



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Evaluación de dos modelos de defectos en la cortical mandibular de rata *Wistar* por medio de micro-CT”.

Que para obtener el título de
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A:

Rocío Gutiérrez Escalona

Director:

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Sinodales:

Dra. Janeth Serrano Bello

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez

Mtra. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez

C.D Guillermo Arturo Cejudo Lugo

Investigación realizada gracias los proyectos: PAPIIT de la UNAM IA201814 y Proyecto CONACYT CB201401-0235984. Agradecemos a UNAM-PAPIIT y CONACYT por las becas recibidas.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*“La gente cree ansiar y perseguir estrellas,
pero termina como peces de colores en
una pecera”.*

*“La facultad que tenemos de manipularnos a
nosotros mismos para que no se tambaleen lo
más mínimo los cimientos de nuestras creencias
es un fenómeno fascinante”.*

Muriel Barbery

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco a la Dra Cynthia G. Trejo Iriarte por su confianza, conocimientos, apoyo, paciencia, consejos y permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

Agradezco a la Dr. Luis A. Medina Velázquez por brindarme parte de su conocimiento, por el tiempo dedicado en cada una de sus puntuales correcciones y aportaciones, por la confianza, comprensión, consejos y paciencia.

Agradezco a la Dra. Janeth Serrano Bello por sus invaluable conocimientos, tiempo y paciencia para mi aprendizaje en el manejo del microCT. Por sus consejos, comprensión y dedicación para que este trabajo culminara de la mejor manera.

A quienes formaron parte de mis revisores a la Mtra. Betsaida Julieta Ortiz Sánchez y C.D Guillermo Arturo Cejudo Lugo, por el tiempo dedicado a revisar las versiones previas de este trabajo y por sus valiosas e imprescindibles aportaciones y comentarios que permitieron mejorarlo.

A mis compañeros del INCAN: Roberto, Pável y Sirio, quiénes compartieron conmigo su conocimiento y valiosa experiencia en Física, para denotar importantes contribuciones a mi aprendizaje.

Agradezco al Mtro. en C. Crisoforo Mercado por todas sus aportaciones, consejos y enseñanzas para el correcto manejo de animales de laboratorio.

A mis compañeros de Laboratorio de Investigación en Odontología, por su gran apoyo en todos los procesos experimentales de este trabajo.

Agradezco con gran cariño a mis amigos, confidentes, colegas y hermanos Francisco Javier y Rosaura por el apoyo, consejos, tolerancia y compañía que sin merecer algo a cambio me brindaron.

A mis padres, Adela Escalona y Enrique Gutiérrez, que con mucho amor, cariño, comprensión y paciencia me otorgaron su apoyo incondicional durante todo el proceso que conllevó a la culminación de este trabajo.

A mi hermano, César Gutiérrez, por su comprensión, apoyo y por estar siempre conmigo.

A esos pequeños seres anónimos sin los cuales el conocimiento y la vida no sería igual.



ÍNDICE

CAPÍTULO 1	1
___ Tejido óseo	1
___ Matriz ósea	1
___ Histología ósea	3
___ Organización estructural	4
___ Embriología ósea	4
___ Modelado óseo	5
___ Remodelación ósea	5
___ Tomografía computacional	6
___ Micro-CT (Sistema Albira)	7
CAPÍTULO 2	10
___ Justificación	10
___ Antecedentes	11
___ Hipótesis	13
___ Objetivos	13
CAPÍTULO 3	14
___ Materiales y métodos	14
___ Diseño del estudio	15
___ Diseño quirúrgico del defecto mandibular	15
___ Evaluación tomográfica	17
___ Adquisición y reconstrucción de imágenes	18
___ Imágenes 3D	19
___ Construcción de regiones de interés (ROI)	20
___ Evaluación clínica	21
___ Análisis estadístico	22



CAPÍTULO 4	23
<u>Resultados</u>	23
<u>Discusión</u>	34
<u>Resumen de resultados</u>	40
<u>Conclusión</u>	40
Bibliografía	41
Anexos	47



RESUMEN

Introducción: La pérdida ósea del área maxilofacial es un problema para la salud ya que afecta a las funciones del sistema estomatognático, como son la masticación, fonación, deglución y estética. Actualmente, existen terapias innovadoras para la regeneración ósea, sin embargo, antes de ser puestas en práctica en los seres humanos estas deben ser evaluadas en modelos preclínicos *in vivo*. Una técnica útil y no invasiva que permite evaluar la regeneración ósea es la microtomografía computarizada (micro-CT) capaz de realizar un análisis de la microarquitectura (como es cantidad y calidad ósea) y densidad mineral ósea (DMÓ).

Objetivo: Evaluar dos propuestas de modelos de defectos en la cortical mandibular de rata *Wistar* mediante la técnica de microtomografía computarizada.

Método: Se utilizaron 11 ratas *Wistar* con un peso que osciló de entre 250-300 gr, machos (n=5) y hembras (n=6). En cada rata se realizaron dos defectos en la cortical mandibular con dimensiones de 4 x 3 x 1 mm, con diferente localización: defecto anterior del lado derecho de la mandíbula y defecto posterior del lado izquierdo de la mandíbula. Se organizaron los grupos como: defecto anterior machos (DAM); defecto posterior machos (DPM); defecto anterior hembras (DAH); y defecto posterior hembras (DPH). Los cambios en los defectos fueron evaluados por medio de micro-CT en los tiempos de estudio: 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días.

Resultados: A los 60 días, clínicamente los defectos todavía persistían en todos los grupos, sin embargo, se observaron cambios en el porcentaje de la reparación ósea: grupo DAM y DAH 95%, grupo DPM y DPH 85%. A través de las imágenes 3D obtenidas por micro-CT, los defectos se observaron bien definidos a los 7, 14, 21 y 30 días, mientras que a los 45 y 60 días se visualizaban pobremente definidos. El análisis tomográfico confirmó una regeneración ósea progresiva, que no alcanzó el 100%, desde los 30 y hasta los 60 días. Con respecto a la concentración de Hidroxiapatita [HA], ninguno de los grupos de defectos presentó el 100% de [HA], con respecto a tejido sano, en el día 60 presentaron los siguientes porcentajes; grupo DAM 66%, DPM 58%, DAH 74% y DPH 58%.

Conclusiones: Los modelos de defecto estudiados en el presente trabajo son de gran utilidad para la evaluación de la regeneración ósea debido a que se mantienen como defectos de tamaño crítico (DTC) a los 30 y 60 días, aunque para fines de ergonomía y diseño quirúrgico, se concluye que el DP es mejor con respecto al DA, y con nulas diferencias entre machos y hembras de edad intermedia.



ABREVIATURAS

[HA]: Concentración de Hidroxiapatita mg/cc

AMIDE: Medical Imaging Data Examiner (por sus siglas en inglés)

BMP: Sialoproteína ósea

Cal: Calcitonina

Cbfa1: factor de transcripción, core-binding factor a-1

CSF-1: F: actor estimulante de colonias

CT: Tomografía computarizada

DAH: Defecto Anterior en Hembras

DAM: Defecto Anterior en Machos

DMÓ: Densidad Mineral Ósea

DPH: Defecto Posterior en Hembras

DPM: Defecto Posterior en Machos

DTC: Defecto de Tamaño crítico

HA: Hidroxiapatita

HD-LV: Alta dosis, Bajo voltaje (High Dose, Low voltage) (por sus siglas en inglés)

HU: Unidades Hounsfield (por sus siglas en inglés)

kV: kilovoltio

M-CSF: Factor estimulante de macrófagos

mA: Miliamperio

Micro-CT: Microtomografía Computarizada (μ CT)

OC: Osteocalcina

OP: Osteopontina

OPG: Osteoprotegerina



OsiriX: Software para Visualizar Imágenes en 3 dimensiones

PET: Tomografía por emisión de positrones (por sus siglas en inglés)

PMOD: Biomedical Image Quantification Technologies LLC

RER: Retículo Endoplásmico Rugoso

ROI: Región de Interés

SPECT: Tomografía por emisión de fotón único (por sus siglas en inglés)

TÓ: Tejido óseo

VOI: Volumen de Interé

CAPÍTULO 1

Tejido óseo

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conjuntivo que está compuesto por células y una matriz extracelular mineralizada. Es un tejido duro, capaz de proveer sostén y protección; es un tejido dinámico que cambia constantemente en relación con las fuerzas que soporta y actúa como reservorio de calcio y otros minerales, como fósforo y magnesio (Dongmei Cui, 2011); también sirve como inserción para los músculos y forma estructuras que protegen a las células hematopoyéticas y, en coordinación con las glándulas paratiroides, juega un papel importante en la regulación homeostática de la calcemia (Fortoul, 2011). El tejido óseo está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada, lo que le confiere la propiedad de dureza. La disposición de estas laminillas es la que determina que el hueso sea cortical o esponjoso (Fernández T. A., 2006).

Matriz ósea

La matriz es una sustancia intercelular calcificada, integrada por componentes orgánicos e inorgánicos (Figura 1) (Arenas, 2008) (Dongmei Cui, 2011).

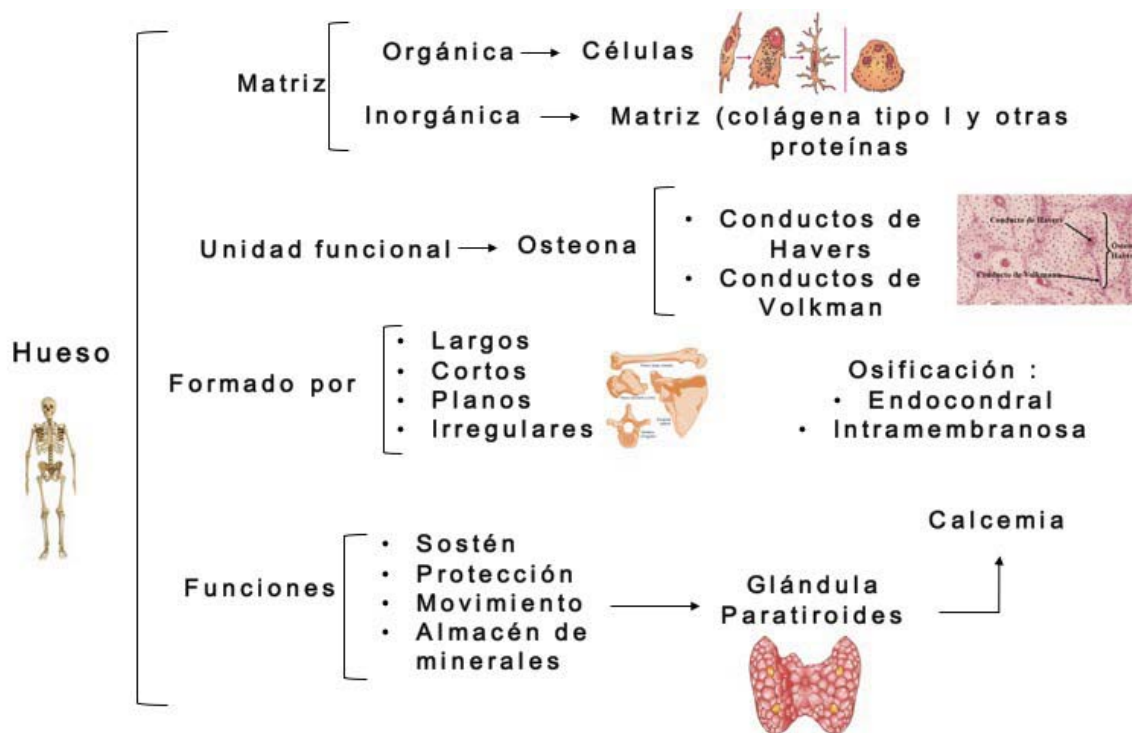


Fig. 1 Esquema de los componentes y funciones del hueso. Imagen modificada de (Fortoul, 2011).

La porción inorgánica del hueso está compuesta por calcio y fósforo en forma de cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, y fosfato de calcio en forma amorfa. Los cristales de hidroxiapatita (40 μm de largo x 25 μm de ancho y 1.5 a 3 μm de grosor) están dispuestos en una forma ordenada a lo largo de las fibras de colágeno tipo I, depositándose en las regiones del intersticio del colágeno.

La porción orgánica constituye alrededor del 35% del peso seco y contiene colágeno tipo I (en alrededor de 80 a 90%). El colágeno tipo I se encuentra dispuesto en forma de haces grandes (50 a 70 μm de diámetro). En la matriz ósea también se encuentran varias glucoproteínas como son: Osteocalcina (OC), Osteopontina (OP) y sialoproteína ósea (BMP) (Tabla 1) (Garther, 2008). Estos componentes de la matriz ósea orgánica son sintetizados y secretados por las células osteoprogenitoras y los osteoblastos, y constituyen el tejido osteoide, en donde se depositarán los cristales de sales de calcio (fosfatos y carbonatos) por actividad de los osteoblastos (Arenas, 2008).

Tabla 1. Proteínas de la matriz osteoide (Fernández T. H., 2006).

COLÁGENO	<ul style="list-style-type: none"> • Tipo I, III, V, XII
PROTEOGLICANOS	<ul style="list-style-type: none"> • condroitin sulfato • decorina • biglicano • hialuronano
PROTEÍNAS CON ÁCIDO γ-CARBOXI-GLUTÁMICO	<ul style="list-style-type: none"> • osteocalcina • proteína de la matriz con ácido γ-carboxi-glutámico
GLICOPROTEÍNAS	<ul style="list-style-type: none"> • osteonectina • fosfatasa alcalina • proteínas con RGD: <ul style="list-style-type: none"> - fibronectina - trombospondina - osteopontina - vitronectina - sialoproteínas óseas
PROTEÍNAS DEL PLASMA	<ul style="list-style-type: none"> • ALBÚMINA • α2-SH- glicoproteína
FACTORES DE CRECIMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> • IGF-I y II (Insulin growth factor I y II) • TGF-β (Transforming growth factor -beta) • PDGF (Platelet derived growth factor)

Histología ósea

Las células que componen el hueso son: células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteoprogenitoras derivan del mesénquima embrionario (Fig.2), están localizadas en la capa celular interna del periostio, en el recubrimiento de los canales haversianos y en el endostio.

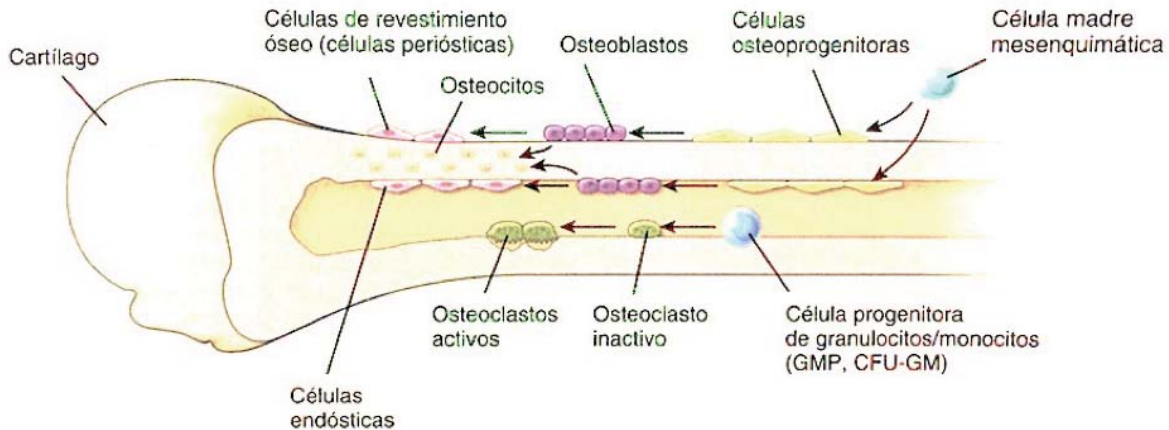


Fig. 2 Representación esquemática de las células asociadas al hueso (Wojciech P. , 2012).

