



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Estudio histológico del implante de un biovidrio en un modelo de defecto crítico en mandíbula de rata”

Tesis

Para obtener el título de Cirujano Dentista

Presenta

BARRALES URIBE ALEJANDRA

Directora de tesis

Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte

Jurado:

Dr. José Francisco Gómez Clavel

Mtra. Marcela Sofía Jiménez Martínez

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez

Mtro. Crisóforo Mercado Márquez

Investigación realizada gracias al proyecto CONACYT CB201401-0235984.



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México.

2018



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.



AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos el apoyo del Grupo de Investigación Traslacional en Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad de Alcalá, en especial a la Dra. Julia Buján Varela y al Dr. Natalio García-Honduvilla, quienes participaron y nos apoyaron en la confección y diseño del modelo de estudio, así como de la planeación estratégica en la presente tesis.

Agradecemos por los materiales elaborados por el Dr. Juan Peña, y suministrados por el Grupo de investigación Biomateriales inteligentes y VERDI (Polyvalent mesoporous nanosystem for bone diseases) del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España, dirigido por la Dra. María Vallet Regí.

Agradecemos la colaboración del Dr. Pedro Esbrit director de Laboratorio en la Unidad de Investigación Ósea y Articular, Institución de Investigación en Salud (IIS) -Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, España, que nos suministró la PTHrP.

Agradecemos también al M. en C. Crisóforo Mercado Márquez, responsable de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la UIM de la FES-Cuautitlán UNAM todas las facilidades otorgadas para la realización de los procedimientos experimentales *in vivo* de esta tesis.

Agradecemos el apoyo en el área de análisis histológico al Dr. German Isauro Garrido Fariña, quien es responsable del Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología de la FES-Cuautitlán UNAM.

Agradecemos el apoyo, consejos y atenciones a los doctores José Francisco Gómez Clavel, Marcela Sofía Jiménez Martínez, Luis Alberto Medina Velázquez.



A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la institución que me formó,
profesionalmente y humanamente.

A mis padres Lilia y Berna que me brindaron su apoyo, consejos y en los momentos más difíciles me alentaron a seguir adelante, anhelando que siempre me prepararas para enfrentarme a la vida. Hoy se ven culminados nuestros esfuerzos y mis deseos, iniciándose así una etapa en mi vida, en la que siempre estarán en mi corazón.

A mi hermana Ana que con sus consejos me han ayudado a afrontar los retos que se me han presentado a lo largo de la vida, por estar siempre para escucharme y ayudarme además de ser mi hermana ha sido una amiga.

A mis abuelos Bertha y Vicente, a mis tías Paty y Mely por todo su apoyo, comprensión, que siempre me alentaron a seguir adelante para nunca rendirme, han sido parte fundamental de mi vida.

A mi prima y sobrina Ary y Andy a quien adoro y llenan mi vida de alegrías.

A la doctora Cynthia mi directora de tesis por toda la paciencia y su valioso tiempo, conocimientos que me sirvieron de gran ayuda. Gracias por todo el apoyo.

A mis compañeros de laboratorio por toda su ayuda en la realización de esta tesis y especialmente a Ana compañera y amiga por todo tu apoyo brindado en este tiempo, que sin conocerme me brindaste tu amistad y confianza, Eve gracias por apoyarme y brindarme tu amistad, Mario e Israel gracias por ayudarme, su amistad y por todos los momentos divertidos.

