



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
SUPERIORES UNIDAD JURIQUILLA

**“EVALUACIÓN *IN VIVO* DE PRÓTESIS
CRANEALES USANDO COMPOSICIONES
VARIABLES DE VIDRIOS BIOACTIVOS BASE
FOSFATO/ TiO_2 PARA LA DETERMINACIÓN Y
CORRELACIÓN DE EFECTOS SECUNDARIOS
EN EL CEREBRO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS

P R E S E N T A:

ANA LUCÍA SÁNCHEZ ALFONSO



**ENES
JURIQUILLA**

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CRISEIDA RUÍZ AGUILAR

CODIRECTOR DE TESIS:
DRA. LORENA GAYTÁN TOCAVÉN

Querétaro, Qro., Junio 2023



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.

Firmas

I. RESUMEN

La fabricación de prótesis craneales tiene una larga historia, siendo usada desde tiempos antiguos para reconstruir regiones craneofaciales. Sin embargo, aún no se tiene un consenso con respecto a cuál es el material ideal para dichas prótesis. Los vidrios bioactivos son materiales capaces de adherirse a tejido óseo adyacente y promover la formación del mismo. En la presente investigación, utilizando ratas Wistar, se evaluaron prótesis craneales de composiciones de vidrio bioactivo base fosfato, las cuales se reforzaron con óxido de titanio. Se aplicaron pruebas conductuales motoras y cognitivas a los sujetos a lo largo de 4 meses, y se analizó histológicamente el tejido cerebral para conocer los posibles efectos secundarios del implante. Los resultados mostraron precipitaciones de hidroxiapatita en la superficie del implante desde el primer mes postquirúrgico en el grupo experimental, contrario al grupo control, donde las precipitaciones comenzaron a aparecer hasta el tercer mes después de la cirugía. El implante mostró favorecer la regeneración de nuevo tejido óseo, sin provocar alteraciones en la conducta de los animales.

Palabras clave: vidrios bioactivos, andamio, tejido óseo, cerebro, evaluación *in vivo*

ABSTRACT

Cranial prosthetics have a long history, with them being used from ancient times to reconstruct and repair regions of the face and the skull. Still to this date, there has yet to be a consensus regarding which is the best material that should be used for these prostheses. Bioactive glasses are materials that can bond to the adjacent bone tissue and stimulate its regeneration. In the present investigation, male Wistar rats were used to evaluate phosphate-based bioactive glass cranial prostheses reinforced with titanium oxide. Motor and behavioral tests were performed on the subjects through 4 months and the brain tissue was analyzed with histological techniques with the intention to evaluate the potential side effects of the scaffold on the brain. The results showed hydroxyapatite precipitations on the implant surface from month one post-surgery, contrary to the control group, where

precipitations began to appear until month three after surgery. The implant was shown to help bone tissue regeneration without affecting the behavior of the rats.

Keywords: bioactive glasses, scaffold, bone tissue, brain, *in vivo* evaluation

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mis padres, Juan y Julieta, así como a mi abuelito Rolando. Este proyecto es la culminación de una etapa a la que no hubiera podido llegar sin todo el apoyo que me han dado. De todo corazón muchas gracias por siempre estar.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres por todo el apoyo que me han dado a lo largo de toda mi vida, el amor, los consejos, los consuelos, la motivación, y por todo lo que me han enseñado. No hay cosa que hagan por mí que pase desapercibida. A mi abuelito, por siempre estar cuando fuera que lo necesitáramos, el apoyo y la confianza que ha depositado en mí a lo largo de los años. Este trabajo es resultado de un trabajo en equipo.

A mi hermanito, Juan Pablo, por escucharme, cuidarme y apoyarme en todo momento. Tengo la certeza de que estaremos siempre el uno para el otro.

A la Gang y a Norma, con quienes he crecido y quienes siempre han estado para darme un empujón cuando más lo he necesitado. Por escucharme hablar de este proyecto una y otra vez, y echarme porras. Su amistad es de las cosas más valiosas en mi vida.

Un especial y gran agradecimiento a mis asesoras, la Dra. Criseida y la Dra. Lorena, por la paciencia, los enormes aprendizajes que me han dado, y la gran disposición que las caracteriza. De verdad que no pude haber pedido mejores guías.

Quiero dar un agradecimiento también a las personas que me apoyaron en alguna parte de este proyecto; al técnico académico del laboratorio D11 del Instituto de Neurobiología, Francisco Camacho Barrios, al personal del bioterio del INB, a la Dra. Deysi Gasca Martínez por su apoyo en la Unidad de Análisis Conductual, al Dr. Manuel Aguilar Franco por el apoyo en las técnicas de SEM y EDS, y a la Dra. Luz Eugenia Alcántara Quintana por apoyarnos con la histología craneal.

Finalmente, me gustaría agradecer a la UNAM por todas las herramientas que me brindó, los profesores y la educación del más alto nivel, así como por el financiamiento parcial de este proyecto por medio de los apoyos PAPIME PE101422 y PAPIIT-TA100522.

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	3
II.	LISTA DE FIGURAS.....	8
III.	LISTA DE TABLAS.....	10
IV.	LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	10
V.	INTRODUCCIÓN.....	12
VI.	ANTECEDENTES.....	13
	3.1 TEJIDO ÓSEO.....	13
	3.2 BIOMATERIALES.....	15
	3.2.1 HISTORIA DE LOS BIOMATERIALES.....	17
	3.3 CRANEOPLASTÍA.....	18
	3.3.1 MATERIALES UTILIZADOS PARA CRANEOPLASTÍA.....	21
	3.4 SÍNTESIS DE LOS BIOVIDRIOS.....	25
	3.5 DEGRADACIÓN DEL IMPLANTE.....	26
	3.5.1 ANDAMIO Y REPARACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO.....	27
	3.5.2 IMPLANTES Y NEUROTOXICIDAD.....	29
	3.6 MODELOS ANIMALES.....	31
	3.7 EVALUACIÓN CONDUCTUAL.....	32
	3.7.1 Memoria de trabajo.....	32
	3.7.2 Aprendizaje asociativo.....	34
	3.7.3 LABERINTO EN T.....	34
	3.7.4 RUEDA DE EJERCICIO.....	35
	3.8 ASTROGLIOSIS.....	35
VII.	JUSTIFICACIÓN.....	40
VIII.	HIPÓTESIS.....	41
IX.	OBJETIVO.....	41
	6.1 OBJETIVO GENERAL.....	41
	6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	41
X.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
	7.1 FABRICACIÓN DEL IMPLANTE.....	43
	7.2 ANIMALES.....	43
	7.2.1 Cirugía estereotáxica.....	44
	7.3 PRUEBAS CONDUCTUALES.....	45
	7.3.1 Evaluación cognitiva.....	46
	7.3.2 Evaluación motora.....	49
	7.4 SACRIFICIO.....	49
	7.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL TEJIDO CRANEAL.....	49
	7.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	49
	7.5.2 Análisis elemental por espectroscopia de energía dispersiva (EDS).....	51
	7.6 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CRANEAL.....	51
	7.7 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CEREBRAL.....	51
	7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	55
XI.	RESULTADOS.....	56
	8.1 EVALUACIÓN COGNITIVA.....	56
	8.2 EVALUACIÓN MOTORA.....	59

8.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	61
8.5 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CRANEAL	64
.....	64
8.6 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL TEJIDO CEREBRAL	65
XII. DISCUSIÓN.....	66
XIV. REFERENCIAS	74
XV. APÉNDICES	81
XVI. ANEXOS.....	86

II. LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Células que conforman el tejido óseo y sus funciones.	14
*imagen creada en biorender.com.....	14
fig. 2. Imagen que muestra ejemplos de aplicaciones de biomateriales.	16
fig. 3. Ejemplos de defectos craneales congénitos. A – encefalocele. Defecto del tubo neural causado cuando el tubo no se cierra completamente durante la gestación. Se produce una abertura en alguna región del cráneo. B – craneosinostosis. Defecto en el cual los huesos del cráneo se cierran de manera prematura, antes de que el cerebro se termine de formar, por lo que a medida que crece, el cráneo puede deformarse. Existen diferentes tipos de craneosinostosis dependiendo las suturas que se unan prematuramente.	19
fig. 4. Diagrama que muestra las diferentes opciones de materiales que se pueden utilizar para reconstrucciones del cráneo.	20
fig. 5. Imagen de una craneoplastía con un implante hecho de peek.	22
*imagen tomada de torres-criollo et al., 2021.....	22
fig. 6. Diagrama que muestra las fases que ocurren desde la implantación del andamio hasta la regeneración y remodelación ósea.....	28
fig. 7. Vías reportadas de toxicidad causada por penetración de nanopartículas de tio ₂ al snc. Se muestra un resumen de las vías que se conocen hasta ahora por medio de las cuales nanopartículas de tio ₂ pueden acceder al sistema nervioso central. Sin embargo, se ha observado que los efectos de las nanopartículas de tio ₂ dependen de la dosis, ruta, y tiempo de exposición.....	30
*figura modificada de czajka et al., 2015.....	30
fig. 8. Diagrama que muestra las diferentes clasificaciones de la memoria. La memoria, a grandes rasgos, puede ser dividida en dos modalidades: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. A su vez, dentro de estos tipos de memoria podemos encontrar subclasificaciones.	
33	
*tomada de portellano, 2005.....	33
fig. 9. Imágenes de la morfología de astrocitos en diferentes grados de astrogliosis. Inmunohistoquímica para gfap con hematoxilina. A – astrocitos lejos de una lesión, estado saludable. B – astrogliosis moderada. Expresión de gfap aumentada, hipertrofia celular, preservación de dominios astrocíticos. C – astrogliosis difusa severa. Expresión de gfap	

aumentada, hipertrofia, proliferación de astrocitos, procesos astrocíticos se enciman unos con los otros.	38
*figura modificada de sofroniew & vinters, 2010.	39
fig. 10. Diagrama de las etapas experimentales. En el diagrama se pueden observar de manera general las etapas que se siguieron durante el proceso experimental.....	42
fig. 11. Imagen que muestra uno de los implantes de biovidrio fabricados. A- se muestra el diámetro del implante (3 mm). B- se muestra el grosor del implante (1 mm).....	43
fig. 12. Imágenes de la cirugía estereotáxica. A - se muestra el trépano realizado en los animales control. B – muestra el trépano y la colocación del implante en los animales experimentales.	45
fig. 13. Representación del laberinto en t. A - se muestra el protocolo de alternancia forzada donde uno de los brazos se encuentra bloqueado. B – muestra el segundo ensayo de la alternancia forzada. En donde ninguno de los brazos se encuentra bloqueado pero sólo en el que no se exploró previamente se encuentra una recompensa.	46
*imagen creada en biorender.com.....	46
fig. 14. Imágenes de un sujeto experimental durante su prueba en el laberinto en t. A – ensayo de elección forzada, con el brazo derecho bloqueado. B – ensayo de elección libre, ninguno de los brazos se encontraba bloqueado.....	48
fig. 15. Imágenes que muestran los cráneos con el recubrimiento de oro únicamente en la parte superior. A – vista superior, cráneo experimental. B – vista superior, cráneo control. C – vista inferior, cráneo experimental. D – vista inferior, cráneo control.....	50
fig. 16. Imagen que muestra la lámina del rat brain paxinos utilizada como referencia para seleccionar las rebanadas cerebrales.	52
*imagen tomada de paxinos & watson, 1998.	52
fig. 17. Imágenes de una rebanada cerebral obtenidas con el microscopio de fluorescencia. A – corte cerebral visto con un objetivo de 10x, marcando la región de interés. B – zoom de la misma rebanada, delimitando las coordenadas posteriormente analizadas para llevar a cabo el conteo de astrocitos.	54
fig. 18. Número de aciertos logrados por día. Grupo experimental vs. Control. Se muestran las medianas por grupo, por día, del número de aciertos logrados, a través de 4 meses de evaluación. A - mes 1 (experimental n=12, control n=11) . B - mes 2 (experimental n=11, control n=10). C - mes 3 (experimental n=10, control n=9). D - mes 4 (experimental n=9, control n=8).57	57
datos graficados: medianas e iqr	57
fig. 19. Latencia de acierto (s) por día. Grupo experimental vs. Control. Se muestran las medianas por grupo, por día, del tiempo (s) que se tomaban los sujetos en lograr el acierto (latencia de acierto) a través de 4 meses de evaluación. A - mes 1 (experimental n=12, control n=11) . B - mes 2 (experimental n=11, control n=10). C - mes 3 (experimental n=10, control n=9). D - mes 4 (experimental n=9, control n=8).....	58
datos graficados: q1, mediana, q3, valores mínimo y máximo	59
fig. 20. Distancia (m) recorrida por día. Grupo experimental vs. Control. Se muestran los promedios de la distancia (m) recorrida por grupo, por día, a través de 4 meses de evaluación. A - mes 1 (experimental n=12, control n=11) . B - mes 2 (experimental n=11, control n=10). C - mes 3 (experimental n=9, control n=9). D - mes 4 (experimental n=9, control n=8).	61

datos graficados: q1, mediana, q3, valores mínimo y máximo	61
fig. 21. Imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido (sem). Se muestran imágenes de cráneos control (izquierda) y cráneos experimentales (derecha) a diferentes tiempos después de la cirugía (1, 2, 3 y 4 meses).....	62
fig. 22. Relación ca/p (% atómico) grupo control vs. Experimental. Se muestran los promedios de la relación ca/p de las regiones de interés en los cráneos analizadas (n= 3) con eds a diferentes tiempos después de la cirugía (1, 2, 3 y 4 meses).....	63
datos graficados: promedio \pm error estándar.....	63
fig. 23. Histología del tejido craneal (4 meses postquirúrgico) tinción hematoxilina-eosina. A - se muestra una imagen del cráneo experimental donde el tejido presenta infiltrado inflamatorio (aumento 10x). B - se muestra una imagen del cráneo presentando tejido óseo normal (aumento 10x). C – acercamiento a 40x del cráneo experimental. D – acercamiento a 40x del cráneo control.....	65
fig. 24. Número promedio de astrocitos. Grupo experimental vs. Control. Se muestra el promedio del número de astrocitos expresando gfap en las regiones de interés analizadas (n= 3) a diferentes tiempos después de la cirugía (2, 3 y 4 meses). *p = 0.031, diferente del grupo control.....	66
datos graficados: promedio \pm error estándar.....	66
fig. 25. Hidroxiapatita sintetizada por ma, 2012 con morfología de flor.....	68

III. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tabla comparativa de diferentes biomateriales comúnmente utilizados para craneoplastias. (alkhaibary et al., 2020, aydin et al., 2011, kaur et al., 2014, piazza et al., 2017 & spetzger et al., 2010).	24
tabla 2. Tabla que resume los diferentes grados posibles de astrogliosis. (sofroniew, 2015).....	36
tabla 3. Se muestran los valores obtenidos con la prueba estadística realizada (u de mann-whitney) comparando el número de aciertos logrados del grupo experimental contra el grupo control.....	56

IV. LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- AgO** – Óxido de plata
- ATP** – Adenosín trifosfato
- BHE** – Barrera hematoencefálica
- Ca** – Calcio

CaO – Óxido de calcio
Cl – Cloro
CO₂ – Dióxido de carbono
CuO – Óxido de cobre
EDS – Espectroscopia de energía dispersiva
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial
HA – Hidroxiapatita
KPBS –
Mg – Magnesio
MMA - Metacrilato de metilo
N₂ – Nitrógeno
Na₂O – Óxido de sodio
NiDAB – Diaminobenzidina con níquel
O₂ – Oxígeno
P – Fósforo
P₂O₅ – Óxido de fósforo
PEEK – Polietereetercetona
PFA – Paraformaldehído
PMMA – Polimetilmetacrilato
PO₄ – Fosfato
SEM – Microscopía electrónica de barrido
SiO₂ – Óxido de silicio
SNC – Sistema Nervioso Central
Ti – Titanio
TiO₂ – Óxido de titanio
ZnO – Óxido de zinc

V. INTRODUCCIÓN

Los biomateriales son materiales que se utilizan para corregir o reemplazar algún tejido dentro del cuerpo humano o animal. Una de las características más importantes con la que deben cumplir los biomateriales es ser biocompatibles, es decir cumplir la función médica para la cual fue diseñado sin inducir toxicidad o efectos indeseados en el organismo. En el caso de las craneoplastias existe una variedad de materiales que se pueden utilizar. Sin embargo, no existe un consenso respecto a cuál es el mejor material para llevar a cabo este procedimiento. Cuando se trata de materiales utilizados para elaborar prótesis de hueso, idealmente deben tener propiedades osteoinductivas y osteoconductoras. Los vidrios bioactivos son materiales que tienen un gran potencial como prótesis óseas ya que han mostrado excelentes resultados de biocompatibilidad, osteointegración y osteoinducción.

Uno de los problemas con respecto a los materiales utilizados para craneoplastias es que existe muy poca literatura con respecto a si la degradación de los materiales comúnmente utilizados podrían resultar tóxicos para el cerebro, y en caso de ser así, si esto se vería reflejado en síntomas y signos neurológicos.

En la presente tesis se desarrolló y caracterizó un implante craneal fabricado con vidrio bioactivo base fosfato con una composición química de $45\text{P}_2\text{O}_5 - 30\text{CaO} - 24\text{Na}_2\text{O}$ y 1TiO_2 . Este andamio fue evaluado *in vivo* en ratas Wistar macho para analizar el efecto de osteointegración, degradación y estimulación de regeneración del tejido óseo, así como para determinar sus posibles efectos secundarios en el cerebro. Los resultados obtenidos son prometedores, ya que el andamio favorece la regeneración del tejido craneal sin inducir daño a los tejidos circundantes, mostrando una alta biocompatibilidad y propiedades osteoconductoras.

VI. ANTECEDENTES

3.1 Tejido óseo

Los huesos son órganos que forman parte del sistema esquelético. Tienen seis funciones básicas: brindar sostén, protección y asistencia en el movimiento, además de participar en la homeostasis mineral, la producción de células sanguíneas y en el almacenamiento de triglicéridos (Tórtora & Derrickson, 2018). El tejido óseo está compuesto de células, una matriz extracelular, y lípidos. Aproximadamente 20% del hueso se conforma de agua, y el 80% restante (peso seco) se constituye de 30-35% sustancias orgánicas y 65-70% sustancias inorgánicas (Oryan et al., 2015).

En el tejido óseo se encuentran cuatro tipos de células: células osteogénicas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Fig. 1). Las primeras, son células madre derivadas del mesénquima y sus hijas se transforman en osteoblastos. Los osteoblastos, a su vez, son las células encargadas de formar el hueso; sintetizan y secretan fibras colágenas y otros componentes que forman la matriz osteoide. Los osteocitos son osteoblastos maduros y se encargan de regular el metabolismo del tejido óseo. Finalmente, los osteoclastos son células gigantes que liberan enzimas lisosómicas y ácidos que degradan la matriz osteoide en un proceso llamado resorción (Tórtora & Derrickson, 2018). La absorción y formación de huesos depende de un balance entre osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Fillingham & Jacobs, 2016).

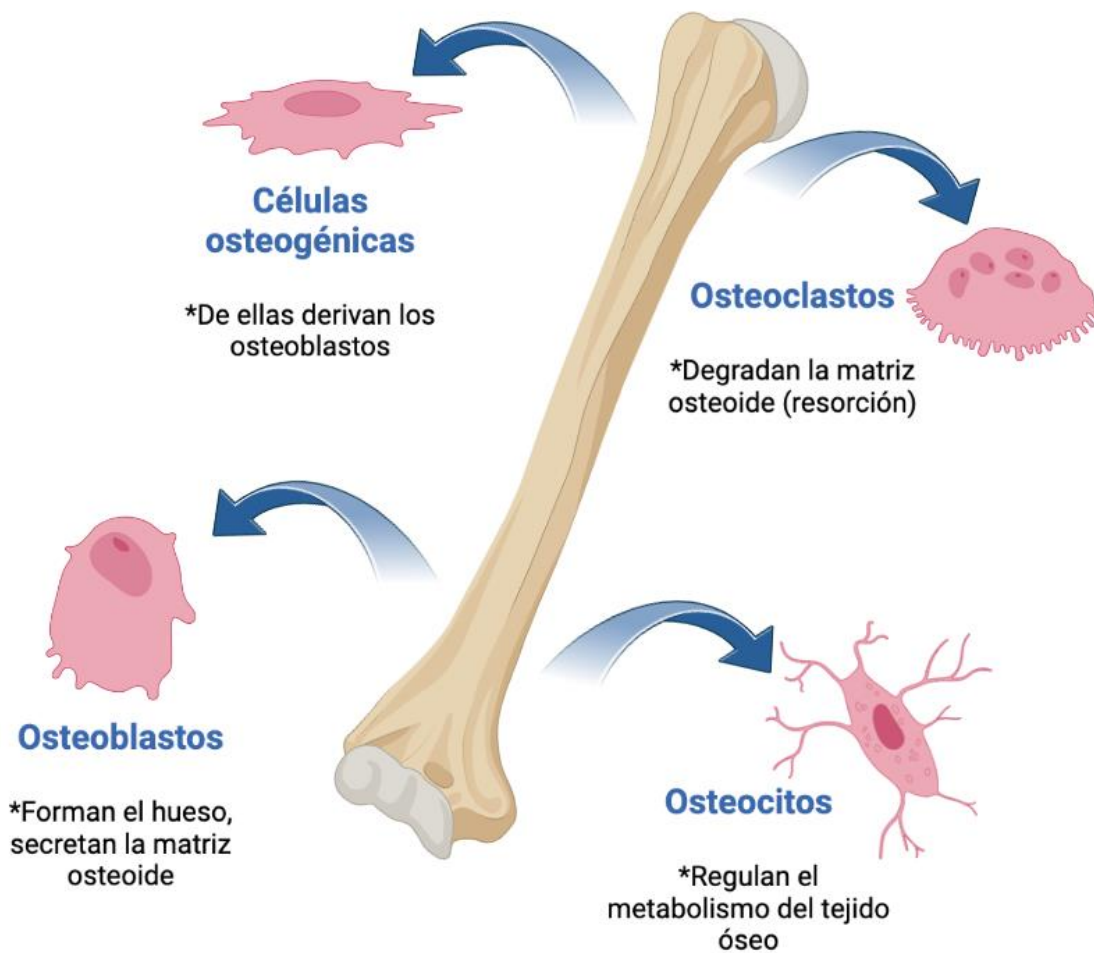


Fig. 1. Células que conforman el tejido óseo y sus funciones.

*Imagen creada en BioRender.com

La fase orgánica de la matriz se compone de fibras de colágeno tipo I, otros tipos de colágeno, y proteínas no colágenas. Por otro lado, la fase inorgánica está formada principalmente por sales minerales y calcio en forma de hidroxapatita (Oryan et al., 2015). La hidroxapatita natural está compuesta principalmente de calcio y fósforo, aunque también presenta porcentajes bajos de elementos tales como el sodio, el cloro y magnesio, los cuales juegan un rol importante en el proceso de remodelación ósea (García-Garduño & Reyes-Gasga 2006).

3.2 Biomateriales

A lo largo del tiempo, se han sugerido diversas definiciones de biomateriales, sin embargo, la utilizada actualmente fue publicada por Zhang y Williams en 2019 y establece que un biomaterial es "un material diseñado para tomar una forma que puede dirigir, a través de interacciones con los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico" (Zhang et al., 2022).