Los osteoblastos sintetizan los componentes proteicos orgánicos de la matriz ósea: colágena tipo I, proteoglicanos y glucoproteínas; son células con forma de huso e incluyen un núcleo oval, Retículo Endoplásmico Rugoso (RER) escaso, aparato de Golgi poco desarrollado y ribosomas libres en abundancia; son células muy activas durante el periodo de crecimiento óseo.

Los osteocitos son células óseas maduras derivadas de los osteoblastos, que quedan atrapadas en lagunas dentro de la matriz ósea calcificada, hay de 20 000 a 30 000 osteocitos por mm^3 de hueso; contienen canalículos, que alojan sus prolongaciones citoplasmáticas y se irradian en todas direcciones, y contienen líquido extracelular por los cuales, llevan nutrientes y metabolitos.

Los osteoclastos son células grandes multinucleadas de progenitores granulocito-macrófago y tienen la función de reabsorción de la matriz ósea durante la remodelación; tienen receptores para el factor estimulante de osteoclastos (M-CSF), factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), osteoprotegerina (OPG) y calcitonina (Cal), entre otros (Garther, 2008).

Organización estructural

El tejido óseo está constituido por osteonas (llamadas también Sistema de Havers), las cuales son las unidades anatómicas y funcionales de este tejido (Fernández T. H., 2006). El hueso cortical o compacto constituye el 80% del tejido óseo y se estructura en conductos de Havers recubiertos de laminillas en disposición concéntrica donde se sitúan los osteocitos. El hueso esponjoso o trabecular constituye el 20% del total del tejido óseo y se estructura en laminillas en forma de red que delimitan cavidades areolares en cuyo interior se encuentra médula ósea (fig. 3) (Sobotta J., 2009).

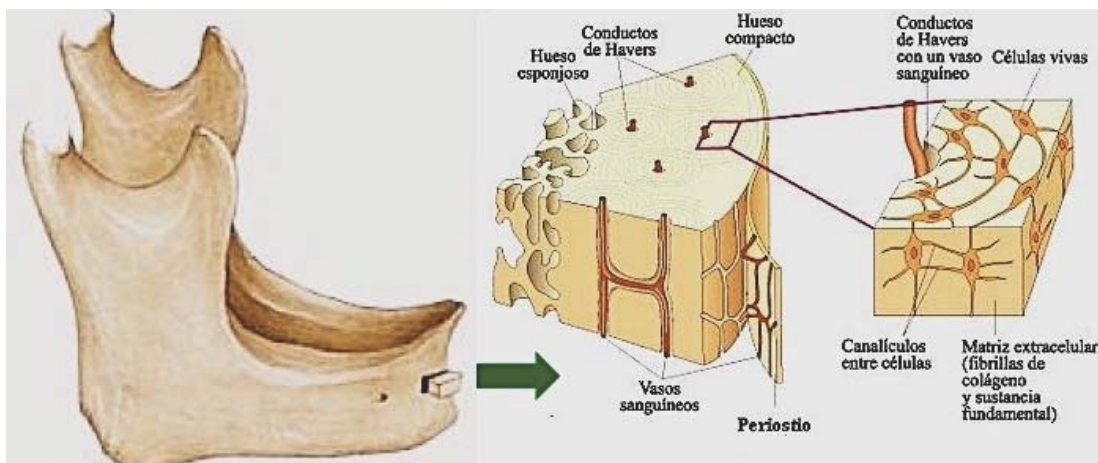


Fig. 3 Esquema de la estructura del hueso mandibular (imagen modificada de <http://biohumana35.blogspot.mx>, 2016).

Embriología ósea

La formación del hueso se clasifica en endocondral e intramembranosa. En la osificación endocondral el hueso se forma a partir de un precursor cartilaginoso. En la osificación intramembranosa las células mesenquimales migran y se acumulan en regiones específicas y se diferencian en células osteoprogenitoras y en osteoblastos que secretan colágeno, sialoproteínas óseas, OC y otras proteínas de la matriz ósea, que posteriormente se calcifica y crece por aposición, las espículas aumentan de tamaño y se unen en una red trabecular que adquiere la configuración general del hueso en desarrollo (Wojciech P. , 2015).

Modelado óseo

Durante la infancia y la juventud los huesos mantienen su forma externa; esto se debe a que, junto con el crecimiento en longitud y tamaño, también tiene lugar un modelado de las superficies externa e interna del hueso; esta alcanza el valor más alto ("masa ósea máxima") alrededor de los 30 años, cuando el esqueleto adquiere su tamaño y su forma definitivos.

La principal característica del modelado se debe a que la formación y reabsorción de tejido óseo son independientes; existe un crecimiento por depósito de tejido óseo en la cara externa (denominado aposición perióstica) y al mismo tiempo, los osteoclastos reabsorben tejido óseo en la superficie interna de la diáfisis, pero con menor velocidad que el depósito en la cara externa. El resultado es que el espesor de la pared de la diáfisis se incrementa en paralelo con el diámetro de la diáfisis y la cavidad medular (Geneser, 2000).

Remodelación ósea

El hueso es un tejido en constante remodelación mediante la reabsorción y aposición de tejido, que permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfo-cálcico. Este fenómeno equilibrado denominado proceso de remodelado permite la renovación de un 5% del hueso cortical y un 20 % del trabecular al año (Fernández T. A., 2006).

El remodelado comprende el reemplazo del tejido óseo ya formado por tejido nuevo, los osteoblastos y los osteoclastos trabajan en conjunto como una unidad denominada unidad de remodelado óseo. Comienza cuando un grupo de pre-osteoclastos se diferencia a osteoclastos que luego forman un cono de corte que se desplaza por el hueso con un diámetro correspondiente al de la osteona. Posteriormente, tiene lugar el crecimiento interno de vasos sanguíneos y alrededor de ellos se forman capas de tejido óseo laminillar, que gradualmente se rellena y da lugar a la formación de una nueva osteona cortical. Por último, los osteoblastos se transforman en células de revestimiento óseo, que tapizan el conducto de Havers (Geneser, 2000).

El remodelado óseo es realizado por los osteoclastos que reabsorben hueso y osteoblastos que forman el mismo, este proceso ocurre en cinco fases: 1) **activación** mediante la detección de una señal iniciadora por un daño o bien por una señal endocrina; 2) **resorción** que promueve la formación y activación de osteoclastos; 3) **reversión** en el cual las células reversas de fenotipo desconocido

remueven la matriz mineralizada de la superficie ósea, estimulando el proceso de formación ósea; 4) **formación** con las señales producidas por la matriz degradada; y 5) **terminación** que es la conclusión del ciclo y ocurre cuando se ha reemplazado la misma cantidad de hueso que se ha reabsorbido (Fig.4) (Dennis, 2016).

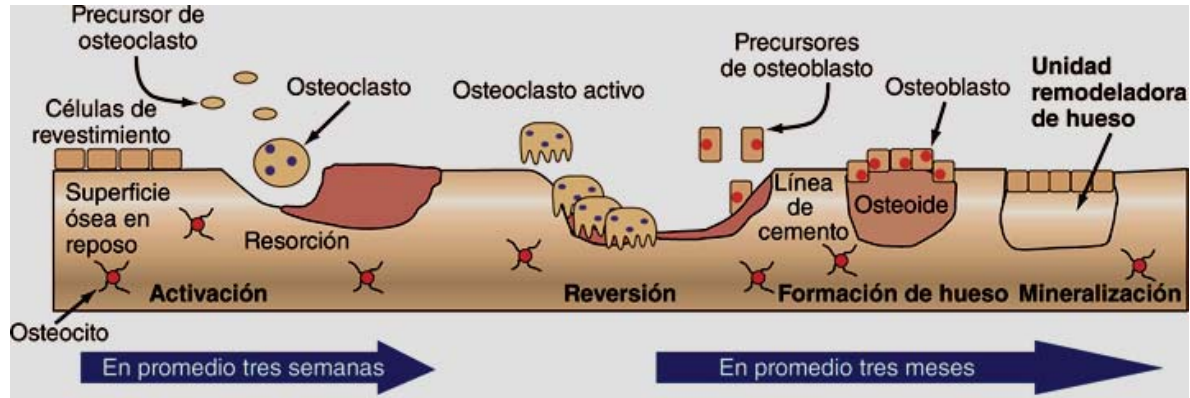


Fig. 4. Esquema representativo del remodelado óseo (Dennis, 2016).

La frecuencia con la que determinada zona ósea sufre remodelado se denomina frecuencia de activación. Ésta es afectada por factores locales tales como citocinas y factores de crecimiento secretados, y por cargas mecánicas del tejido óseo, pero también por hormonas circulantes, en especial las tiroideas, la hormona paratiroidea y las sexuales (Wojciech P. , 2012). El hueso cortical o compacto se remodela y tiene funciones metabólicas más lentas que el hueso trabecular, así como una participación discreta en el intercambio de sales de calcio al espacio extracelular intersticial, sus funciones primordiales son protección y soporte (Wojciech P. , 2012).

Tomografía computacional

El término tomografía computacional es una técnica para generar imágenes 3D, que se obtiene mediante mediciones de la atenuación de un haz de rayos X que pasa desde distintos ángulos por un sujeto de estudio, alrededor de éste; estas imágenes son el producto del procesamiento del conjunto de mediciones mediante un algoritmo computacional (Bushberg J. T., 2012).

Por medio del algoritmo de reconstrucción es posible obtener información tridimensional, a partir de proyecciones bidimensionales de un mismo objeto, variando el ángulo de incidencia del haz de rayos X y detectando su transmisión del lado opuesto de la fuente de rayos X.

La CT permite:

- Realizar una medición 3D directa de la morfología trabecular, tales como: el grosor y la separación trabecular.
- Realizar mediciones con un rendimiento rápido usando muestras de hueso sin descalcificar.
- Realizar una evaluación de la morfología ósea por exploración no destructiva.

Micro-CT (Sistema Albira)

Este sistema de CT está compuesto por un tubo generador de rayos X y un detector bidimensional, colimador y filtros como se puede apreciar a continuación (Fig. 6). Los fotones de rayos X que pasan a través del objeto/muestra son registrados por la placa detectora, obteniendo datos de la variación de la radiación transmitidas y atenuada al interactuar con los tejidos. Mediante modelos estereológicos es posible obtener una representación en 3D del objeto/muestra que caracteriza la distribución espacial de la densidad del material (Bouxsein, 2010).

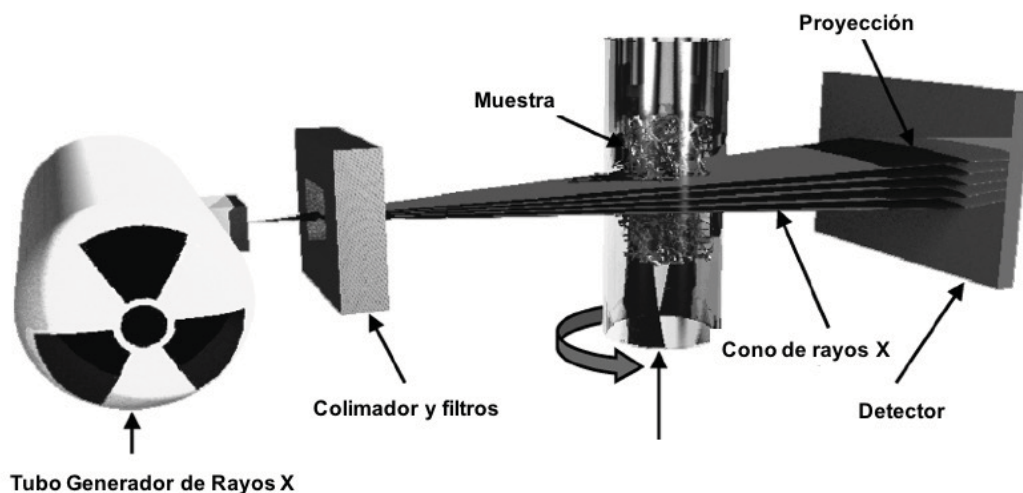


Fig. 5. Componentes clave y principio fundamental para el funcionamiento del escáner micro-CT. Imagen modificada de (Bouxsein, 2010).

Un sistema trimodal de adquisición de imagen (Fig. 7) está conformado por tres unidades de adquisición tomográfica: PET (Tomografía por emisión de positrones), SPECT (Tomografía por emisión de fotón único), y CT (Tomografía computarizada) todos ellos, son utilizados para la obtención de imágenes de pequeñas especies en investigaciones científicas.



Fig. 7 Esquema del interior del sistema trimodal Albira Suite con sus respectivas modalidades (PET/SPECT/CT)(Oncovisión, España).

El sistema Albira permite la obtención de imágenes tridimensionales y cuantificar la concentración de HA. Los parámetros esenciales para la adquisición de una imagen con ésta técnica son los siguientes: voltaje, corriente y número de proyecciones.

El **voltaje** se refiere a la diferencia de potencial inducida en los extremos del tubo generador de rayos X; los electrones son acelerados obteniendo gran energía y al impactarse con un blanco (generalmente de Tungsteno) en el otro extremo del tubo éstos serán frenados produciendo rayos X. La **corriente** se produce por el movimiento de los electrones y, por lo tanto, a mayor corriente mayor será el número de fotones producidos. En cuanto a las **proyecciones**, esto se refiere a la cantidad de ángulos o tomas a los que se le hará incidir la radiación sobre la muestra/objeto de estudio mientras el tubo generador de rayos X y la placa detectora giran para completar un campo de 360° (Gómez, 2015) (Bushberg J. T., 2012).

Según “Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomograph” se recomienda: aumentar el número de proyecciones con la finalidad de obtener una mejor resolución espacial y con respecto a la corriente es mejor a baja energía y alto voltaje para lograr la capacidad de diferenciar hueso (Bouxsein, 2010).

Cada imagen tomográfica que se obtienen de una CT está compuesta por cortes formados por una malla rectangular llamados pixeles que por definición, **pixel** es la unidad básica de una imagen digitalizada en una escala de grises, cada uno de los cuales concierne a un elemento de volumen llamado **voxel**, este tiene asociado un valor numérico que representa alguna información relacionada con esa ubicación (Bouxsein, 2010).

