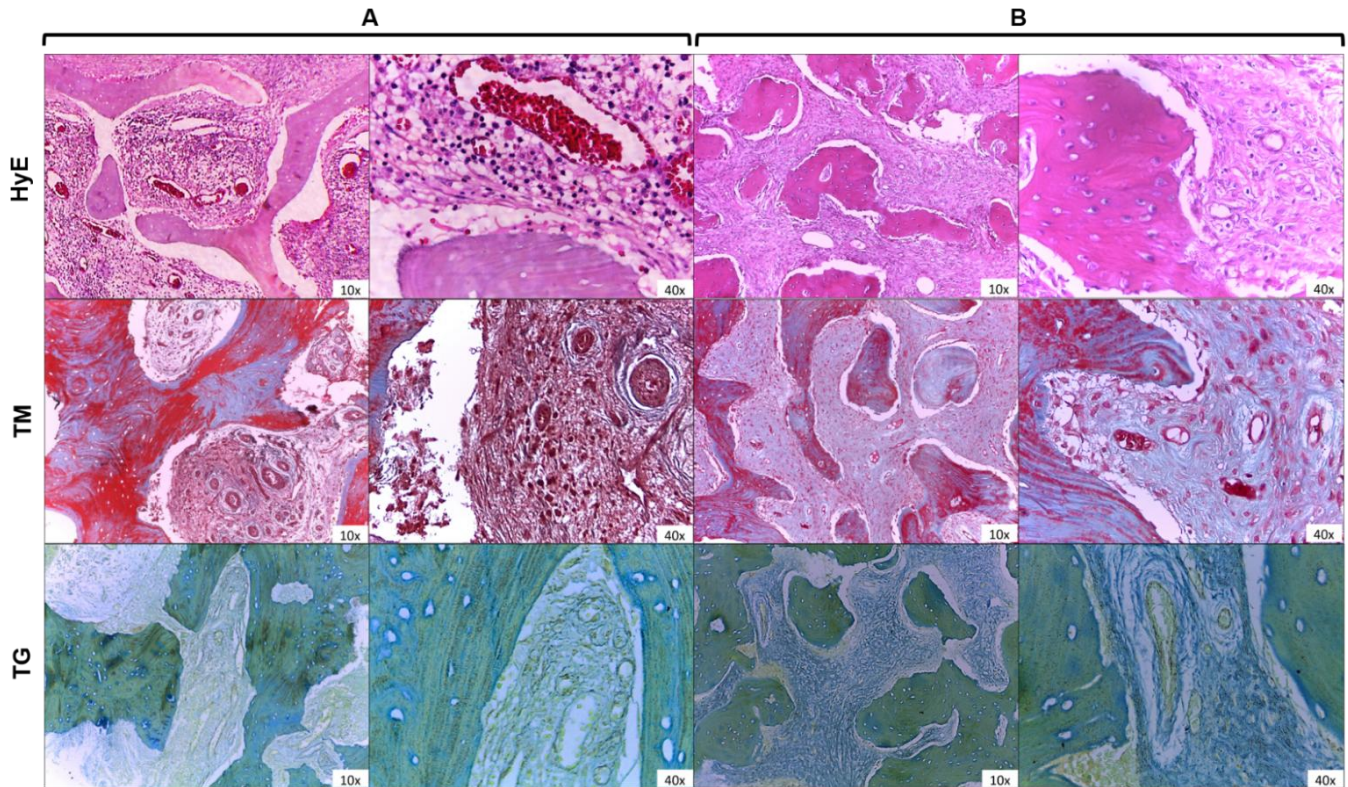


Figura 20. Apariencia histológica de las lesiones después de aplicar las técnicas histológicas. En A (lesiones fibroósas no inflamatorias) observamos a 10x y 40x en HyE (Hematoxilina y Eosina), TM (Tricrómica de Masson) y TG (Técnica para fibras elásticas de Gallego), también aplicadas en B (lesiones óseas no inflamatorias).

Para las lesiones fibroósas no inflamatorias obtuvimos una media de 18 vasos en el conteo con HyE (min= 8, máx=28), con TM obtuvimos una media de 16 (min= 10, máx=25) y con la TG obtuvimos una media de 17 (min=0, máx=27). (Fig.21)

Mientras que en las lesiones óseas inflamatorias obtuvimos una media de 10 en el conteo con HyE (min= 3, máx= 19), la media para TM fue de 17 (min= 0, máx=37) y con la TG fue de 13 (min= 0, máx=26). (Fig.22)

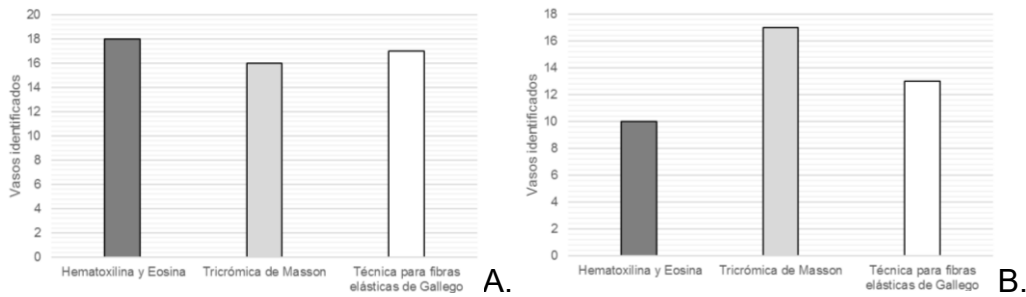


Figura 21. Distribución vasos sanguíneos por tipo de lesión. A. Lesiones fibro-óseas inflamatorias, B. Lesiones óseas no inflamatorias

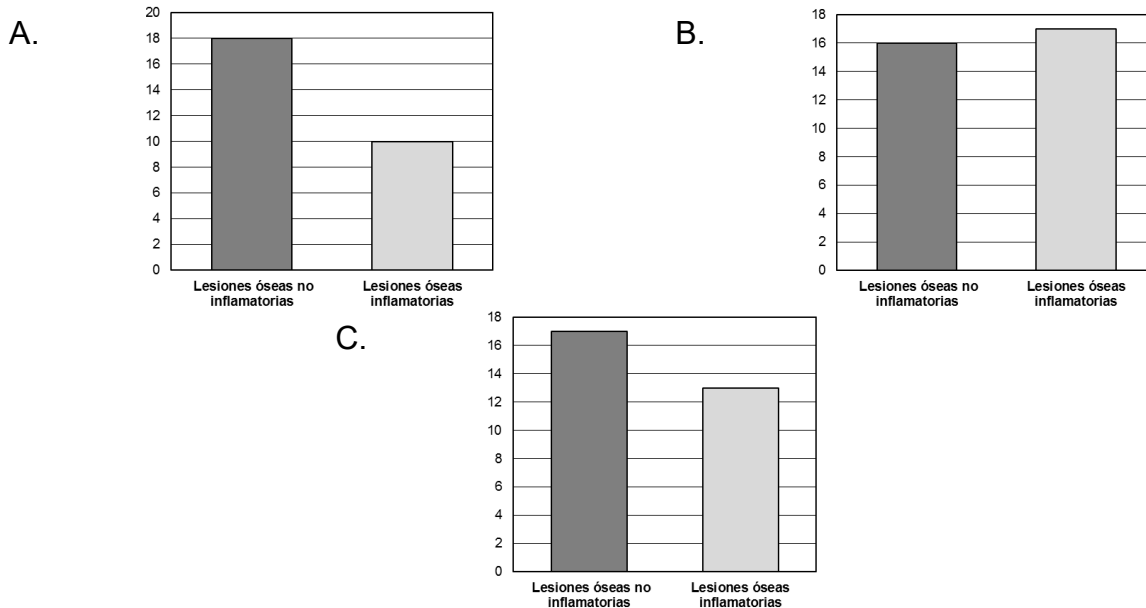


Figura 22. Distribución de lesiones por técnica histológica utilizada. A. Hematoxilina y Eosina, B. Tricrómica de Masson y C. Técnica para fibras elásticas de Gallego

CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS Y EL TIPO DE LESIÓN

De los datos recabados, se realizó una correlación entre las técnicas según el tipo de lesión para dilucidar qué técnica presentaba una correlación fuerte y positiva con respecto al número de vasos identificados en cada tipo de lesión y así evaluar la eficiencia con cada tipo de tinción. Para las lesiones fibroóseas no inflamatorias, se obtuvo una correlación fuerte y positiva ($R=0.95$) y un coeficiente de determinación de 0.8 entre HyE-TM, obteniendo una $p<0.05$; al analizar la relación entre HyE-TG obtuvimos una correlación débil negativa ($R=-0.28$) y un coeficiente de determinación de 0.005, obteniendo una $p=0.39$; entre TM-TG encontramos una correlación escasa negativa ($R=-0.24$) y un coeficiente de determinación de 0.015, obteniendo una $p=0.47$. (Figura 23)

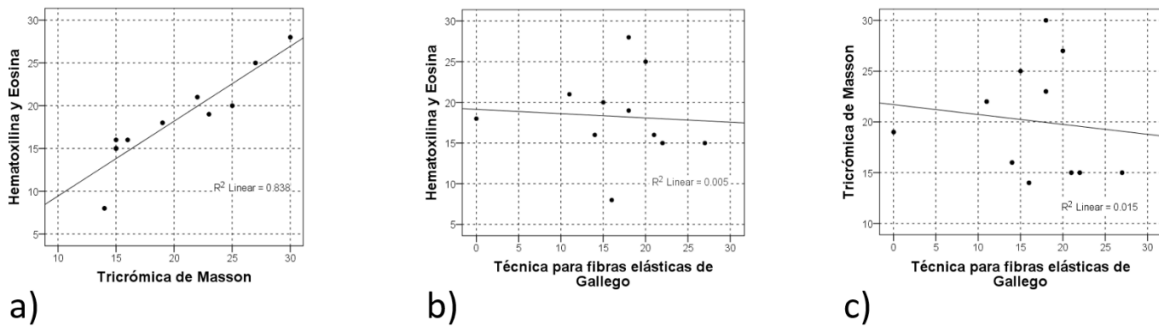


Figura 23. Diagramas de dispersión para lesiones fibrosas no inflamatorias. Se muestra en a) correlación entre hematoxilina y eosina y tricrómica de Masson, b) correlación entre hematoxilina y eosina y técnica para fibras elásticas de Gallego y c) correlación entre tricrómica de Masson y técnica para fibras elásticas de Gallego

En las lesiones óseas inflamatorias, se observó una correlación moderada y positiva ($R=0.53$) y un coeficiente de determinación de 0.25 entre HyE-TM, obteniendo una $p=0.03$; al analizar la relación entre HyE-TG obtuvimos una correlación escasa positiva ($R=0.05$) y un coeficiente de determinación de 0.001, obteniendo una $p=0.85$; entre TM-TG encontramos una correlación débil positiva ($R=0.44$) y un coeficiente de determinación de 0.21, obteniendo una $p=0.08$. (Figura 24)

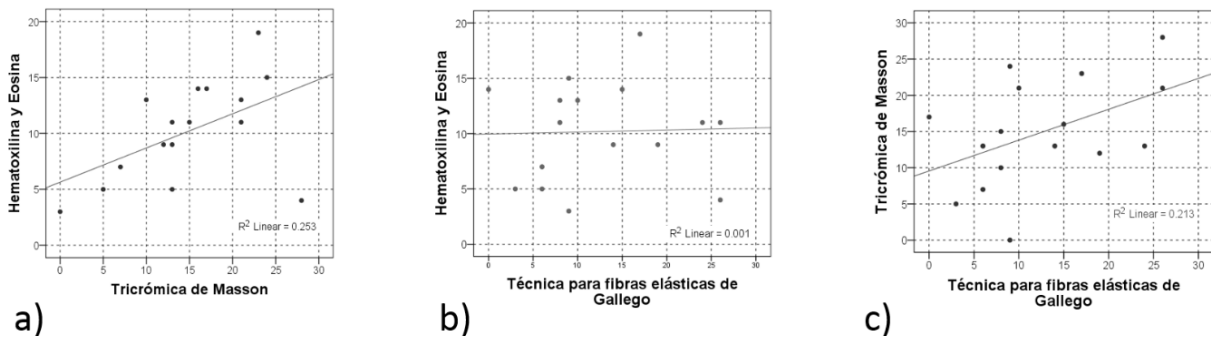


Figura 24. Diagramas de dispersión para lesiones óseas inflamatorias. Se muestra en a) correlación entre hematoxilina y eosina y tricrómica de Masson, b) correlación entre hematoxilina y eosina y técnica para fibras elásticas de Gallego y c) correlación entre tricrómica de Masson y técnica para fibras elásticas de Gallego

CORRELACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS Y LAS VARIABLES ANTECEDENTES

Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre las técnicas histoquímicas utilizadas y las variables antecedentes (edad, sexo y localización de la lesión), los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 13.

Tabla 13. Correlación de vasos sanguíneos		
Lesiones fibroóseas no inflamatorias		
Utilizando Hematoxilina y Eosina		
Variables antecedentes	Coeficiente de correlación	Valor de P
Edad	0.04	0.88
Sexo	0.12	0.72
Localización de la lesión	-0.20	0.54
Utilizando Tricrómica de Masson		
Edad	0.13	0.68
Sexo	0.56	0.06
Localización de la lesión	-0.63	0.35
Utilizando técnica para fibras elásticas de Gallego		
Variables antecedentes	Coeficiente de correlación	Valor de P
Edad	0.34	0.30
Sexo	-0.030	0.93
Localización de la lesión	0.087	0.80
Lesiones óseas inflamatorias		
Utilizando Hematoxilina y Eosina		
Edad	0.18	0.50
Sexo	0.02	0.91
Localización de la lesión	-0.14	0.58
Utilizando Tricrómica de Masson		
Edad	0.24	0.35
Sexo	-0.13	0.62
Localización de la lesión	0.01	.95
Utilizando técnica para fibras elásticas de Gallego		
Edad	0.18	0.49
Sexo	-0.22	0.41
Localización de la lesión	-0.19	0.47

ANÁLISIS COMPARATIVO DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS PARA CONTEO DE VASOS SANGUÍNEOS EN LESIONES ÓSEAS INFLAMATORIAS Y LESIONES FIBRO-ÓSEAS NO INFLAMATORIAS

Las diferencias entre el número de vasos sanguíneos observados en cada técnica (HyE, TM y TG) entre las lesiones fibroóseas no inflamatorias no mostraron diferencias significativas al igual que entre las lesiones óseas inflamatorias.