Dicho de otra forma, los biomateriales son materiales que fueron diseñados para interactuar con sistemas biológicos. Se pueden utilizar con fines terapéuticos, por ejemplo, para corregir o reemplazar algún tejido del cuerpo humano o animal, o bien, con fines diagnósticos. Pueden ser de origen sintético o de origen biológico. Sin embargo, al estar en contacto directo con sistemas biológicos, los biomateriales deben cumplir con ciertos requisitos, tales como: no ser tóxico, ser químicamente estable e inerte, tener una resistencia mecánica adecuada, tener una densidad y peso adecuados, entre otros.

Dentro de los biomateriales podemos encontrar metales, cerámicos, vidrios, polímeros, entre otros. Algunos ejemplos del uso de biomateriales en la actualidad incluyen (Fig. 2):

- Implantes, por ejemplo, marcapasos, injertos, prótesis de cadera, implantes dentales, anticonceptivos, etc.
- Material quirúrgico y de curación, tales como suturas, clavos y grapas.
- Sistemas de administración de medicamentos.
- Biosensores.



Fig. 2. Imagen que muestra ejemplos de aplicaciones de biomateriales.

Una de las características más importantes que deben tener los biomateriales es el ser biocompatibles. Este término hace referencia a la capacidad que tiene un material a cumplir la función médica para la cual fue diseñado, a inducir una respuesta adecuada en el

huésped y a ser capaz de interactuar *in vivo* sin inducir toxicidad o efectos indeseados en el organismo (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2019).

Es importante mencionar también, que cuando hay una implantación de biomateriales se desencadenan reacciones fisiológicas en el huésped. Dentro de las respuestas fisiológicas que pueden presentarse, se pueden dar lugar a procesos tales como: interacción entre el biomaterial y la sangre, creación de una matriz provisional, procesos inflamatorios agudos y crónicos, reacción a cuerpo extraño y fibrosis (Anderson et al., 2008).

3.2.1 Historia de los biomateriales

La búsqueda de reemplazar o reparar tejidos dañados con materiales externos al cuerpo tiene una larga historia. Existen registros que parecen indicar que ya en tiempos del Egipto Antiguo se tenían este tipo de prácticas. Asimismo, en Grecia y Roma (siglo VII a.C - siglo IV d.C) se utilizaban metales y otros materiales para tratar heridas (Vallet-Regí, 2022). Existen también registros de cómo en la civilización maya se utilizaba nácar obtenido de conchas como implantes dentales, e incluso había un reconocimiento de que el material era capaz de integrarse al hueso (Ratner & Zhang, 2020).

En el siglo XVI, en Europa se comenzó a experimentar con oro y plata, principalmente como tratamientos dentales, y más tarde, con la llegada de avances tecnológicos y médicos tales como los rayos X y la anestesia, en el siglo XIX se inició con el uso de materiales diversos para ser implantados dentro del cuerpo humano. Fue gracias a la experimentación con estos materiales, que se comenzaron a conocer dos grandes desventajas del uso de metales como implantes; por un lado, este tipo de materiales presentaban corrosión al entrar en contacto con el organismo, y sus fluidos, y por el otro, las propiedades mecánicas que presentaban eran precarias (Vallet-Regí, 2022).

Tanto la Primera Guerra Mundial, como la Segunda jugaron un papel importante en el avance del área de biomateriales. Esto se dio por un lado, gracias a que se contaban con

más avances tecnológicos y científicos, así como por la gran necesidad de buscar alternativas para tratar a las personas que habían sido heridas por las guerras (Vallet-Regí, 2022). Sin embargo, por la urgencia de la situación, no se hacían suficientes pruebas experimentales con los materiales previas a ser implantadas en el cuerpo, e incluso se utilizaban materiales que ya estaban listos para usarse y cuyo fin se había pensado originalmente para otra cosa. Dentro de estos materiales se encontraban silicones, poliuretano, acero inoxidable, nylon, teflón y titanio (Ratner & Zhang, 2020).

No fue sino hasta la década de los 60s que se comenzaron a cuestionar los daños en el organismo que se presentaban durante y después de colocar un implante en el cuerpo. Incluso si había investigaciones con este enfoque, la falta de comprensión que se tenía de detalles del sistema inmune (tales como el sistema del complemento) hacía que no se pudiera determinar exactamente por qué una reacción adversa podría estar sucediendo (Ratner & Zhang, 2020). Además, este tipo de prácticas no estaban reguladas por ninguna institución gubernamental ni médica. Fue entonces, durante esta década que surgió una nueva discusión, y por primera vez se habló del término “biocompatibilidad” (Vallet-Regí, 2022).

Desde ese momento, también se entendió que tanto personal del área de las ciencias de la salud como ingenieros debían colaborar de manera más cercana para poder desarrollar materiales con mejores características. El área de biomateriales continuó creciendo gracias también a la creación de sociedades tales como la American Biomaterials Society en 1979 y la European Society of Biomaterials en 1979 (Vallet-Regí, 2022).

3.3 Craneoplastía

La craneoplastía es un proceso quirúrgico común por el medio del cual se reparan defectos craneales (Alkhaibary et al., 2020). Se lleva a cabo por razones cosméticas o para restaurar procesos del flujo normal de líquido cefalorraquídeo y brindar protección a estructuras vitales como el cerebro (Piazza et al., 2017).

Los defectos craneales pueden ser de tipo congénito o adquiridos (Zubillaga et al., 2007). Cuando se trata de niños menores de 3 años de edad, los defectos congénitos (también llamadas malformaciones) y fracturas son las causas principales por las que se lleva a cabo una craneoplastia (Fig. 3). En todos los otros grupos de edad, la extirpación de tumores y las craneotomías descompresivas (procedimiento quirúrgico por medio del cual se retira una parte del cráneo) son la principal causa de defectos craneales (Aydin et al., 2011).

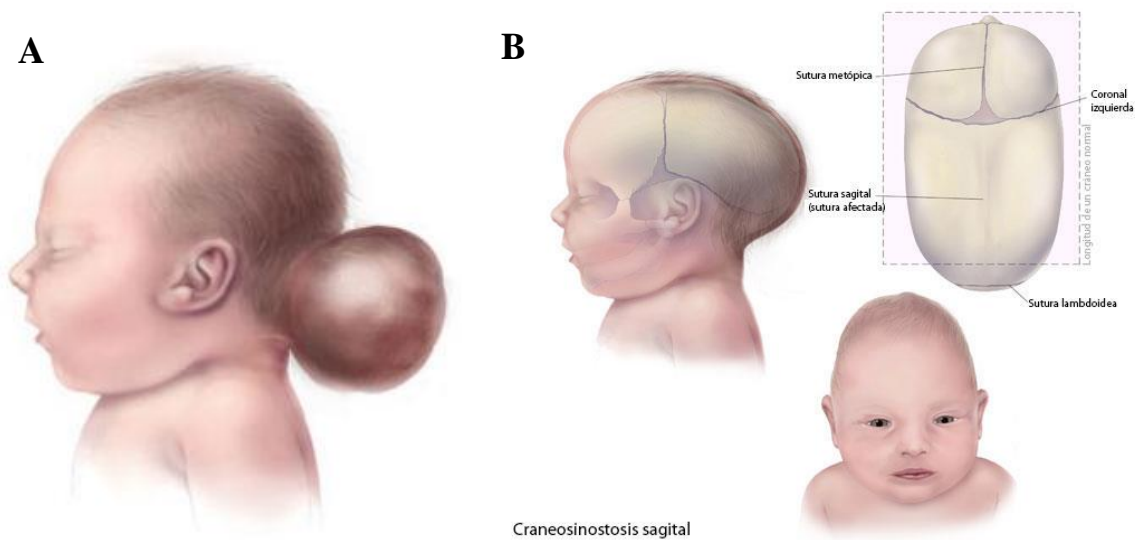


Fig. 3. Ejemplos de defectos craneales congénitos. A – Encefalocele. Defecto del tubo neural causado cuando el tubo no se cierra completamente durante la gestación. Se produce una abertura en alguna región del cráneo. **B – Craneosinostosis.** Defecto en el cual los huesos del cráneo se cierran de manera prematura, antes de que el cerebro se termine de formar, por lo que a medida que crece, el cráneo puede deformarse. Existen diferentes tipos de craneosinostosis dependiendo las suturas que se unan prematuramente.

*Tomada del Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, Centro Nacional de Defectos Congénitos y Discapacidades del Desarrollo.

La craneoplastia es un procedimiento que data desde tiempos antiguos. Hay evidencias de prácticas relacionadas a la craneoplastia desde 7000 a.C. Sin embargo, el enfoque ha cambiado a lo largo de la historia, ya que en civilizaciones antiguas, los materiales utilizados para craneoplastias se escogían dependiendo de la jerarquía del paciente, ya

que en ese momento a los materiales se les daba mayor importancia como un símbolo de estatus en vez de por su eficacia (Shah et al., 2014). De manera general, los materiales que se utilizan en craneoplastias se dividen en dos grandes grupos: biológicos y sintéticos. Los biológicos a su vez se dividen en injertos autólogos, alógrafos y xenógrafos (Fig. 4).

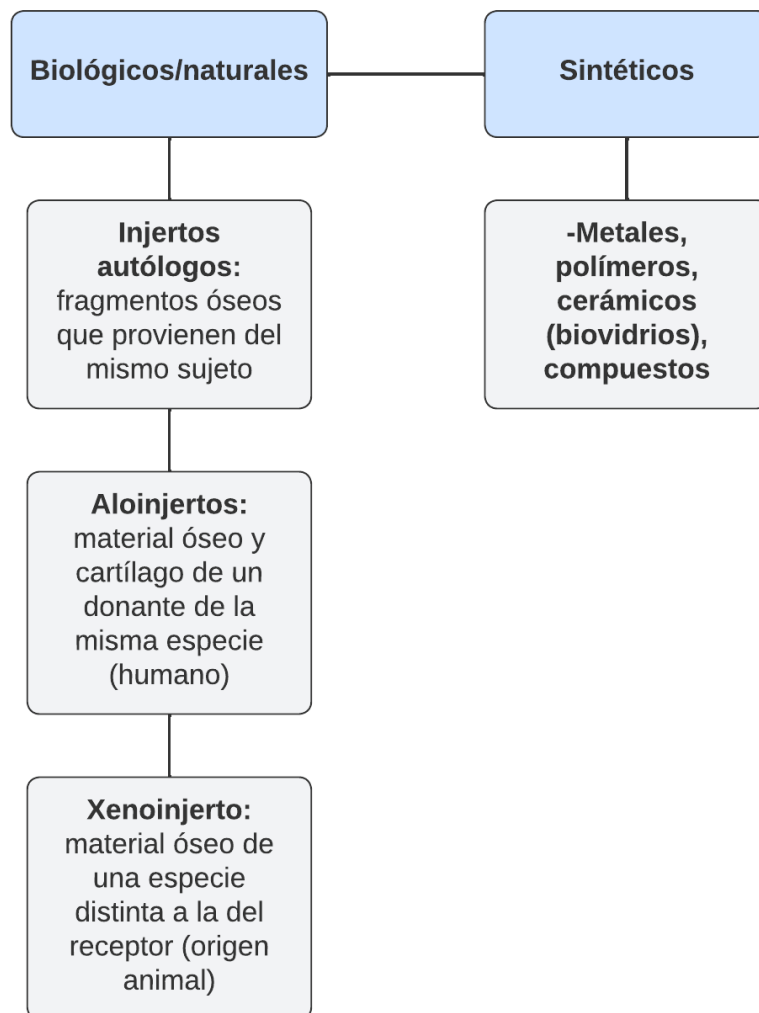


Fig. 4. Diagrama que muestra las diferentes opciones de materiales que se pueden utilizar para reconstrucciones del cráneo.

3.3.1 Materiales utilizados para craneoplastia

Los materiales biológicos fueron de los primeros en ser estudiados. En el siglo XVII, un cirujano llamado Jacob van Meekeren intentó reparar el cráneo de un paciente utilizando hueso de un perro como implante (xenoinjerto). Al principio, la intervención parecía haber sido exitosa, pero más tarde van Meekeren se vio obligado a realizar una segunda cirugía para remover el implante. Los xenoinjertos fueron más tarde reemplazados por injertos autólogos, ya que los médicos se dieron cuenta de que estos tenían mejores resultados (Shah et al., 2014). A pesar de los buenos resultados que ofrecen los injertos autólogos y su bajo costo, a lo largo de la historia se han buscado adaptar otros materiales para intentar reparar regiones del cráneo.

El aluminio fue de los primeros materiales metálicos utilizados para este fin, aunque al experimentar con este material se llegó a la conclusión de que era propenso a causar infecciones, además de tardar mucho tiempo en desintegrarse y causar daño al tejido circundante. De manera posterior a la Primera Guerra Mundial se probó con oro y plata, pero la utilización de estos materiales resultaba demasiado caro y no apto como prótesis craneal. Después de la Segunda Guerra, se sustituyeron los materiales antes mencionados por tantalito. Dicho material presentaba una adecuada resistencia a la corrosión y causaba menos infecciones, pero era un material caro de producir y presentaba el gran inconveniente de ser un buen conductor de temperatura (Shah et al., 2014).

Ante la falta de un material metálico que presentara características adecuadas, la atención se dirigió hacia los materiales acrílicos, los cuales ya se habían comenzado a utilizar en la industria dental con buenos resultados. El MMA presentaba características favorables a comparación de los metales, tales como ser resistente al calor, ser inerte y radiolúcido, pero también tenía desventajas como por ejemplo, tenía un alto riesgo de infección y sus residuos podían ser tóxicos (Shah et al., 2014).

Más tarde se comenzó a experimentar con hidroxiapatita sintética, la cual demostró tener una baja tasa de rechazo por parte del organismo y una unión adecuada al tejido óseo.

Sin embargo, una de las principales limitaciones de este material es que es muy susceptible a fracturas (Shah et al., 2014).

Los polímeros también son un grupo de materiales que se han considerado y han sido probados para llevar a cabo craneoplastías. De manera general, son inertes, fáciles de moldear y algunos pueden ser radiolúcidos, como por ejemplo el polietere tercetona (PEEK). El PEEK es un material que en años recientes ha sido utilizado para diseñar prótesis personalizadas para los pacientes, ya que pueden ser modeladas por computadora e impresas en 3D (Fig. 5). Aunque este material tiene las desventajas de que es más caro de producir que otros materiales y no cuenta con propiedades osteoinductivas (Shah et al., 2014).



Fig. 5. Imagen de una craneoplastía con un implante hecho de PEEK.
*Tomada de Torres-Criollo et al., 2021.

Los vidrios bioactivos y vitrocerámicos son materiales que en años recientes, han sido estudiados dado que han mostrado tener un gran potencial para la regeneración del tejido

óseo (Kaur et al., 2014). Los biovidrios representaron un gran avance en el área de ingeniería del tejido óseo, al ser uno de los primeros materiales completamente sintéticos que se unen al hueso. El biovidrio fue desarrollado por el Dr. Larry Hench y sus colegas en la Universidad de Florida. Originalmente, las investigaciones de Hench estaban centradas en vidrios y su interacción con la radiación nuclear. Fue en 1967 que después de tener una plática con un coronel que había participado en la guerra de Vietnam que Hench decidió trabajar en una propuesta de vidrio hecho a base de silicato y vidrios cerámicos con cantidades críticas de iones de Ca y P para su uso como implantes, hipotetizando que no serían rechazados por el hueso. Fue así que en 1969, Hench creó un vidrio que nombró 45S5 (44.5 wt% SiO₂), el cual se probó en fémures de ratas, obteniendo como resultados que el material se unía al tejido óseo (Hench, 2006). Más tarde, se demostró que la superficie de este material al entrar en contacto con fluidos biológicos se convertía en una estructura rica en fosfato, probablemente en hidroxiapatita (Ratner & Zhang, 2020).

En la actualidad, el buen desempeño de materiales autólogos y sintéticos han hecho que se consideren como las mejores opciones para aplicaciones en craneoplastía (Alkhaibary et al., 2020). Como se ha visto, existe una amplia gama de biomateriales que pueden ser utilizados, cada uno presenta ventajas y desventajas (Tabla 1). Idealmente, el material utilizado para craneoplastías debe ser radiolúcido, capaz de ajustarse al defecto craneal y cerrarlo completamente, ser no infeccioso, presentar propiedades biomecánicas adecuadas, debe ser barato de producir, fácil de moldear y que no se dilate con calor (Aydin et al., 2011). Uno de los retos principales en el desarrollo de implantes óseos es el desarrollar un andamio que presente las propiedades mecánicas adecuadas y que al mismo tiempo sea biodegradable. Además, el objetivo final de la ingeniería de tejidos óseos, es fabricar un material que sea gradualmente reemplazado por tejido óseo del paciente (Chen et al., 2012, Navarro et al., 2003).

Tabla 1. Tabla comparativa de diferentes biomateriales comúnmente utilizados para craneoplastias. (Alkhaibary et al., 2020, Aydın et al., 2011, Kaur et al., 2014, Piazza et al., 2017 & Spetzger et al., 2010).

<i>Materiales</i>	Ventajas	Desventajas
<i>Injertos autólogos</i>	Son de bajo riesgo de infección, presentan buenas propiedades osteoconductoras.	Existe el riesgo, en caso de necesitar una segunda cirugía por reabsorción del hueso y/o fracturas, estética deficiente.
<i>Mallas de titanio</i>	Presentan buena resistencia mecánica, bajo riesgo de infección, buenos resultados cosméticos.	Puede ser conductor de calor o frío, se utiliza como dispositivos médicos en estudios de imagenología.
<i>Vitrocerámicos</i>	Son osteoconductoras, osteoinductoras, resistentes a la corrosión.	Son frágiles, existe un alto riesgo de fracturas.
<i>Polímeros</i>	Son maleables, fácil de fabricar, buenos resultados cosméticos.	Presentan baja resistencia mecánica, alta degradación a lo largo del tiempo.

Los injertos óseos varían en cuanto a sus propiedades de osteoconducción, osteoinducción, osteogénesis y soporte estructural. El concepto de osteoconducción hace referencia al proceso por el medio del cual un injerto funciona como un andamio, alojando de manera pasiva a las células necesarias. La osteoinducción es el proceso donde se reclutan, proliferan y se diferencian las células madre mesenquimales en condroblastos y osteoblastos (Fillingham & Jacobs, 2016). En el caso de los materiales utilizados para elaborar prótesis óseas se prefieren aquellos que tengan propiedades osteoinductivas y osteoconductoras (Spetzger et al., 2010).

Una característica importante de los materiales utilizados para injertos óseos es que deben funcionar como plantillas para favorecer el crecimiento y el anclaje celular; de manera inicial proveyendo de estabilidad mecánica y estructural hasta que las células produzcan una matriz extracelular adecuada (Di Silvio & Jayakumar, 2009). Los vidrios bioactivos son materiales que generalmente son capaces de adherirse a tejido óseo circundante y promover la formación del mismo (Ducheyne, 1999).

Un material bioactivo es aquel que induce una actividad biológica específica al estar en contacto con tejido vivo. Los vidrios bioactivos, presentan un proceso de dos pasos al ser implantados en el cuerpo; primero, la superficie interacciona con fluidos corporales y después se forma una capa de apatita que provee una superficie de unión con los tejidos (Kaur et al., 2014). Esta fase es química y estructuralmente equivalente a la fase mineral del hueso (Chen et al., 2012). Los vidrios a base de fosfato tienen una tasa de disolución rápida a comparación de otros biomateriales. Sin embargo, se pueden agregar óxidos tales como el TiO_2 para cambiar la velocidad de degradación e incrementar las propiedades mecánicas (Ruiz-Aguilar et al., 2017)

3.4 Síntesis de los biovidrios

Existen dos principales técnicas utilizadas para la fabricación de vidrios bioactivos, la técnica de fusión- temple y la de sol-gel.

Fusión-temple: el vidrio se prepara utilizando cantidades estequiométricas de diferentes óxidos o carbonatos de alta pureza (99.9%). Después, éstos son mezclados en un molino de bolas, y el polvo resultante de este proceso se funde a altas temperaturas. La fusión obtenida se vacía en moldes con la forma que se le quiere dar al vidrio. En algunas ocasiones, al vidrio se le da un tratamiento posterior llamado recocido. En este proceso se utiliza una temperatura de 500°C para eliminar tensiones internas de los vidrios.

Sol-gel: esta técnica se utiliza para la fabricación de vidrios porosos y se consta de procesos de hidrólisis, polimerización, gelificación, secado y deshidratación. Lo que se

hace es que una solución (sol) pase a un estado de gel, que está formado tanto de una fase líquida, como sólida. Como resultado se tiene un material que tiene una tasa de degradación más rápida, y por lo tanto, los vidrios fabricados con esta técnica, se convierten más rápidamente a HA a comparación de aquellos obtenidos por el método de fusión-temple. De este proceso se obtienen vidrios que presentan una mayor pureza y homogeneidad. Sin embargo, cuentan con una menor fuerza (Kaur et al., 2014).

A las composiciones de biovidrios se les puede añadir pequeñas cantidades (dopaje) de diferentes elementos y compuestos para modificar sus propiedades. Por ejemplo, el añadir ZnO, CuO, AgO, o TiO₂ permite que se liberen iones que pueden brindar propiedades antibacteriales (Kaur et al., 2014). Además, los biovidrios a los que se les agrega titanio basados en el sistema P₂O₅-CaO-Na₂O hace que el vidrio se vuelva más rígido y resistente a la hidratación, mecanismo por el cual se disuelven este tipo de vidrios. En otras palabras, la solubilidad puede ser controlada al adicionar TiO₂ (Navarro et al., 2001)

En la biodegradación de un material in vivo, están involucrados mecanismos fisicoquímicos y biológicos. Cuando se trata de propiedades fisicoquímicas, la solubilidad juega un papel importante, ya que afecta la estabilidad de un material in vivo; si es muy soluble será reabsorbido por medio de disolución pasiva en los fluidos fisiológicos antes de que pueda haber formación de nuevo tejido. Por otro lado, en materiales menos solubles ocurre una reabsorción activa, donde el material pasa por un proceso similar al de la remodelación del tejido óseo de forma natural. Es por esto que la degradación de un material es una pieza clave (Navarro et al., 2003).

3.5 Degradación del implante

Los vidrios a base de fosfato se conforman de una composición química P₂O₅ – CaO – Na₂O y son completamente degradables (Ruiz-Aguilar, 2017). La degradación de estos materiales es un factor importante cuando se trata de la regeneración ósea (Davison et al., 2014).

La degradación de los biocerámicos se puede dar por varios mecanismos fisicoquímicos. Uno de ellos es por medio de una degradación iónica, la cual depende del intercambio de aniones y cationes entre el material y el medio fisiológico en donde se encuentra implantando. El resultado de esta degradación es una capa de apatita carbonatada. Otro mecanismo por el cual se da la degradación, es por medio de los cambios morfológicos, funciones y metabolismo celulares. Este proceso está mediado por osteoclastos, células multinucleadas que reabsorben la superficie del material y fagocitan partículas degradadas. Se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* que los osteoblastos son capaces de degradar fosfatos de calcio de manera similar al material óseo (Davison et al., 2014).

Uno de los retos actuales en la ingeniería de materiales es lograr un balance entre el crecimiento (regeneración) del tejido y la tasa de degradación del material utilizado (Davison et al., 2014).