CAPÍTULO 2

Justificación

La pérdida ósea del área maxilofacial es un problema para la salud, ya que afecta a las funciones de la maxila y la mandíbula: la masticación, fonación, deglución y estética, principalmente. Esta pérdida ósea, se debe fundamentalmente, a la presencia de traumatismos o patologías. Actualmente existen terapias innovadoras para la regeneración ósea, sin embargo, antes de ser usadas en pacientes deben ser evaluadas en modelos preclínicos *in vivo* con el objetivo de ofrecer: seguridad, efectividad, practicidad, reproducibilidad y funcionamiento.

Es por ello que en la presente tesis se propuso evaluar dos modelos de defectos óseos en la cortical mandibular, para establecer cuál de ellos puede ser útil en la evaluación de diferentes aplicaciones de la regeneración ósea en esta área.

La evaluación de estos modelos se realizó por medio de micro-CT, que proporcionan imágenes 3D de alta resolución consiguiendo evaluar la morfología, cantidad y calidad ósea; y a través de un análisis de concentración de HA se logró discernir cuál de los dos modelos permitiría ser una herramienta estándar más útil para evaluar la regeneración ósea.

Antecedentes

Tradicionalmente cuando se trata de regeneración ósea en el área de la mandíbula los modelos más empleados son defectos denominados como transóseos, que se realizan en el área de la rama mandibular de forma circular de 5 mm de diámetro, el cual atraviesa la cortical de la rama mandibular evaluándose en tiempos promedio de 8 semanas; Chin y cols (Chin V.K., 2013); Schliephake y cols en 2008 (Schliephake H., 2008); Fan y cols 2014 (Fan J., 2014); Kolk y cols en 2016 (Kolk A., 2016); Requicha y cols en 2014 (Requicha, 2014); Kowalczewski C. J. y cols en 2014 (Kowalczewski J. C., 2014), son algunos de los investigadores que han empleado este tipo de modelo.

Chin y cols, también probaron a realizar un defecto de 2 mm de diámetro y determinaron que este último fue suficiente para considerarse como defecto de tamaño crítico en ratas machos (Chin V.K., 2013). Por su parte, Schliephake y cols realizaron un defecto mandibular al cual denominaron como grupo control con un defecto relleno solo por una membrana de PLA y después de 6 semanas observaron regeneración ósea en este grupo (Schliephake H., 2008).

Múltiples estudios reflejan la gran utilidad de utilizar imágenes tridimensionales mediante microCT para la evaluación de la cantidad, calidad y microarquitectura en defectos óseos; por ejemplo, DeConde y cols en 2014 (DeConde A.S., 2014) realizaron una investigación en un modelo de mandibulectomía segmental en ratas con el objetivo de establecer el tamaño de un defecto crítico en un segmento en donde no se logró que el hueso regenerara espontáneamente. Para ello, utilizaron 29 ratas macho Sprague-Dawley de 4 meses de edad, que dividieron en 4 grupos (n=7) según el tamaño de la segmentación de la mandíbula: Grupo 1: 0 mm; Grupo 2: 1 mm; Grupo 3: 3 mm y Grupo 4: 5 mm, todas fueron fijadas con 1 mm de microplacas, con un tiempo de estudio de 12 semanas. Obteniendo como resultados, que ningún defecto de 5 mm desarrolló con éxito unión ósea, mientras que todos los defectos de 0 y 1 mm mostraron un crecimiento óseo continuo. Concluyendo que el modelo segmentario de rata de 5 mm no puede regenerar por sí mismo, por ello, DeConde y cols definieron un defecto de tamaño crítico mandibular como: “aquel defecto que no llegan a su completa regeneración durante todo el periodo de vida del animal”.

En la presente tesis nos propusimos evaluar dos modelos, éstos se realizaron y ubicaron predominantemente en la cortical mandibular externa por debajo de la línea oblicua; uno posterior y otro anterior hacia el área del incisivo, éste modelo es

de tipo cavitario; el cual fue propuesto previamente por Trejo y cols, en 2010 (Trejo, 2010) y modificado por Ramírez y cols en 2015 (Ramírez, 2015). Eligiendo esta ubicación debido a que éste es un hueso que presenta características de regeneración deficiente y carencia vascularización en comparación con la maxila.

Hipótesis

El modelo de defecto crítico realizado en la zona posterior de la cortical mandibular, es un modelo animal apto para su empleo en estudios de regeneración ósea.

Objetivos

General

Evaluar dos modelos de defecto en la cortical mandibular de rata Wistar mediante la técnica de microtomografía computarizada.

Específicos

- ❖ Comparar dos tipos de defecto en la cortical mandibular, uno anterior y otro posterior.
- ❖ Comparar ambos modelos de defecto (anterior y posterior) entre machos vs hembras.
- ❖ Calcular la densidad mineral ósea en la zona del defecto en comparación con tejido adyacente sano en todos los grupos de estudio.

CAPÍTULO 3

Materiales y métodos

Los procesos quirúrgicos fueron realizados en el Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz ubicado dentro de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) Almaraz, así como en la unidad de aislamiento y Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Mientras que, los estudios tomográficos y obtención de imágenes tridimensionales fueron realizados en el Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular del Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

Para este estudio todos los procedimientos, manipulación y cuidado de los especímenes, se apegaron a la Norma Oficial Mexicana “NOM-062-ZOO-1999” sobre manejo de animales de laboratorio con respecto a especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los mismos, así como los estándares establecidos y avalados por la Comisión de ética de la FES Iztacala, UNAM bajo el folio 1074 (Anexo 3). Durante el periodo de experimentación, los especímenes se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y en el Bioterio del Posgrado de la Facultad de Odontología a una temperatura que osciló entre 21°-27° C, con humedad relativa de 45%-55% y un fotoperiodo de 12/12 h con acceso *ad libitum* de agua y alimento; siendo monitoreados cada tercer día con la finalidad de supervisar la cicatrización y comportamiento.

Los procedimientos de los desechos de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI) como eutanasia, aserrín de camas de los especímenes, suturas, hojas de bisturí y demás desechos, se manejaron cuidadosamente y apegado a la norma sobre el manejo de residuos biológicos Norma Oficial Mexicana “NOM-087-ECOL-1995”, el manejo de residuos se realizó de acuerdo a la “Guía técnica”, de la Comisión de Bioseguridad de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM bajo el aval del número de folio 036 (Anexo 4).

Los materiales, instrumental y marcas de los mismos se describen de manera detallada en el Anexo 1, el material fungible y la lista descriptiva de: reactivos químicos, fármacos y equipos utilizados se puede consultar el Anexo 2.

Diseño del estudio

Se emplearon un total de 11 ratas de la cepa *Wistar*; con un peso que osciló entre los 250-300 gr, machos (n=5) y hembras (n=6); que se organizaron en 4 grupos: DAM defecto anterior en machos (5 defectos); DPM defecto posterior en machos (5 defectos); DAH defecto anterior en hembras (6 defectos), y DPH defecto posterior en hembras (6 defectos).

Diseño quirúrgico del defecto mandibular

Todas las intervenciones quirúrgicas se realizaron en el Bioterio de la FESC, en condiciones de asepsia, en una sala de cirugía y se utilizaron campos y material quirúrgico estéril (fig. 7).

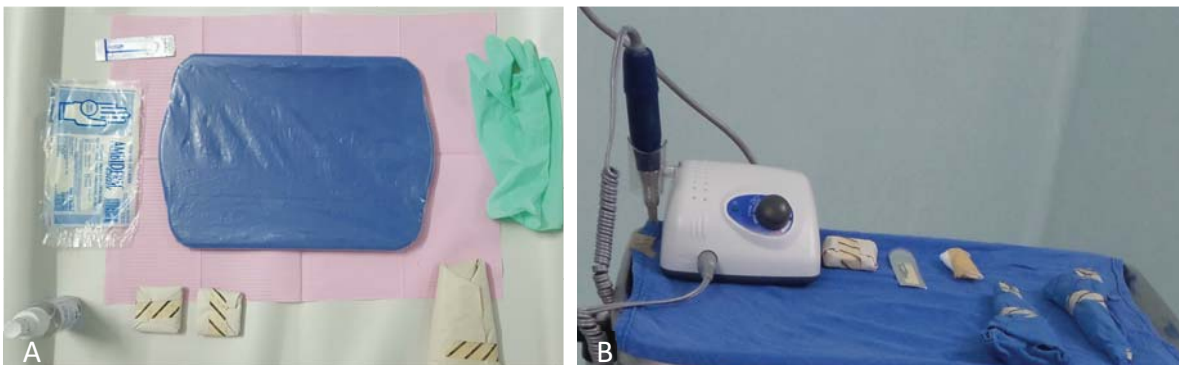


Fig. 7. Área de cirugía en condiciones óptimas de asepsia.

Los especímenes fueron pesados en una balanza granataria y anestesiados vía intraperitoneal con un coctel de anestésico general: ANESKET® (Clorhidrato de Ketamina, 60mg/kg de peso) y un relajante muscular PROCIN® (Xilazina, 7mg/kg de peso).

El área quirúrgica fue rasurada y se despejaron las vías aéreas superiores. Se sujetaron las extremidades en una base de plástico en forma de camilla y sobre el espécimen se añadió un campo hendido estéril y se realizó asepsia en la zona quirúrgica con antiséptico.

Cuando los especímenes estuvieron preparados se comenzó el acto quirúrgico con una incisión extraoral nítida y de una sola intención de aproximadamente 1.5 cm de longitud, sobre el borde mandibular involucrando la dermis. Con unas pinzas de mosco curvas se realizó disección roma del periostio, exponiendo la superficie vestibular de la cortical mandibular. Para realizar el defecto anterior: en el lado derecho de la mandíbula, se localizó el foramen mentoniano, anterior a los molares y posterior al incisivo; como referencia, estos defectos fueron en los dos grupos: Defecto Anterior Machos (DAM) y Defecto Anterior Hembras (DAH). Para realizar el defecto posterior: en el lado izquierdo de la mandíbula, se tomó como referencia la línea oblicua externa donde se inserta el músculo masetero y se realizó el defecto justo por debajo de ésta y ligeramente inclinado; estos defectos fueron de los grupos: Defecto Posterior Machos (DPM) y Defecto Posterior Hembras (DPH).

Ambos modelos de defecto se realizaron con una fresa quirúrgica de carburo en forma de bola del número ½ y un micromotor Strong 210 de baja velocidad a una potencia de 1000 rpm, con irrigación constante con solución fisiológica estéril para evitar necrosis del hueso debido al calentamiento por fricción. Para corroborar una correcta posición y medición de los defectos se utilizó una guía quirúrgica confeccionada con acetato como se muestra en la Fig. 8 C y se midió con una sonda periodontal milimetrada. Las dimensiones del defecto fueron: 4 mm de largo por 3 mm de ancho y aproximadamente 1 mm de profundidad sin tocar las raíces dentales. Concluido este tiempo quirúrgico, se suturó por planos con Ethicon Vicryl 3-0 (Johnson&Johnson) estéril reabsorbible de ácido poliglicólico para el musculo y para la unión de la dermis se ocupó sutura Ethicon Seda 3-0 (Johnson&Johnson) (Fig. 8).

Al finalizar las cirugías, los especímenes fueron medicados con antibiótico: Pentrexil® (Ampicilina, 10mg/Kg) durante 5 días post-cirugía y, en pro de evitar el sufrimiento innecesario de los especímenes, y de acuerdo nuevamente, con los estándares de ética, los especímenes fueron tratados con analgésico: Pisadol® (Tramadol 5mg/Kg) durante 3 días, ambos medicamentos fueron aplicados cada 24 horas vía intramuscular; para evitar algún tipo de infección y ésta pudiera interferir en los resultados obtenidos en este estudio, es por ello que una vez identificada la presencia de infección generalizada, el animal en cuestión no solo fue excluido del estudio, sino que además fue inmediatamente sacrificado. Se mantuvieron monitoreados todos los días, hasta su sacrificio de acuerdo con los tiempos de estudio establecidos

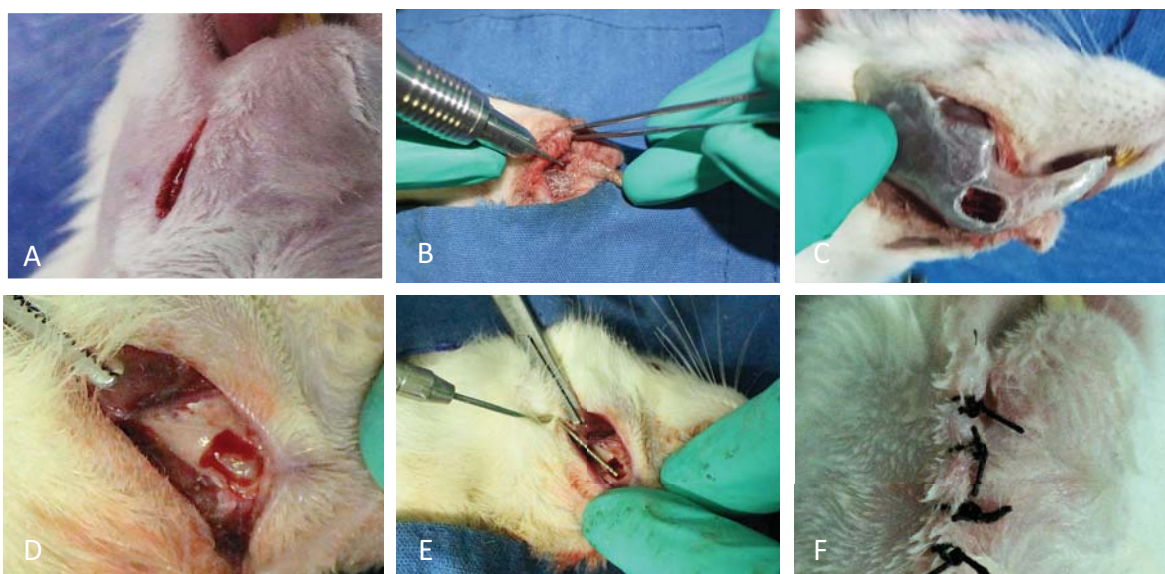


Fig. 8. Fotografías del diseño quirúrgico donde se puede observar: A) Zona de la incisión; B) Confección de defecto óseo con la fresa quirúrgica; C) Férula quirúrgica posicionada como guía para la confección del defecto; D) Defecto en la cortical mandibular; E). Verificación de las medidas (4 x 3 x 1 mm) del defecto con la sonda periodontal; F) Re-aposición de tejidos y sutura.

Evaluación tomográfica

Pasados siete días de la cirugía, los especímenes se trasladaron al INCAn para la toma de imágenes con la unidad de micro-CT del sistema Albira. Las imágenes se obtuvieron a diferentes tiempos de estudio: 7, 14, 21, 30, 45 y 60 días; con el objetivo de evaluar el porcentaje del área del defecto y la concentración de Hidroxiapatita [HA]. Se hace hincapié en la situación de que todos los análisis de micro CT se realizaron en el mismo individuo (ratas vivas), con la finalidad de disminuir la variabilidad biológica.

Adquisición y reconstrucción de imágenes

Para la toma de las imágenes, los animales fueron anestesiados con un equipo de anestesia inhalada con isoflurano, Lisorane®1, (3% Isoflurano/oxígeno)(Fig. 9).



Fig. 9. Imágenes del sistema de anestesia inhalada del sistema Albira.