A todos aquellas personas que se han cruzado en mi camino dejando aprendizajes y que son importantes para mí y que de una u otra manera estuvieron a mi lado y me dieron ánimos, sobre todo cariño y amistad.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	4
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN	8
CAPÍTULO 1	10
1. MARCO TEÓRICO.....	10
1.1 EL METABOLISMO ÓSEO.....	10
1.1.1 Hueso	10
1.1.2 Remodelación ósea	11
1.2 OSTEOPOROSIS	14
1.2.1 Fisiopatología	16
1.2.2 Características clínicas	17
1.2.3 Factores de riesgo	18
1.2.4 Diagnóstico y tratamiento	19
1.2.5 Criterios de la OMS para el diagnóstico con DEXA	19
1.2.6 Medicamentos aprobados por la Secretaria de Salud en México para tratar la osteoporosis postmenopáusica.	19
1.3 BIOMATERIALES (CERÁMICAS).....	21
1.4 FUNCIONALIZACIÓN.....	24
1.5 HORMONA PARATIROIDEA	26
1.6 PTHrP.....	27
CAPÍTULO 2	29
2.1 ANTECEDENTES	29
2.2 JUSTIFICACIÓN	33
2.3 OBJETIVO.....	35
2.4 HIPÓTESIS.....	35
CAPÍTULO 3	36
3. METODOLOGÍA	36
3.1 Diseño del estudio.....	37
3.2 Línea del tiempo experimental.	40
3.3 Modelo animal osteoporótico.	41
3.4 Diseño Quirúrgico del defecto mandibular.....	42



3.5 Implantación de constructos.....	44
3.6 Método de funcionalización.	44
3.7 Método de la elaboración del biomaterial con la biomolécula PTHrP.	45
3.8 Evaluación clínica y sacrificio	45
3.9 Procesamiento histológico de la muestra.....	46
3.10 Análisis histológico e histomorfométrico.	47
CAPÍTULO 4	48
4. RESULTADOS.	48
4.1 Evaluación histológica	48
4.2 Comparaciones de 4 semanas sin OVX y 4 semanas con OVX.....	60
4.3 Hallazgos histológicos a las 4 semanas	63
4.4 Análisis comparativos de peso de especímenes sin y con OVX	65
4.5 Resultados. Evaluación Radiográfica.....	66
4.6 Resultados. Análisis macroscópico de las lesiones.	67
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIÓN.....	73
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	74
ÍNDICE DE TABLAS.....	76
TRABAJOS CITADOS.....	77
ANEXOS.....	81

ABREVIATURAS

APTS: biomaterial macroporoso bioactivo (SiO_2 85%- Ca^0 10%- P^2O^5 5%).

APTSf: Amino-Propil Trietoxi- Silano.

BMPs: Proteínas morfogenéticas óseas, del inglés Bone Morphogenic Protein.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio, del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DEXA: Técnica de absorciometría de rayos X de energía dual.

DMO: Densidad Mineral Ósea.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos, del inglés Fibroblast growth factor.

HA: Hidroxiapatita.

HPTP: Hiperparatiroidismo primario.

IGF -1: Factor de crecimiento insulínico 1, del inglés Insulin like growth factor.

IGF-2: Factor de crecimiento insulínico 2, del inglés Insulin like growth factor.

IL -1: Interleucina 1.

IL-6: Interleucina 6.

IT: Ingeniería de tejidos (Tissue engineering).

LAVOS: Estudio Latinoamericano de Osteoporosis Vertebral.

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos.

MMP-9: Matriz metaloproteínasa-9.

NHI: Instituto Nacional de Salud, del inglés National Institute of Health.

NLS: Dominios de localización nuclear/nucleolar.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPG: Osteoprotegerina.

Ost: Osteostatina.

O: Ovariectomía (la nomenclatura de los grupos).

OVX: Ovariectomía.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés Platelet-derived growth factor.

PK: Proteína quinasa.

PKC: Proteína quinasa C.

PTH (1-34): Teriparatida.

PTH (1-84): Molécula de longitud completa.

PTH: Hormona paratiroidea.

PTHrP: proteína o péptido relacionado con la hormona paratiroidea.

RANKL: Del ligando activador del receptor del factor nuclear κ B, del inglés Receptor Activador for Nuclear Factor κ B Ligand.

Sham: Cirugía simulada

TGF $-\beta$: Factor de crecimiento transformante β , del inglés Transforming growth factor β .

TRAP: Fosfatasa ácida al tartrato resistente, del inglés Tartrate resistant acid phosphatase.

NOMECLATURA GRUPOS:

s= sana.