3.5.1 Andamio y reparación del tejido óseo

La respuesta celular al material del andamio involucra procesos de osteoinducción, osteoconducción y osteointegración. Este conjunto de fenómenos es lo que hace posible la formación de hueso y la unión e incorporación entre el material y el huésped. Los eventos celulares que ocurren al interaccionar el tejido con el andamio se pueden dividir en 5 fases (Di Silvio & Jayakumar, 2009) (Fig. 6).

Primero, hay una formación de hematoma como consecuencia del daño generado al preparar el tejido para la implantación del andamio y a la implantación misma. La fase de inflamación es el inicio de la proliferación, diferenciación y migración de células mesenquimales. Al mismo tiempo, se reclutan neutrófilos linfocitos y monocitos, los cuales liberan factores de crecimiento. Posteriormente, inicia la vascularización, etapa en donde comienza el desarrollo de tejido fibrovascular en el andamio y en el tejido periférico. Este paso es esencial, ya que de esto dependerá la aportación de nutrientes del ambiente al interior del andamio. En el proceso de reabsorción, los osteoclastos comienzan a actuar directamente sobre la superficie del andamio, antes de que la

regeneración del hueso se logre por medio de osificación intramembranosa o endocondrial. Finalmente, cuando se logra una estabilidad mecánica comienza la fase de remodelado. La rapidez de ésta última depende de la edad, la genética, las condiciones metabólicas y patológicas del huésped, entre otras cosas (Di Silvio & Jayakumar, 2009).

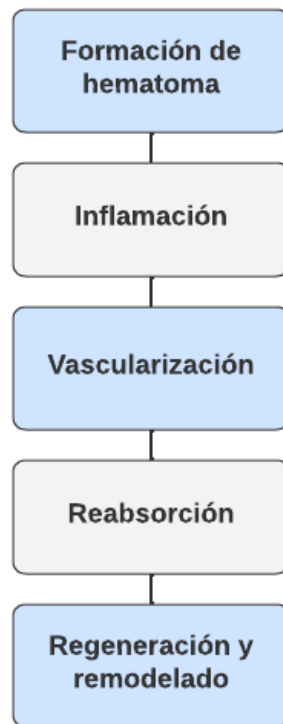


Fig. 6. Diagrama que muestra las fases que ocurren desde la implantación del andamio hasta la regeneración y remodelación ósea.

Al mismo tiempo que se busca que el andamio favorezca los procesos anteriores, es necesario asegurar que las partículas residuales del mismo no causen toxicidad. En el caso de la craneoplastía, debido a la proximidad que se tiene con el cerebro, se debe considerar que los materiales implantados podrían provocar neurotoxicidad (Las et al., 2021).

3.5.2 Implantes y neurotoxicidad

Existe muy poca literatura con respecto al estudio de si la degradación de los materiales utilizados en ingeniería de tejidos podrían resultar tóxicos para el cerebro, y en caso de ser así, si esto se traduciría en afectaciones neurológicas. Las nanopartículas de biomateriales pueden acceder a la sangre o a los nódulos linfáticos y luego desplazarse a diferentes órganos tales como el corazón, los riñones e incluso el cerebro. Se ha encontrado también que partículas de biomateriales se pueden acumular en diferentes regiones cerebrales tales como el bulbo olfatorio, el hipocampo, la corteza cerebral y el estriado (Ge et al., 2019).

Pikis et al., 2015 analizaron casos de pacientes quienes habían tenido cirugías de reconstrucción craneal con polimetilmetacrilato (PMMA) y encontraron que algunos presentaban signos y síntomas de disfunción neurológica, por lo que sugirieron que la irrigación sanguínea podría jugar un papel en procesos de neurotoxicidad al disperar monómeros residuales del material hacia el cerebro.

Por otro lado, Czajka et al., 2015 analizaron varios casos donde se reportó que nanopartículas de titanio resultaban tóxicas para el Sistema Nervioso Central (SNC), resultando también en disunciones neurológicas. Dentro de las vías reportadas por las que nanopartículas de titanio han llegado al SNC se encuentran neuronas olfatorias y a través de la sangre, logrando atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Fig. 7). La BHE es una barrera de permeabilidad altamente selectiva que regula el paso de moléculas desde el torrente sanguíneo al cerebro. Esta barrera se forma por células cerebrales endoteliales, astrocitos y pericitos, que en conjunto contribuyen a la homeostasis cerebral. La disfunción de la BHE correlaciona con enfermedades neurodegenerativas (Shelly et al., 2021). Ge et al., también describieron que algunas nanopartículas de biomateriales pueden atravesar la BHE por diferentes vías tales como por difusión transcelular, difusión paracelular, transcitosis mediada por receptores y transcitosis adsortiva.

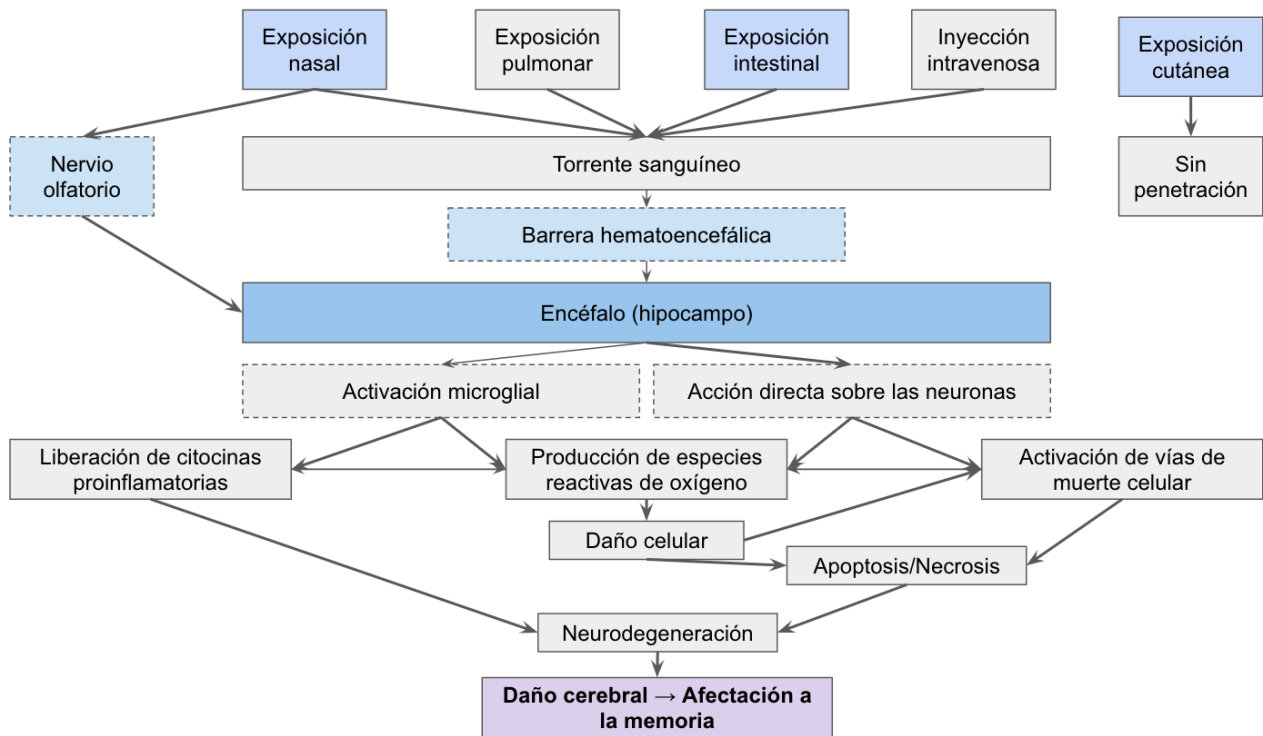


Fig. 7. Vías reportadas de toxicidad causada por penetración de nanopartículas de TiO_2 al SNC. Se muestra un resumen de las vías que se conocen hasta ahora por medio de las cuales nanopartículas de TiO_2 pueden acceder al Sistema Nervioso Central. Sin embargo, se ha observado que los efectos de las nanopartículas de TiO_2 dependen de la dosis, ruta, y tiempo de exposición.

*Figura modificada de Czajka et al., 2015.

En el caso de los biovidrios, Moreira- Gonzalez et al., 2005 describieron el uso del biovidrio 45S5 para reconstrucciones de la bóveda craneal en conejos. En este trabajo de investigación se describe que las partículas del material utilizado tienden a migrar hacia tejido circundante cuando el área que necesita ser reconstruida es de gran tamaño, y que cuando éstas migran, comienzan a degradarse en el tejido suave, provocando una reacción inflamatoria alrededor. Sin embargo, dentro del estudio no se consideró hacer pruebas conductuales a los animales para estudiar si la migración del material podría causar disfunciones neurológicas.

3.6 Modelos animales

La evaluación *in vitro* de biomateriales tiene ciertas limitaciones, por ejemplo, no hay una respuesta inmune o inflamatoria, además de la ausencia de la cascada de eventos que se pueden dar cuando se coloca un implante *in vivo*, tampoco se puede replicar un ambiente 3D de órganos y tejidos como se tiene *in vivo*. Es por ello que se cuestiona la relevancia clínica de las evaluaciones *in vitro* de biomateriales (El-Rashidy et al., 2017).

La utilización de modelos animales para la evaluación de biomateriales permite un estudio de mayor duración, en diferentes condiciones del tejido y a diferentes edades. La especie seleccionada debe presentar similitudes fisiológicas y patológicas a los humanos, debe permitir estudiar los efectos postquirúrgicos en un tiempo relativamente corto, y además se debe tener un conocimiento de las características del hueso cuando se trata de estudiar andamios para tejido óseo. También se debe tener en cuenta el costo que tendrá mantener y cuidar a los animales y el espacio que ocuparán (El-Rashidy et al., 2017).

Los roedores, particularmente las ratas y ratones, han sido de los principales modelos animales utilizados en la investigación biomédica, al igual que en neurociencias. Estos dos modelos presentan diversas similitudes. Sin embargo, el tamaño de las ratas hace que sean más prácticas cuando se va a realizar un procedimiento quirúrgico. Las ratas y ratones también parecen presentar algunas diferencias cuando se trata de procesos de aprendizaje, siendo que los ratones necesitan de más sesiones de habituación y entrenamiento para poder llevar a cabo una tarea. Adicionalmente, las ratas tienen un desempeño más estable a lo largo del tiempo y se ven menos afectadas por distractores fuera de la tarea a realizar. Es por esto que generalmente se prefieren las ratas cuando se tiene un protocolo que involucra pruebas cognitivas (Ellenbroek & Youn, 2016).

3.7 Evaluación conductual

3.7.1 Memoria de trabajo

La memoria es una función cognitiva que, a su vez, involucra varios procesos; reconoce, codifica, consolida y almacena información obtenida de manera previa. Además es capaz de recuperar y evocar dicha información. (Portellano, 2005). A pesar de que existen diferencias en las clasificaciones dependiendo los autores que se consulten, de manera general podemos encontrar dos tipos de memoria: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo (Fig. 8).

Memoria a largo plazo: es la capacidad para retener información a lo largo de periodos de tiempo prolongados, o bien, de forma permanente. Este tipo de memoria involucra la capacidad para evocar la información después de un intervalo de tiempo. Es decir, la memoria a largo plazo permite codificar, almacenar y recuperar información previamente obtenida. A su vez, la memoria a largo plazo se puede clasificar en declarativa (semántica y episódica) y no declarativa (priming, procedimental y condicionamiento clásico).

Memoria a corto plazo: es el proceso por el cual inicialmente hay retención de la información, y tiene una duración breve, que puede ir desde segundos hasta minutos u horas. Dentro de este tipo de memoria podemos encontrar subclasificaciones tales como la memoria sensorial, la memoria inmediata y la memoria de trabajo (Portellano, 2005).

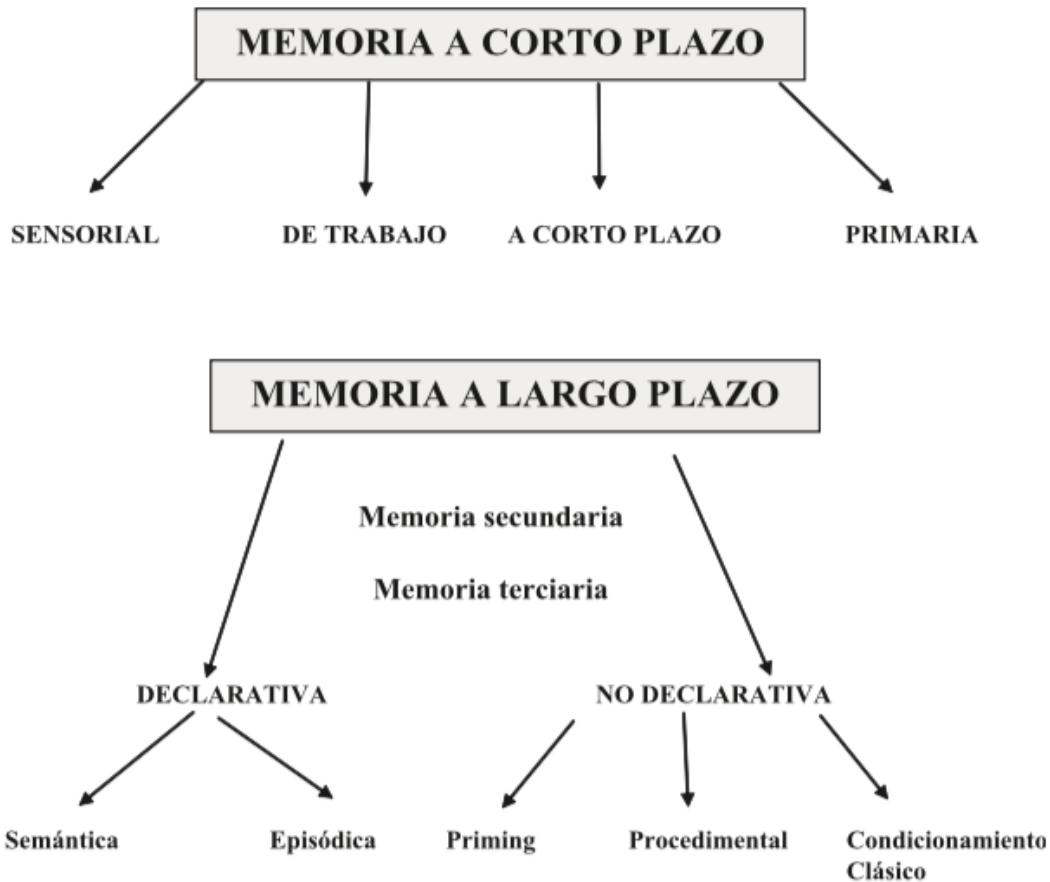


Fig. 8. Diagrama que muestra las diferentes clasificaciones de la memoria. La memoria, a grandes rasgos, puede ser dividida en dos modalidades: memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. A su vez, dentro de estos tipos de memoria podemos encontrar subclasificaciones.

*Tomada de Portellano, 2005.

La memoria de trabajo (también llamada memoria operativa), es un sistema que brinda almacenamiento y manipulación temporal de información que se necesita para llevar a cabo tareas cognitivas (Baddeley, 1992). La memoria de trabajo espacial (spatial working memory) se puede evaluar en el laberinto en T con un protocolo de alternancia recompensada o alternancia forzada.

3.7.2 Aprendizaje asociativo

El aprendizaje se define como la capacidad de adquirir nueva información que a su vez provoca cambios en la conducta y en la función cerebral (American Psychological Association), por lo que está fuertemente relacionada con la memoria. Al igual que con la memoria, el aprendizaje puede ser clasificado en distintos tipos, por ejemplo aprendizaje implícito, explícito, asociativo, no asociativo, entre otros (Kandel et al., 2012).

El aprendizaje asociativo se define como un proceso por el medio del cual, se relaciona un evento con otro, o con un elemento del ambiente. Este tipo de aprendizaje está relacionado con el aprendizaje por condicionamiento y es una conducta adaptativa con la cual se relaciona un evento A con una consecuencia B, por lo que implica la modificación o el desarrollo de conductas específicas, involucrando a sistemas sensoriomotores, que transducen la información de un estímulo, y después se llevan a cabo las acciones correspondientes basadas en la información obtenida (Christian, 2010).

3.7.3 Laberinto en T

En la investigación conductual usando modelos animales, se puede emplear una variedad de instrumentos dependiendo de los procesos cognitivos y conductuales que se quieran estudiar. Una de las pruebas cognitivas que se pueden utilizar y que presenta una gran versatilidad es el laberinto en T. El laberinto en T, es una herramienta en donde es posible evaluar aprendizaje y memoria en roedores (Ngoc et al., 2020). De manera más específica, en este laberinto se pueden estudiar procesos tales como la memoria de trabajo (Deacon & Rawlins, 2006) y el aprendizaje asociativo (Aguayo-Del Castillo et al., 2016).

Asimismo, se pueden utilizar diversos protocolos en el laberinto en T, sin embargo, los parámetros conductuales evaluados suelen ser la respuesta de ingreso a los brazos meta, el porcentaje o número de ensayos resueltos de manera correcta o incorrecta y el

tiempo que le toma al sujeto recorrer el brazo-central, y entrar a alguno de los brazos-meta (latencia) (Aguayo-Del Castillo et al., 2016).

3.7.4 Rueda de ejercicio

La rueda de ejercicio, es una de las pruebas que sirve para evaluar actividad locomotora en roedores (Mann & Chesselet, 2015). Es una prueba en donde se puede medir la actividad voluntaria con los siguientes parámetros: número de rotaciones (distancia recorrida), velocidad, tiempo que se toman los animales para iniciar la prueba y el número de descansos que se toman (Brooks & Dunnett, 2009).

3.8 Astrogliosis

Los astrocitos son células que forman parte del Sistema Nervioso Central (SNC), y que cumplen diversas funciones en el mantenimiento del mismo. Juegan un rol importante en mecanismos homeostáticos tales como; el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, microregulación del flujo sanguíneo cerebral y metabolismo de diversas sustancias, entre otras (Halliday et al., 1996). Además, reaccionan cuando hay daño en el SNC con cambios en la expresión génica, en su estructura celular y en sus funciones. A estos cambios se les denomina astrogliosis. Es importante resaltar que la astrogliosis no es un proceso que se dé de igual forma en todas las situaciones (Sofroniew, 2015).

Puede haber diferentes grados de astrogliosis: leve-moderada, difusa severa y severa con formación de cicatriz glial. En la Tabla 2 se describen las características de cada uno de los grados en los que se puede presentar la astrogliosis, mientras que la Fig. 9 muestra cómo la morfología de los astrocitos cambia dependiendo el grado de astrogliosis.

Tabla 2. Tabla que resume los diferentes grados posibles de astrogliosis. (Sofroniew, 2015).

<p>Leve-Moderada</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en la expresión génica. • Grados variables de hipertrofia del cuerpo y procesos celulares. • Expresión incrementada de proteína acídica fibrilar glial (GFAP). 	<p>Generalmente asociada a:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Trauma leve (sin concusión ni penetración). • Activación inmune innata. • Puede ocurrir en regiones con cierta distancia de lesiones focales del SNC. <p>Tiene potencial considerable para resolverse.</p>
<p>Difusa severa</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en la expresión génica. • Incremento pronunciado de GFAP. • Hipertrofia celular • Proliferación. • Superposición de procesos de astrocitos vecinos. 	<p>Generalmente asociada a:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Daños neurodegenerativos crónicos. • Isquemia. • Trauma difuso. • Algunos tipos de infecciones. <p>El potencial para resolverse y regresar a la normalidad se reduce y hay tendencia a la reorganización de tejidos.</p>

<p>Severa con formación de cicatriz glial</p>	<ul style="list-style-type: none">• Se forma una cicatriz compuesta de (en su mayoría) astrocitos recién proliferados con formas alargadas → sus procesos se sobreponen y forman barreras alrededor del área dañada.	<ul style="list-style-type: none">• La formación de una cicatriz glial se asocia a reorganización del tejido y cambios estructurales permanentes incluso si lo que causó el daño inicial se resuelve.
------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

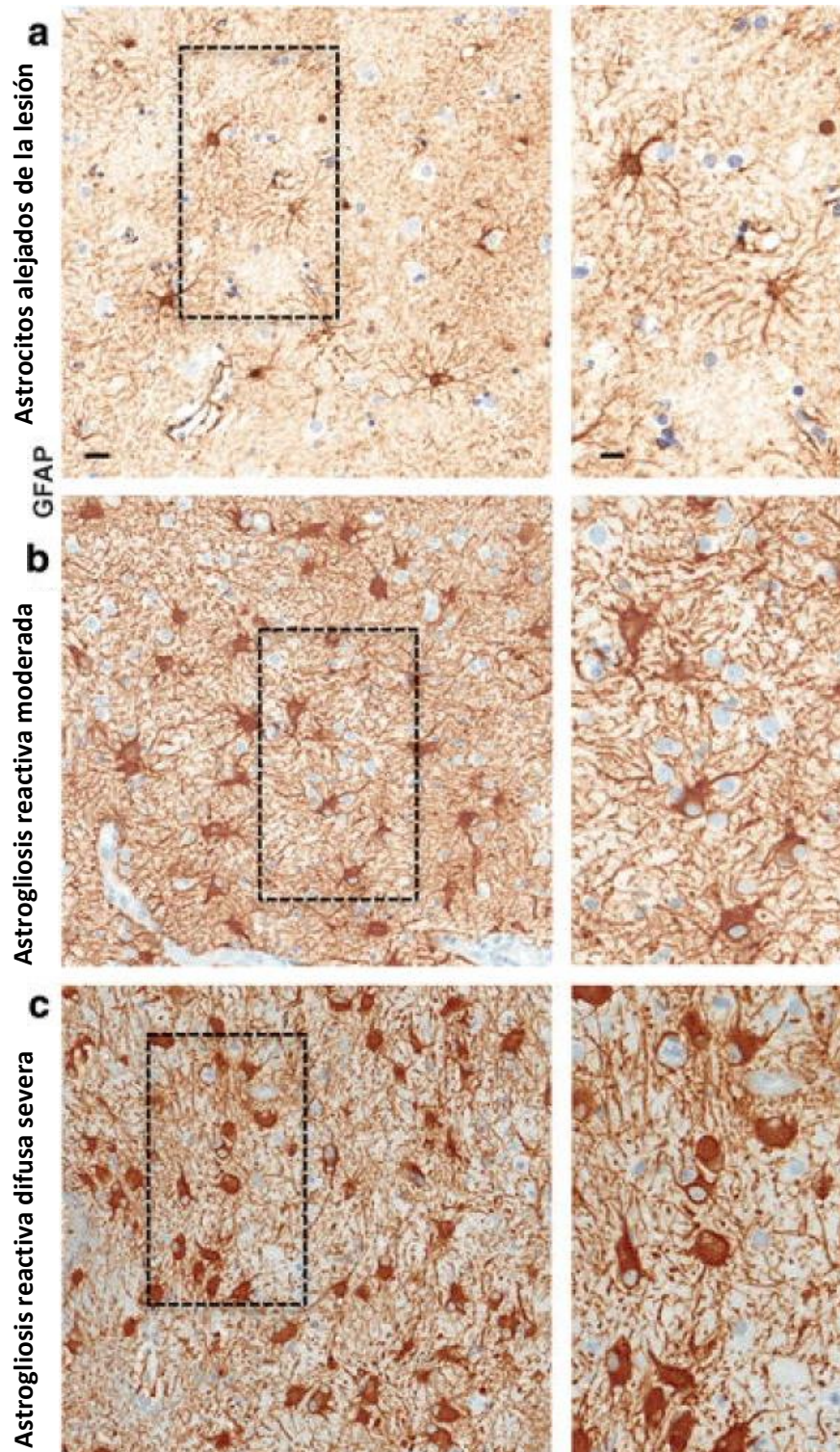


Fig. 9. Imágenes de la morfología de astrocitos en diferentes grados de astrogliosis. Inmunohistoquímica para GFAP con hematoxilina. A – Astrocitos lejos de una lesión, estado saludable. B – Astrogliosis moderada. Expresión de GFAP aumentada, hipertrofia celular, preservación de dominios astrocíticos. C – Astrogliosis difusa severa. Expresión de

GFAP aumentada, hipertrofia, proliferación de astrocitos, procesos astrocíticos se enciman unos con los otros.