Una vez sedados, los especímenes se llevaron a la cama de sujeción para evitar el movimiento durante la toma (Fig. 10). Se realizó la adquisición de las imágenes con los parámetros: voltaje de 35 kV y 0.4 mA con un tamaño de voxel de 35 μm y en calidad de alta resolución (HR), cada estudio HR proporciona información obtenida de 1000 proyecciones. El tiempo de adquisición por cada defecto tuvo una duración de 30 a 40 minutos aproximadamente.



Fig. 10. Micro-CT con espécimen en camilla para la toma de imágenes.

Las imágenes se reconstruyeron utilizando el software de Albira (Albira suite reconstructor®) que dio como resultado una matriz de 558 x 558 x 516 con una resolución de 125 μm ; este sistema específico de microCT puede escanear 516 cortes.

Imágenes 3D

El software OsiriX MD (Pixmeo Sarl, 2016) se utilizó en el procesamiento y la visualización de imágenes 2D y 3D (Fig. 11). Para evaluar la regeneración ósea, se dibujó manualmente una región de interés (ROI) (Fig. 12) alrededor de la periferia del defecto en cada imagen de cada rata para determinar el área del defecto dependiendo de la cantidad de regeneración ósea. Los valores se normalizaron frente al área de defectos medida al día 7 para calcular el porcentaje de regeneración (% de área).



Fig. 11. Imagen tridimensional, ejemplo del DPH a los 7 días, obtenida por medio del software OsiriX

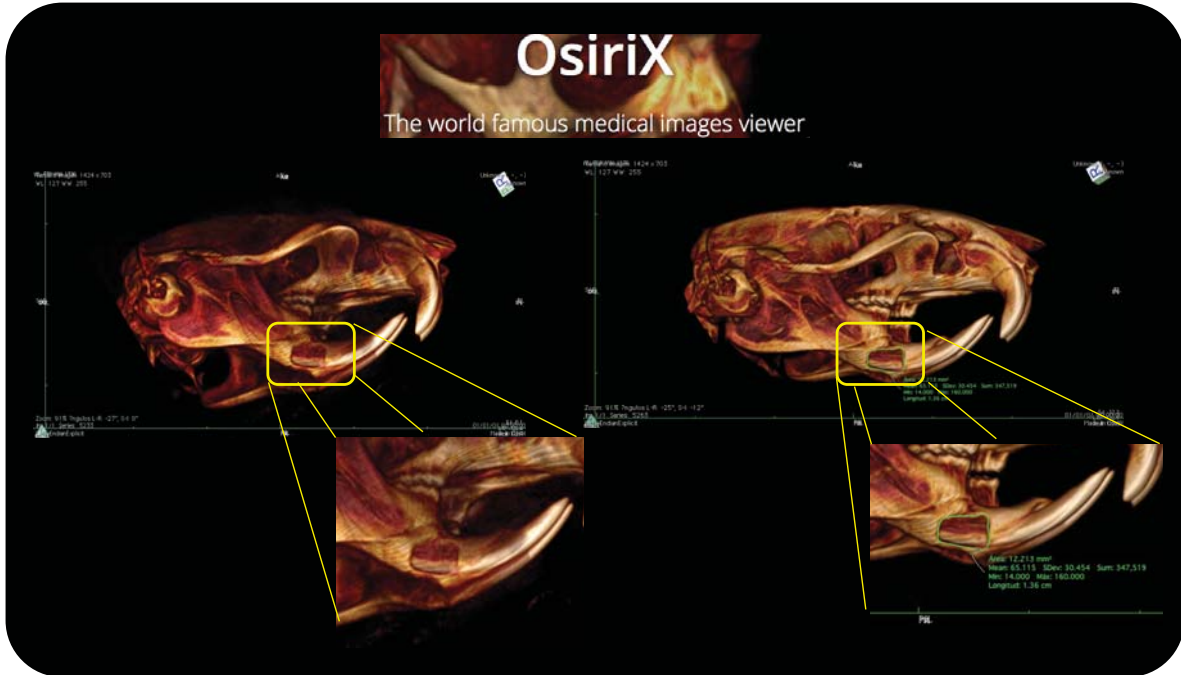


Fig. 12. Imágenes de la ubicación el defecto y medida del área de la zona del defecto, ejemplo obtenido del DAM a los 7 días post-cirugía.

Construcción de regiones de interés (ROI)

Se analizaron las imágenes con el software PMOD (PMOD Technologies Ltd, Zurich, Suiza) para lograr relacionar los valores de las unidades CT a un valor de concentración de HA, dada por el software PMOD, se tomó como antecedente un estudio previo realizado en el Laboratorio de Física Médica del INCa en 2017, donde utilizaron un cuerpo de calibración con concentraciones de HA conocidas y evaluadas a los diferentes parámetros de corriente y voltaje del sistema de CT con base en el artículo de Todd A. Y cols. (2012) (Todd A. Sasser, 2012).

Con el objetivo de calcular la [HA] a los 60 días se seleccionaron de manera manual 3 regiones de interés (ROI) en el día 60: ROI A, tejido sano (TS) de la región de la línea oblicua externa, tomándose como control; ROI B seleccionado de la zona remanente del defecto anterior para ambos grupos (machos y hembras) y ROI C seleccionado de la zona remanente del defecto posterior para ambos grupos (machos y hembras) (Fig. 13).

ROI A (Fig.13A) se obtuvo de la protuberancia de la línea oblicua externa, donde no se realizó ninguna intervención; con medidas de 0.5 x 0.5 mm, propagado 4 rebanas. Las ROI B (Fig.13B) y C (Fig.13C) se seleccionaron en la zona del defecto

remanente con diferentes medidas para cada una, puesto que dependía de cómo había regenerado el defecto en cada espécimen; se propagaron 4 veces, sin tocar la estructura de los dientes. Se obtuvieron los datos del promedio de las unidades CT para los tres ROI's y se registraron.

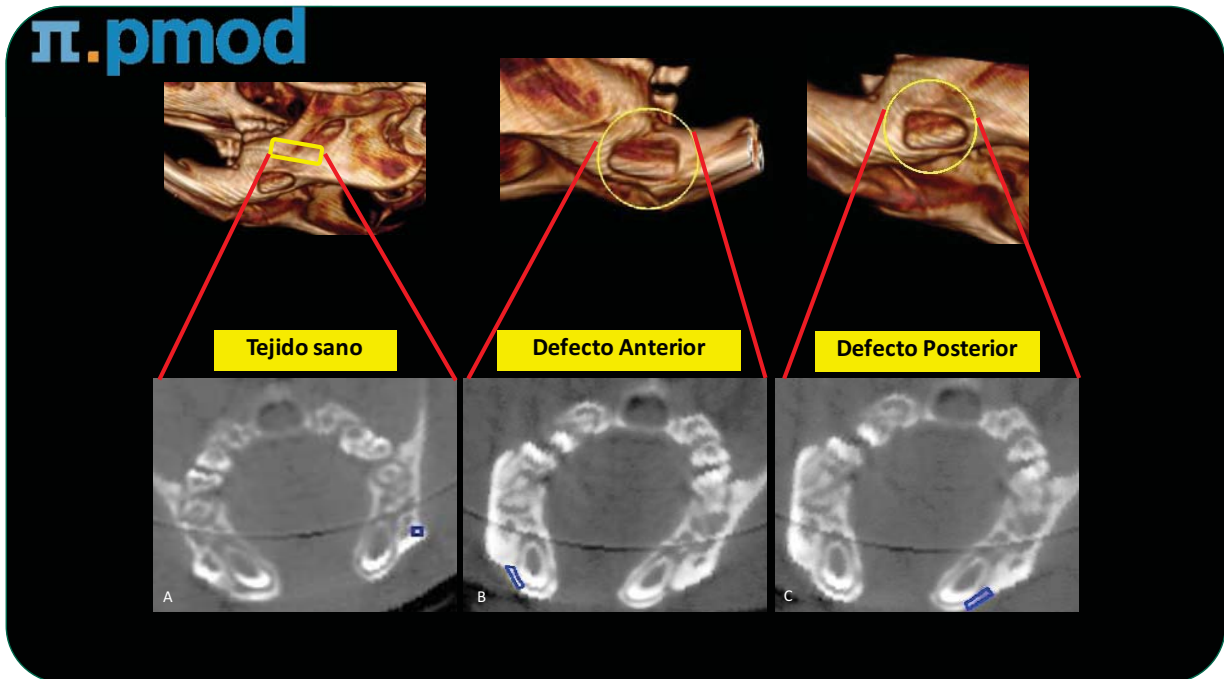


Fig. 13. Selección de ROI a los 60 días. A). ROI A, de la zona de tejido adyacente sano; B) ROI B, de la zona del defecto anterior; y C) ROI C, de la zona del defecto posterior. Ejemplo de DAM a los 60 días.

Evaluación clínica

Al término de los tiempos de estudio (60 días) se evaluó la mortalidad y morbilidad de todos los especímenes. Se realizó el registro con evidencia descriptiva y fotográfica de la observación clínica del área intervenida.

Al término del estudio todos los especímenes fueron sacrificados por sobreexposición a CO₂. Se obtuvieron las muestras de las mandíbulas y se evaluaron los cambios macroscópicos en la conformación del defecto por medio de observación y de fotografías.

Para el estudio histológico, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4%, con un pH de 7.4 durante 24 horas y se realizó su descalcificación con Osteosoft®

durante 3 semanas con un seguimiento radiográfico para su posterior procesamiento histológico (estos resultados se omiten en la presente tesis).

Análisis estadístico

Todos los resultados se presentan como valores promedio representadas en gráficas de cajas y bigotes. Las diferencias intergrupales se evaluaron mediante ANOVA y la prueba post hoc de BONFERRONI. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS V.20. Para todas las pruebas se tomó un nivel de significancia de $p < 0.05$

CAPÍTULO 4

Resultados

Hallazgos clínicos

Los 11 especímenes fueron monitoreados durante al menos 15 días previos a la cirugía, durante la cirugía, postcirugía y todo el tiempo que duró el estudio. Durante las observaciones, no se presentaron complicaciones. Uno de los especímenes murió en el día 30 después de la cirugía, por la presencia de infección local, por lo que se retiró del estudio, no relacionándose dicho suceso con la capacidad de sobrevivencia de los especímenes luego de la cirugía, sino con un hecho puntual de organización.

No se presentó ninguna disfunción masticatoria, ni de otro tipo; todos los especímenes se alimentaron habitualmente, hecho que se observó también con el control de peso que se observó estable y con un aumento acorde a su tamaño y edad. La morbilidad fue del 0%.

Desde el momento de la cirugía y hasta el día 7, todos los especímenes presentaron inflamación de leve a moderada en la zona de intervención quirúrgica. A los 14 días post-cirugía la mitad de los especímenes (machos y hembras) presentaron una buena cicatrización de más del 30% de la longitud cutánea, mientras que la otra mitad de los especímenes presentaron un cierre completo de la herida cutánea. A los 21 días las heridas apenas eran perceptibles, sin evidencia de inflamación y/o infección. A los 60 días post-cirugía se observó una correcta cicatrización cutánea de los tejidos intervenidos, obsérvese en la Figura 14.

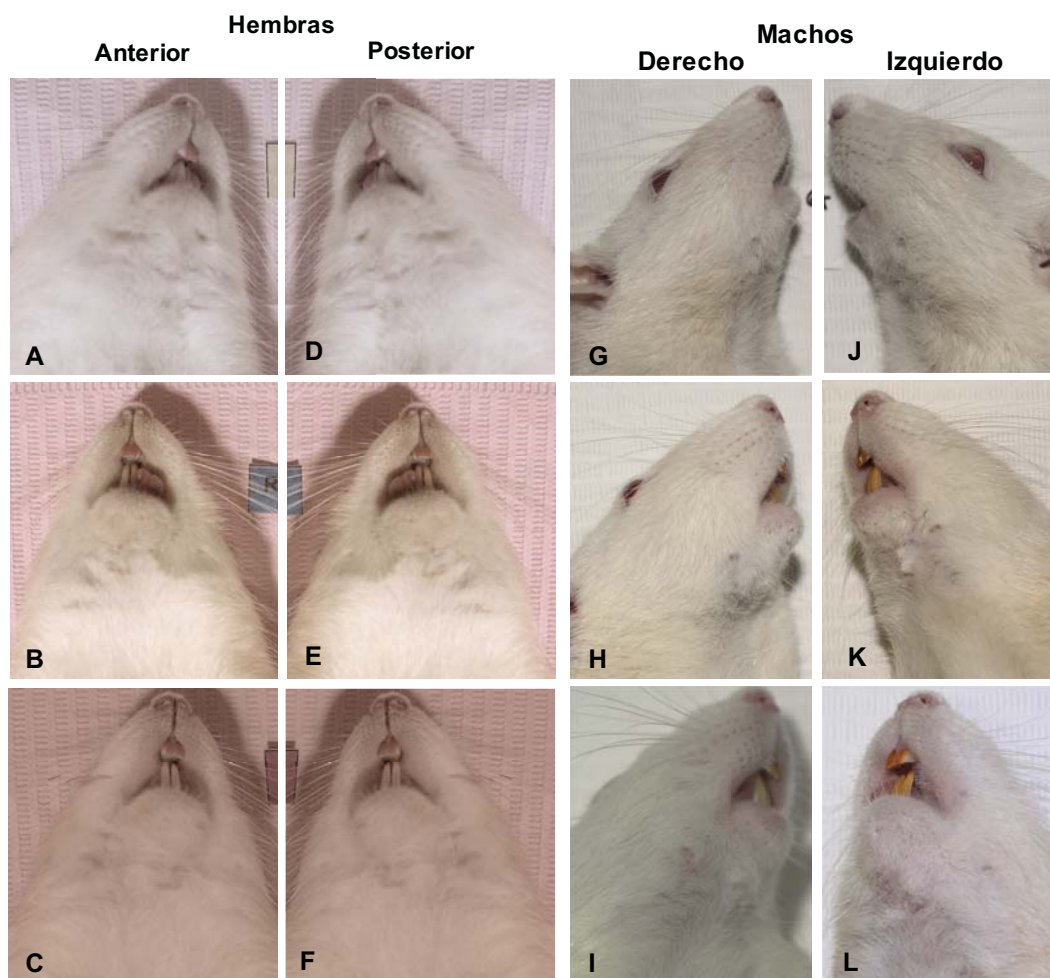


Fig. 14. Fotografías representativas de la evaluación clínica de los especímenes a los 60 días. A, B y C fotografías clínicas del grupo DAH; D, E y F fotografías clínicas del grupo DPH; G, H, I fotografías clínicas correspondientes al grupo DAM; finalmente J, K y L fotografías clínicas del grupo DPM. En todas las fotografías se observa en las que se observa cicatrización cutánea completa.

Análisis de imágenes tomográficas

El análisis de micro-CT se realizó en los diferentes tiempos experimentales con los individuos vivos, esto con la finalidad de mantener un registro de la cronología de la cicatrización del defecto de cada sujeto de estudio y evitar la variabilidad biológica.

Las imágenes tridimensionales revelaron datos complementarios a los hallazgos clínicos observados, confirmando que, en el día 60 ninguno de los dos modelos (en ninguno de los grupos de estudio) presentó una regeneración total del defecto. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos de machos y hembras.