Al buscar diferencias entre la técnica utilizada y el tipo de lesión, en el conteo de vasos con HyE se observaron diferencias entre las lesiones que arrojaron una $p < 0.05$. Al realizar el conteo de vasos con TM las diferencias entre lesiones dieron una $p = 0.057$ y en el conteo con TG se observó una $p = 0.12$ al contrastar entre lesiones. (Fig. 26)

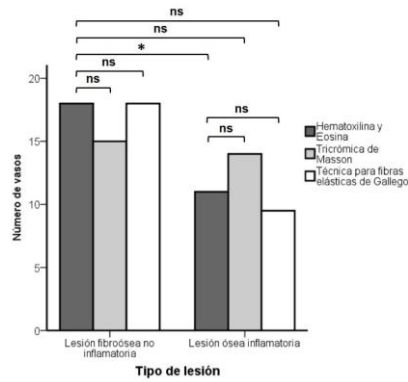


Figura 25. Gráficas de barras. Se muestra las diferencias entre los vasos observados y las lesiones. Prueba Kruskal Wallis y prueba pos hoc de Tukey * $p < 0.05$, ns= no significancia

Al buscar diferencias entre la técnica utilizada y el tipo de lesión, en el conteo de vasos con HyE se observaron diferencias entre las lesiones que arrojaron una $p < 0.05$. Al realizar el conteo de vasos con TM las diferencias entre lesiones dieron una $p = 0.057$ y en el conteo con TG se observó una $p = 0.12$ al contrastar entre lesiones.

Las diferencias entre el número de vasos sanguíneos observados en la técnica que mostró menor variación (hematoxilina y eosina) entre los diagnósticos incluidos en las lesiones fibro-óseas no inflamatorias y las variables antecedentes, los cuales no mostraron diferencias significativas (Fig. 26). Por sexo reportado $p = 1.0$ (a.), por diagnóstico $p = 0.567$ (b.), por localización $p = 1.0$ (c.), por edad categorizada $p = 1.0$ (d.)

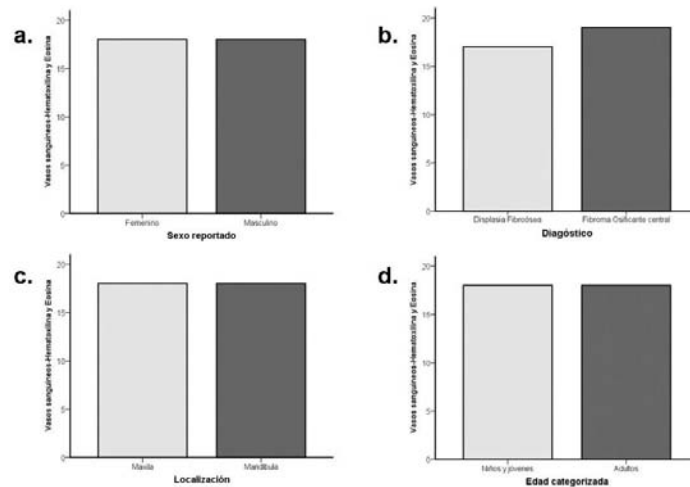


Figura 26. Gráficas de barras. Se muestra las diferencias entre los vasos observados en las lesiones fibro-óseas no inflamatorias. Prueba U Mann-Whitney, donde todos los casos presentaron no significancia.

Las diferencias entre el número de vasos sanguíneos observados en la técnica que mostró menor variación (hematoxilina y eosina) entre los diagnósticos incluidos en las lesiones

óseas inflamatorias y las variables antecedentes, los cuales no mostraron diferencias significativas (Fig. 27). Por sexo reportado $p=1.0$ (a.), por diagnóstico $p=1.0$ (b.), por localización $p=1.0$ (c.), por edad categorizada $p=0.411$ (d.)

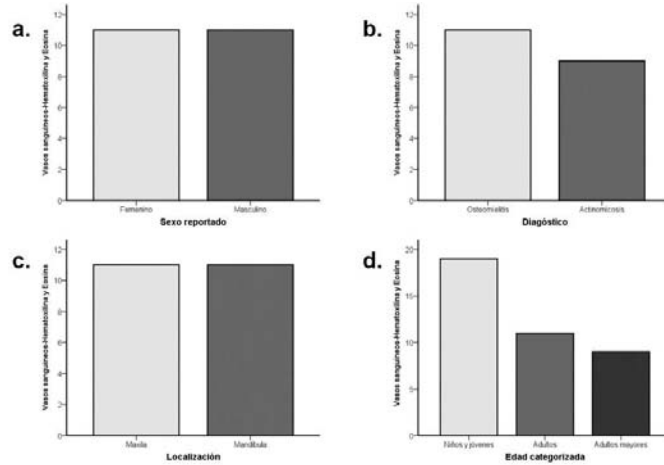


Figura 27. Gráficas de barras. Se muestra las diferencias entre los vasos observados en las lesiones óseas inflamatorias. Pruebas U Mann-Whitney y Kruskal Wallis y prueba pos hoc de Tukey donde todos los casos presentaron no significancia.

Al comparar el número de vasos sanguíneos presentes en todas las muestras y analizarlos según su diagnóstico y variables antecedentes solo pudimos observar diferencias significativas al compararlas por edad $p=0.046$ (Fig. 28)