*Figura modificada de Sofroniew & Vinters, 2010.

La astrogliosis es un proceso similar a la inflamación que inicia como una respuesta adaptativa y beneficiosa, que sirve para reparar el daño y brindar protección al tejido, y que, bajo ciertas circunstancias puede llegar a resultar potencialmente dañino (Sofroniew, 2015). Anteriormente se pensaba que la formación de cicatrices gliales únicamente exacerbaban el daño al SNC. Sin embargo, ahora se conocen los efectos neuroprotectores de las cicatrices gliales, que no solo actúan como una barrera para delimitar el daño y prevenir que siga creciendo, sino que también tienen una participación en la homeostasis del flujo sanguíneo cerebral, en procesos de inmunomodulación y en la estimulación de la neurogénesis (Wang et al., 2018).

Uno de los métodos principales de inmunohistoquímica para la identificación de astrocitos, es utilizar un antígeno contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) que es un filamento intermedio que se encuentra en el cuerpo y los procesos celulares de los astrocitos (Halliday et al., 1996). La regulación positiva de GFAP es una característica que ocurre también en distintos tipos de desórdenes del SNC, así como en respuesta temprana a un daño (Escartin et al., 2021). Aunque el incremento en la expresión de GFAP es comúnmente utilizado para observar el incremento en el número de astrocitos (Kumosa, 2023), y puede ser un fuerte indicador de remodelación de astrocitos reactivos, se recomienda utilizar otros marcadores de astrocitos en combinación con GFAP, ya que GFAP por sí solo no es un marcador absoluto de reactividad ni indica funciones alteradas de astrocitos reactivos (Escartin et al., 2021).

VII. JUSTIFICACIÓN

La fabricación de prótesis craneales, se usa desde tiempos antiguos en la reconstrucción de regiones craneofaciales, sin embargo en la actualidad sigue siendo objeto de estudio, debido a que todavía no se tiene un consenso de una sola composición química de material que pueda ser el que mejores propiedades tenga para estas prótesis (Zanotti et al., 2016). Es por ello, que es importante buscar alternativas para la fabricación de prótesis craneales, siendo ésta la principal motivación para desarrollar andamios 3D con materiales que ofrezcan la mayor biocompatibilidad, osteoconductividad y degradación controlada, reduciendo los riesgos de afectaciones secundarias en el paciente.

Los vidrios bioactivos han mostrado excelentes resultados de biocompatibilidad, osteointegración, osteoinducción, osteoconducción y degradabilidad controlada, siendo excelentes candidatos para ser empleados como implantes craneales. Sin embargo sus bajas propiedades mecánicas han llevado al uso de elementos que se añaden en cantidades controladas como es el óxido de titanio, biocerámico que permitirá mejorar la dureza y la interacción celular. Resaltando, que los vidrios bioactivos presentan diversas ventajas como biomateriales, usados como andamios fabricados 3D con diversas composiciones químicas aplicados a la reconstrucción craneofacial y ortopédica (Thrivikraman et al., 2017).

Por otro lado, existe muy poca literatura al respecto de si los biomateriales utilizados para craneoplastías podrían causar neurotoxicidad (Pikis et al., 2015), y de ser así, si este daño se podría ver reflejado en afectaciones neurológicas. Sin embargo, se ha reportado que partículas de biomateriales se pueden acumular en diferentes regiones cerebrales tales como el bulbo olfatorio, el hipocampo, la corteza cerebral y el estriado (Ge et al., 2019).

VIII. HIPÓTESIS

El implante de vidrio bioactivo mostrará una adecuada capacidad de regeneración ósea sin presentar efectos adversos en el tejido cerebral.

IX. OBJETIVO

6.1 Objetivo general

Analizar la capacidad de un implante craneal de vidrio bioactivo base fosfato y reforzado en cantidades variables en porcentaje molar de óxido de titanio para regenerar tejido óseo, así como sus posibles efectos secundarios en el cerebro.

6.2 Objetivos particulares

1. Desarrollar una prótesis craneal hecha de vidrio bioactivo base fosfato reforzada en cantidades variables de óxido de titanio (TiO_2), asegurando sus propiedades físicas, químicas y biológicas, así como una biocompatibilidad adecuada para su uso en sujetos con lesiones craneales.
2. Analizar si el implante de vidrio bioactivo favorece la regeneración de tejido óseo en ratas Wistar macho.
3. Evaluar en ratas Wistar macho si la degradación del implante produce cambios histológicos en el cerebro.
4. Analizar por medio de pruebas motoras y cognitivas si la degradación del implante induce alteraciones conductuales en el cerebro en ratas Wistar macho a diferentes tiempos de exposición (1, 2, 3 y 4 meses postquirúrgicos)

X. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describen cada una de las etapas experimentales, así como un panorama general del proyecto de investigación. (Fig. 10)

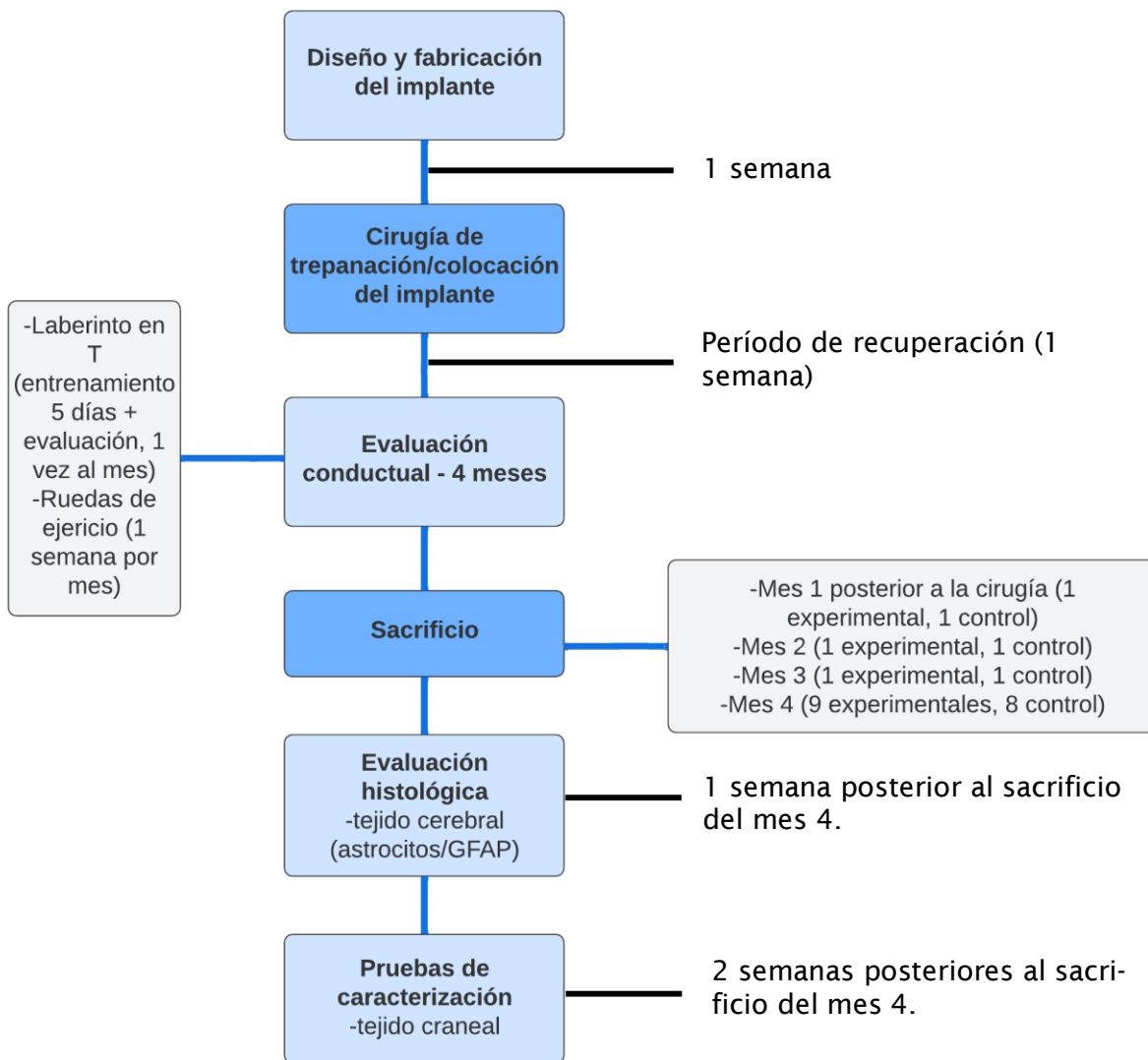


Fig. 10. Diagrama de las etapas experimentales. En el diagrama se pueden observar de manera general las etapas que se siguieron durante el proceso experimental.

7.1 Fabricación del implante

Para la fabricación del implante se usó una composición de vidrio bioactivo base fosfato, con una composición $45\text{P}_2\text{O}_5 - 30\text{CaO} - 24\text{Na}_2\text{O} - \text{TiO}_2$ en estado sólido en forma de polvos, el cual se fabricó por la ruta de fusión y temple convencional. El material previamente sintetizado fue molido en un mortero hasta obtener una consistencia de polvo fino. Posteriormente, el polvo obtenido fue tamizado con mallas con abertura de 0.59 mm, 0.50 mm, 0.42 mm, y 0.297 mm. Se pesaron 2 g del polvo tamizado y se agregaron 15 gotas de ionómero de vidrio tipo I de la marca MEDENTAL. La mezcla obtenida fue colocada en moldes cilíndricos individuales de 3.5 mm de diámetro y 5 mm de alto. Se dejaron secar las muestras en una caja Petri al aire libre durante aproximadamente 1 semana. Cada una de las muestras después del curado se desmoldó y cortó con un bisturí manteniendo las medidas de 3 mm de diámetro y 1 mm de grosor (Fig. 11).

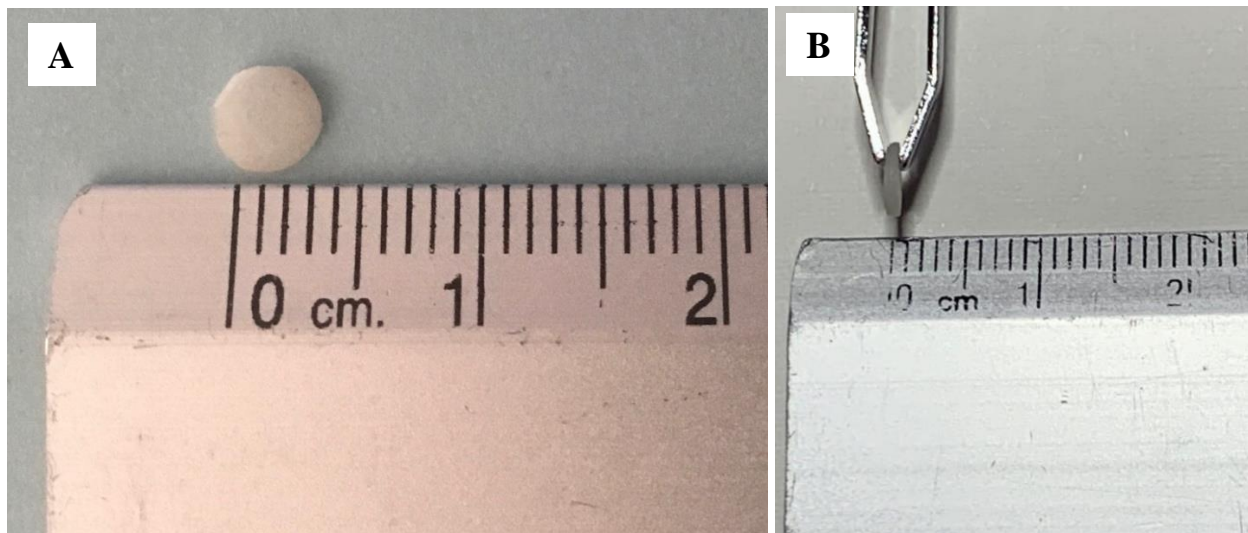


Fig. 11. Imagen que muestra uno de los implantes de biovidrio fabricados. A- Se muestra el diámetro del implante (3 mm). **B-** Se muestra el grosor del implante (1 mm).

7.2 Animales

Se utilizaron 23 ratas Wistar macho, adultas jóvenes (250-300 g) para la experimentación *in vivo*. Se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Neurobiología en la UNAM Juriquilla con un ciclo invertido de luz/oscuridad (12/12). Se dividieron en dos grupos para su estudio, un grupo control (11 ratas) y un grupo experimental (12 ratas). La manipulación de

los sujetos se llevó a cabo durante su periodo de actividad, y todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos bioéticos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INB bajo el número 128.A ([Anexo 1](#)).

7.2.1 Cirugía estereotáxica

Los sujetos se anestesiaron intraperitonealmente con una mezcla de ketamina (7 ml) y xilacina (3 ml) con una dosis de 1 ml/1000 g. Posteriormente, se colocaron en el estereotáxico y se realizó un trépano de 3 mm de diámetro en el lado derecho del cráneo; 3 mm posterior a la sutura bregma y 3 mm a la derecha a partir de la línea media. En los animales control se dejó el trépano intacto (Fig. 12A) y se suturó la piel. En el grupo experimental se colocó el implante de biovidrio en el trépano antes de suturar (Fig. 12B). Se aplicó pomada Furacine sobre la herida y se mantuvo en observación hasta que terminara el efecto de la anestesia. Durante la semana siguiente los sujetos se mantuvieron en un periodo de observación y recuperación.

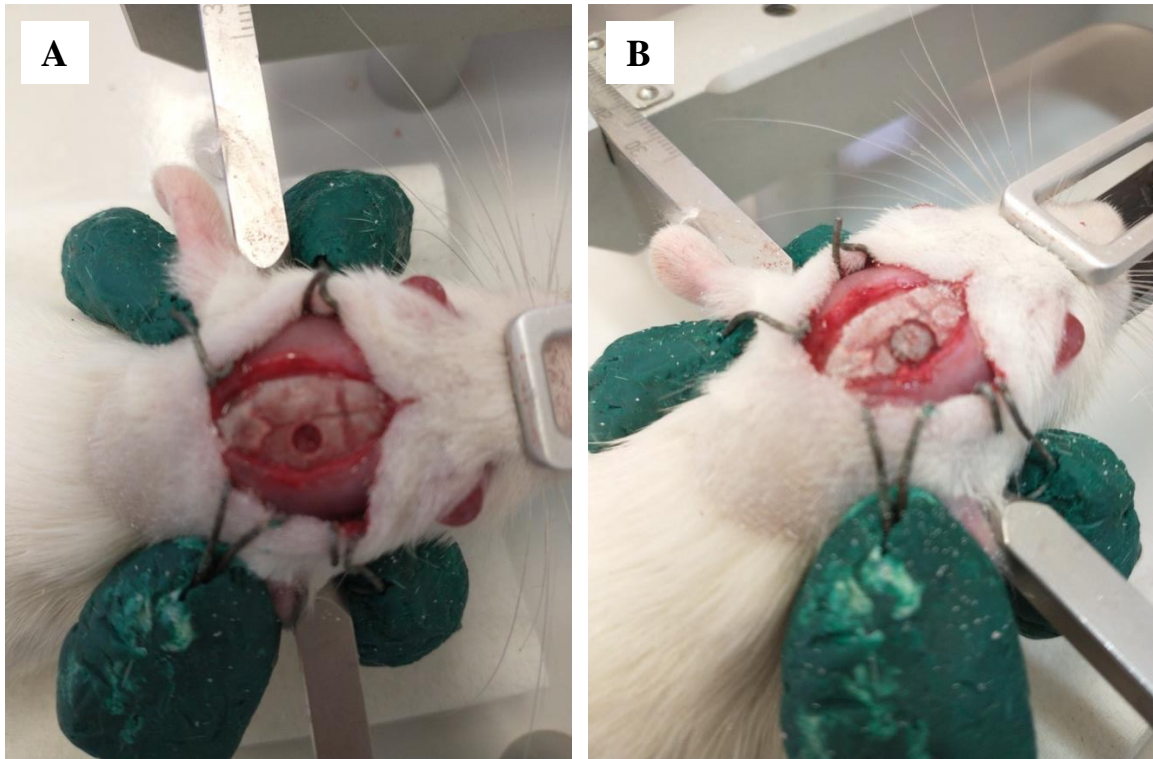


Fig. 12. Imágenes de la cirugía estereotáxica. A - Se muestra el trépano realizado en los animales control. **B** – Muestra el trépano y la colocación del implante en los animales experimentales.

7.3 Pruebas conductuales

Los sujetos fueron entrenados y evaluados en dos tareas, una cognitiva y una motora. Las pruebas fueron elegidas debido a la localización del implante (cercano a la corteza motora, Fig. 16) y debido a los reportes de Ge et al., 2019, donde se describe que se ha encontrado acumulación de nanopartículas de ciertos biomateriales en regiones del cerebro tales como la corteza, el hipocampo y el estriado. Estas regiones cerebrales están relacionadas con funciones motoras, de aprendizaje y de memoria.

El entrenamiento y evaluación de las pruebas elegidas (laberinto en T y rueda de ejercicio) se llevaron a cabo durante 1 semana al mes durante 4 meses consecutivos. Cada una de las pruebas se llevó a cabo siempre en el mismo cuarto de experimentación y en el mismo horario.

7.3.1 Evaluación cognitiva

El laberinto en T se conforma de un brazo central que suele ser el más largo, y un brazo a cada lado al final del brazo central (llamados brazos meta) (Fig. 13) (Aguayo-Del Castillo et al., 2016). Las ratas presentan una tendencia natural a alternar los brazos en el laberinto en T (Dudchenko, 2004). Cuando se utiliza un paradigma de condicionamiento en este laberinto, el experimentador refuerza la conducta de alternancia que se presenta de manera natural (Aguayo-Del Castillo et al., 2016).

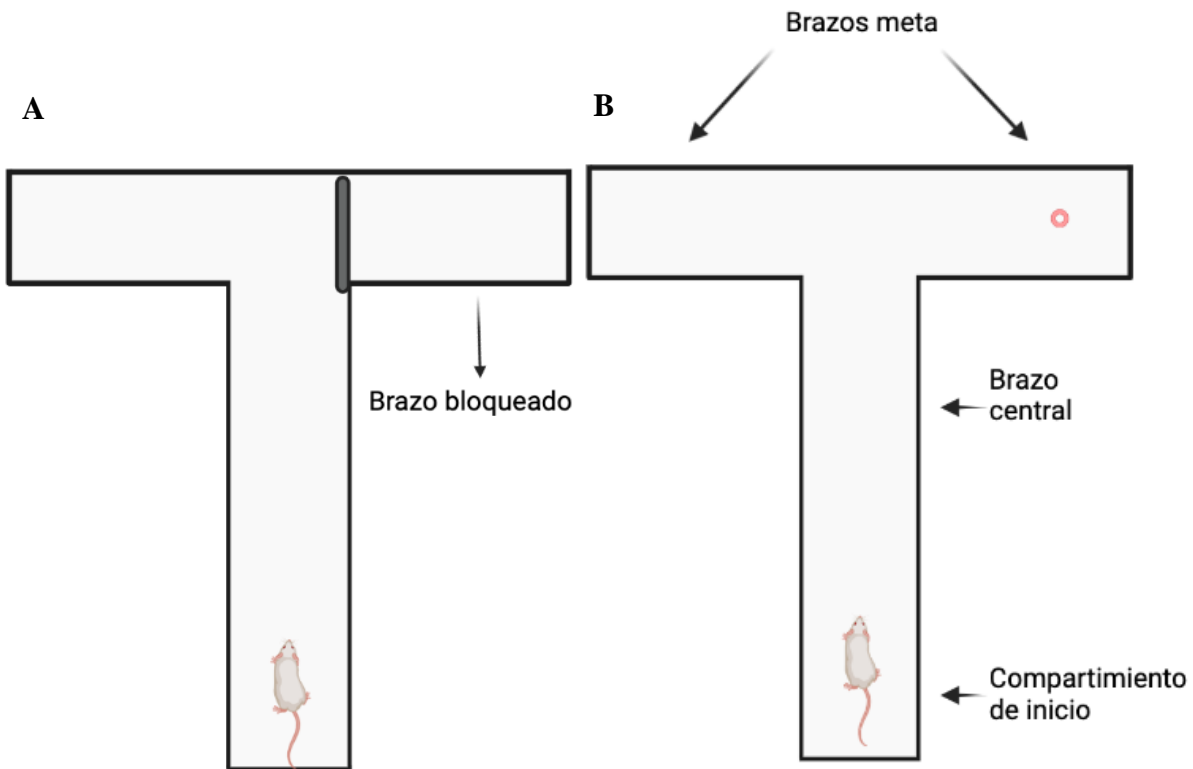


Fig. 13. Representación del laberinto en T. **A** - Se muestra el protocolo de alternancia forzada donde uno de los brazos se encuentra bloqueado. **B** - Muestra el segundo ensayo de la alternancia forzada. En donde ninguno de los brazos se encuentra bloqueado pero sólo en el que no se exploró previamente se encuentra una recompensa.

*Imagen creada en BioRender.com

La memoria de trabajo espacial (spatial working memory) y el aprendizaje asociativo se pueden evaluar en el laberinto en T con un protocolo de alternancia recompensada o alternancia forzada. Este consiste en dos ensayos; en el primero se bloquea uno de los

brazos meta de manera que el animal no tiene más opción que entrar al brazo contrario (Fig. 14A). En el segundo ensayo, se regresa al animal al brazo central y se le deja escoger a cuál de los brazos entrar (Fig. 14B). Si el animal decide volver a entrar al brazo que ya había explorado anteriormente no recibe una recompensa (McHugh & Bannerman, 2010). Por el otro lado, si el animal ingresa al brazo contrario al previamente explorado recibe una recompensa, que generalmente es alimento. Para asegurar que el alimento sea recompensante, previo a la prueba, se restringe la ingesta de alimento del animal a un 80%.