De manera general, se observó que a los 7 días los grupos con defectos anteriores (DAH y DAM) y posteriores (DPH y DPM) no se encontraron bien definidos. Al día 14 se observó algo de tejido de nueva formación en todos los grupos de estudio. Al día 21 se observó tejido nuevo que se asemeja en estructura al tejido óseo desde la periferia hacia el centro, cabe mencionar que nunca se observó formación de tejido nuevo en la parte central del defecto. En el día 30 aún era visible la presencia del defecto, pero de menor tamaño. En la observación a los días 45 y 60, en los grupos de las hembras DAH y DPH los defectos aún eran visibles, aunque presentó una disminución de las dimensiones en casi un 85% (Figuras 15 y 16). En los grupos de los machos DAM y DPM se observó a los 45 y 60 días un cierre del 80 % del defecto, pero todavía era visible la lesión a los 60 días (Figuras 15 y 16).

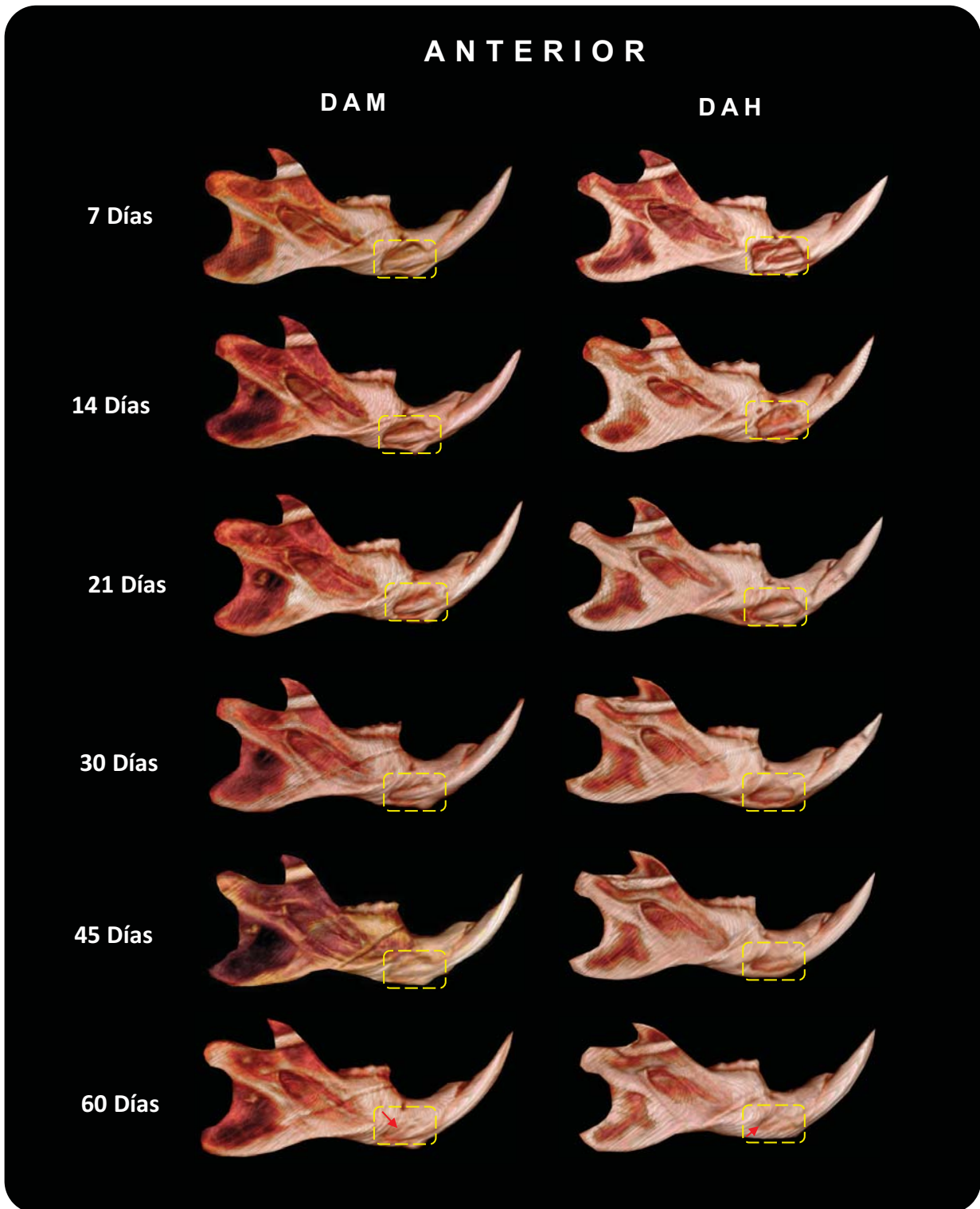


Fig. 15. Imágenes tridimensionales cronológicas representativas a los diferentes tiempos experimentales (7,14, 21, 30, 45 y 60 días). Las líneas punteadas en amarillo señalan la localización del defecto óseo y las flechas rojas indican la zona y remante del defecto óseo.

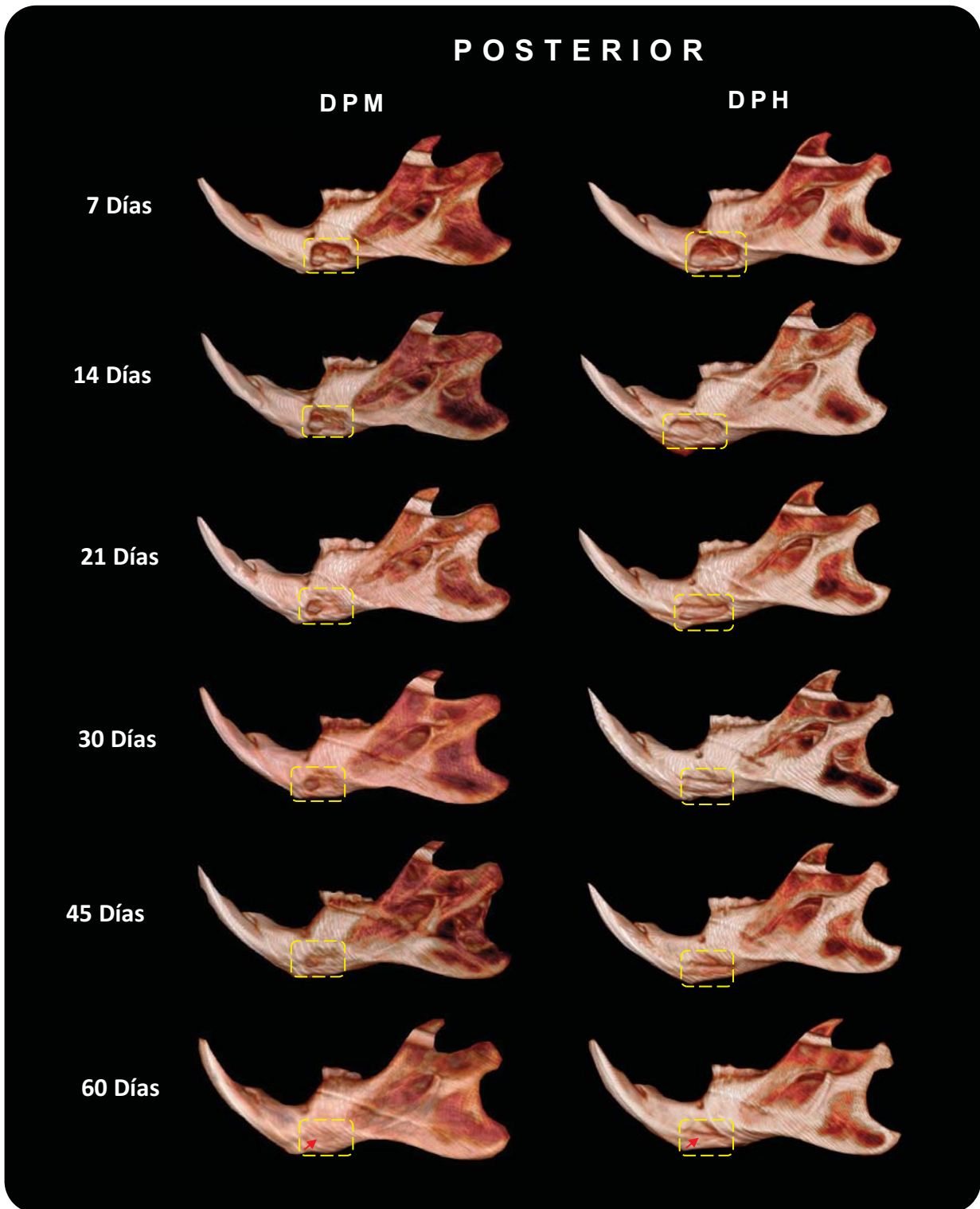


Fig. 20. Imágenes tridimensionales cronológicas representativas a los diferentes tiempos experimentales (7,14, 21, 30, 45 y 60 días). Las líneas punteadas en amarillo señalan la localización del defecto óseo y las flechas rojas indican la zona y remante del defecto óseo.

Hallazgos clínicos *Postmortem*

En cuanto a los hallazgos clínicos *postmortem*, después de la necropsia, a los 60 días; de manera general, se puede decir que no se presentó regeneración y/o relleno total del defecto. En el caso específico de los grupos de hembras (DAH y DPH) se observó que en la zona donde se realizó el defecto había tejido continuo, de consistencia blanda al tacto; pero en ninguno de los especímenes se observó una total reparación, ya que se pudo apreciar una huella remanente del defecto realizado. En el grupo DPH los defectos fueron visualmente mayores. En la evaluación macroscópica, el grupo DPH tuvo un índice de regeneración menor en comparación con el grupo DAH (Figura 17).

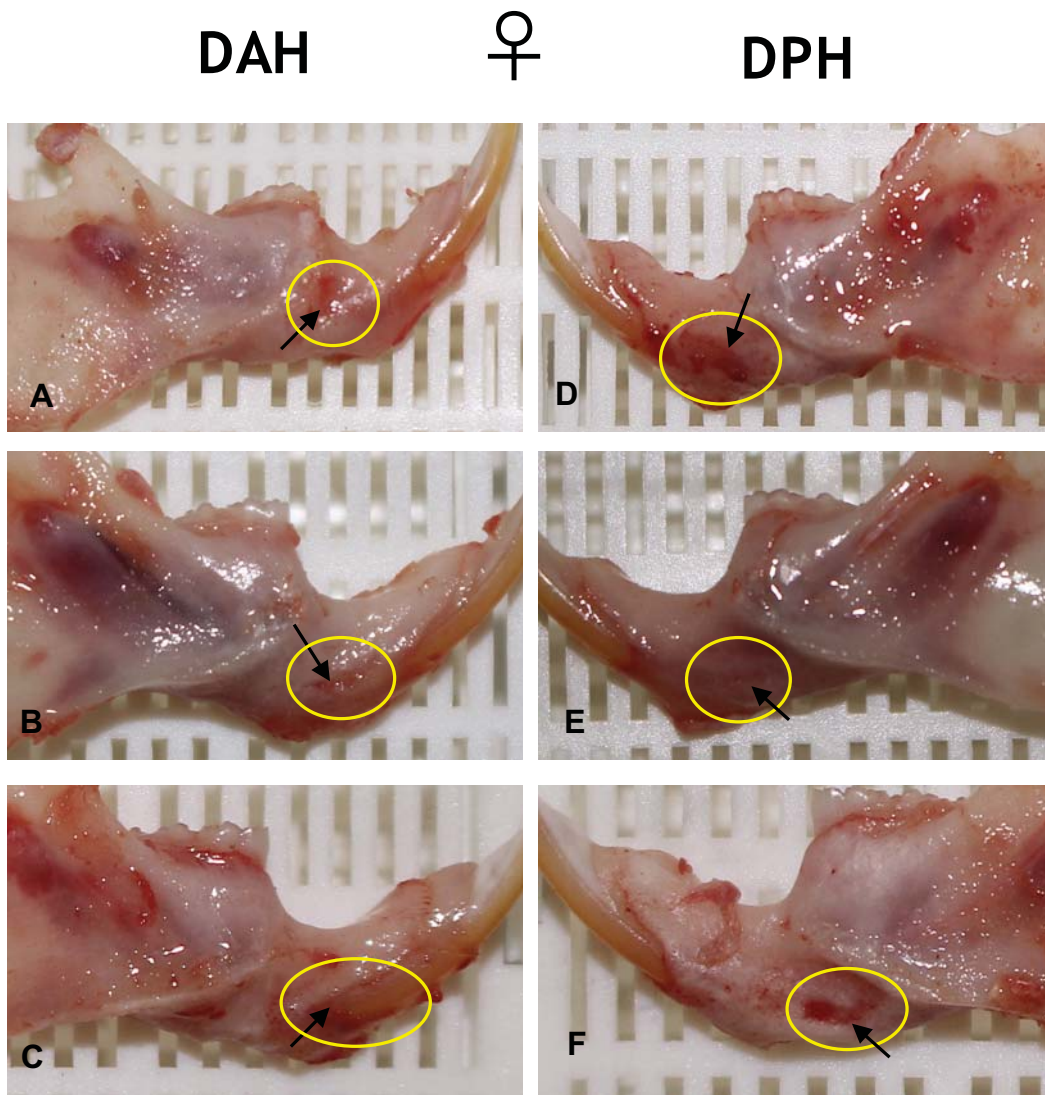


Fig. 17. Fotografías representativas de la evaluación *postmortem*. A, B y C muestran los defectos del grupo DAH. D, E, F muestran los defectos del grupo DPH.

En los grupos de machos (DAM y DPM) no se observaron diferencias en la zona donde se realizó el defecto. Se observó tejido dentro del defecto, pero en este no regeneró la totalidad de los defectos (Figura 18).