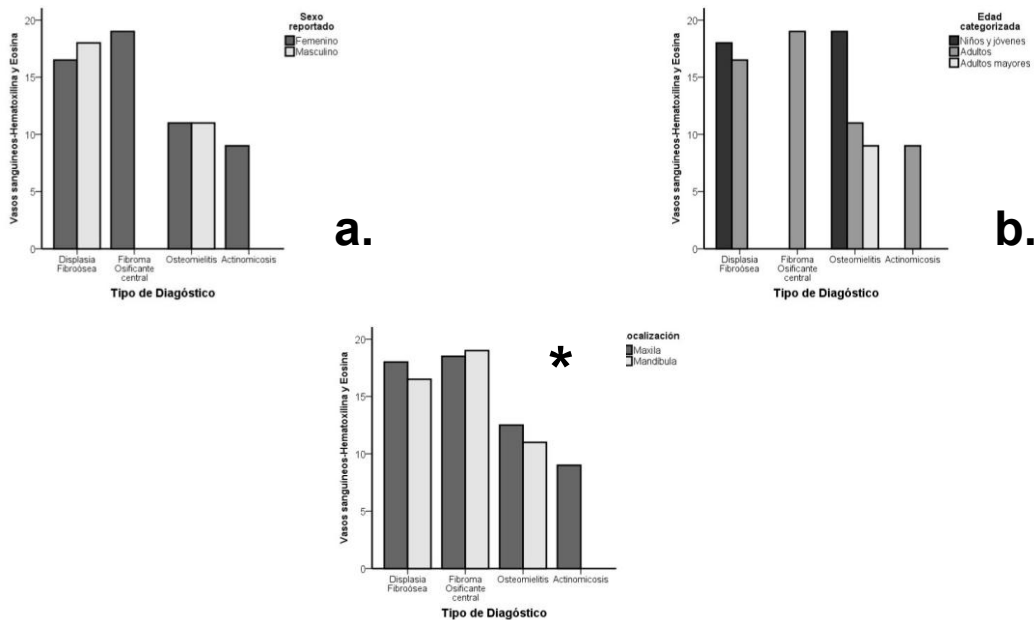


Figura 28. Gráficas de barras. Se muestran las diferencias entre los vasos observados según el tipo de diagnóstico agrupados según (a.) sexo reportado, (b.) edad categorizada y (c.) localización. Pruebas Kruskal Wallis y prueba pos hoc de Tukey donde solo se mostró significancia (*) según la localización

C.

ANALISIS CON PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

Finalmente se realizaron pruebas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos para VEGF y CD34, utilizando como controles para la técnica, intestino grueso y amígdala humanos. (Fig. 29)

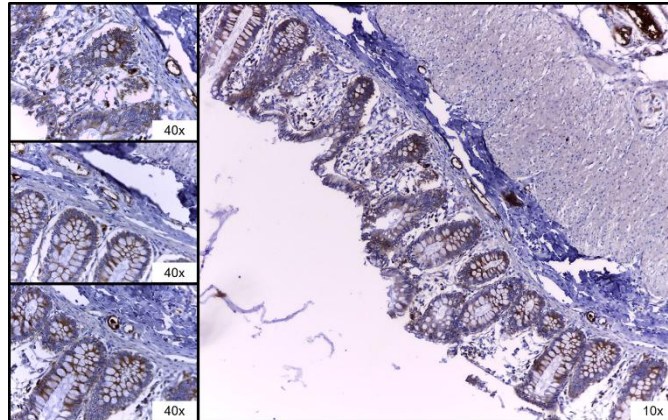


Figura 29. Microfotografías de los controles para VEGF en tejido de intestino grueso.

Sin embargo, por el tipo de descalcificación (Ácido Nítrico al 2% durante 48 hrs) al que las muestras del estudio fueron sometidas no fue posible realizar una recuperación antigénica exitosa. (Fig. 30)

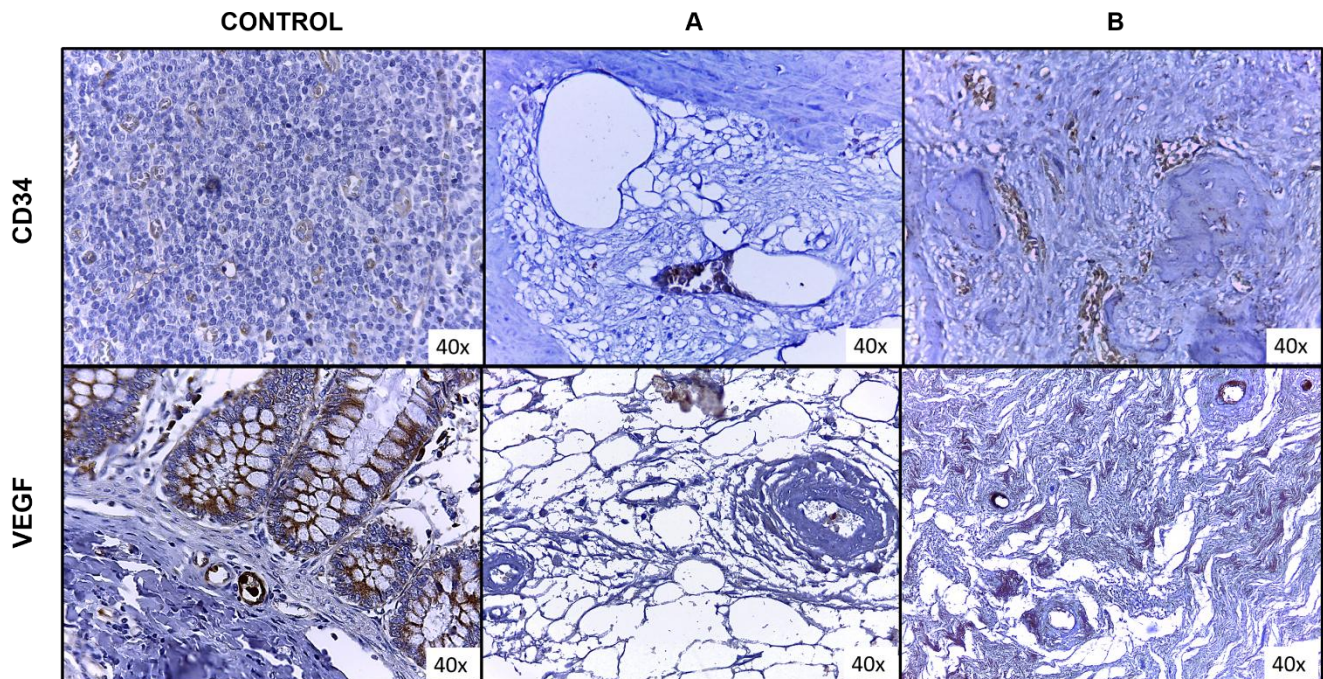


Figura 30. Microfotografías del resultado de inmunohistoquímica identificando CD34 y VEGF. Observar la falta de tinción en vasos sanguíneos en A (lesiones óseas inflamatorias) y en B (lesiones fibro-óseas no inflamatorias) comparadas con los controles (amígdala para CD34 e intestino grueso para VEGF).

DISCUSIÓN

El papel de la angiogénesis en estas lesiones aún sigue siendo controversial y poco estudiado. Conceptos recientes mencionan que la producción del hueso, la reacción inflamatoria y el tejido fibroso son resultado de la acción de las células pluripotentes provenientes de los vasos sanguíneos (65).

Las lesiones fibroóseas no inflamatorias son desordenes con etiología desconocida. Bernier hipotetizó que estas lesiones pueden ser causadas por estímulos irritantes (incluida la extracción dental) que activa la producción de tejido nuevo a partir de las membranas remanentes de tejido periodontal. Estas teorías sobre el origen de esas lesiones incluyen casos traumáticos y del desarrollo (58). La etiología y patogénesis de las lesiones óseas inflamatorias aún no están completamente dilucidadas y aun muchos factores predisponentes relacionados han sido discutidos. Sin embargo se sabe que la mayoría son causados por estímulos irritantes (66).