Se evaluaron ambos grupos (control y experimental) en el laberinto en T con un protocolo de elección forzada, donde los sujetos podían obtener una recompensa de comida por ensayo (Froot Loop®). Dos días previos al comienzo del entrenamiento, a los sujetos se les restringía el alimento al 80% de su consumo total. Antes de empezar con el primer entrenamiento (mes 1), los sujetos tuvieron un periodo de habituación de tres días. Durante estos tres días, los sujetos se colocaron en el laberinto por 10 minutos diarios y se les permitió la exploración libre. Una vez concluido el periodo de habituación se prosiguió al entrenamiento. Éste se llevó a cabo durante cinco días consecutivos donde cada día se realizaban seis ensayos por sujeto (en pares; uno de elección forzada y uno de elección libre), cada ensayo tenía un límite de cinco minutos. En el primer ensayo, se bloqueaba el brazo derecho, de manera que el animal no tenía más opción que ingresar al brazo izquierdo (elección forzada). En el segundo ensayo (de elección libre) ambos brazos estaban abiertos.



Fig. 14. Imágenes de un sujeto experimental durante su prueba en el laberinto en T. A – Ensayo de elección forzada, con el brazo derecho bloqueado. **B –** Ensayo de elección libre, ninguno de los brazos se encontraba bloqueado.

Si el sujeto elegía el brazo que en el primer ensayo se encontraba bloqueado, se contaba como acierto y se tenía acceso a la recompensa. De lo contrario, se contabilizaba como error y no había recompensa. Además de contabilizar acierto o errores, se midió el tiempo que el sujeto tardaba en lograr el acierto (latencia). Si el sujeto no lograba hacer un acierto en el tiempo límite de cinco minutos, se contaba como error. Una vez concluidos los días de entrenamiento se les hizo la evaluación final. Ésta consistía en un solo ensayo de elección libre. Al igual que en el entrenamiento se midió la latencia, el número de errores y el acierto.

7.3.2 Evaluación motora

La actividad locomotora voluntaria se evaluó en la rueda de ejercicio (Activity Wheel LE904 Panlab). Los sujetos se colocaron de manera individual en una caja de acrílico, la cual está unida a la rueda de ejercicio, durante 30 minutos al día por 5 días consecutivos, una vez al mes, durante cuatro meses. Los sujetos corrían de forma voluntaria durante este tiempo. Se midió el número de vueltas que daban los sujetos en intervalos de seis minutos con el multicontador LE3806 Panlab, y los datos se obtuvieron por medio del software SEDACOM V2.0.

7.4 Sacrificio

Cada mes, durante cuatro meses, un sujeto del grupo experimental y uno del grupo control, fueron sacrificados con el objetivo de tener un seguimiento temporal de la regeneración ósea, así como de los posibles efectos en el cerebro. Una vez transcurridos cuatro meses se sacrificaron el resto de los sujetos (8 controles y 9 experimentales). Los sujetos fueron anestesiados intraperitonealmente con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg). Se llevó a cabo una perfusión intracardiaca con una solución fisiológica (0.1 M PBS) y una solución fijadora (PFA 4%). El cráneo y el cerebro de cada uno de los sujetos fueron recolectados. Los cerebros se conservaron en PFA 4% durante una hora, posteriormente fueron transferidos a una solución de sacarosa 30% y se conservaron a una temperatura de 4°C hasta ser cortados. Los cráneos se enjuagaron en una solución salina y después se almacenaron en un ambiente seco.

7.5 Caracterización física y química del tejido craneal

7.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para observar la morfología del hueso (y del andamio en el grupo experimental) de las muestras craneales, se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM, JEOL JSM-

6060LV), usando un bombardeo de electrones con 20 kV. Los cráneos fueron previamente metalizados con oro en la parte superior para asegurar la conducción de electrones (Fig. 15). Se analizaron 4 cráneos por grupo, uno por cada mes después de la cirugía (1, 2, 3 y 4 meses) en la región donde se hizo el trépano (ambos grupos) y en el caso del grupo experimental, en la región donde se colocó el implante.

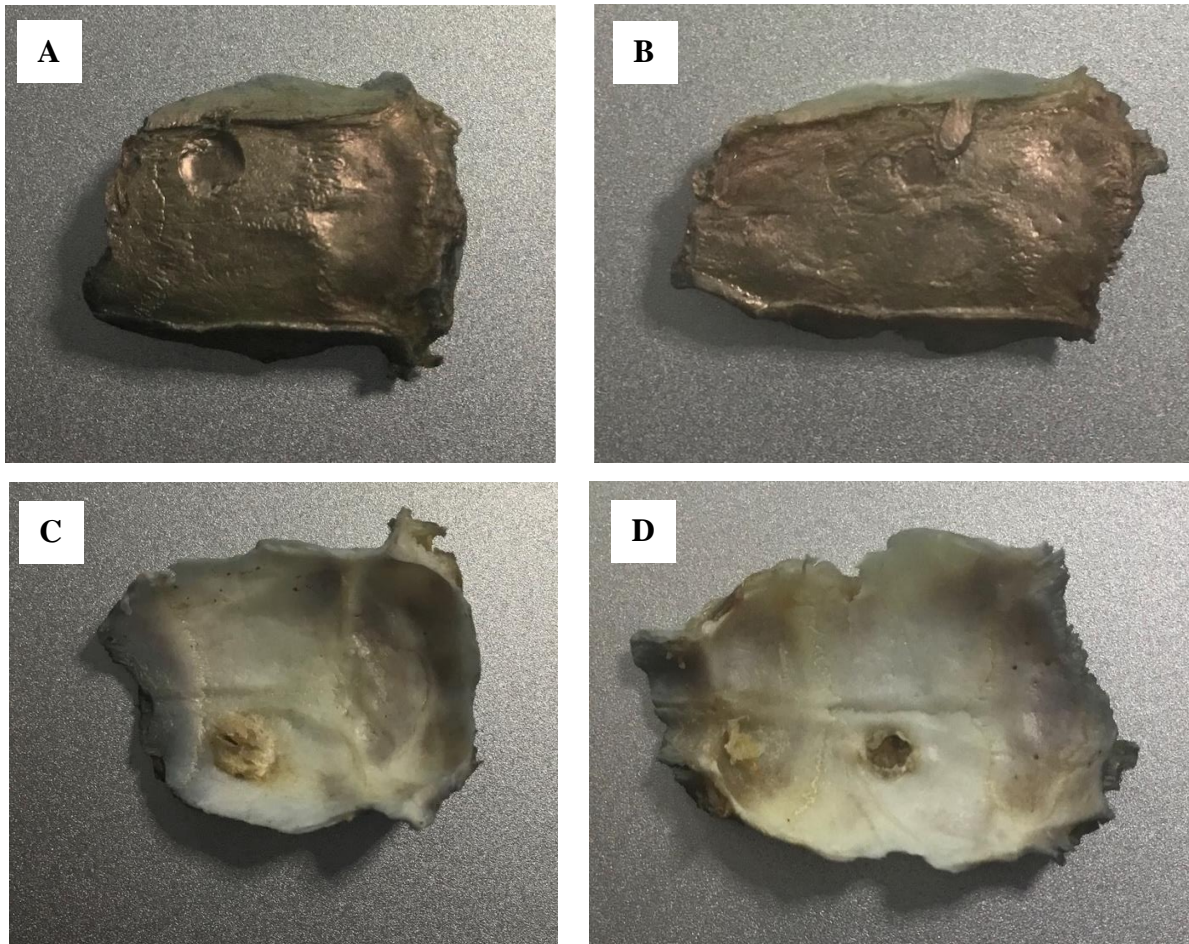


Fig. 15. Imágenes que muestran los cráneos con el recubrimiento de oro únicamente en la parte superior. A – Vista superior, cráneo experimental. B – Vista superior, cráneo control. C – Vista inferior, cráneo experimental. D – Vista inferior, cráneo control.

7.5.2 Análisis elemental por espectroscopia de energía dispersiva (EDS)

Con el fin de llevar a cabo un análisis elemental y obtener la relación de Ca/P en diferentes áreas de interés en el tejido craneal se utilizó la técnica de espectroscopia de energía dispersiva (EDS). Las muestras analizadas fueron las mismas previamente estudiadas con SEM. Se analizaron los elementos encontrados en 3 regiones de interés por cráneo para obtener la relación Ca/P. Cabe mencionar que dichas regiones se encontraban donde se hizo el trépano y se colocó el implante (grupo experimental).

7.6 Evaluación histológica del tejido craneal

Dos muestras de cráneo fueron utilizadas para evaluar histológicamente el tejido (1 control, 1 experimental, ambas obtenidas 4 meses después de la cirugía). Cada una de las muestras fue embebida en parafina para ser cortada en un micrótopo (Leica RM2125 RTS). Se realizó un rebaje hasta visualizar el tejido. Después se hizo una reducción al bloque de parafina hasta 30 μm , para posteriormente hacer un corte con un grosor de 3 μm . Cada uno de los cortes se llevó a un baño de agua destilada a 50° C para estirarlos. Se sumergieron los portaobjetos en el baño de estiramiento y se situaron los cortes. Una vez secos, se les dio un tratamiento con diferentes concentraciones de alcoholes (Alcohol Etilico Abs. CTR Scientific; pureza 99.947%, peso 0.789g/ml y humedad 0.0483), 50°, 60°, 70°, 80°, 90° y absoluto. En cada una de las concentraciones, los portaobjetos se dejaron 10 minutos. Posteriormente se tiñeron con Hematoxilina (H3136) y Sigma Eosina (861006 Sigma).

7.7 Evaluación histológica del tejido cerebral

Los cerebros fueron preparados para ser cortados en un criostato. Se colocaron en un molde y se recubrieron con un medio de congelación de tejidos (Leica Tissue Freezing Medium). Posteriormente, fueron congelados con hielo seco. Se colocaron en el criostato

(-22°C) y se hicieron cortes coronales de 30 µm. Las rebanadas, fueron conservadas en una solución anticongelante a una temperatura de 4°C hasta ser utilizadas. Se utilizaron tres sujetos por grupo, uno por cada mes del mes dos al mes cuatro. Se seleccionaron tres rebanadas por sujeto para hacer una inmunohistoquímica contra GFAP. Las rebanadas fueron seleccionadas específicamente de una región del cerebro que se encontrara debajo de donde se realizó el trépano y/o se colocó el implante. Además, para tener mayor control, se utilizó como guía el Atlas 'The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates' para seleccionar rebanadas donde las estructuras mostradas en la Fig. 16 pudieran ser observadas.

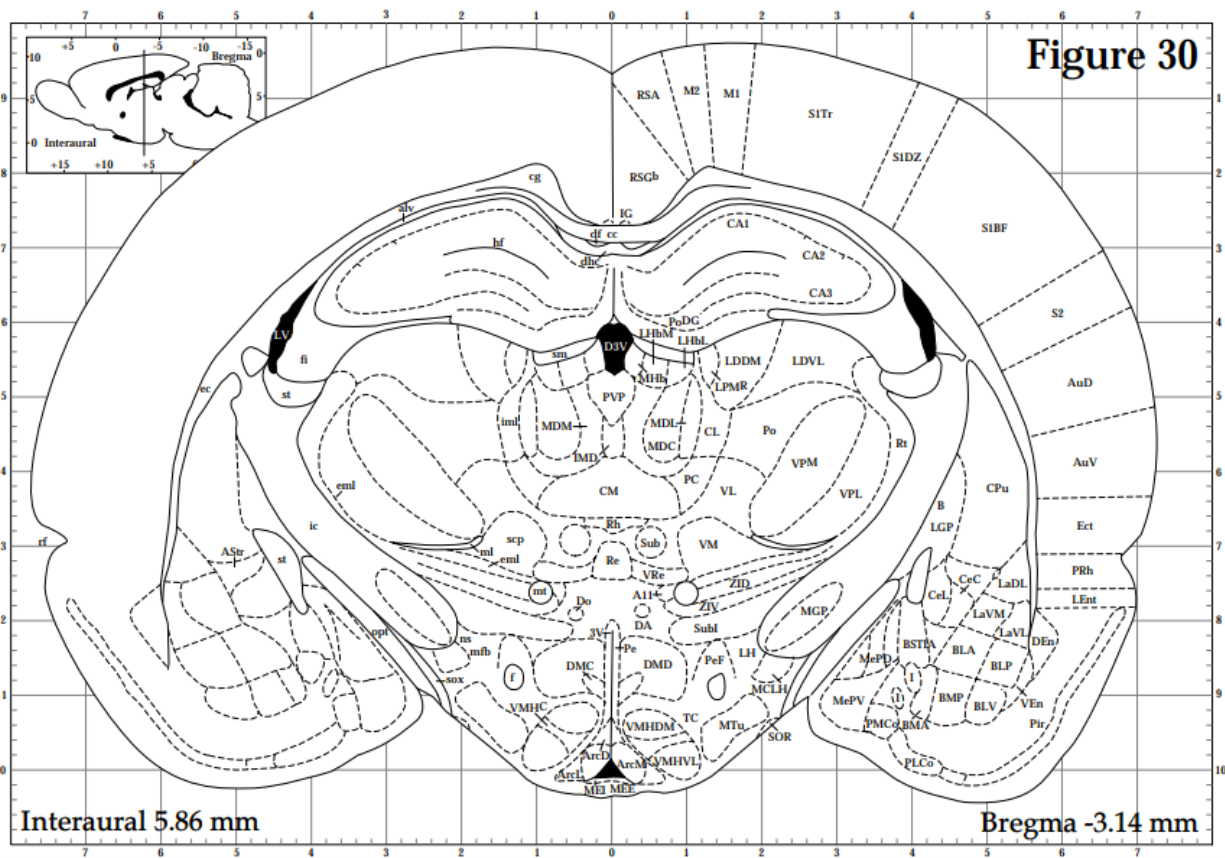


Fig. 16. Imagen que muestra la lámina del Rat Brain Paxinos utilizada como referencia para seleccionar las rebanadas cerebrales.

*Tomada de Paxinos & Watson, 1998.

Las rebanadas fueron lavadas con KPBS 0.05 M (6 lavados de 5 minutos cada uno) y posteriormente se incubaron 48 horas con el anticuerpo primario, rabbit anti-GFAP

1:5000. Transcurridas 48 horas, las rebanadas se lavaron con KPBS 0.05M (5 lavados de 5 minutos cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario, anti-rabbit BA vector (1:200) durante una hora. Posteriormente se hicieron lavados con KPBS 0.05M (5 lavados de 5 minutos cada uno) y se incubaron en las proteínas A B durante una hora. Después, se hicieron dos lavados con acetato de sodio 0.175 M (5 minutos cada uno) y se incubaron en NiDAB por 20 minutos. Finalmente, se hizo un lavado con KPBS 0.05M antes de montar los cortes en portaobjetos gelatinizados. Se obtuvieron imágenes de cada una de las rebanadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus, BX60) con un aumento de 10X para analizar las regiones de interés. El análisis de las imágenes se llevo a cabo con el software ImageJ, donde se delimitó una primer área de interés (1.15 x 0.75 mm) a partir del perímetro de la lesión. Dentro de dicha área se delimitaron tres regiones de interés, cada una de las cuales fue delimitada por las mismas coordenadas en cada una de las imágenes (Fig. 17). En cada una de las regiones de interés, se utilizó la herramienta 'Multi-point tool' para realizar un conteo manual de astrocitos.

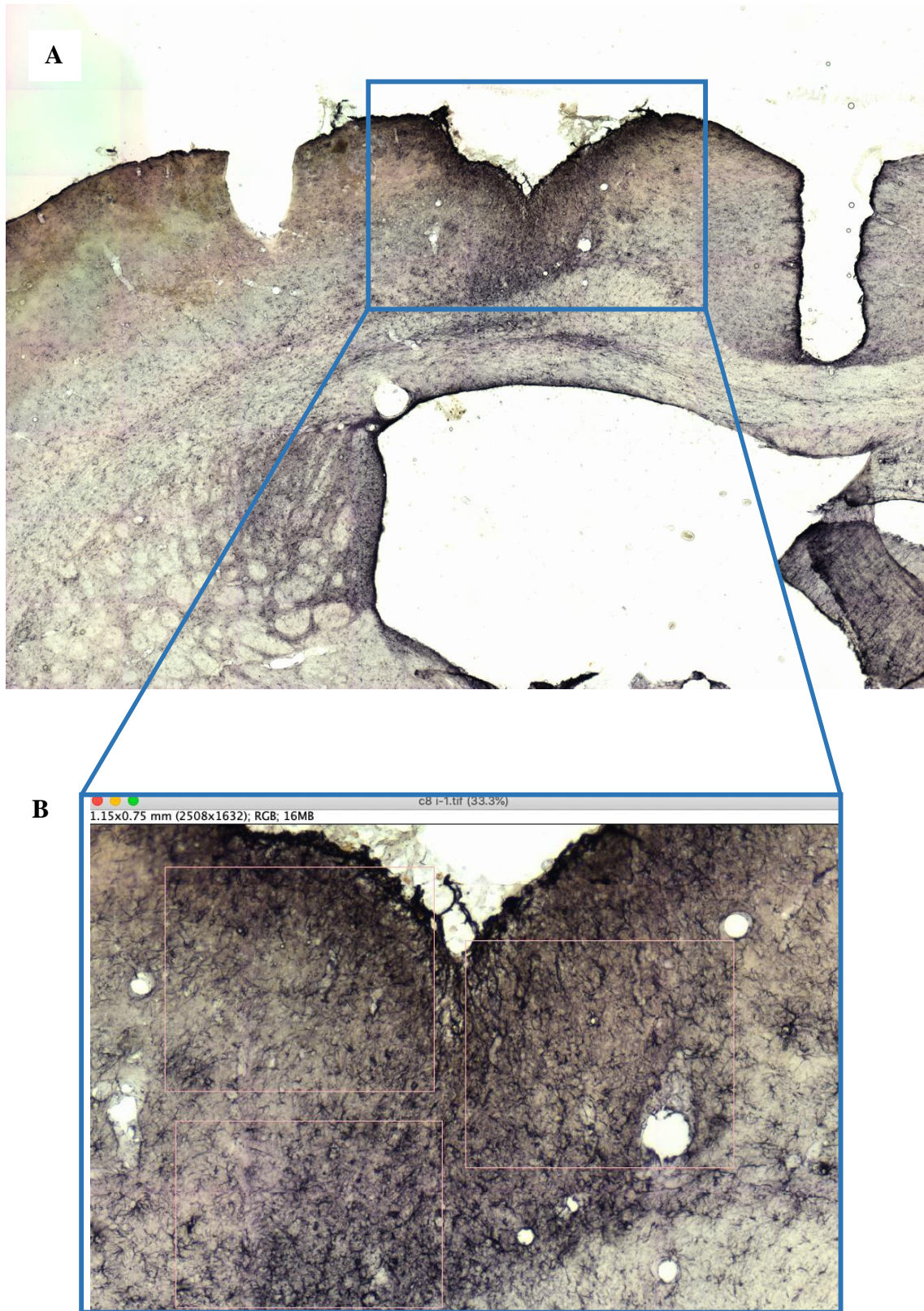


Fig. 17. Imágenes de una rebanada cerebral obtenidas con el microscopio de fluorescencia. **A** – Corte cerebral visto con un objetivo de 10x, marcando la región de

interés. **B** – Zoom de la misma rebanada, delimitando las coordenadas posteriormente analizadas para llevar a cabo el conteo de astrocitos.

7.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos por día de experimentación, por sujeto, fueron promediados. Dichos datos fueron analizados con pruebas estadísticas para evaluar si seguían una tendencia normal. Al no pasar las pruebas de normalidad, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para hacer la comparación del grupo experimental contra el grupo control, día por día, a lo largo del experimento. Los datos obtenidos del conteo del número de astrocitos pasaron la prueba de normalidad, por lo que se utilizó una t de Student para comparar al grupo experimental contra el grupo control, mes por mes.

XI. RESULTADOS

8.1 Evaluación cognitiva

Durante la evaluación cognitiva, al comparar ambos grupos no se observaron diferencias significativas (Apéndice A y B). La comparación entre grupos mostró que el desempeño de los sujetos experimentales fue similar al de los sujetos control, mostrando en ambos grupos los resultados favorables esperados del entrenamiento; un aumento en el número de aciertos logrados (Tabla 3, Fig. 18) y una disminución en el tiempo que les tomaba a los sujetos realizar el acierto (latencia) (Fig. 19). En la evaluación final de cada mes no se observaron diferencias significativas.

Tabla 3. Se muestran los valores obtenidos con la prueba estadística realizada (U de Mann-Whitney) comparando el número de aciertos logrados del grupo experimental contra el grupo control.

MES	1	2	3	4
Día 1	MWU= 59, T= 139, p= 0.644	MWU= 50, T= 115, p= 0.340	MWU= 45, T= 90, p= 1.0	MWU= 36, T= 72, p= 1.0
Día 2	MWU= 66, T= 132, p= 1.0	MWU= 49.5, T= 104.5, p= 0.294	MWU= 45, T= 90, p= 1.0	MWU= 36, T= 72, p= 1.0
Día 3	MWU= 59.5, T= 125.5, p= 0.493	MWU= 55, T= 110, p= 1.0	MWU= 45, T= 90, p= 1.0	MWU= 36, T= 72, p= 1.0
Día 4	MWU= 66, T= 132, p= 1.0	MWU= 55, T= 110, p= 1.0	MWU= 45, T= 90, p= 1.0	MWU= 31.5, T= 67.5, p= 0.289
Día 5	MWU= 66, T= 132, p= 1.0	MWU= 55, T= 110, p= 1.0	MWU= 45, T= 90, p= 1.0	MWU= 36, T= 72, p= 1.0

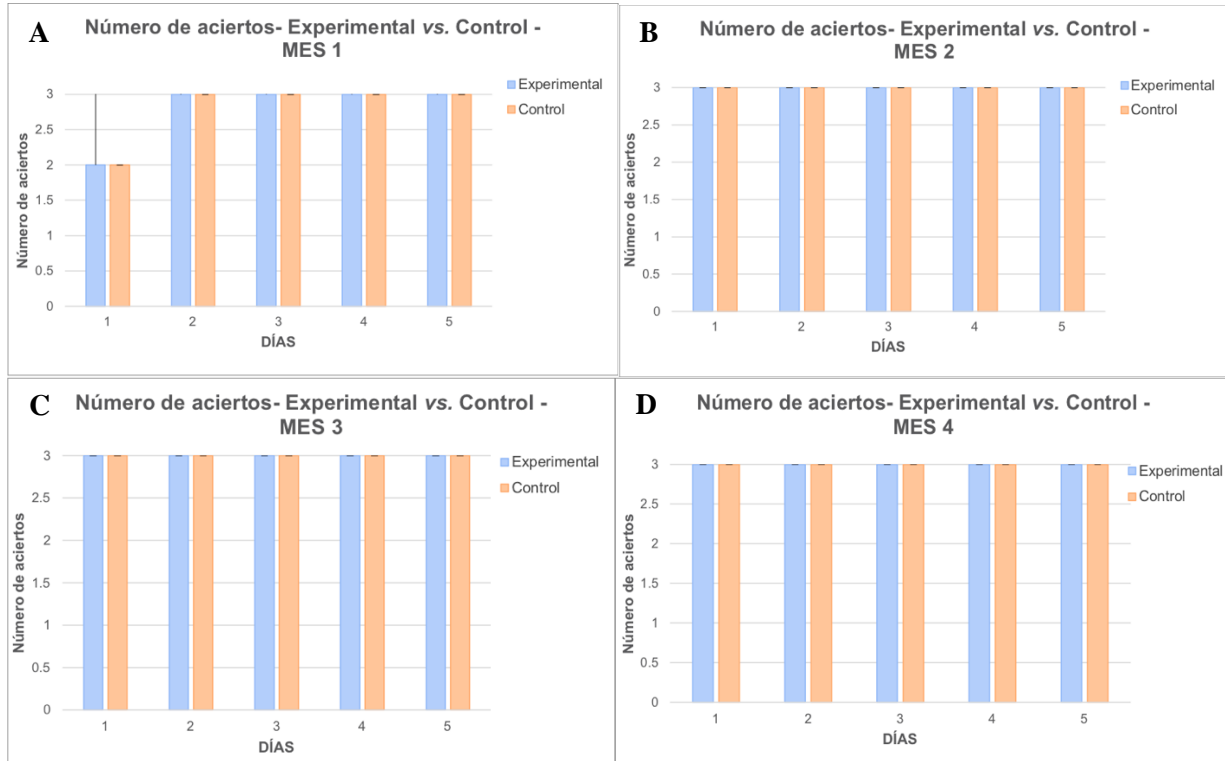
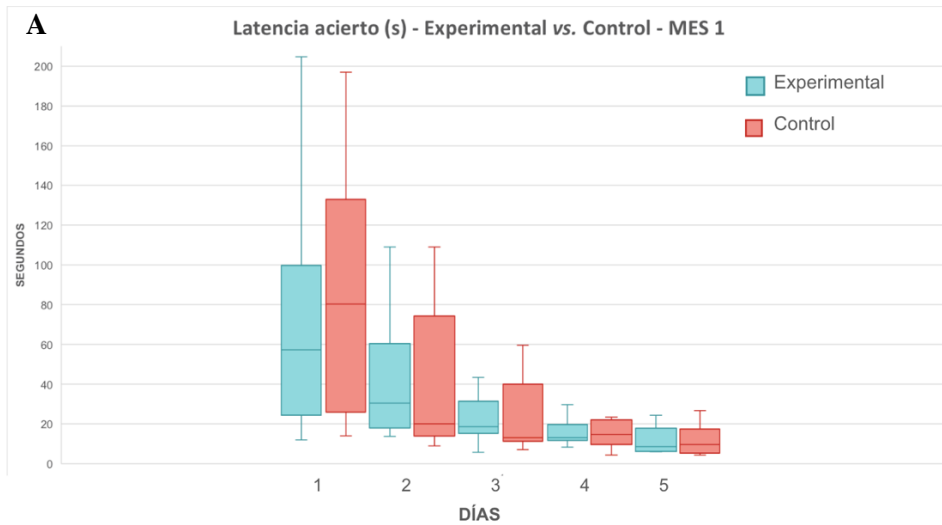


Fig. 18. Número de aciertos logrados por día. Grupo experimental vs. control. Se muestran las medianas por grupo, por día, del número de aciertos logrados, a través de 4 meses de evaluación. **A** - Mes 1 (Experimental N=12, Control N=11) . **B** - Mes 2 (Experimental N=11, Control N=10). **C** - Mes 3 (Experimental N=10, Control N=9). **D** - Mes 4 (Experimental N=9, Control N=8).