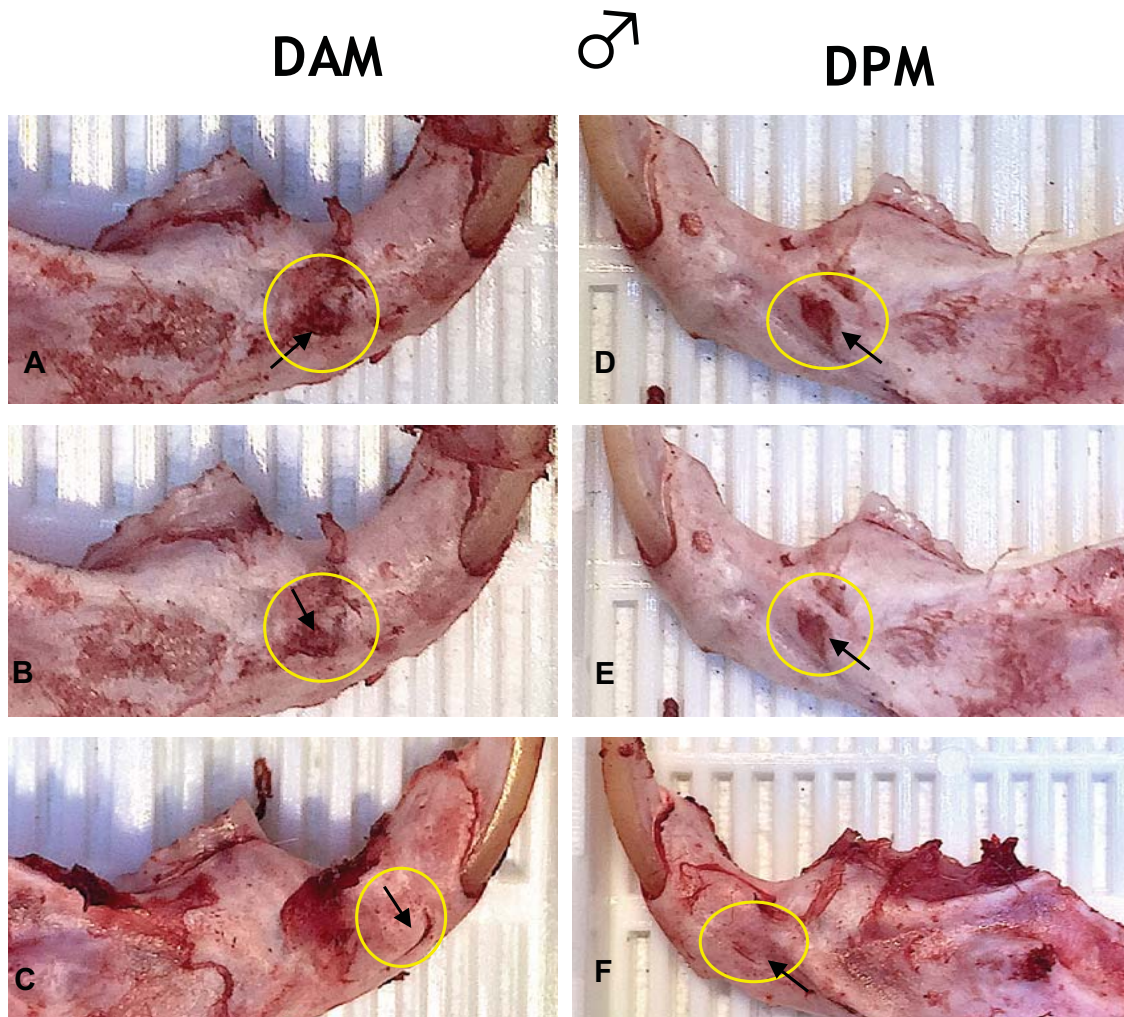


Fig. 18 Fotografías representativas de la evaluación *postmortem*; A, B y C muestran los defectos del grupo DAM. D, E y F muestran los defectos del grupo DPM.

Resultados del % de regeneración

Se graficaron los resultados obtenidos de los promedios de las áreas de regeneración en gráficos de cajas y bigotes con la finalidad de conocer la distribución de los datos. Éstos mostraron un comportamiento de regeneración constante, pero la regeneración pareció haberse detenido o por lo menos no cambió al día 45 en un aproximadamente 80% y así permaneció hasta el día 60 para ambos modelos de defecto y para ambos géneros. Se observó un porcentaje de regeneración del 80% en los grupos de machos (DAM y DPM) en el día 60 y, con un 85% en los grupos de hembras (DAH y DPH)(Figura 19 y 20).

Comparando los valores obtenidos con respecto a las variables de ubicación y género, el porcentaje regenerado en los defectos ubicados en anterior tanto el grupo de machos y hembras, se puede observar una distribución de los datos de forma creciente en cada uno de los tiempos experimentales sin llegar a la completa regeneración del defecto (100%), a partir del día 30 hasta el día 60 hubo datos que no cayeron dentro de los cuartiles debido a que se salían del rango en el que estaban la mayoría de los datos.

Respecto al porcentaje de regeneración de los defectos ubicados en posterior (Figura 2) se observó una distribución de los datos similar al de la Figura 19 en donde el porcentaje de regeneración tiene un comportamiento creciente conforme aumenta el tiempo, pero sin llegar al 100% de regeneración. Los datos entre el grupo de machos y hembras en posterior se presentaron distribuidos de manera diferente que en la Figura 19 debido al tamaño de las cajas y bigotes, ya que no presentaron una distribución tan equilibrada, pesar de esto, es notable la diferencia entre los días 14, 21 y 30, pero ésta no perceptible en los días siguientes.

No existe diferencias entre el porcentaje de regeneración con respecto a la ubicación en machos y hembras, siendo que en ambos grupos se puede observar un porcentaje de regeneración del orden entre 80-85%. En ninguno de los grupos de estudio, los datos obtenidos mostraron un 100% en la regeneración.

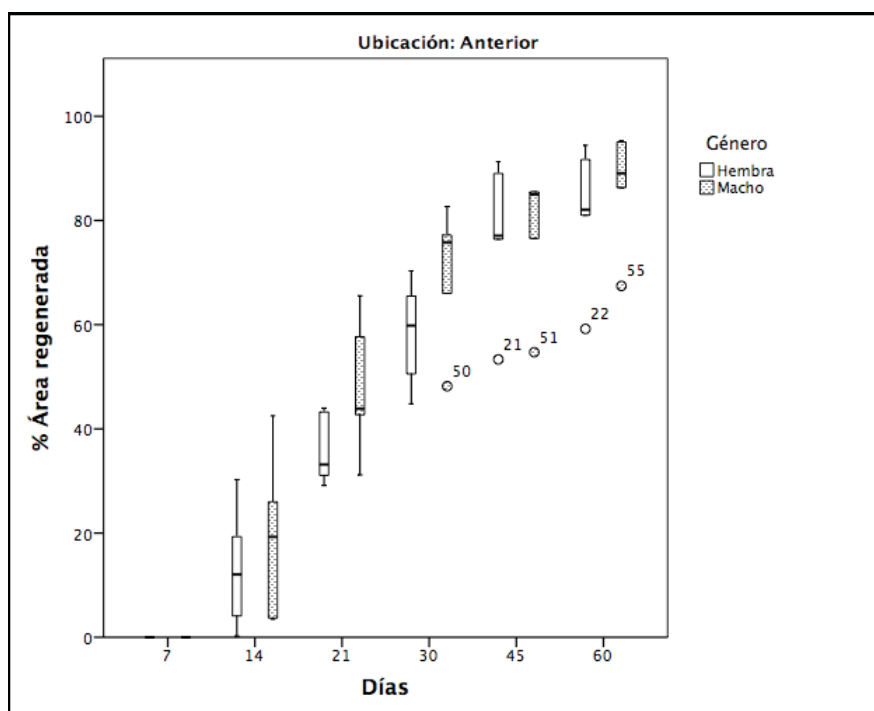


Figura 19. Porcentaje de regeneración ósea de los grupos DAH y DAM a todos los tiempos de estudio.

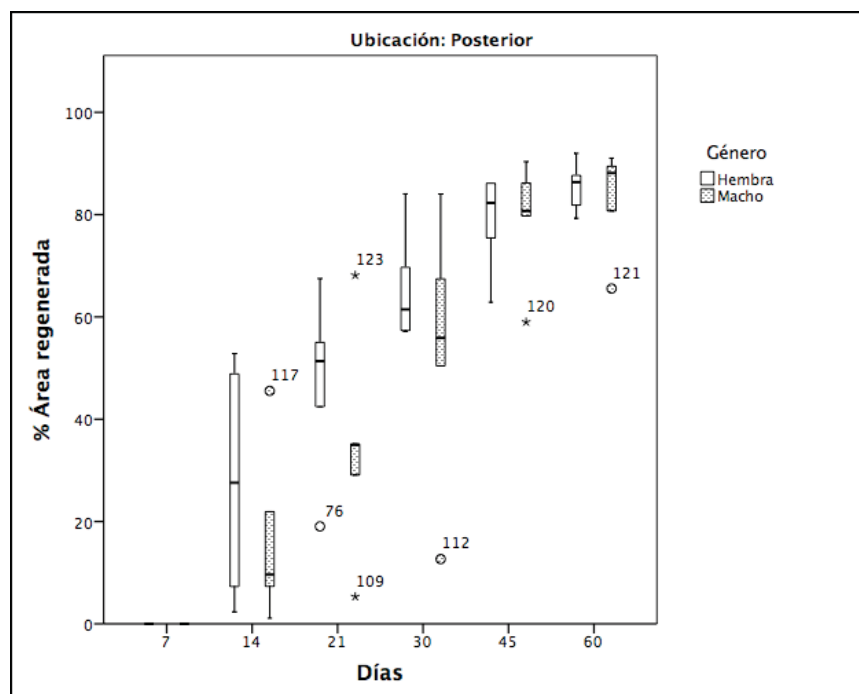


Figura 20. Porcentaje de regeneración ósea de los grupos: DPH y DPM para todos los tiempos de estudio.

En los grupos de machos los datos no fueron homogéneos; a pesar de esto, fue notable el aumento en la tasa de regeneración en los días 14, 21 y 30, pero no se observó diferencia en los días 30, 45 y 60. En el día 60 se observó la máxima tasa de regeneración del defecto en un 80% en el grupo DAM, y del 83% en el grupo DPM (gráfica 4).

Un análisis de varianza (ANOVA) indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con diferente ubicación de defecto lo que indica que no existen diferencias significativas entre la ubicación del defecto entre los grupos de estudio.

Resultados sobre el % de [HA]

La siguiente gráfica representa el porcentaje de la concentración de hidroxiapatita, normalizada por la [HA] de tejido sano adyacente de la línea oblicua externa, como función de la ubicación del defecto, esto evaluado por género a los 60 días (gráfica 6).

Los resultados determinaron que el porcentaje de HA es mayor en el DA presentando un 66% en machos y un 74% en hembras en comparación con el porcentaje obtenido en el DP que en machos alcanzó un 62% y en hembras un 58%, observándose que en ninguno de los grupos logra alcanzar el 100% de [HA].

Un análisis de varianza (ANOVA) de un factor donde se compararon los grupos DAH con 74% y el DPH con 58%, lo que indicó que sí existen diferencias estadísticamente significativas, debido a que el valor de significancia es $p < 0.004$. De la misma manera se ocupó el mismo análisis para comparar los porcentajes obtenidos para el DAM y el DPM lo que indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos.

Con estos resultados se puede afirmar que con respecto a la ubicación del defecto entre machos, no se encontraron diferencias en el porcentaje de [HA] que se encontró en el orden de 60-66%, sin embargo, esto cambia cuando se compara la ubicación del defecto en el grupo de las hembras puesto que la gráfica nos arroja resultados en los cuales podemos decir que el DP tiene una menor [HA] específicamente el 58%.

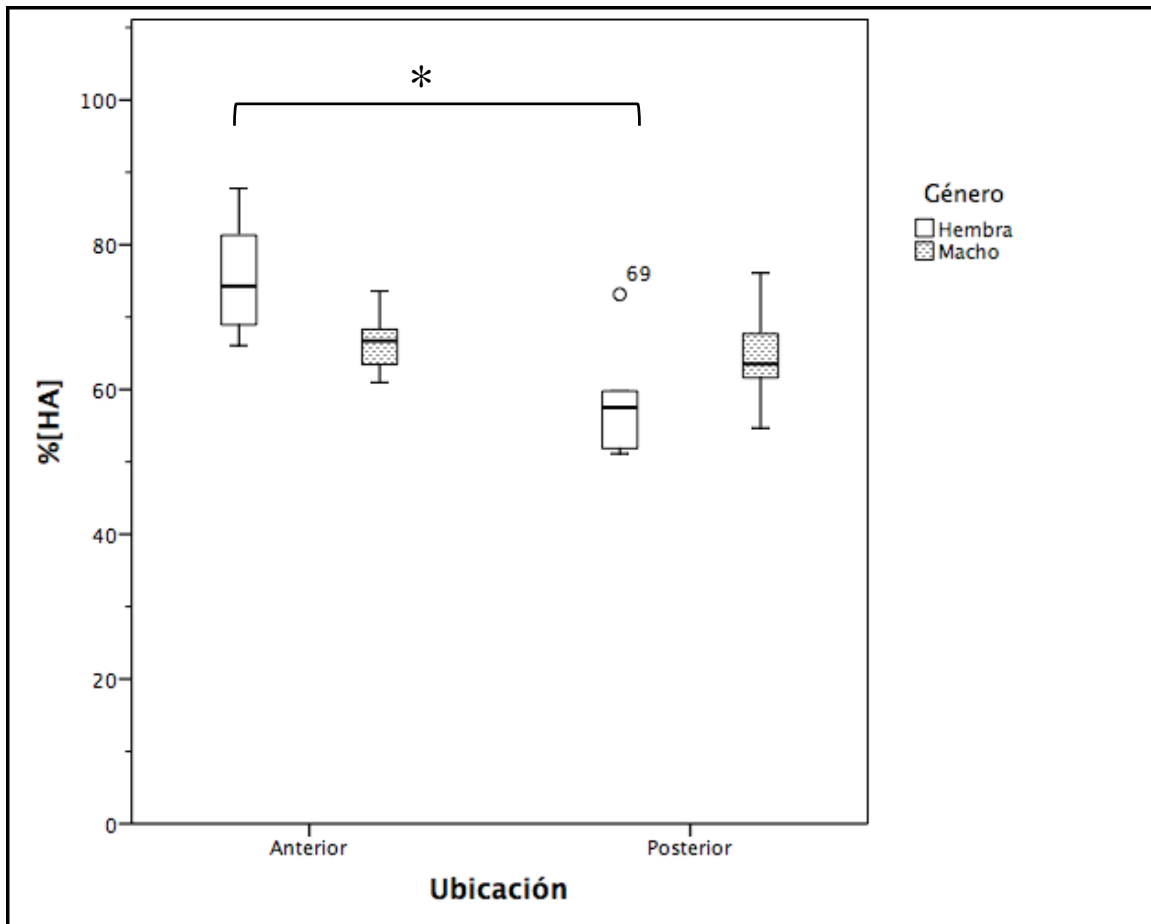


Figura 21. Tasa de concentración de HA a los 60 días como función de la ubicación, comparando machos vs hembras. *Existe diferencias estadísticamente significativas entre hembras con respecto a la ubicación ($p < 0.004$).

Discusión

Por definición, un defecto óseo de tamaño crítico (DTC) es aquel defecto más pequeño (en el caso específico de ratas 4 mm de diámetro en mandíbula) que no puede llegar a su completa regeneración durante todo el periodo de vida de un animal (Shanbhag S., 2016) (DeConde A.S., 2014). En el estudio de Chin y cols. (2013) donde evaluaron defectos óseos en el ángulo de la mandíbula de ratas *Wistar* para el día 90, el diámetro mínimo en el que observaron DTC fue de 4 mm. Del mismo modo, Shanbhag y cols, (2016) hicieron una revisión sistemática de modelos animales de DTC en maxila o mandíbula con terapias aplicables, evaluadas por medio de micro-CT; en donde mencionaron que un defecto crítico puede considerarse como tal, si cumple con la medida mínima de 4 mm de diámetro. En la presente investigación se realizaron dos propuestas de modelos de defecto óseo con las medidas de 4 x 3 x 1 mm evaluadas a un tiempo máximo de 60 días, y se obtuvo como resultado que, para este día, ninguno de los dos modelos logró alcanzar el 100% de regeneración. Por lo que se puede aseverar que nuestros modelos animales a los que se les realiza defectos en la cortical mandibular se pueden considerar como DTC al menos durante los 60 días posteriores a su creación.