De la muestra final, identificamos seis displasias fibrosas, cinco fibromas osificantes centrales, además de quince casos de osteomielitis y solo un caso de actinomicosis.

La edad media para las lesiones fibroóseas no inflamatorias la encontramos entre 20 y 40 años, misma edad reportada para este tipo de lesiones (57,67). Para las lesiones óseas inflamatorias encontramos una edad media entre 40 y 60 años, igual a la reportada en la literatura (42).

Ambas lesiones ocurren más frecuentemente en mujeres que en hombres, como lo pudimos observar en nuestros resultados mostrando una mayor prevalencia en el sexo femenino sobre el masculino, resultados coherentes con lo encontrado en la literatura. Se observó que en nuestra muestra la razón de padecer este tipo de lesiones es 0.76 veces mayor en mujeres que hombres (IC95% 0.157-4.022), sin ser una asociación estadísticamente significativa.

Ambas lesiones se he reportado que afectan en su mayoría a la mandíbula, como lo observamos en nuestra muestra. La razón de padecer ambas lesiones es 2.64 veces mayor

en la mandíbula que en la maxila (IC95% 0.539-12.938), sin presentar significancias estadísticas.

Por lo tanto nuestro estudio sugiere que ser mujer y el sitio mandibular son factores de riesgo potenciales, aunque no únicos, para presentar estas lesiones, ya que dependen de otros factores que no incluimos en este estudio (55,66,68).

Además de aplicar la tinción histológica de rutina (Hematoxilina y Eosina) Manish en 2012 sugirió el uso de la tinción Tricrómica de Masson como herramienta útil para el diagnóstico de lesiones bucales, debido a los detalles que muestra la técnica en fibras elásticas. En este estudio, además, utilizamos la Técnica para fibras elásticas de Gallego la cual permitió observar en diferentes tonalidades los vasos sanguíneos y distinguirlos mejor. Esta técnica es una variante de la técnica de Lille que utiliza reagentes básicos como la fushina, el propósito de esta técnica es teñir con diferentes tonalidades los tejidos duros y blandos de lesiones patológicas. Esta técnica ha sido utilizada para evaluar cambios fibróticos en vasos sanguíneos, en varios tumores odontogénicos y para evaluar tejidos duros en lesiones fibroóseas no inflamatorias (69–71). En este estudio se observaron cambios fibróticos en los vasos sanguíneos de las lesiones óseas inflamatorias.

Dentro de nuestros hallazgos histológicos después de aplicar las tres diferentes tinciones en las lesiones fibroóseas no inflamatorias pudimos observar algunas características como tejido hiper celular fibroso, deposición de hueso trabecular, osteoblastos en la periferia ósea, formaciones osteoides y una gran cantidad de vasos sanguíneos parecidos a capilares, en las cercanías de las áreas osteoides. Específicamente la tinción Tricrómica de Masson nos permitió ver con más detalle el tejido conectivo presente en estas lesiones. Por otro lado, la tinción para fibras elásticas de Gallego nos permitió diferenciar las deposiciones de tejido duro en estas lesiones (70).

En las lesiones óseas inflamatorias pudimos observar señales de resorción ósea, por la presencia de osteoclastos en la periferia ósea, infiltrado inflamatorio, además la ausencia de osteocitos dentro las lagunas, formación de secuestros óseos y menos cantidad de vasos sanguíneos que se encontraban dilatados en áreas inflamatorias(42,43,72).

Al realizar el conteo de vasos sanguíneos observados en ambas lesiones se observó que las lesiones óseas inflamatorias mostraban menor cantidad (HyE=18, TM= 16, TG=17) que las lesiones fibroóseas no inflamatorias (HyE=10 , TM=17 , TG=13), sin embargo estas diferencias no mostraron diferencias significativas. Estos hallazgos pueden deberse a que las lesiones óseas inflamatorias que entraron al estudio sean de naturaleza crónica, se sabe que el comportamiento de la angiogénesis en procesos inflamatorios crónicos se ve afectada y disminuida, además del hecho de que la muestra está compuesta por adultos mayores y la edad también es un factor que disminuye la capacidad de formación de nuevos vasos sanguíneos(11,39). En el caso de las lesiones fibroóseas no inflamatorias debido a su naturaleza proliferativa existe una liberación de factores de crecimiento que promueve la angiogénesis además del crecimiento estromal característico de la lesión, esto puede explicar la presencia de más vasos sanguíneos en este tipo de lesiones (70,73).

Para conocer la consistencia entre los vasos sanguíneos observados entre las diferentes técnicas histológicas aplicadas, utilizamos la prueba de correlación de Spearman, en donde observamos que el número de vasos sanguíneos en las lesiones fibroóseas no inflamatorias mostraban una correlación fuerte y positiva ($R=0.95$) y un coeficiente de determinación de 0.8 entre HyE-TM, con lo que podemos afirmar que el ajuste del modelo es bueno y esto permite saber que en verdad existe correlación entre las dos técnicas de tinción usadas, obteniendo una $p<0.05$; al analizar la relación entre HyE-TG obtuvimos una correlación débil negativa ($R=-0.28$) y un coeficiente de determinación de 0.005, no mostrando significancia estadística en estos resultados; entre TM-TG encontramos una correlación escasa negativa ($R=-0.24$) y un coeficiente de determinación de 0.015, sin ser resultados estadísticamente significativos.

Igualmente aplicamos esta prueba en las lesiones óseas inflamatorias, en donde observamos una correlación moderada y positiva ($R=0.53$) y un coeficiente de determinación de 0.25 entre HyE-TM, obteniendo resultados significativos estadísticamente; al analizar la relación entre HyE-TG obtuvimos una correlación escasa positiva ($R=0.05$) y un coeficiente de determinación de 0.001, sin ser estadísticamente significativa esta relación; entre TM-TG encontramos una correlación débil positiva ($R=0.44$) y un coeficiente de determinación de 0.21, sin presentar resultados significativos estadísticamente.

Al realizar un análisis de correlación entre las técnicas histoquímicas utilizadas y las variables antecedentes (edad, sexo y localización de la lesión), no se encontró ningún tipo de relación, posiblemente debido al tamaño de la muestra, lo cual no significa que no existan, ya que en la literatura se muestra que la edad tiene una gran influencia en la presencia y características de los vasos sanguíneos, como menciona Kusumbe en 2014, donde gracias a sus experimentos con ratones logra identificar dos tipos de capilares involucrados en la osteogénesis y uno de ellos va perdiendo actividad conforme avanzan en edad los ratones (65).

Al buscar diferencias entre la técnica utilizada y el tipo de lesión, en el conteo de vasos con HyE se observaron diferencias entre las lesiones que arrojaron una $p < 0.05$ estadísticamente significativa lo cual indica una sincera diferencia entre la naturaleza de ambas lesiones. Al realizar el conteo de vasos con TM las diferencias entre lesiones dieron una $p = 0.057$ y en el conteo con TG se observó una $p = 0.12$ al contrastar entre lesiones. Esta diferencia se basa principalmente en las estructuras que son visibles aplicando las diferentes técnicas histológicas. Como mencioné anteriormente la técnica TM nos deja ver mayor detalle sobre el tejido conectivo y por lo tanto la variación entre los datos recolectados fue mayor, parecido a lo que se observó con la TG.