Datos graficados: medianas e IQR



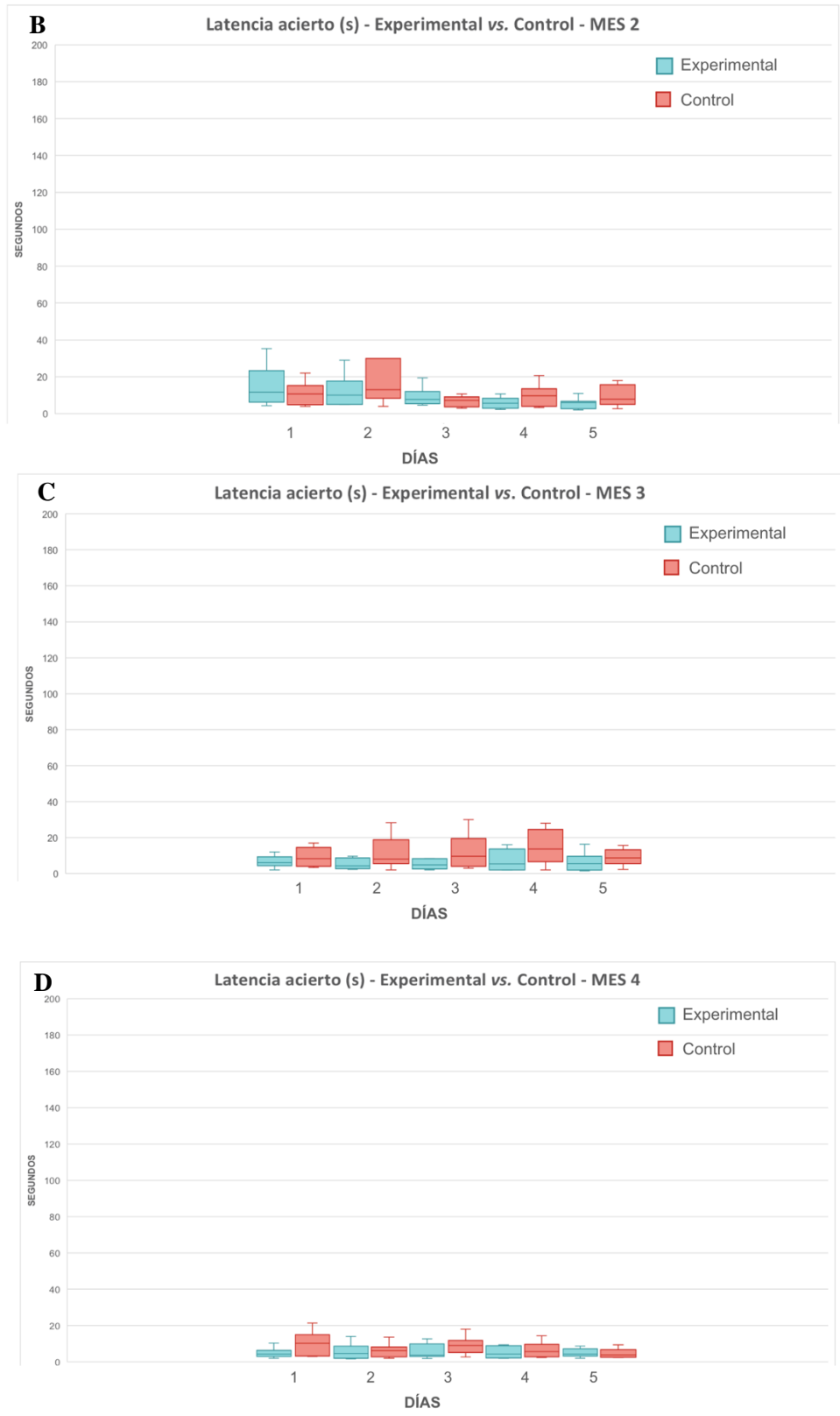
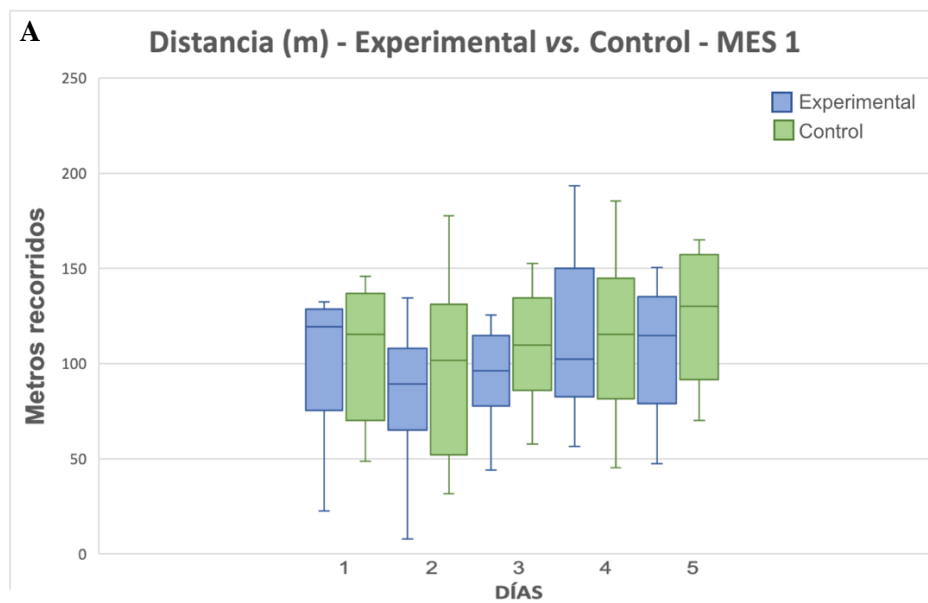


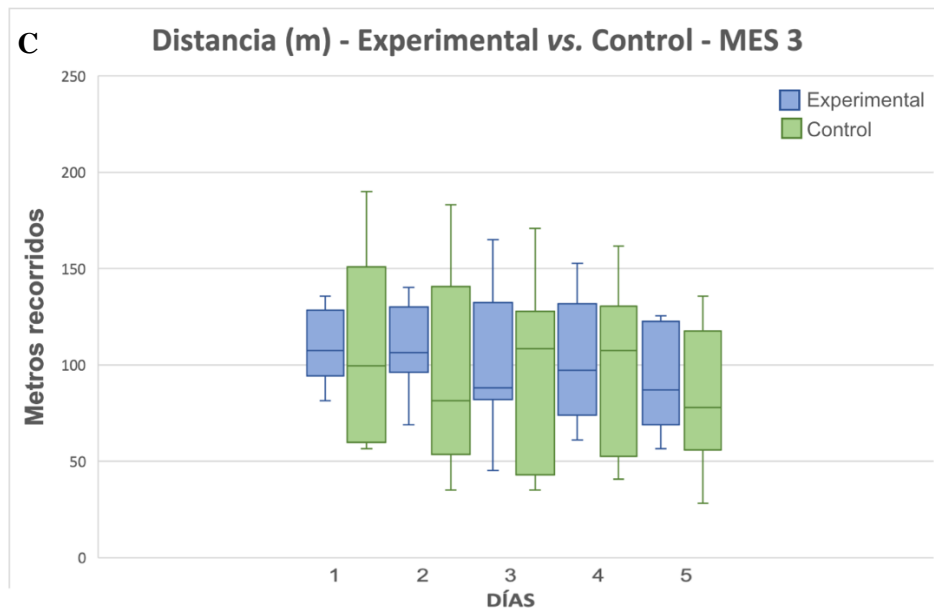
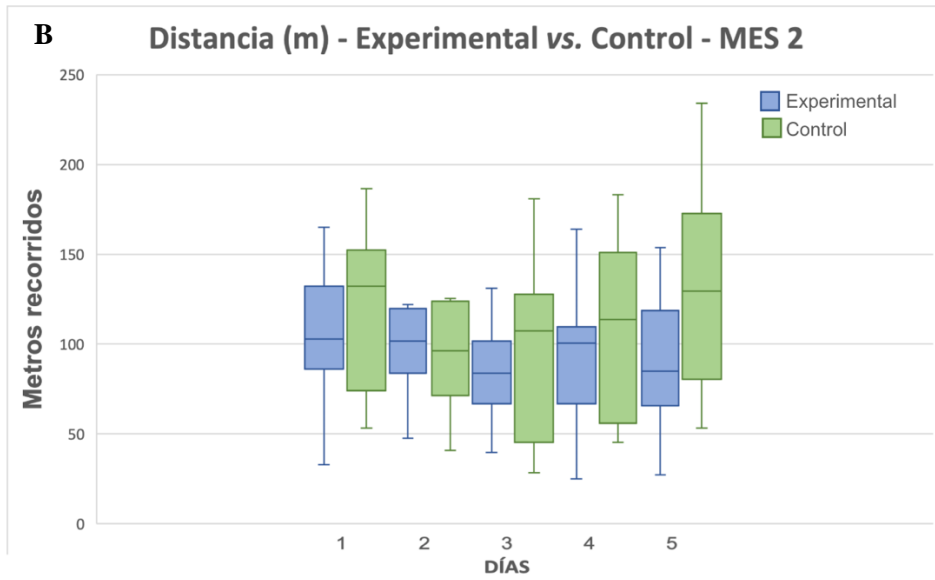
Fig. 19. Latencia de acierto (s) por día. Grupo experimental vs. control. Se muestran las medianas por grupo, por día, del tiempo (s) que se tomaban los sujetos en lograr el acierto

(latencia de acierto) a través de 4 meses de evaluación. **A** - Mes 1 (Experimental N=12, Control N=11) . **B** - Mes 2 (Experimental N=11, Control N=10). **C** - Mes 3 (Experimental N=10, Control N=9). **D** - Mes 4 (Experimental N=9, Control N=8).
Datos graficados: Q1, mediana, Q3, valores mínimo y máximo

8.2 Evaluación motora

En la evaluación motora se midió la distancia recorrida en metros (m) por los sujetos al utilizar la rueda de ejercicio. Similar a la prueba cognitiva, los resultados de esta prueba no mostraron diferencias significativas entre grupos (Fig. 20, Apéndice C). Esto sugiere que a pesar de que el implante provocó inflamación no causó daño al tejido cerebral.





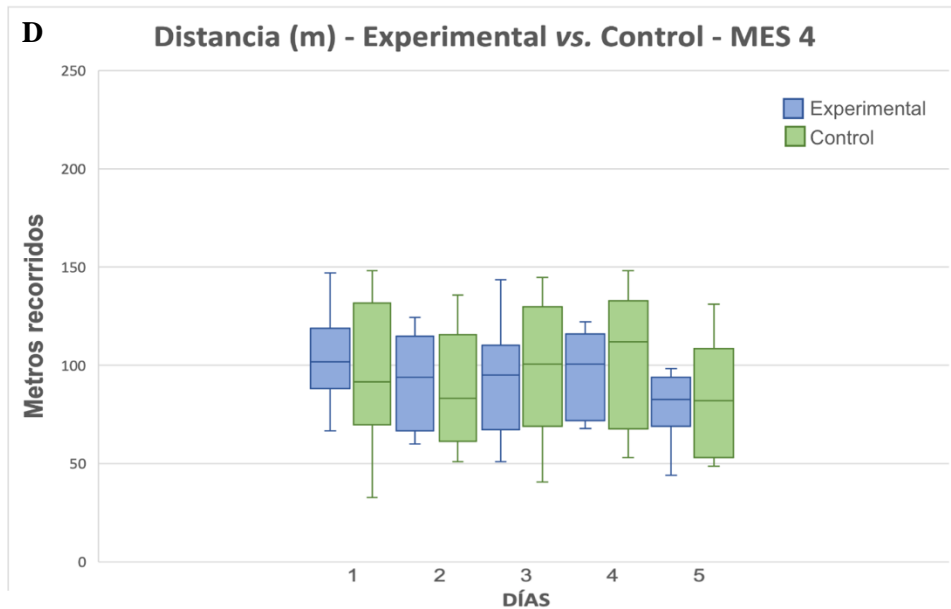


Fig. 20. Distancia (m) recorrida por día. Grupo experimental vs. control. Se muestran los promedios de la distancia (m) recorrida por grupo, por día, a través de 4 meses de evaluación. **A** - Mes 1 (Experimental N=12, Control N=11) . **B** - Mes 2 (Experimental N=11, Control N=10). **C** - Mes 3 (Experimental N=9, Control N=9). **D** - Mes 4 (Experimental N=9, Control N=8).

Datos graficados: Q1, mediana, Q3, valores mínimo y máximo

8.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes obtenidas por SEM muestran diferencias morfológicas entre los cráneos control y los cráneos experimentales de la fase mineral del tejido óseo (Fig. 21). En los cráneos experimentales se puede observar la rápida formación de precipitados de la fase mineral del hueso con morfología tipo de láminas (hidroxiapatita carbonatada, HA) (Sridhar, 2010) a partir del mes 1 posterior a la cirugía de colocación del implante, incrementando el área de forma progresivamente mayor con el paso de los meses. Por otro lado, en los cráneos control la formación de hidroxiapatita (HA) comienza a ser notoria a partir del mes 3. Esto muestra que el implante de vidrio bioactivo ayuda a la regeneración del tejido óseo al acelerar el proceso de formación de la fase mineral del hueso.

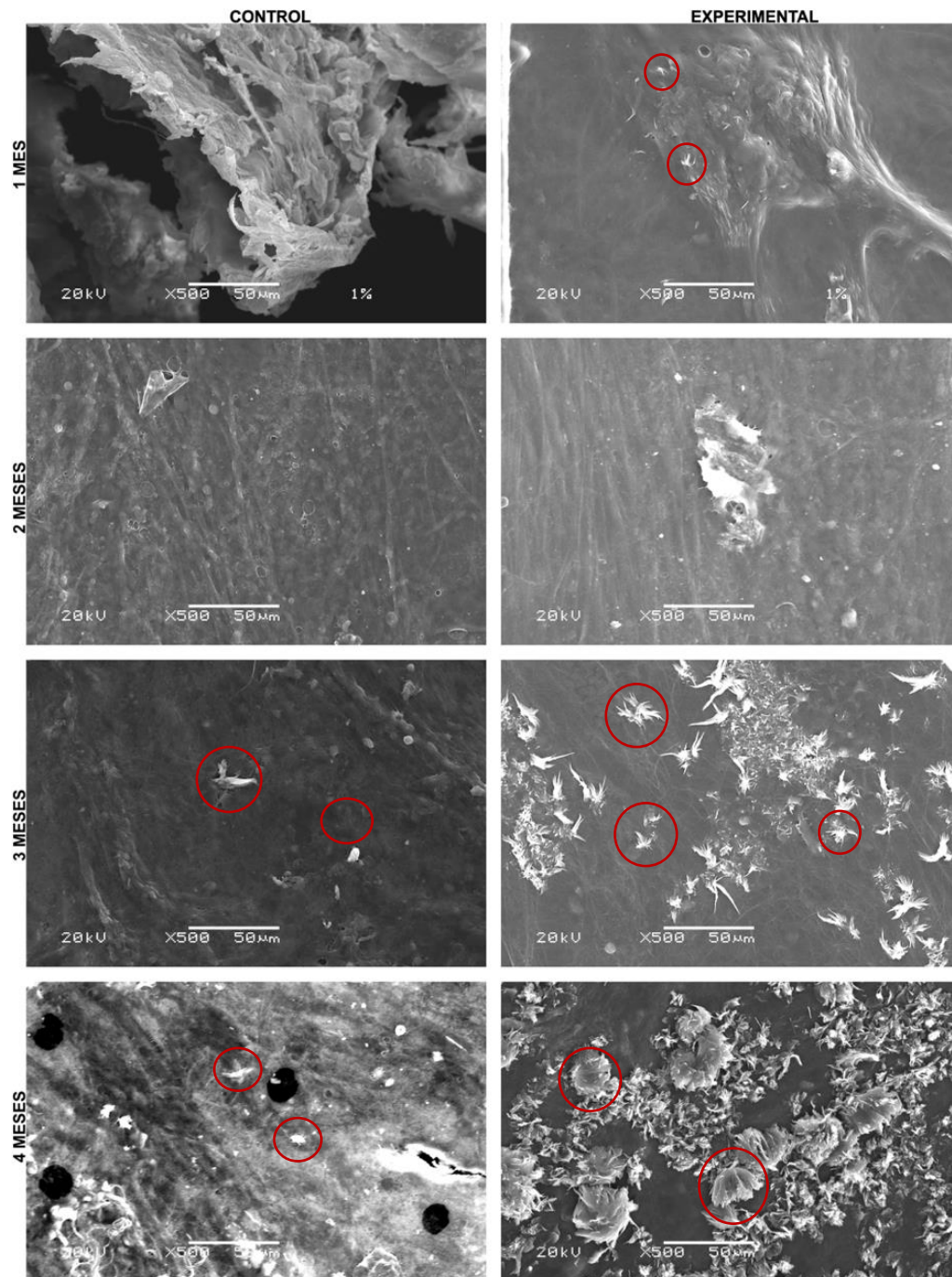


Fig. 21. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Se muestran imágenes de cráneos control (izquierda) y cráneos experimentales (derecha) a diferentes tiempos después de la cirugía (1, 2, 3 y 4 meses).

8.5 Análisis elemental por EDS

El componente principal de los huesos es la hidroxiapatita (HA), un mineral compuesto de calcio (Ca) y fósforo (P), y el cual brinda rigidez a los huesos (Sotiropoulou et al., 2015). La relación Ca/P es un factor importante en la absorción y retención de calcio en el tejido óseo (Loughrill et al., 2017). Idealmente, la relación atómica de Ca/P de la hidroxiapatita es de 1.67. Sin embargo, en diversos estudios donde se han utilizado biomateriales para la formación de HA se ha encontrado que el rango de la relación Ca/P puede ir desde 1.3 hasta 2.0 (Stanciu et al., 2007).

En los datos obtenidos por el análisis elemental por EDS de las regiones de interés por cráneo (n=3) se observan las relaciones atómicas de Ca/P que van desde 0.12 hasta 0.97 en el grupo experimental y de 0.54 hasta 3.01 en el grupo control (Fig. 22).

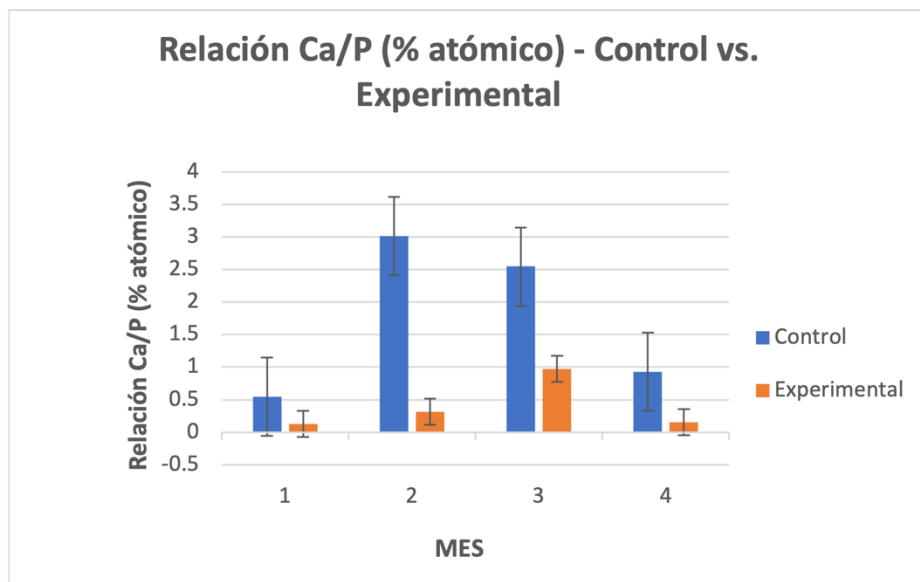
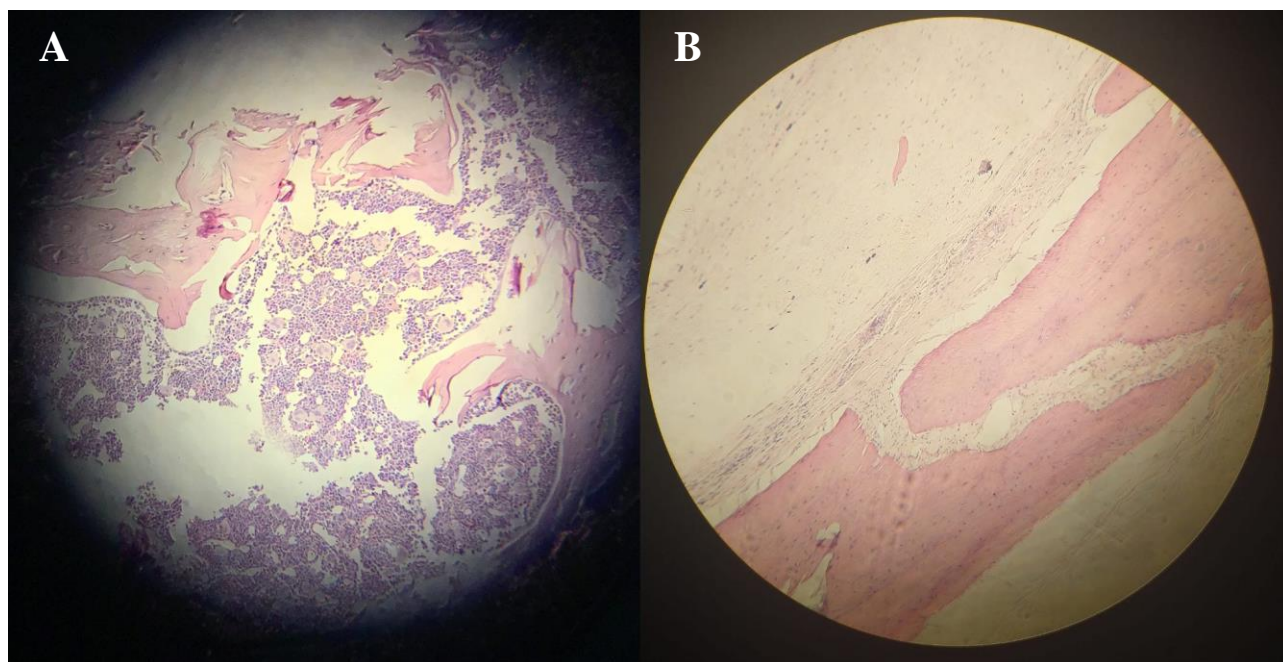


Fig. 22. Relación Ca/P (% atómico) Grupo Control vs. Experimental. Se muestran los promedios de la relación Ca/P de las regiones de interés en los cráneos analizadas (n= 3) con EDS a diferentes tiempos después de la cirugía (1, 2, 3 y 4 meses).