Actualmente, gran parte de las investigaciones biomédicas se realizan en pequeñas especies debido a que cumplen las siguientes características: seguridad, efectividad, practicidad, reproducibilidad y estabilidad funcional y estructural del tejido a lo largo del tiempo (Padial M. M., 2015). Propusimos el empleo de rata de la cepa *Wistar* para nuestro modelo de DTC, puesto que sugieren ciertas ventajas entre ellas: alta tasa de reproductibilidad de los experimentos, manipulación y sedación sencilla, así como bajo costo en mantenimiento. Además, los estudios iniciales en individuos de menor jerarquía y tamaño, siempre son considerados como un punto de partida en la investigación, esto con la finalidad de obtener información y fundamentos para determinar el comportamiento, la eficacia y tiempos de regeneración. Así mismo, Kolk eligió a estos especímenes como su modelo animal con la justificación de que presentan receptores similares de células óseas, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos comparados con las células de hueso humano (Kolk A., 2016).

El tejido óseo está en constante crecimiento y remodelación para mantener a los huesos biomecánicamente y metabólicamente competentes, conservando resistencia ósea al reemplazar hueso mecánicamente fatigado por hueso nuevo y sano. Dentro de la formación de los huesos se encuentra un tipo de formación, al

cual se le nombró como osificación intramembranosa, la cual se da en huesos planos como la bóveda craneal, clavícula y mandíbula (Guda T, 2014); la mandíbula es un hueso impar, único, presenta una articulación con el cráneo de tipo gínglimoartoidal, en ella se alojan los órganos dentarios y junto con ellos es responsable de las funciones de masticación, deglución, fonación y estética, principalmente. Además, la mandíbula soporta cargas con dos configuraciones distintas: una interna, porosa y de arquitectura esponjosa (trabecular), y un hueso externo, más denso y compacto (cortical).

Actualmente, el 83.3% de los estudios de DTC se realizan en la mandíbula, ya sea bilateral o unilateral, con mayor frecuencia en el cuerpo o la rama de la mandíbula utilizando trepanación e irrigado (Shanbhag S., 2016). Muchos son los estudios que realizan DTC en la rama y ángulo mandibular (Suliman, 2015), (Bain, 2015), (Zhao, 2010), (Uchiyama H., 2011), (Park C. H., 2014), (Jiang, 2009), pero presentan ciertas desventajas, por ejemplo; son poco útiles cuando se requiere probar algún biomaterial, debido a que los modelos son transóseos por lo que no tiene ningún tipo de retención para contener el biomaterial. Algunos artículos reportan DTC en fémur y en calvaria (Trejo, 2010), (Bouyer, 2016), (Uchiyama H., 2011), con la finalidad de investigar la efectividad de agentes regenerativos como factores de crecimiento, biomateriales, implantación de células o tejidos, o cualquiera de estas combinaciones. Estos tipos de modelos en la práctica odontológica no son viables, puesto que este tipo de defectos óseos no son la principal afección de la población odontológica, así que se propuso un modelo que contribuya al conocimiento y a las posibles aplicaciones en el área de la Odontología (Secretaría de Salud, 2015).

En contraste, el tamaño y la forma de los DTC estudiados en este trabajo no solo son menos traumáticos, sino que también, al no ser seccionales, bicorticales o transóseos puede llegar a utilizarse para múltiples fines. La ubicación posterior de nuestros modelos se realizó en la cortical mandibular puesto que, esta zona se caracteriza por tener poca vascularización y escasa médula ósea, siendo estas características coadyuvantes para que no se alcance la solución de la continuidad espontánea cuando se realizan ambos defectos, es decir, los consideramos difíciles de reparar por su ubicación anatómica. Podemos decir que estos DTC son únicos e innovadores puesto que, por el diseño es un defecto de tipo contenedor bebido a que aloja a los biomateriales, constructos o andamios a se requiera evaluar (Martínez-Lage, 2013).

Por otro lado, nuestro modelo también presentó limitantes puesto que, al realizarlos simultáneamente, en ambos lados (izquierdo y derecho) de la mandíbula, el proceso

de reparación podría influir en el lado contrario (Braddock, 2001). Con respecto a la realización de los defectos en los grupos de hembras se puede decir que ésta fue complicada debido al tamaño de la mandíbula, que en comparación con las mandíbulas de los grupos de machos son de menor tamaño. Cabe mencionar también que no son útiles para evaluar el soporte de la fuerza biomecánica, como se hace con los modelos en huesos largos (Al-Fotawei R., 2014).

Adicionalmente, nuestro modelo se realizó mediante un abordaje extraoral, como lo han hecho otros autores (Zhao, 2010), (Park C. H., 2014), que proporciona un entorno de aislamiento con la cavidad bucal, lo que implica que la contaminación o infección por microorganismos presentes dentro de la cavidad oral fue poco probable. Este protocolo sugiere un abordaje extraoral con la finalidad de permitir al espécimen continuar con su alimentación debido a que no se fracturó o diseccionó el músculo, como sugiere Al-fotawei y cols en 2014 (Al-Fotawei R., 2014); el músculo masetero permaneció intacto, puesto que al diseccionarlo se podría reflejar en un posoperatorio largo y una pobre alimentación de los especímenes.

Para evitar la pérdida innecesaria de vidas de animales, de acuerdo con el principio 3-R (reemplazo, refinamiento, y reducción) y la variabilidad biológica entre cada individuo, se realizó el seguimiento al mismo sujeto en cada tiempo de estudio. Los tiempos de estudios fueron elegidos para cubrir el tiempo máximo de recambio óseo basado en los cursos de tiempo de curación del defecto óseo mandibular observado en experimentos previos (Kolk A., 2016). Al igual que otros tejidos, la reparación ósea es un proceso continuo que establece una cascada de eventos en movimiento. La curación del hueso incluye una inicial respuesta inflamatoria rápida (minutos a horas), quimiotaxis y mitosis (horas a días), producción de células extracelulares matriz, remodelación del sitio de la lesión y angiogénesis localizada (días a semanas). La remodelación ósea por medio de respuestas bioquímicas conduce a la reconstitución de la continuidad ósea y reparación completa del tejido en semanas (Braddock, 2001). Es por ello que nosotros seleccionamos los tiempos de estudio para evaluar la reparación de nuestros modelos.

Nuestros resultados con micro-CT son similares a otros estudios en donde han evaluado el comportamiento de un andamio de almidón y policaprolactona (SPCL) en la regeneración ósea en un defecto bicortical de rata, a las 8 semanas (56 días) su defecto control no llegó a una completa regeneración (Requicha, 2014). En otro estudio en donde evaluaron la cicatrización de dos tipos de defectos en la rama mandibular (derecho de 2 mm e izquierdo de 5 mm), en ratas hipertensas vs ratas sanas a los tiempos 2, 3, 5, 10, 15, 30, 60 y 90; haciendo referencia en la

incapacidad del hueso mandibular para alcanzar la solución de continuidad espontánea para ambos grupos (Chin V.K., 2013). Los tiempos de estudio para evaluar el potencial de regeneración ósea y el crecimiento óseo ectópico de dos biomateriales y un control vacío, en un modelo *in vivo* de DTC en mandíbula de rata, a las 8 y 16 semanas (56 y 112 días) la regeneración se observó incompleta (Kowalczewski J. C., 2014). Finalmente en el estudio de Ebina y cols., (2009) donde cuantificaron el porcentaje de volumen óseo en dos modelos de defectos alveolares en ratas (uno pequeño (B) y otro grande (BM) evaluados a los 0, 3, 6, 12 y 24 semanas postcirugía (0, 21, 42, 84 y 168 días), el estudio mostró un pequeño aumento en el volumen óseo entre las semanas 6 y 24 en las mandíbulas control, mientras que aumentó en las primeras 6 semanas, lo que sugiere que el crecimiento en el porcentaje de regeneración de la mandíbula de rata alcanza un máximo a las 12 semanas postcirugía y así se mantiene constante (Ebina, 2009). Nuestros resultados en los grupos DAH vs DAM y DPH vs DPM, donde se muestra un aumento del porcentaje de regeneración entre los días 14 y 21, sugiere que el porcentaje alcanza un máximo a los 30 días y ahí se mantiene constante hasta el día 60.

Algunos investigadores como Hsu y cols. (Hsu P. Y., 2016) no encontraron diferencias significativas entre la pérdida ósea en los huesos de la mandíbula de ratas ovariectomizadas, pero recientes estudios demuestran que la deficiencia de estrógenos induce y conduce claramente cambios estructurales en los huesos de la mandíbula y del hueso alveolar de ratas adultas (Ejiri, 2008). La mayoría de los pacientes son adultos, y dado que hay evidencia creciente de importantes diferencias entre individuos jóvenes y mayores en los resultados de curación ósea, se sugiere el uso de la rata adulta como sujeto de prueba estándar; especialmente para investigar las diferencias relacionadas con el género y opciones de tratamiento específicas para cada sexo (Strube, 2009).

Para esta investigación se requirieron ratas jóvenes machos y ratas jóvenes hembras para comparar si existía alguna diferencia que influyera en la regeneración ósea con respecto a la presencia de cambios hormonales presentes en hembras. Los resultados arrojaron que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos DAH vs DAM y DPH vs DPM, esto puede tener concordancia con el estudio realizado por Liu et al., en 2014 quienes observaron que ratas con ovariectomía (OVX) tendía a mantenerse relativamente estable la DMÓ en comparación con huesos largos, columna vertebral y el ilion, mientras que encontraron un ligero aumento en ratas sin OVX. Aunque la DMÓ de la mandíbula en ratas OVX parecía ser menor que las ratas sin OVX a través del período de

observación, la diferencia significativa fue encontrada solamente mandíbula en la semana 24 (Z Liu, 2015). Podríamos decir que en nuestro estudio de modelos DH vs DM no presentaron diferencias estadísticamente significativas debido a que utilizamos ratas hembras jóvenes que no presentan cambios en los niveles de estrógenos; utilizando la curva de referencia de Cossio et al., podemos argumentar la edad en días según el promedio del peso de las hembras, por lo que la edad que tenían al momento de ser sacrificadas eran 123 días con lo que aún eran ratas jóvenes (Cossio, 2013).

La micro-CT *in vivo* y *ex vivo* es una herramienta de gran utilidad debido a que tiene una resolución espacial que permite realizar con mayor certeza evaluaciones de imágenes tridimensionales y actualmente es el estándar de oro que permite evaluar la DMÓ, la microarquitectura y la morfología ósea así como realizar estudios a especímenes y llevar un seguimiento de cada uno de ellos sin tener que sacrificar demasiados animales. Aunque no debemos dejar de mencionar a las técnicas histológicas que juegan un papel importante y complementario para hacer las investigaciones más certeras, por ejemplo, Kolk et al., en 2015 realizaron comparaciones entre un biomaterial de PDLLA con diferentes concentraciones de BPM-2, las evaluaron por medio de micro-CT y por medio de fluorocromos para marcar el tejido mineralizado y evaluar el curso temporal de la formación inicial de hueso nuevo, y el proceso temprano de mineralización (Kolk A., 2016). Con eso podemos decir que, si bien nuestro trabajo presenta este tipo de limitantes, se debió a falta de tiempo y sobretodo recursos, pero no es una limitante determinante para decir que nuestros resultados no son válidos.

En este estudio se utilizaron los parámetros de 35 kV y 0.4 mA, sin embargo este estudio estuvo limitado por la resolución del equipo (120 μm); cuando el análisis de estructuras pequeñas tales como las trabéculas de rata presentan dimensiones de 20-60 micras (Bouxsein, 2010), (Bissinger, 2016). Debido a que el sistema Albira no se encuentra específicamente calibrado para el análisis de la microarquitectura ósea, para poder evaluar la DMÓ se realizaron ajustes que permitieron conocer la [HA] como lo menciona Bruker en su artículo "Bone mineral density (BMD) and tissue mineral density (TMD) calibration and measurement by micro-CT using Bruker-MicroCT CT-Analyser".

En nuestros resultados de la [HA] en el DAH logramos observar la dispersión de datos ~680 mgHA/cc mientras que en el DPH se obtuvo ~510 mgHA/cc, aquí podemos observar diferencias estadísticamente significativas; sin embargo, en el DAM obtuvimos ~650 mgHA/cc a diferencia del DPM que los datos se ubicaron en

~600 mgHA/cc lo que no marca diferencias significativas. En estudios previos han reportado que el valor promedio de la DMÓ en un DTC en el ángulo de la rama mandibular de ratas macho Sprague Dawley con un peso entre 479 ± 501 g a los 56 días fue de 876 mgHA/cc (Bissinger, 2016). En otro estudio de Jiang y cols. (2009) reportaron valores de la DMÓ de 550 mgHA/cc en un DTC en la rama de la mandíbula de ratas macho Fisher F344 de 8 semanas (56 días) de edad y con un peso que osciló entre 250 ± 15 g (Jiang, 2009). Con base en estos datos podemos decir que los resultados obtenidos de la [HA] en este trabajo pueden ser comparativos a los valores que se han obtenido en otras investigaciones.

Finalmente, debemos agregar que para el sistema Albira en su modalidad mirco-CT la radiación emitida se encuentra en un intervalo de 30-300 mGy, siendo esta una dosis baja impartida para la totalidad de las modalidades del CT puesto que, la dosis letal para ratones se encuentra entre 5.0 y 7.0 Gy. No obstante, en la adquisición con los parámetros de 45 kV y 0.4 mA en la modalidad de HR la dosis es de 250 mGy por lo que, nos encontramos por encima del umbral de efectos que pueden llegar a inducir cambios en los especímenes (Rueda, 2017). En humanos, la dosis de radiación ionizante del orden de 3-5 Gy puede inducir hinchazón y fragmentación en el crecimiento de los huesos largos. Dosis aplicadas a cultivos celulares de osteoblastos *in vitro* pueden inhibir proliferación celular e inducir la muerte celular, lo que podría conducir a deterioro del crecimiento óseo (Klinck, 2008). Obviamente, son necesarios más estudios para determinar los posibles efectos de la exposición a la radiación en el análisis de μ CT *in vivo*.

Resumen de resultados

Evaluamos dos modelos de defectos en la cortical mandibular en ambos géneros de rata *Wistar* por medio de la técnica de micro-CT, y con base en los resultados se concluye:

- Ambas ubicaciones de los modelos de defectos son de gran utilidad para la evaluación de la regeneración ósea, aunque para fines de ergonomía y de realización quirúrgica, concluimos que el DP es mejor con respecto al DA, tanto para machos como en hembras.
- Se evaluó la regeneración por género. En ambos modelos se logró el objetivo de conseguir defectos de tamaño crítico. Por lo que el género no afecta el proceso de regeneración ósea.
- Se evaluó el porcentaje de [HA], con lo que podemos argumentar que para el caso específico del DA y DP en machos el porcentaje fue menor en comparación a los DA y DP en hembras pero no se encontraron diferencias significativas al utilizar hembras o machos.