Posteriormente se realizó un análisis con las variables antecedentes utilizando la técnica histoquímica que tuvo menos variación (Hematoxilina y Eosina) en donde se observaron diferencias solo al comparar los diagnósticos de ambas lesiones con la edad obteniendo una $p < 0.05$ estadísticamente significativa lo cual nos indica algo anteriormente observado, las lesiones óseas inflamatorias y las lesiones fibro-óseas no inflamatorias presentan una mayor frecuencia en etapas de la vida diferentes. Recordemos que las lesiones óseas inflamatorias presentan una mayor incidencia en personas mayores de 50 años, mientras que las lesiones fibro-óseas no inflamatorias tienen una mayor incidencia en etapas tempranas de la vida (42,55,56).

En la actualidad se conoce que los vasos sanguíneos no solo transportan oxígeno, nutrientes y una gran cantidad de productos, sino además provee una gran cantidad de señales que

juegan roles importantes en el crecimiento y la homeostasis. Las células endoteliales forman a todos los vasos sanguíneos y tienen funciones diferentes dependiendo del ambiente que las rodee. La comunidad científica desde hace tiempo ha sospechado una conexión entre las células endoteliales y las células osteoprogenitoras, porque además de su cercanía, se ha propuesto que la angiogénesis promueve la cicatrización ósea(15,65,74).

El mecanismo exacto de comunicación entre los vasos sanguíneos y el tejido óseo sigue siendo un misterio para los científicos y más aún el papel que tienen en patologías óseas. Por esa razón utilizando técnicas histoquímicas fáciles y accesibles describimos la presencia de vasos sanguíneos existentes en estas lesiones. Sin embargo, la estructura del tejido y la posición de vasos sanguíneos pueden no ser tan detalladas. Las tinciones inmunohistoquímicas y los estudios moleculares pueden llegar a ser más específicos ya que se buscan marcadores proteínicos en el tejido.

Adams, Kusumbe y la Ramasamy, han utilizado nuevas técnicas para obtener una alta resolución en sus técnicas imagenológicas mediante inmunofluorescencia para dilucidar el papel de la angiogénesis en procesos de mineralización ósea. De esta manera han encontrado dos diferentes tipos de vasos sanguíneos, a los cuales han llamado: tipo H y tipo L dependiendo de la cantidad de marcadores proteínicos de CD31 y endomucina, siendo H por “high” (alto) y L por “low” (bajo)(65,75,76).

Kusumbe observó que en el crecimiento de huesos planos se encontraban exclusivamente capilares tipo H y en huesos irregulares eran encontrados solo capilares de tipo L. Además observaron que existe una gran preferencia de las células osteoprogenitoras en situarse en las proximidades de los capilares tipo H, lo cual indica que este tipo de capilares representan la conexión entre la angiogénesis y la osteogénesis(65).

Se conoce que existen dos vías principales por las cuales se regula el desarrollo y mantenimiento de los vasos sanguíneos: la HIF y la Notch. En el tejido óseo estas vías regulan a los vasos sanguíneos, sin embargo, de manera diferente al resto del organismo, ya que se ha observado que Notch promueve la angiogénesis en lugar de suprimirla y HIF regula de manera positiva ambos procesos, angiogénesis y osteogénesis (36–38,65).

En los humanos, se sabe que la formación ósea disminuye con la edad, es por eso que la calidad ósea y la cicatrización ósea se encuentran deterioradas. Al mismo tiempo se ha observado que las células endoteliales H en ratones viejos se encuentran disminuidas (39).

Es por esto que estos hallazgos son de suma importancia para el desarrollo de futuras investigaciones en el campo de las patologías óseas. De acuerdo con nuestros resultados, es de suma importancia conocer el papel que juega la angiogénesis en estas lesiones, ya que solo pudimos describir la cantidad de vasos sanguíneos y creemos necesario realizar más estudios de inmuno-reactividad, especialmente la posibilidad de buscar otros factores que influyan la vascularidad como son los factores genéticos, epigenéticos e inmunológicos.

CONCLUSIONES

- Las técnicas histológicas utilizadas en este estudio son consideradas una alternativa fácil, accesible y atractiva para el diagnóstico patológico. Nuestros resultados muestran que la técnica Hematoxilina y Eosina y la técnica Tricrómica de Masson son la mejor opción para la localización de vasos sanguíneos.
- Encontramos variaciones en la presencia de vasos sanguíneos al compararlas según el tipo de lesión. Sin embargo, las diferencias significativas solo fueron encontradas al comparar los resultados con Hematoxilina y Eosina entre las lesiones óseas inflamatorias y las Lesiones fibro-óseas no inflamatorias.
- Dependiendo del tipo de diagnóstico al compararlo con los datos clínicos, no fue posible identificar diferencias significativas excepto en al analizarlas por grupo de edad.
- Los datos clínicos (variables antecedentes) no mostraron significancias al realizar el análisis de correlación con el número de vasos identificados según las técnicas histológicas usadas.
- Finalmente, nuestros resultados describen histológicamente las características y frecuencia de los vasos sanguíneos en estas lesiones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bancroft J. Bancroft's theory and practice of histological techniques. 2013.
2. Kaigler D, Pagni G, Park C-H, Tarle SA, Bartel RL, Giannobile WV. Angiogenic and osteogenic potential of bone repair cells for craniofacial regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2010 Sep;16(9):2809–20.
3. Xiao W, Wang Y, Pacios S, Li S, Graves DT. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol*. 2016;18:9–16.
4. Martin TJ. Bone Biology and Anabolic Therapies for Bone: Current Status and Future Prospects. *J Bone Metab*. 2014;21(1):8.
5. Bancroft JD, Layton C, Suvarna SK. Bancroft's theory and practice of histological techniques [Internet]. 7th Edition. Churchill Livingstone Elsevier; 2013 [cited 2016 Jun 14]. 656 p. Available from: <http://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20090426369>
6. Lowe JS, Anderson PG. Stevens & Lowe's Human Histology: With STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences; 2014. 452 p.
7. Titorencu I, Pruna V, Jinga VV, Simionescu M. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. *Cell Tissue Res*. 2013 Nov 29;355(1):23–33.
8. Noble F le, Noble J le. Bone biology: Vessels of rejuvenation. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):313–4.
9. Riancho JA, Delgado-Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto-osteoclasto. *Reumatol Clínica*. 2011 Sep;7:1–4.
10. Hall JE. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica. Elsevier Health Sciences; 2011. 4264 p.
11. Jilka RL, O'Brien CA. The Role of Osteocytes in Age-Related Bone Loss. *Curr Osteoporos Rep*. 2016 Feb;14(1):16–25.
12. Arboleya L, Castañeda S. Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reumatol Clínica*. 2013 Sep;9(5):303–15.
13. f 107-116 Emelí Cortina Ramírez - 107-116_Emeli_Cortina_Ramirez.pdf [Internet]. [cited 2014 Nov 18]. Available from: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2004/09/107-116_Emeli_Cortina_Ramirez.pdf
14. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb 1;26(2):229–38.
15. Matsuo K, Kuroda Y, Nango N, Shimoda K, Kubota Y, Ema M, et al. Osteogenic capillaries orchestrate growth plate-independent ossification of the malleus. *Development*. 2015 Nov 15;142(22):3912–20.