Datos graficados: promedio \pm error estándar

8.5 Evaluación histológica del tejido craneal

Se observaron las laminillas con los cortes craneales, previamente tratados, con un microscopio óptico (10x y 40x), y se encontraron diferencias en el contenido celular que se presenta en el cráneo control a comparación del cráneo experimental (Fig. 23). Mientras que en el cráneo control se observa un tejido óseo con contenido celular normal, en el cráneo experimental se puede observar la presencia de infiltrado inflamatorio.



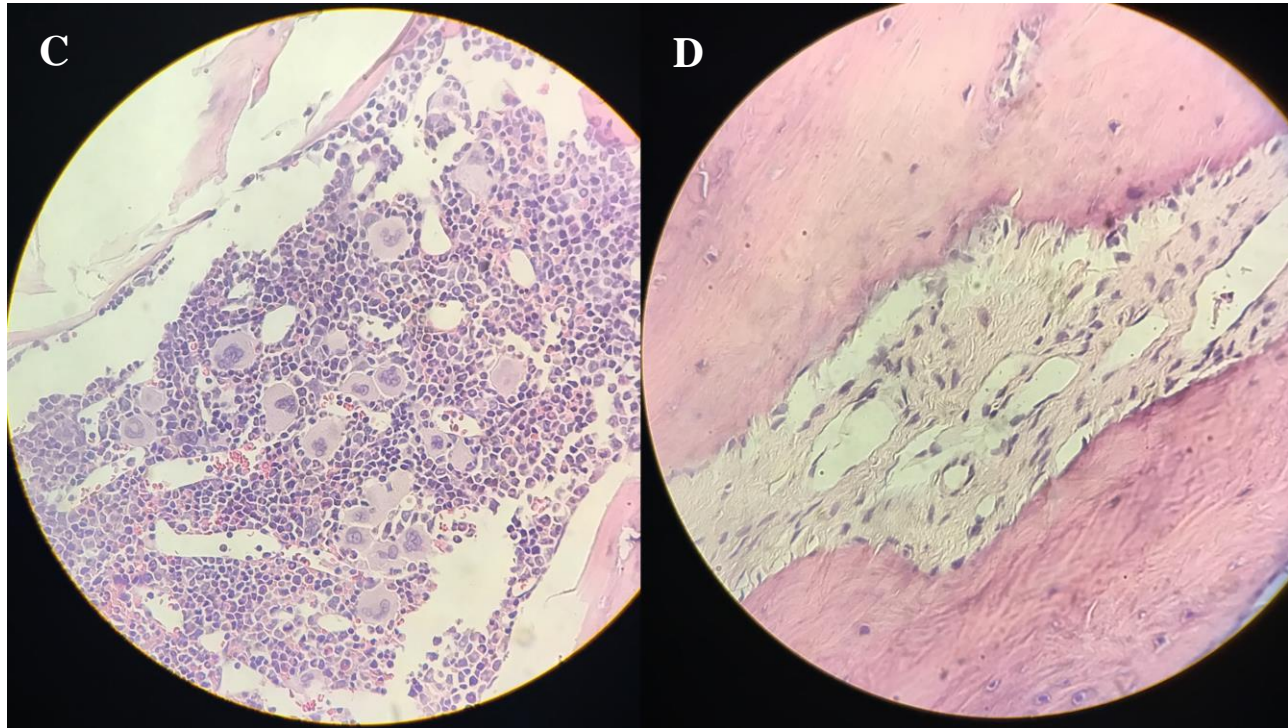


Fig. 23. Histología del tejido craneal (4 meses postquirúrgico) Tinción hematoxilina-eosina. A - Se muestra una imagen del cráneo experimental donde el tejido presenta infiltrado inflamatorio (aumento 10x). **B -** Se muestra una imagen del cráneo presentando tejido óseo normal (aumento 10x). **C –** Acercamiento a 40x del cráneo experimental. **D –** Acercamiento a 40x del cráneo control.

8.6 Evaluación histológica del tejido cerebral

Al realizar el conteo del número de astrocitos que expresaban GFAP en las regiones de interés, no se observó una diferencia significativa entre el grupo control contra el experimental en los tiempos de mes 3 y mes 4 posteriores a la cirugía. En el mes 2 se observó una diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental ($P = 0.031$) (Fig. 24, Apéndice D).

NOTA: Debido a errores al realizar la técnica de perfusión intracardíaca no fue posible llevar a cabo la evaluación histológica en las muestras de mes 1 posterior a la cirugía.

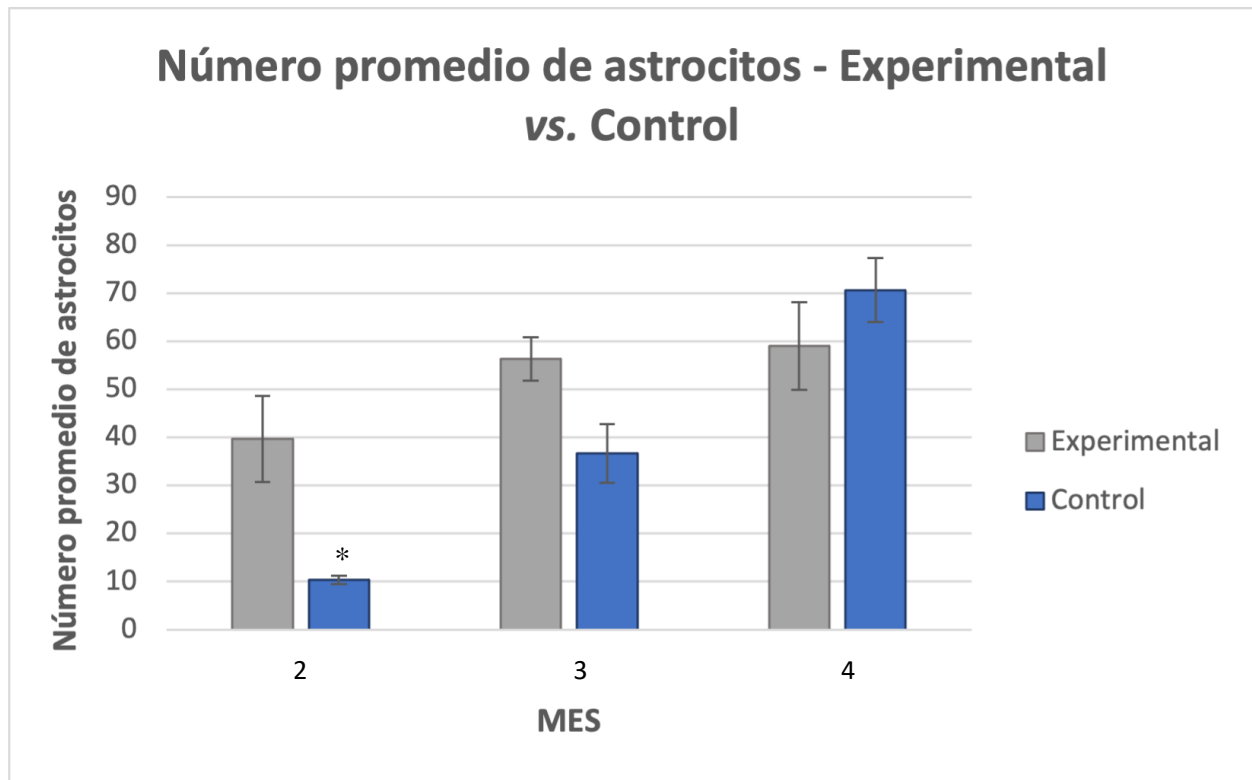


Fig. 24. Número promedio de astrocitos. Grupo experimental vs. control. Se muestra el promedio del número de astrocitos expresando GFAP en las regiones de interés analizadas (n= 3) a diferentes tiempos después de la cirugía (2, 3 y 4 meses). *P = 0.031, diferente del grupo control.

Datos graficados: promedio \pm error estándar

XII. DISCUSIÓN

La craneoplastía es un procedimiento quirúrgico que tiene una larga historia, y para el cual se han empleado diversos materiales tanto biológicos como sintéticos. Cada uno de los materiales utilizados para esta intervención presentan ventajas y desventajas, y a pesar de que en la actualidad se utilizan principalmente implantes autólogos y de titanio, aún no existe un consenso dentro de la comunidad médica respecto a cuál es el mejor

material para llevar a cabo craneoplastías. Idealmente, el material utilizado para la reconstrucción craneal debería cumplir con ciertas características tales como ser radiolúcido, capaz de ajustarse al defecto craneal, no inducir toxicidad, ser resistente mecánicamente y favorecer la regeneración del tejido óseo del huésped (Aydin et al., 2011, Chen et al., 2012, Navarro et al., 2003, Spetzger et al., 2010).

Los vidrios bioactivos y cerámicos son materiales que tienen un gran potencial dentro de la ingeniería de tejido óseo dado que favorecen la regeneración del mismo (Kaur et al., 2014). Sin embargo, no hay suficientes estudios donde se haya evaluado el desempeño de prótesis craneales de vidrios bioactivos *in vivo* y en donde, además, se hayan considerado los posibles efectos secundarios de la degradación de la prótesis en el cerebro durante el tiempo de adsorción del implante craneal. De manera previa al presente trabajo, Ruiz-Aguilar et al., 2022 estudiaron andamios craneales de fosfato tricálcico *in vivo*. En dicho trabajo, se realizó un seguimiento tanto de la regeneración ósea como del estado del cerebro durante el período de adsorción del implante y posterior al mismo, por medio de seguimiento con resonancia magnética y pruebas conductuales, y de forma histológica post mortem. Los resultados obtenidos en el trabajo mencionado mostraban que no había diferencias significativas entre el grupo control vs. el grupo experimental en las pruebas conductuales aplicadas ni en las evaluaciones histológicas.

Como continuación al trabajo anterior, en la presente investigación se tenía como objetivo analizar la capacidad de un implante craneal de vidrio bioactivo para regenerar el tejido óseo, y evaluar si la degradación del mismo podría causar efectos en el cerebro. En concordancia con Ruiz-Aguilar et al., 2022 en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de las dos pruebas conductuales realizadas (Tabla 3, Fig. 18-20). De manera particular, en la prueba cognitiva del laberinto en T, (Tabla 3, Fig. 18-19), se obtuvieron los resultados esperados del grupo control; un aumento en el número de aciertos logrados y una disminución en el tiempo que les tomaba a los sujetos lograr el acierto (latencia). Estos resultados son favorables ya que indican que la colocación del implante craneal no causó daño cerebral que se tradujera en afectaciones en la memoria de trabajo, el aprendizaje ni en la conducta locomotora.

En la Fig. 21, en las imágenes del tejido craneal obtenidas por SEM se puede observar que hay diferencias entre la aparición de precipitados de la fase mineral del hueso (hidroxiapatita) entre el grupo control y el grupo experimental. Dichos precipitados se asemejan morfológicamente a los sintetizados por Ma, 2012 (Fig. 25), descritos como hidroxiapatita con morfología de flor. En el grupo control éstas precipitaciones no se observan hasta el mes 3 posterior a la cirugía de trepanación, mientras que en el grupo experimental comienzan a aparecer desde el mes 1 posterior a la cirugía de implantación. Esto sugiere que el implante de vidrio bioactivo tiene propiedades osteoconductoras que favorecen la regeneración del tejido óseo.

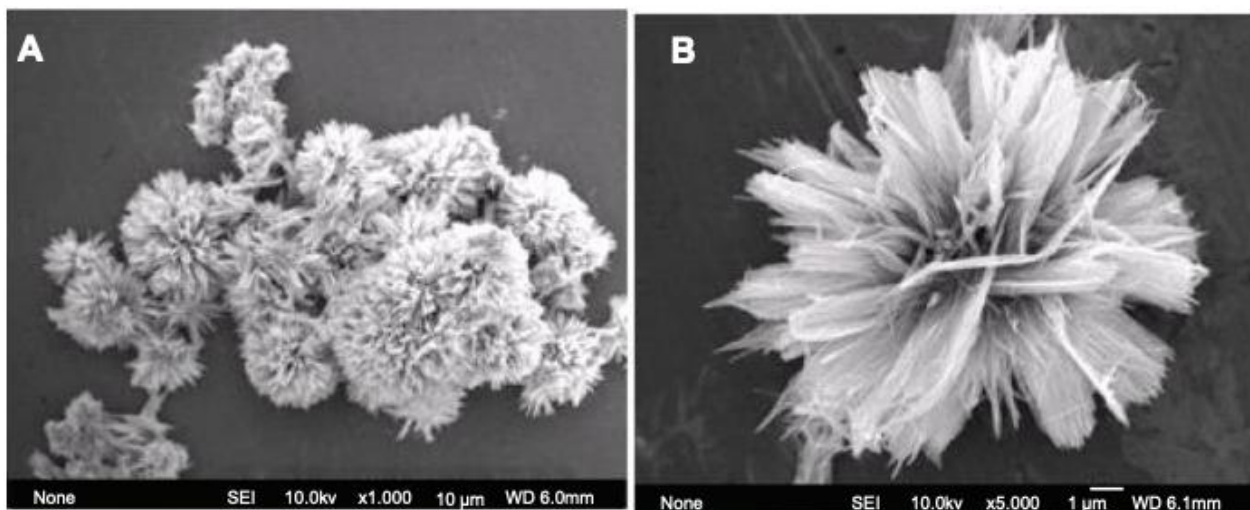


Fig. 25. Hidroxiapatita sintetizada por Ma, 2012 con morfología de flor.

En los datos obtenidos del análisis elemental por EDS no se observa una relación Ca/P dentro de los rangos que presenta la hidroxiapatita (1.3 a 2.0) (Fig. 22). Esto podría ser explicado por diferentes teorías; por un lado el implante (en el caso del grupo experimental) está en un constante intercambio iónico con el medio en el que se encuentra. Cuando se implanta un andamio, en el organismo se da un proceso de interacción entre el implante y el medio en el que se encuentra. Esto incluye iones no orgánicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , etc.) sustancias orgánicas (glucosa, ATP, etc.) y gases (CO_2 , N_2 , O_2 , etc.). Al momento de disolución de la superficie del andamio, hay un incremento de sustancias tales como Ca^{2+} and PO_4^{3-} en el fluido corporal. Dichas sustancias tienden a acumularse en la

superficie del andamio, lo que a su vez promueve la formación de fosfatos similares a la apatita y la absorción de proteínas y otros factores de crecimiento que estimulan la regeneración de nuevo tejido óseo (Lu et al., 2018). Esto hace que los elementos encontrados no sean únicamente representativos de la muestra en sí, sino de posibles residuos del medio con el que estuvo en contacto, ya que el lavado por el que pasaron los cráneos fue breve y únicamente se hizo con el objetivo de eliminar residuos tales como la sangre y restos de tejido conjuntivo. Adicional a esto, existe la posibilidad de que el material no estuviera completamente degradado aún, por lo que el EDS detectaría también los elementos presentes en el implante por su naturaleza.

En el caso del grupo control, la relación de Ca/P es mayor, lo que no necesariamente implica que sea mejor. Debido a que en las muestras control no había un implante y el tejido óseo se regeneraba de manera natural, la cuantificación de calcio y fósforo fue mayor por el hecho de que el EDS cuantificaba la capa más externa de la muestra, la cual estaría formada principalmente de calcio y fósforo. Sin embargo, esto no implica que la fase mineral del hueso estaba formada aún, dado que la relación Ca/P no es de ≈ 1.6 .

En la evaluación histológica del tejido craneal (Fig. 23) se observó que en el cráneo experimental había infiltrado inflamatorio, mientras que en el cráneo control se observó tejido óseo normal. La presencia de una respuesta inflamatoria es esperada cuando se implanta un cuerpo externo al organismo. El organismo tiene de manera natural una respuesta inmune a implantes, debido a que el sistema reacciona para proteger al organismo de patógenos extraños (Wang et al., 2023).

Durante las primeras etapas de implantación del andamio, se induce una respuesta inflamatoria benéfica, con la que se reduce el riesgo de infecciones. Una vez que esta etapa de inflamación aguda termina, se inicia una respuesta de inflamación crónica donde participan células gigantes de tipo de cuerpo extraño. En la etapa final de implantación, los macrófagos también son capaces de favorecer la reparación del tejido y angiogénesis (Wang et al., 2023).

A pesar de que los mecanismos exactos aún no se entienden completamente, investigaciones han sugerido que los materiales osteoinductivos (tales como los fosfatos de calcio, biocerámicas y biovidrios) desencadenan una cascada de eventos a partir de la primera interacción con células del sistema inmune. Dicha cadena de reacciones termina en la diferenciación de células estromales en células capaces de formar tejido óseo (Sadowska & Ginebra, 2020). Si bien el proceso inflamatorio es esperado al haber colocado un andamio en el tejido, para futuros trabajos debe considerarse la posibilidad de llevar a cabo un análisis histológico del tejido craneal más allá de los 4 meses establecidos en el presente trabajo, esto, con el objetivo de comprobar que el proceso inflamatorio tuvo una resolución.

En la evaluación histológica del tejido cerebral (Fig. 24) no se observaron diferencias significativas en el número de astrocitos detectados en las regiones de interés entre el grupo control y el grupo experimental en los meses 3 y 4 postquirúrgicos. En el mes 2 posterior a la cirugía se observó una diferencia significativa entre ambos grupos, siendo que en el grupo experimental hubo un mayor número detectado de astrocitos. Esto sugiere que la colocación del implante podría desencadenar una respuesta de astrogliosis de manera inicial.

El daño al SNC casi siempre es acompañado de algún grado de gliosis reactiva, inflamación y cicatrización (Bradbury et al., 2019). Cuando hay un daño, los astrocitos se vuelven reactivos de forma rápida y pueden formar un borde con una alta densidad de astrocitos (Moulson et al., 2021). Anteriormente se pensaba que la astrogliosis únicamente exacerbaba el daño cerebral. Sin embargo, se han descrito los beneficios neuroprotectores de este mecanismo, al limitar el daño y preservar la función neurológica después del daño (Sofroniew, 2015). Asimismo, la regulación positiva de GFAP es una característica que ocurre como respuesta temprana a un daño. Sin embargo, el incremento en la expresión de GFAP no siempre correlaciona en proporción a la severidad del daño ni es un indicador de funciones alteradas de los astrocitos reactivos, por lo que se recomienda para futuros trabajos, combinar este marcador con otros marcadores astrocíticos para lograr una estimación más correcta con respecto al número de astrocitos (Escartin et al., 2021).

Incluso si hubiese una formación de cicatriz glial, no se puede pensar en esto simplemente como benéfico o dañino para el SNC, dado que la función de estas cicatrices es variable dependiendo del daño (Wang et al., 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos de las pruebas conductuales son prometedores ya que muestran que incluso si hubo una respuesta de astrogliosis, ésta no afectó las funciones cognitivas ni motoras.

El material sintético ideal para reconstrucciones de defectos del tejido óseo debe presentar las mismas características que presenta el hueso de manera natural; debe ser completamente biocompatible, fuerte, inerte, fácil de trabajar, con bajo peso, idealmente de bajo costo y debe permitir evaluaciones radiológicas aún implantado (Spetzger et al., 2010).

Los vidrios bioactivos presentan un conjunto de características que otros materiales no presentan al mismo tiempo, por ejemplo, son biocompatibles, cuentan con la habilidad de degradarse a una tasa controlada y convertirse en HA, así como de unirse a tejidos y liberar iones durante su degradación. Dichos iones a su vez, no sólo promueven el crecimiento de células óseas, es decir la osteogénesis, sino que también estimulan los procesos de angiogénesis y condrogénesis (Kaur et al., 2014). Además, de lo anteriormente mencionado y de acuerdo a los resultados presentados en este trabajo, no parecen causar alteraciones cerebrales que se traduzcan en afectaciones a conductas cognitivas tales como la memoria y el aprendizaje, ni en conducta motora.

En contraste con otros materiales comúnmente utilizados, Shelly et al., 2021 llevaron a cabo un estudio donde proponían que la exposición crónica a titanio (Ti) causaba disfunción de la BHE y un declive cognitivo. En dicho estudio se utilizaron ratas, a las cuales se les expuso a titanio por diferentes medios (vía intravenosa, implante). Asimismo, las entrenaron en tareas cognitivas tales como el laberinto de Barnes, reconocimiento de objetos y laberinto en Y. Encontraron que aquellos animales a los que se les había administrado Ti por vía intravenosa presentaban altas concentraciones de titanio en los pulmones, huesos y cerebro, así como deficiencias en las pruebas conductuales. En el grupo

que tenía el implante, únicamente encontraron Ti en el tejido adyacente aunque de igual forma presentaban diferencias en las pruebas conductuales en comparación con el grupo control. Como parte de sus conclusiones mencionaron que no se conocen las consecuencias en la salud que se puedan tener a largo plazo cuando se está expuesto crónicamente a titanio. Es importante resaltar que las prótesis de titanio están diseñadas para poder conservarse en el cuerpo durante décadas. Adicional a esto, hipotetizaron que la exposición crónica a nanopartículas de titanio causa disrupción de la BHE.