Conclusión

El presente trabajo de investigación concluye que el modelo de defecto crítico realizado en la zona posterior de la cortical mandibular de ratas *Wistar* hembras y machos jóvenes es un modelo de DTC apto para su empleo en estudios de regeneración ósea donde se implementen terapias con biomateriales, células, andamios, o constructos.



Bibliografía

- Al-Fotawei R., A. A. (2014). Radiological assessment of bioengineered bone in a muscle flap for the reconstruction of critical-size mandibular defect. *PLoS One*, 9(9), e107403.
- Arenas, M. C. (2008). *Biología celular e histología médica. Tejido Óseo*. México: Facultad de Medicina. Departamento de biología celular.
- Bain, J. B.-A. (2015). Enhancement of the Regenerative Potential of Anorganic Bovine Bone Graft Utilizing a Polyglutamate-Modified BMP2 Peptide with Improved Binding to Calcium-Containing Materials. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 21(17), 2426-2436.
- Bissinger, O. K. (2016). Micro-CT vs. Whole Body Multirow Detector CT for Analysing Bone Regeneration in an Animal Model. *PLoS One*.
- Bouxsein, M. L. (2010). Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1468–1486.
- Bouyer, M. G. (2016). Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration. *Biomaterials*, 104, 168e181.
- Boyle W.J., S. W. (May de 2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423, 337-342.
- Braddock, M. H. (2001). Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair. *News in Physiological Sciences*, 16, 208-213.
- Brouwers J. E., v. R. (Marzo de 2009). Effects of PTH treatment on tibial bone of ovariectomized rats assessed by in vivo micro-CT. *Osteoporosis International*, 20, 1823–1835.
- Buroni F., C. P. (Noviembre de 2004). Determinación De Las Constantes Elásticas Anisótropas Del Tejido Óseo Utilizando Tomografías Computadas. Aplicación A La Construcción De Modelos De Elementos Finitos. *Mecánica Computacional*, XXIII, 3009-3032.
- Bushberg J. T., B. J. (2012). *The Essential Physics of Medical Imaging*. Lippincott Williams & Wilkins .
- Campbell, J. R. (2001). *Las radiaciones: reto y realidades*. México: Fondo de Cultura Económico.
- Chen Y., D. E. (2017). Micro-CT based finite element models of cancellous bone predict accurately displacement once the boundary condition is well replicated: A validation study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65, 644–651.



- Chin V.K., S. A.-H. (Septiembre de 2013). Bone healing of mandibular critical-size defects in spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Oral Research*, 27(5), 423-30.
- Colnot, C. (2011). Cell Sources for Bone Tissue Engineering: Insights from Basic Science. *Tissue Engineering*, 17(6), 449-457.
- Cossio, B. M. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 2151-2156.
- DeConde A. S., S. D. (Mayo de 2013). BMP-2 impregnated biomimetic scaffolds successfully induce bone healing in a marginal mandibular defect. *Laryngoscope*, 1149–1155.
- DeConde A.S., L. M. (2014). Defining the critical-sized defect in a rat segmental mandibulectomy model. *JAMA*, 58-65.
- Dennis, K. L. (2016). Harrison. Principios de medicina interna (19º ed.). McGraw-Hill.
- Dongmei Cui, L. W. (2011). Histología con correlaciones funcionales y clínicas. China: Lippincott Williams & Wilkins.
- Dorafshar A.H., M. G. (Noviembre de 2014). Comparison of Free Fibular Flaps With Reamer-Irrigator-Aspirator Bone Grafts for the Reconstruction of Critical-Sized Mandibular Defects. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 25(6), 1953-1958.
- Ebina, H. H. (2009). Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral Diseases*, 15, 273-289.
- Effendy N. M., K. M. (2017). The effects of *Labisia pumila* extracts on bone microarchitecture of ovariectomized-induced osteoporosis rats: A micro-CT analysis. *Journal of X-Ray Science and Technology*, 101–112.
- Ejiri, S. T. (2008). Estrogen deficiency and its effect on the jaw bones. *Journal of bone and mineral metabolism*, 26, 409-415.
- Eweida A. M., N. A. (2011). Mandibular reconstruction using an axially vascularized tissue-engineered construct. *Annals of Surgical Innovation and Research*, 5:2.
- Fan J., P. H. (2014). Adipose-Derived Stem Cells and BMP-2 Delivery in Chitosan-Based 3D Constructs to Enhance Bone Regeneration in a Rat Mandibular Defect Model. *TISSUE ENGINEERING*, 20(15), 2169-2179.
- Faot F., C. M. (2015). Micro-CT analysis of the rodent jaw bone micro-architecture: A systematic review. *Bone Reports*, 14–24.
- Fassbender M., M. S. (2014). Efficacy of two different demineralised bone matrix grafts to promote bone healing in a critical-size-defect: a radiological, histological and histomorphometric study in rat femurs. *International Orthopaedics*, 38, 1963–1969.
- Fernández, T. A. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea III El proceso de remodelado. Madrid: Med Oral Patol Oral Cir Bucal.



- Fernández, T. H. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. (11), E471-51.
- Fortoul, V. G. (2011). Biología celular e histología médica. Guía calidad en educación.
- Fujita Y., G. S. (Agosto de 2016). Effect of dietary calcium deficiency and altered diet hardness on the jawbone growth: A micro-CT and bone histomorphometric study in rats. *Archives of Oral Biology*(76), 200-210.
- Garther, L. P. (2008). Texto atlas de Histología (3ª ed.). China: MacGraw-Hill.
- Geneser, F. (2000). Histología 3º Edición. México: Panamericana.
- Gómez, P. S. (2015). Caracterización de un micro CT para la cuantificación de densidad mineral ósea en defectos de tamaño crítico en calvarias de rata Wistar. México.
- Guda T, L. C. (2014). Quality of bone healing: perspectives and assessment techniques. *Wound Repair Regeneration*, 39-49.
- Harada S., R. G. (May de 2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature Publishing Group*, 423, 349-355.
- Herford A. S., B. P. (2008). Reconstruction of Mandibular Continuity Defects With Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Journal Oral Maxillofac Surgugery*, 66, 616-624.
- Herford AS, B. P. (2008). Reconstruction of Mandibular Continuity Defects With Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Journal Oral Maxillofac Surgugery*, 66, 616-624.
- Hsu J. T., W. S. (Agosto de 2013). The assessment of trabecular bone parameters and cortical bone strength: A comparison of micro-CT and dental cone-beamCT. *Journal of Biomechanics*, 46, 2611–2618.
- Hsu P. Y., T. M. (April de 2016). Cortical Bone Morphological and Trabecular Bone Microarchitectural Changes in the Mandible and Femoral Neck of Ovariectomized Rats. *PLoS One* (e0154367).
- Hussein K. A., Z. I.-S. (2012). Difference in Soft Tissue Response Between Immediate and Delayed Delivery Suggests a New Mechanism for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 Action in Large Segmental Bone Defects. *Tissue Engieneering*, 18(5), 5 and 6,.
- Jiang, X. Z. (2009). Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. *Biomaterials*, 30, 4522–4532.
- Kanno Y., N. T. (2016). Computed tomographic evaluation of novel custom-made artificial bones, "CT-bone", applied for maxillofacial reconstruction. *Regenerative Therapy*, 1-8.



- Kim J., Y. H.-k. (2013). Enhanced regeneration of rabbit mandibular defects through a combined treatment of electrical stimulation and rhBMP-2 application. *Medical & Biological Engineering & Computing*(51), 1339-1348.
- Klinck, R. C. (2008). Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning. *Medical Engineering & Physics*, 30, 888-895.
- Kolk A., T. T. (2016). A novel nonviral gene delivery tool of BMP-2 for the reconstitution of critical-size bone defects in rats. *Biomedical Materials Research*.
- Kowalczewski J. C., et al. (Marzo de 2014). Reduction of ectopic bone growth in critically-sized rat mandible defects by delivery of rhBMP-2 from kerateine biomaterials. *Biomaterials*, 3220–3228.
- Liu H., L. W. (Junio de 2016). Bone micro-architectural analysis of mandible and tibia in ovariectomised rats a quantitative structural comparison between undecalcified histological sections and micro-CT. *Bone & Joint Research*, 5(6), 253-262.
- Liu Z, Y. C. (2015). Distributional Variations in Trabecular Architecture of the Mandibular Bone: An In Vivo Micro-CT Analysis in Rats. *PLoS One*, 12.
- MacDonald, D. (2011). *Oral and Maxillofacial Radiology: A Diagnostic Approach*. Wiley-Blackwell.
- Martínez-Lage, A. J. (2013). Tratamiento de defectos intraóseos causados por enfermedad periodontal agresiva mediante derivados de la matriz del esmalte: revisión y descripción de la técnica. *23(1)*, 49-58.
- Masoumeh, F. a. (2010). Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue and Cell*, 42, 211–216.
- Padial M. M., R. J. (2015). Standardized in vivo model for studying novel regenerative approaches for multitissue bone-ligament interfaces. *Nature*, 10(7), 1038-1048.
- Park C. H., R. F. (2014). Image-Based, Fiber Guiding Scaffolds: A Platform for Regenerating Tissue Interfaces. *Tissue Engineering*, 20.
- Ramírez G. J. C., A. C. (2008). Tomografía computarizada por rayos X: fundamentos y actualidad. *Revista Ingeniería Biomédica*, 2(4), x-x.
- Ramírez, P. M. (2015). Validación de defecto crítico en hueso mandibular de rata en la cepa Wistar. UNAM, FES Iztacala.
- Rebaudi A., T. P. (2010). Preoperative Evaluation of Bone Quality and Bone Density Using a Novel CT/microCT-based Hard-Normal-Soft Classification System. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 25(1), 75-85.



- Redondo L. M., V. H. (Junio de 1997). Repair of experimental mandibular defects in rats with autogenous, demineralised, frozen and fresh bone. *British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 166-169.
- Requicha, J. F. (Marzo de 2014). Evaluation of a starch-based double layer scaffold for bone regeneration in a rat model. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(7), 904-909.
- Roodman, G. D. (1999). Cell biology of the osteoclast. *Experimental Hematology*, 27, 1229–1241.
- Rosset P., D. F. (2014). Cell therapy for bone repair. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*(100), 107-112.
- Rueda, A. (2017). Caracterización dosimétrica de la unidad microct de un sistema trimodal de adquisición de imagen microPET/SPECT/CT. UNAM. UNAM.
- Sasser T. A., C. S. (Abril de 2012). Segmentation and Measurement of Fat Volumes in Murine Obesity Models Using X-ray Computed Tomography. *Journal of Visualized Experiments*(62), 1-5.
- Schliephake H., W. H. (2008). Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid An experimental study in rats. *Biomaterials*.
- Secretaría de Salud. (2015). Recuperado el Enero de 2017, de Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2010/sem10.pdf>
- Shanbhag S., P. N. (2016). Alveolar bone tissue engineering in a critical-size defects of experimental animal models: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
- Sobotta J., W. U. (2009). *Histología* (2ª ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Strube, P. M. (2009). Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone*, 45(6), 1065–1072.
- Suliman, S. X.-W.-N. (2015). Release and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 are affected by scaffold binding techniques in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 197, 148-157.
- Todd A. Sasser, S. E. (Julio de 2012). Albira CT system/PMOD software protocol for obtaining bone mineral density units using a Hydroxiapatite phantom. *Carestream Molecular Imaging (AP0123)*, 1-4.
- Toshihisa, K. (December de 2016). Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 2-17.
- Trejo, I. C. (2010). Terapia celular para la reparación ósea de la cavidad bucal. Modelo experimental de defecto mandibular.



- Uchiyama H., Y. M. (Agosto de 2011). In vivo 3D analysis with micro-computed tomography of rat calvaria bone regeneration using periosteal cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*(5), 483-490.
- Vonwil D., C. J. (Octubre de 2014). Validation of Fluorescence Molecular Tomography/Micro-CT Multimodal Imaging In Vivo in Rats. *Molecular Imaging and Biology*(16), 350Y361.
- Wojciech, P. (2012). *Ross Histología Texto atlas color con Biología Celular y Molecular* (6ª edición ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Wojciech, P. (2015). *Ross. Histología* (7a ed.). LWW.
- Yagyuu T., K. T. (2012). Unique and reliable rat model for the assessment of cell therapy: bone union in the rat mandibular symphysis using bone marrow stromal cells. *Journal of Tissue Engineering* , 9, 276-285.
- Zhao, J. H. (2010). Combination of b-TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs to heal critical size mandibular defects in rats. *Oral Diseases*, 16, 46–54.



Anexos

1. Material fungible

Material fungible	Marca
Bata de laboratorio	-----
Sanitas	kimberly Clark
Gafas de seguridad	-----
Cubrebocas	AMBIDERM™
Guantes desechables estériles	AMBIDERM™
Guantes desechables de látex	AMBIDERM™
Campos quirúrgicos estériles	-----
Campos quirúrgicos hendidos estériles	-----
Gasas	MEDICOM®
Masking tape	Tuk®
Jeringas de tuberculina 3 ml	AMBIDERM™
2 Campos de 60x30 cm	-----
Instrumental quirúrgico de disección y sutura estéril	-----
Hoja de bisturí del número 11	HERGOM®
Fresa de bola de tamaño ½	SS WHITE®
Jeringa de 20 ml	NIPRO
Nylon 000	Johnson&Johnson
Vicryl 000	Johnson&Johnson
Cobija para rata 60x60cm	-----



2. Reactivos químicos, fármacos y equipos

Reactivos químicos	Marca
NaCl 9%	Solución CS PiSA
Alcohol	-----
Antiséptico	Isodine

Fármacos	Marca
Ketamina 1000mg/10ml	Anesket®
Xilazina 20mg/1ml	Procin®
Isoflurano 100ml	Lisorane®
Tramadol 5mg/kg	Pisadol®
Ampicilina 10mg/Kg	Pentrexil®

Equipo	Marca
Micromotor	Strong 210
Cámara fotográfica	Canon modelo SDL
μ CT	BRUKER
Lámpara	ARTIVA
Rasuradora	WAHL®
Balanza electrónica	OHAUS®



3. Aval de la Comisión de Ética de la FES Iztacala, UNAM.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
COMISIÓN DE ÉTICA



Los Reyes Iztacala a 14/09/2017

Oficio: CE/FESI/092017/1074

DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **Regeneración de hueso mandibular in vivo por medio del uso de Ingeniería de tejidos**, que va a someter a **CONACyT, CB-2014-01**.

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

Avalado sin recomendaciones

Sin otro particular por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración y aprovechamos la oportunidad para enviarle un atento saludo y nuestro respeto académico.

Atentamente

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido
Presidente





4. Aval de la Comisión de Bioseguridad de la FES Iztacala, UNAM.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
Comisión de Bioseguridad



DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

Regeneración de hueso mandibular in vivo por medio del uso de Ingeniería de tejidos.

que será sometido a la convocatoria: CONACYT.

Cumple con los requisitos establecidos por las leyes y normas en materia de Bioseguridad,
razón por la cual se avala para su desarrollo.

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU

Los Reyes Iztacala, a los 13 días del mes de febrero del 2017

Biol. MUÑOZ LOPEZ JOSE LUIS
Presidente