16. Sporn MB, Roberts AB. Peptide Growth Factors and Their Receptors I. Springer Science & Business Media; 2012. 811 p.
17. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492):323–8.
18. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*. 2011 Jun;42(6):556–61.
19. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:109–17.
20. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy Rep*. 2014 Enero;3:481.
21. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103–8.
22. Batista MA, Leivas TP, Rodrigues CJ, Arenas GCF, Belitardo DR, Guarniero R. Comparison between the effects of platelet-rich plasma and bone marrow concentrate on defect consolidation in the rabbit tibia. *Clinics*. 2011 Oct;66(10):1787–92.
23. Doessing S, Heinemeier KM, Holm L, Mackey AL, Schjerling P, Rennie M, et al. Growth hormone stimulates the collagen synthesis in human tendon and skeletal muscle without affecting myofibrillar protein synthesis. *J Physiol*. 2010 Jan 15;588(Pt 2):341–51.
24. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*. 2010 Aug 17;19(2):329–44.
25. 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*. 2014 Jan;386(1-2):15–25.
26. Neve A, Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D. Extracellular Matrix Modulates Angiogenesis in Physiological and Pathological Conditions. *BioMed Res Int*. 2014;2014:756078.
27. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal Transduction in Vasculogenesis and Developmental Angiogenesis. *Int J Dev Biol*. 2011;55(0):353–63.
28. Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone*. 2015 Jan;70:19–27.
29. Yang Y-Q, Tan Y-Y, Wong R, Wenden A, Zhang L-K, Rabie ABM. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci*. 2012 Jun;4(2):64–8.
30. Guerrini MM, Takayanagi H. The immune system, bone and RANKL. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Jun 12;

31. Kim Y-G, Park J-W, Lee J-M, Suh J-Y, Lee J-K, Chang B-S, et al. IL-17 inhibits osteoblast differentiation and bone regeneration in rat. *Arch Oral Biol.* 2014 Sep;59(9):897–905.
32. Aho O-M, Lehenkari P, Ristiniemi J, Lehtonen S, Risteli J, Leskelä H-V. The Mechanism of Action of Induced Membranes in Bone Repair. *J Bone Jt Surg.* 2013 Apr 3;95(7):597–604.
33. Wang X, Yu YY, Lieu S, Yang F, Lang J, Lu C, et al. MMP9 regulates the cellular response to inflammation after skeletal injury. *Bone.* 2013 Jan;52(1):111–9.
34. Guo C, Hu F, Zhang S, Wang Y, Liu H. Association between osteoprotegerin gene polymorphisms and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients. *Genet Mol Biol.* 2013 Jul;36(2):177–82.
35. Matsuo K, Kuroda Y, Nango N, Shimoda K, Kubota Y, Ema M, et al. Osteogenic capillaries orchestrate growth plate-independent ossification of the malleus. *Dev Camb Engl.* 2015 Nov 15;142(22):3912–20.
36. Sena CM, Pereira AM, Seíça R. Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2013 Dec;1832(12):2216–31.
37. De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Cell Metab.* 2013 Nov 5;18(5):634–47.
38. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature.* 2014 Mar 20;507(7492):376–80.
39. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Itkin T, Mäe MA, Langen UH, Betsholtz C, et al. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature.* 2016 Apr 21;532(7599):380–4.
40. Marcia Vital O of C and PL. Questions and Answers about Osteonecrosis (Avascular Necrosis) [Internet]. [cited 2014 Nov 18]. Available from: http://www.niams.nih.gov/health_info/osteonecrosis/
41. Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. *Oral Pathology: Clinical Pathologic Correlations.* Elsevier Health Sciences; 2012. 1143 p.
42. Krakowiak PA. Alveolar Osteitis and Osteomyelitis of the Jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin.* 2011 Aug 1;23(3):401–13.
43. De Ceulaer J, Tacconelli E, Vandecasteele SJ. Actinomyces osteomyelitis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): the missing link? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2014 Jun 1;
44. Koorbusch GF, Deatherage JR, Curé JK. How Can We Diagnose and Treat Osteomyelitis of the Jaws as Early as Possible? *Oral Maxillofac Surg Clin N Am.* 2011 Nov;23(4):557–67.

45. Zalavras CG, Lieberman JR. Osteonecrosis of the Femoral Head: Evaluation and Treatment. *J Am Acad Orthop Surg*. 2014 Jul;22(7):455–64.
46. Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 May;88(5):1117–32.
47. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw—2014 Update. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Oct 1;72(10):1938–56.
48. Aghaloo TL, Felsenfeld AL, Tetradis S. Osteonecrosis of the Jaw in a Patient on Denosumab. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 May 1;68(5):959–63.
49. Aguirre JI, Akhter MP, Kimmel DB, Pingel JE, Williams A, Jorgensen M, et al. Oncologic doses of zoledronic acid induce osteonecrosis of the jaw-like lesions in rice rats (*Oryzomys palustris*) with periodontitis. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2012 Oct;27(10):2130–43.
50. Berti-Couto SA, Vasconcelos ACU, Iglesias JE, Figueiredo MAZ, Salum FG, Cherubini K. Diabetes mellitus and corticotherapy as risk factors for alendronate-related osteonecrosis of the jaws: a study in Wistar rats. *Head Neck*. 2014 Jan;36(1):84–93.
51. Hamadeh IS, Ngwa BA, Gong Y. Drug induced osteonecrosis of the jaw. *Cancer Treat Rev*. 2015 May;41(5):455–64.
52. Boquete-Castro A, Gómez-Moreno G, Calvo-Guirado JL, Aguilar-Salvatierra A, Delgado-Ruiz RA. Denosumab and osteonecrosis of the jaw. A systematic analysis of events reported in clinical trials. *Clin Oral Implants Res*. 2015 enero;n/a – n/a.
53. Ristow O, Otto S, Troeltzsch M, Hohlweg-Majert B, Pautke C. Treatment perspectives for medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ). *J Craniomaxillofacial Surg*. 2015 Mar 1;43(2):290–3.
54. El-Mofty SK. Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Skeleton: An Update. *Head Neck Pathol*. 2014 Nov 20;1–13.
55. Akcam T, Altug HA, Karakoc O, Sencimen M, Ozkan A, Bayar GR, et al. Synchronous ossifying fibromas of the jaws: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Nov;114(5 Suppl):S120–5.
56. Hall G. Fibro-osseous lesions of the head and neck. *Diagn Histopathol*. 2012 Apr 1;18(4):149–58.
57. Prabhu S, Sharanya S, Naik PM, Reddy A, Patil V, Pandey S, et al. Fibro-osseous lesions of the oral and maxillo-facial region: Retrospective analysis for 20 years. *J Oral Maxillofac Pathol JOMFP*. 2013 Jan;17(1):36–40.
58. More C, Asrani M, Thakkar K. Cemento-ossifying fibroma. *Indian J Dent Res*. 2011;22(2):352.