Por otro lado, otro de los materiales utilizados en la actualidad para craneoplastías es el polimetilmetacrilato (PMMA). Referente a este material, Pikis et al., 2015 reportaron a 6 pacientes a quienes se les practicó una craneoplastía con PMMA. Dichos pacientes desarrollaron signos y síntomas de disfunción neurológica posterior a la cirugía, por lo que se sugiere que los residuos de dicho material podrían inducir neurotoxicidad.

XIII. CONCLUSIONES

En la presente investigación se buscó evaluar *in vivo* una prótesis craneal de vidrio bioactivo base fosfato, para determinar si presentaba propiedades osteoconductoras, biocompatibles y además determinar sus posibles efectos secundarios en el cerebro. De los resultados se obtienen las siguientes conclusiones:

1. El implante de vidrio bioactivo base fosfato reforzado con óxido de titanio muestra una biocompatibilidad adecuada.
2. La colocación del implante ayuda a acelerar el proceso de regeneración del tejido óseo.
3. El implante no causó alteraciones en el cerebro que se vieran reflejados en la conducta motora ni en procesos de memoria y aprendizaje.
4. La colocación inicial del implante parece iniciar una respuesta de astrogliosis. Sin embargo, esta respuesta únicamente se observa al mes 2 postquirúrgico, siendo que en los meses posteriores, no hay diferencias significativas en el número de astrocitos reactivos a GFAP entre el grupo control y el grupo experimental.

Considerando los puntos anteriores, se puede concluir que la prótesis craneal con la composición de materiales utilizada presenta un gran potencial para ser utilizada dentro del área de ingeniería del tejido óseo.

XIV. REFERENCIAS

1. Aguayo-Del Castillo A, Sánchez-Castillo H, Casasola-Castro C. Alternancia espacial: el laberinto en forma de T, sus procedimientos y procesos. *Rev Mex Neuroci*. 2016;17(5):36-48.
2. Alkhaibary, A., Alharbi, A., Alnefaie, N., Aloraidi, A., & Khairy, S. (2020). Cranioplasty: A Comprehensive Review of the History, Materials, Surgical Aspects and Complications. *World Neurosurgery*. doi:10.1016/j.wneu.2020.04.211.
3. American Psychological Association. (s.f). Aprendizaje. En American Psychological Association Dictionary. Recuperado el 8 de noviembre, 2023, en <https://dictionary.apa.org/learning>
4. Anderson, J. M., Rodríguez, A., & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*, 20(2), 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
5. Aydin S, Kucukyuruk B, Abuzayed B, Aydin S, Sanus GZ. (2011). Cranioplasty: Review of materials and techniques. *J Neurosci Rural Pract*. ;2(2):162-7. doi: 10.4103/0976-3147.83584.
6. Baddeley A (1992). Working memory. *Science*, 31;255(5044):556-9. doi: 10.1126/science.1736359.
7. Bradbury, E. J., & Burnside, E. R. (2019). Moving beyond the glial scar for spinal cord repair. *Nature Communications*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11707-7>
8. Brooks, S., Dunnett, S (2009).. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* 10, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrn2652>
9. Chen, Q., Zhu, C., & Thouas, G. A. (2012). Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials*, 1(1), 2. doi:10.1186/2194-0517-1-2
10. Christian, K. M. (2010). Cerebellum: Associative Learning. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*. Academic Press, pages 242-248. doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00131-7.

11. Czajka, M., Sawicki, K., Sikorska, K., Popek, S., Kruszewski, M., & Kapka-Skrzypczak, L. (2015). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles in central nervous system. *Toxicology in Vitro*, *29*(5), 1042–1052. doi:10.1016/j.tiv.2015.04.004
12. Davison, N. L., Barrère-de Groot, F., & Grijpma, D. W. (2014). Degradation of Biomaterials. *Tissue Engineering*, 177–215. doi:10.1016/b978-0-12-420145-3.00006-7
13. Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, *1*(1), 7–12. doi:10.1038/nprot.2006.2
14. Di Silvio, L., & Jayakumar, P. (2009). Cellular response to osteoinductive materials in orthopaedic surgery. *Cellular Response to Biomaterials*, 313–343. doi:10.1533/9781845695477.2.313
15. Ducheyne, P. (1999). Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, *20*(23-24), 2287–2303. doi:10.1016/s0142-9612(99)00181-7.
16. Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *28*(7), 699–709. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.09.002
17. Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?. *Disease models & mechanisms*, *9*(10), 1079–1087. <https://doi.org/10.1242/dmm.026120>
18. El-Rashidy, A. A., Roether, J. A., Harhaus, L., Kneser, U., & Boccaccini, A. R. (2017). Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. *Acta Biomaterialia*, *62*, 1–28. doi:10.1016/j.actbio.2017.08.030
19. Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, *24*(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>

20. Fillingham Y, Jacobs J. (2016). Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J.* 98-B(1 Suppl A):6-9. doi: 10.1302/0301-620X.98B.36350.
21. García-Garduño, M. V., & Reyes-Gasga, J. (2006). LA HIDROXIAPATITA, SU IMPORTANCIA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS Y SU APLICACIÓN BIOMÉDICA. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(2),90-95.[fecha de Consulta 3 de Febrero de 2023]. ISSN: 1405-888X. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211937005>
22. Ge, D., Du, Q., Ran, B., Liu, X., Wang, X., Ma, X., Cheng, F., & Sun, B. (2019). The neurotoxicity induced by engineered nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4167-4186. <https://doi.org/10.2147/IJN.S203352>
23. Ghasemi-Mobarakeh, L., Kolahreez, D., Ramakrishna, S., & Williams, D. (2019). Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2019.02.004>
24. Halliday, G. M., Cullen, K. M., Kril, J. J., Harding, A. J., & Harasty, J. (1996). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry in human cortex: a quantitative study using different antisera. *Neuroscience Letters*, 209(1), 29–32. doi:10.1016/0304-3940(96)12592-1
25. Hench, L. L. (2006). *The story of Bioglass®*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(11), 967–978. doi:10.1007/s10856-006-0432-z
26. Kandel, E.R., Koester, J.D., Mack, S.H., Siegelbaum, S.A. (2021). Principles of Neural Science, 6e. McGraw Hill.
27. Kaur G, Pandey O.P., Singh K, Homa D, Scott B, Pickrell G. (2014). A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 102(1):254-74. doi: 10.1002/jbm.a.34690.
28. Kumosa L. S. (2023). Commonly Overlooked Factors in Biocompatibility Studies of Neural Implants. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany)*, 10(6), e2205095. <https://doi.org/10.1002/advs.202205095>
29. Las, D. E., Verwilghen, D., & Mommaerts, M. Y. (2021). A systematic review of cranioplasty material toxicity in human subjects. *Journal of cranio-maxillo-facial*

surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, 49(1), 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2020.10.002>

30. Loughrill, E., Wray, D., Christides, T., & Zand, N. (2017). Calcium to phosphorus ratio, essential elements and vitamin D content of infant foods in the UK: Possible implications for bone health. *Maternal & child nutrition*, 13(3), e12368. <https://doi.org/10.1111/mcn.12368>
31. Lu, J., Yu, H., Chen, C. (2018). Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review. *RSC Advances*, 2015-2033, 8(4). Doi: 10.1039/C7RA11278E
32. Ma, M.-G. (2012). Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity. *International Journal of Nanomedicine*, 1781. doi:10.2147/ijn.s29884
33. Mann, A., & Chesselet, M.-F. (2015). Techniques for Motor Assessment in Rodents. *Movement Disorders*, 139–157. doi:10.1016/b978-0-12-405195-9.00008-1
34. McHugh, S. B., & Bannerman, D. M. (2010). Cognition: Learning and Memory: Spatial. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, 279–287. doi:10.1016/b978-0-08-045396-5.00006-3
35. Moreira-Gonzalez, A., Loboeki, C., Barakat, K., Andrus, L., Bradford, M., Gilsdorf, M., & Jackson, I. T. (2005). Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *The Journal of craniofacial surgery*, 16(1), 63–70. <https://doi.org/10.1097/00001665-200501000-00013>
36. Moulson, A. J., Squair, J. W., Franklin, R. J., Tetzlaff, W., & Assinck, P. (2021). Diversity of Reactive Astrogliosis in CNS Pathology: Heterogeneity or Plasticity? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15, 703810. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.703810>
37. Navarro, M., Clément, J., Ginebra, M. P., Martínez, S., Avila, G., & Planell, J. A. (2001). Improvement of the Stability and Mechanical Properties of Resorbable Phosphate Glasses by the Addition of TiO₂. *Key Engineering*

Materials (Vols. 218–220, pp. 275–278).

<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.218-220.275>

38. Navarro, M., Ginebra, M.-P., Clément, J., Salvador, M., Gloria, A., & Planell, J. A. (2003). *Physicochemical Degradation of Titania-Stabilized Soluble Phosphate Glasses for Medical Applications*. *Journal of the American Ceramic Society*, 86(8), 1345–1352. doi:10.1111/j.1151-2916.2003.tb03474.x
39. Ngoc Hieu, B. T., Ngoc Anh, N. T., Audira, G., Juniardi, S., Liman, R. A. D., Villaflores, O. B., Lai, Y. H., Chen, J. R., Liang, S. T., Huang, J. C., & Hsiao, C. D. (2020). Development of a Modified Three-Day T-maze Protocol for Evaluating Learning and Memory Capacity of Adult Zebrafish. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1464. <https://doi.org/10.3390/ijms21041464>
40. Norma Oficial Mexicana. (6 de diciembre de 1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [NOM-062- ZOO-1999]. Diario Oficial de la Federación, México
41. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. (2015). Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci*. 28(1):57-71. doi: 10.3967/bes2015.006.
42. Paxinos, G. and Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
43. Piazza, M., & Grady, M. S. (2017). Cranioplasty. *Neurosurgery Clinics of North America*, 28(2), 257–265. doi:10.1016/j.nec.2016.11.008.
44. Pikis, S., Goldstein, J., & Spektor, S. (2015). Potential neurotoxic effects of polymethylmethacrylate during cranioplasty. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 22(1), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.06.006>
45. Portellano, J.A. (2005). *Introducción a la neuropsicología*. España: McGraw-Hill/Interamericana de España.
46. Ratner, B. D., & Zhang, G. (2020). A History of Biomaterials. *Biomaterials Science*, 21–34. doi:10.1016/b978-0-12-816137-1.00002-7
47. Ruiz-Aguilar, C. (2017). *Procesamiento de andamios 3D de fosfato tricálcico (β -TCP)/ZrO₂-biovidrio de fosfato para aplicaciones de regeneración ósea* [Tesis de

doctorado, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo] – Repositorio UMSNH.

48. Ruiz-Aguilar, C., Aguilar-Reyes, E. A., Flores-Martínez, M., León-Patiño, C. A., & Nuñez-Anita, R. E. (2017). Synthesis and characterisation of β -TCP/bioglass/zirconia scaffolds. *Advances in Applied Ceramics*, 116(8), 452–461. doi:10.1080/17436753.2017.1356
49. Ruiz-Aguilar, C., Gaytan-Tocaven, L., Paredes, R.G. (2022). In vivo evaluation of tricalcium phosphate scaffold for cranial prosthesis application. *Materials Chemistry and Physics*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2022.125993>.
50. Sadowska, J., & Ginebra, M.-P. (2020). Inflammation and biomaterials: Role of the immune response in bone regeneration by synthetic bone grafts. *Journal of Materials Chemistry B*. doi:10.1039/d0tb01379j
51. Shah, A. M., Jung, H., & Skirboll, S. (2014). Materials used in cranioplasty: a history and analysis. *Neurosurgical focus*, 36(4), E19. <https://doi.org/10.3171/2014.2.FOCUS13561>
52. Shelly, S., Liraz Zaltsman S., Ben-Gal, O., Dayan, A., Ganmore, I., Shemesh, C., Atrakchi, D., Garra, S., Ravid, O., Rand, D., Israelov, H., Alon, T., Lichtenstein, G., Sharabi, S., Last, D., Gosselet, F., Rosen, V., Burstein, G., Friedlander, A., Harel, R., Vogel, G., Schnaider Beerli, M., Mardor, Y., Lampl, Y., Fleminger, G., Cooper, I. (2021). Potential neurotoxicity of titanium implants: Prospective, in-vivo and in-vitro study. *Biomaterials*, 276, 121039. doi:10.1016/j.biomaterials.2021.121039
53. Sofroniew MV. (2015). Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 7(2):a020420. doi: 10.1101/cshperspect.a020420.
54. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
55. Sotiropoulou, P., Fountos, G., Martini, N., Koukou, V., Michail, C., Kandarakis, I., & Nikiforidis, G. (2015). Bone calcium/phosphorus ratio determination using dual energy X-ray method. *Physica Medica*, 31(3), 307–313. doi:10.1016/j.ejmp.2015.01.019

56. Spetzger, U., Vougioukas, V., Schipper, J. (2010). Materials and techniques for osseous skull reconstruction. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 19(2), 110–121. doi:10.3109/13645701003644087.
57. Sridhar, T.M. (2010). Nanobioceramic coatings for biomedical applications. *Materials Technology*, 25(3-4): 184-195. doi: 10.1179/175355510X12723642365449
58. Stanciu, George & Sandulescu, I. & Savu, Bogdan & Stanciu, Stefan & Paraskevopoulos, Konstantinos & Chatzistavrou, X. & Kontonasaki, Eleana & Koidis, Petros. (2007). Investigation of the Hydroxyapatite Growth on Bioactive Glass Surface. *J. Biomed. Pharm. Eng.*. 1.
59. Thrivikraman, G., Athirasala, A., Twohig, C., Boda, S.K., Bertassoni, L.E. (2017). Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dental Clinics of North America*, 61(4):835-856. doi: 10.1016/j.cden.2017.06.003.
60. Torres-Criollo Larry, Fernández-Martínez Rogelio, Saquicela-Espinoza Alberto, Ramírez-Coronel Andrés Alexis, Ávila-Miranda Cristian, & Saltos-Moran Sabrina Esther. (2021). *Técnicas de Craneoplastía, luego de craniectomía descompresiva. Revisión de tres casos.* <https://doi.org/10.5281/zenodo.4543686>
61. Tortora, J. & Derrickson, B. (2018). *Principios de Anatomía y Fisiología*. México: Panamericana.
62. Vallet-Regí, M. (2022). Evolution of Biomaterials. *Frontiers in Materials*, 9, 864016. <https://doi.org/10.3389/fmats.2022.864016>
63. Wang, H., Song, G., Chuang, H., Chiu, C., Abdelmaksoud, A., Ye, Y., & Zhao, L. (2018). Portrait of glial scar in neurological diseases. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 31. <https://doi.org/10.1177/2058738418801406>
64. Wang, J., Yuan, B., Yin, R., & Zhang, H. (2023). Inflammation Responses to Bone Scaffolds under Mechanical Stimuli in Bone Regeneration. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(3), 169. <http://dx.doi.org/10.3390/jfb14030169>
65. Zanotti, B., Zingaretti, N., Verlicchi, A., Robiony, M., Alfieri, A., Parodi, P.C. (2016). Cranioplasty: Review of Materials. *Journal of Craniofacial Surgery*, 27(8), 2061–2072. doi:10.1097/SCS.00000000000003025.

66. Zhang, K., Mikos, A. G., Reis, R. L., & Zhang, X. (2022). Translation of biomaterials from bench to clinic. *Bioactive materials*, 18, 337–338. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.02.005>
67. Zhang X., Williams D. Definitions of biomaterials for the twenty-first century. *Elsevier*. 2019:15–23.
68. Zubillaga Rodríguez, I., Sánchez Aniceto, G., & Montalvo Moreno, J.J.. (2007). Cranial reconstruction with biomaterials: Historical revision and current state. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 29(2), 79-89. Recuperado de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582007000200001&lng=es&tlng=en.

XV. APÉNDICES

Apéndice A. Latencia de aciertos

MES	1	2	3	4
Día 1	MWU= 55, T= 143, p= 0.518	MWU= 39, T= 94, p= 0.275	MWU= 33.5, T= 101.5, p= 0.368	MWU= 22, T= 86, p= 0.193
Día 2	MWU= 50, T= 116, p= 0.339	MWU= 47, T= 118, p= 0.597	MWU= 28, T= 107, p= 0.177	MWU= 31, T= 77, p= 0.665
Día 3	MWU= 54.5, T= 120.5, p= 0.498	MWU= 45.5, T= 100.5, p= 0.526	MWU= 22, T= 113, p= 0.066	MWU= 22, T= 86, p= 0.193
Día 4	MWU= 65, T= 133, p= 0.975	MWU= 30, T= 135, p= 0.084	MWU= 23.5, T= 111.5, p= 0.085	MWU= 31, T= 77, p= 0.665
Día 5	MWU= 63, T= 129, p= 0.878	MWU= 28, T= 137, p= 0.062	MWU= 28.5, T= 106.5, p= 0.191	MWU= 33, T= 69, p= 0.810

MES 1	Experimental (n= 12)	Control (n= 11)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	57.333 (192. 667)	80.333 (183)	55	0.518
Día 2	30.5 (285. 667)	18 (100)	50	0.339

Día 3	18.667 (72.333)	13 (122. 667)	54.5	0.489
Día 4	13 (21.333)	14.667 (93.333)	65	0.975
Día 5	8.5 (43.667)	9.667 (22.333)	63	0.878

MES 2	Experimental (n= 11)	Control (n= 10)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	11.667 (48.333)	10.667 (18)	39	0.275
Día 2	10 (36.667)	13 (103.333)	47	0.597
Día 3	7.667 (14.667)	7.167 (28.667)	45.5	0.526
Día 4	5.667 (15.667)	9.667 (17.333)	30	0.084
Día 5	6 (9)	7.833 (35.667)	28	0.062

MES 3	Experimental (n= 10)	Control (n= 9)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	6 (10)	8.333 (43)	33.5	0.368
Día 2	4.333 (44.667)	8 (26.333)	28	0.177
Día 3	4.833 (16.333)	9.667 (27)	22	0.066
Día 4	5.333 (14)	8 (26)	23.5	0.085
Día 5	5.5 (14.833)	8.667 (13.333)	28.5	0.191

MES 4	Experimental (n= 9)	Control (n= 8)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	4.333 (8.367)	10.167 (18.333)	22	0.193
Día 2	4.667 (12.367)	6.167 (11.667)	31	0.665
Día 3	3.667 (10.8)	9 (15.333)	22	0.193
Día 4	4.333 (19.667)	5.667 (12)	31	0.665

Día 5	4.233 (16)	3.833 (7)	33	0.810
-------	------------	-----------	----	-------

Apéndice B. Número de aciertos

MES 1	Experimental (n= 12)	Control (n= 11)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	2 (2)	2 (2)	59	0.644
Día 2	3 (2)	3 (1)	66	1.0
Día 3	3 (1)	3 (1)	59.5	0.493
Día 4	3 (0)	3 (0)	66	1.0
Día 5	3 (0)	3 (0)	66	1.0

MES 2	Experimental (n= 11)	Control (n= 10)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	3 (1)	3 (0)	50	0.340
Día 2	3 (0)	3 (1)	49.5	0.294
Día 3	3 (0)	3 (0)	55	1.0
Día 4	3 (0)	3 (0)	55	1.0
Día 5	3 (0)	3 (0)	55	1.0

MES 3	Experimental (n= 10)	Control (n= 9)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	3 (0)	3 (0)	45	1.0
Día 2	3 (0)	3 (0)	45	1.0
Día 3	3 (0)	3 (0)	45	1.0
Día 4	3 (0)	3 (0)	45	1.0

Día 5	3 (0)	3 (0)	45	1.0
-------	-------	-------	----	-----

MES 4	Experimental (n= 9)	Control (n= 8)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	3 (0)	3 (0)	36	1.0
Día 2	3 (0)	3 (0)	36	1.0
Día 3	3 (0)	3 (0)	36	1.0
Día 4	3 (0)	3 (1)	31.5	0.289
Día 5	3 (0)	3 (0)	36	1.0

Apéndice C. Distancia recorrida en metros

MES 1	Experimental (n= 12)	Control (n= 11)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	119.318 (237.504)	115.359 (97.264)	56	0.558
Día 2	89.347 (171.908)	101.788 (145.896)	59.5	0.712
Día 3	96.133 (133.455)	109.704 (95.002)	55	0.518
Día 4	102.353 (136.848)	115.359 (140.241)	62	0.829
Día 5	114.794 (102.919)	130.062 (95.002)	49	0.309

MES 2	Experimental (n= 11)	Control (n= 10)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	102.919 (132.324)	132.324 (133.455)	41	0.342
Día 2	101.788 (166.253)	96.133 (204.706)	52.5	0.888
Día 3	83.692 (91.609)	107.44 (152.681)	43	0.418
Día 4	100.657 (139.11)	113.663 (137.979)	42	0.379

Día 5	84.823 (126.669)	129.496 (180.956)	30	0.084
-------	------------------	-------------------	----	-------

MES 3	Experimental (n= 9)	Control (n= 9)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	107.442 (54.287)	99.526 (133.455)	30	0.377
Día 2	106.311 (113.097)	81.43 (148.158)	33	0.536
Día 3	88.216 (119.883)	108.573 (135.717)	39.5	0.965
Día 4	97.264 (91.609)	107.442 (121.014)	36	0.724
Día 5	87.085 (68.989)	78.037 (107.44)	32.5	0.507

MES 4	Experimental (n= 9)	Control (n= 8)		
	Mdn (Rango)	Mdn (Rango)	U	p
Día 1	101.788 (80.299)	91.609 (115.359)	30	0.596
Día 2	93.871 (64.465)	83.127 (84.823)	31	0.665
Día 3	95.002 (92.74)	100.657 (104.05)	31.5	0.700
Día 4	100.657 (54.287)	111.966 (95.002)	30	0.597
Día 5	82.561 (54.287)	81.996 (82.561)	35.5	1.000

Apéndice D. Número de astrocitos

	Experimental (n= 3)	Control (n= 3)		
	M (DE)	M (DE)	t	p
Mes 2	39.667 (15.535)	10.333 (1.528)	-3.255	0.031
Mes 3	56.333 (7.767)	36.667 (10.599)	-2.592	0.061
Mes 4	59 (15.875)	70.667 (11.504)	1.031	0.361

XVI. ANEXOS

Anexo 1. Documento de aprobación del proyecto 128.A por el Comité de Ética en Investigación del INB



INEU/SA/CB/367/2021

A QUIEN CORRESPONDA
Presente

Por medio de la presente les informo que la propuesta de investigación: "EVALUACIÓN IN VIVO DE PRÓTESIS CERÁMICAS REABSORBIBLES PARA APLICACIONES EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS ÓSEOS", cuyo responsable es el **DR. RAÚL GERARDO PAREDES GUERRERO**, ha sido evaluado y aprobado el día 14 de abril del 2021, con número de proyecto 128.A por el Comité de Ética en Investigación del INB. Como resultado se encuentra que cumple con la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y alimentación (SAGARPA) clave NOM-062-ZOO-1999. Para la evaluación de dicho proyecto este comité también tomo en cuenta los criterios de ética para el uso de animales de investigación según los estándares internacionales de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos.

Asimismo, le informo que el laboratorio en el que se realiza este proyecto de investigación cumple con los requisitos mínimos y con la normatividad universitaria en términos de bioseguridad.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Campus UNAM, Juriquilla, Qro. a 27 de Julio del 2021


DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
Presidente del Comité de Ética en Investigación
Instituto de Neurobiología, UNAM