59. Edgar LT, Sibole SC, Underwood CJ, Guilkey JE, Weiss JA. A computational model of in vitro angiogenesis based on extracellular matrix fibre orientation. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 2013;16(7):790–801.
60. Goldner J. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol.* 1938 Mar;14(2):237–43.
61. Ortiz-Hidalgo C. Abelardo Gallego (1879–1930) and his contributions to histotechnology: The Gallego stains. *Acta Histochem.* 2011 Feb;113(2):189–93.
62. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2013 Jan;28(1):2–17.
63. Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N. An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology.* 2011 Oct 1;59(4):801–3.
64. Ortega M, María R, Pendás T, C L, Martínez Ortega M, Pérez Abreu A, et al. EL COEFICIENTE DE CORRELACION DE LOS RANGOS DE SPEARMAN CARACTERIZACION. *Rev Habanera Cienc Médicas.* 2009 Jun;8(2):0–0.
65. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature.* 2014 Mar 20;507(7492):323–8.
66. Momeni H, Shahnaseri S, Hamzeheil Z. Evaluation of relative distribution and risk factors in patients with dry socket referring to Yazd dental clinics. *Dent Res J.* 2011 Dec;8(Suppl 1):S84–7.
67. MacDonald-Jankowski DS. Ossifying fibroma: a systematic review. *Dento Maxillo Facial Radiol.* 2009 Dec;38(8):495–513.
68. Campisi G, Fedele S, Fusco V, Pizzo G, Di Fede O, Bedogni A. Epidemiology, clinical manifestations, risk reduction and treatment strategies of jaw osteonecrosis in cancer patients exposed to antiresorptive agents. *Future Oncol Lond Engl.* 2014 Feb;10(2):257–75.
69. Tamgadge SA, Tamgadge A, Srivastava C, Satheesan E, Bhalerao S. Modified Gallego's Stain as Differential Stain for Oral Hard Tissues in Oral Pathology: A Preliminary Report. *Int J Oral Maxillofac Pathol.* 2014 Jun 30;5(2):2–6.
70. Avinash T, Sandhya T, Gokul V, Neha T, Snehal D. Juvenile cemento-ossifying fibroma: a case report using modified Gallego's staining. *Int J Res Med Sci.* 2016;658–61.
71. Sharma Gaganjot K SM. Peripheral Ossifying Fibroma: A masquerade. *Ann Dent Res.* 2012;2(1):36–43.
72. Renapurkar S, Pasternack MS, Nielsen GP, Kaban LB. Juvenile Mandibular Chronic Osteomyelitis: Role of Surgical Debridement and Antibiotics. *J Oral Maxillofac Surg*

[Internet]. [cited 2016 Apr 28]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239116001191>

73. Eversole R, Su L, ElMofty S. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Complex A Review. *Head Neck Pathol.* 2008 Sep;2(3):177–202.
74. Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *J Dent Res.* 2008 Feb;87(2):107–18.
75. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Starsichova A, Adams RH. Sample preparation for high-resolution 3D confocal imaging of mouse skeletal tissue. *Nat Protoc.* 2015 Dec 1;10(12):1904–14.
76. Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, et al. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature.* 2016 Abril;532(7599):323–8.

ANEXOS

ANEXO 1. Criterios de suficiencia de muestra ósea ideal según Asociación Americana de Investigación Ósea y Mineral

“Para biopsias de hueso humano, recomendamos un diámetro interno de al menos 7.5 mm (5 mm para muestras pediátricas). El mínimo de área tisular aceptable es de 30 mm² y el mínimo de perímetro óseo aceptable es de 60 mm”

Fragmento obtenido y traducido de: Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, et al. Standardized Nomenclature, Symbols, and Units for Bone Histomorphometry: A 2012 Update of the Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2013 Jan; 28(1):2–17.

ANEXO 2. Procedimiento para Poly-lisinar portaobjetos

Se obtuvieron portaobjetos nuevos, los cuales fueron lavados con agua y jabón neutro, posteriormente lavados con alcohol al 70% y secados con toallas de papel, evitando residuos de cualquier tipo.

La poly-L-lysina se diluyo para su uso en una proporción de 1 en 10 con agua destilada. Los portaobjetos previamente lavados fueron sumergidos en la solución de poly-L-lysina durante 5 minutos y se dejaron secar. El procedimiento anterior se realizó dentro de la campana de flujo laminar.

La efectividad de adherencia sobre el tejido de los portaobjetos tratados con Poly-L-lysina se disemina en unos días, por lo que se preparaban inmediatamente antes de su uso.

Procedimiento obtenido y traducido de: Bancroft JD, Layton C, Suvarna SK. *Bancroft's theory and practice of histological techniques.* 7th Edition. Churchill Livingstone Elsevier; 2013. 656 p. y de Poly-L-lysine solution (P8920) -Technical Bulletin - p8920bul.pdf [Internet]. Available

from: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/p8920bul.pdf>

ANEXO 3. Método de conteo celular modificado sin utilizar un programa de análisis de imágenes

Se realizó una modificación al método de conteo celular elaborado por Bologna-Molina R, Damián-Matsumura P, Molina-Frechero N, que a continuación se detalla.

Después de aplicar los diferentes procedimientos histoquímicos, los vasos sanguíneos fueron cuantificados de la siguiente forma:

1. Cada portaobjetos fue fotografiado con ayuda del microscopio óptico de campo claro Leica DM750 en el campos definidos de áreas de tejido estromal perióseo a 4x, donde se seleccionaron las zonas de interés de cada área, las cuales fueron fotografiadas 10x y 40x, las imágenes digitales fueron tomadas con el programa Leica LAZ-EZ y guardadas como archivos tiff.
2. Cada archivo fue abierto usando Microsoft Office PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) y utilizando la función de “Tabla” fue elaborada una gradilla de 6x6 sobre la imagen la cual cubría en su totalidad la imagen.
3. En cada imagen, el conteo de vasos comenzó en la parte superior izquierda y finalizó en la parte superior derecha siguiendo el orden de las flechas (Figura 28)

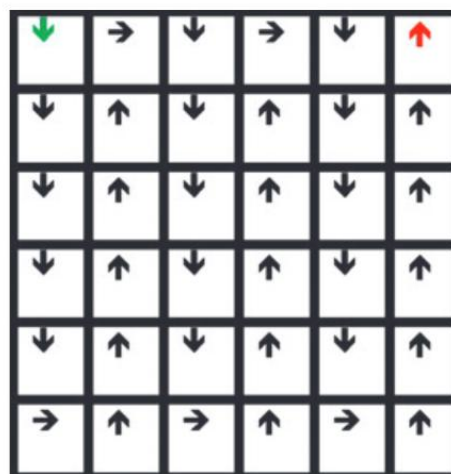


Figura 28. Orden de conteo