A= APTS.

A_f= APTS Funcionalizado.

O= ovariectomía.

PTHrP= Osteostatina o Péptido relacionado con la PTH.

Sham= Cirugía simulada

4s= 4 semanas.

RESUMEN

Introducción. En la Ingeniería de Tejidos (IT) del tejido óseo, el andamio ideal debe ser tridimensional, altamente poroso, biocompatible y poseer propiedades de osteoconducción, es decir, poseer una degradación controlada y una superficie adecuada para fomentar la adhesión, la proliferación y diferenciación celular. La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), es un modulador de la formación y remodelación ósea; que ha demostrado ser capaz de promover la regeneración ósea y a la que se le han atribuido propiedades de osteoinducción; por ello, el objetivo de este trabajo fue comprobar si el biomaterial macroporoso bioactivo (APTS) ($\text{SiO}_2 85\% - \text{CaO} 10\% - \text{P}_2\text{O}_5 5\%$) funcionalizado con el grupo amino (APTSf) y cargado con la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) promueve la regeneración en un defecto óseo mandibular en un modelo animal de osteoporosis.

Métodos. La realización de los experimentos se llevó a cabo con la aprobación de los Comités de Bioética (Folio: 1089) y Bioseguridad (Folio: 035) de la FES-Iztacala. Se emplearon un total de 48 ratas Wistar hembra (200-250 g), el tiempo de estudio fue de 4 semanas (4s). Para los grupos con osteoporosis, aleatoriamente a la mitad de los especímenes se les realizó ovariectomía bilateral y seguimiento radiográfico por 10 meses para comprobar el desarrollo de la enfermedad, las ratas sanas se dejaron envejecer a la par. El defecto se realizó con un acceso extraoral en el hueso cortical mandibular con un tamaño: 3mm x 2mm x 1mm. En el lado derecho se realizó un defecto óseo que se rellenó con los diferentes andamios y en el lado izquierdo se realizó el defecto que se mantuvo sin relleno (Grupo sham). Se colocaron el andamio APTS (A), la biomolécula PTHrP y APTS funcionalizado (Af) organizados en los siguientes grupos (n=6):

Grupo sin osteoporosis.

- ✓ SANAS + APTS = **S.A.**
- ✓ SANAS + APTS + PTHrP = **S.A.PTHrP**
- ✓ SANAS + PTHrP (sin biomaterial) = **S.PTHrP.**
- ✓ SANAS + APTS funcionalizado + PTHrP = **S.Af.PTHrP.**

- ✓ SANAS Sham= **S.sham.**

Grupo Experimental OVX (ovariectomía)

- ✓ OVX + APTS= **O.A.**
- ✓ OVX + APTS + PTHrP = **O.A.PTHrP**
- ✓ OVX + PTHrP (sin biomaterial) = **O.PTHrP.**
- ✓ OVX + APTS funcionalizado+PTHrP= **O.Af.PTHrP.**
- ✓ OVX sham= **O.sham.**

Resultados y discusión. El biomaterial APTS presentó características de relleno que se reabsorbió muy lentamente a las 4 semanas. El APTS cuando se combinó con PTHrP en el grupo O.Af.PTHrP en algunos especímenes presentó encapsulación y no mostró características de osteoconducción y osteoinducción.

La PTHrP mostró propiedades de molécula osteoinductora con cierre del defecto por tejido de neoformación ósea en los grupos: S.PTHrP.4s, y O.PTHrP.4s. Sin embargo en los grupos: O.Af.PTHrP.4s, S.Af.PTHrP.4s, se observó hiperplasia ósea fuera del defecto, sobre el tejido sano en la base de la mandíbula.

Conclusiones. El APTS (sin funcionalizar) se comportó como un relleno de lenta reabsorción en los defectos tanto de especímenes con y sin OVX. El APTS_f se encapsuló en casi todos los grupos a las 4 semanas, pero se observó regeneración ósea dentro de los defectos.

La PTHrP se comportó como una molécula osteoinductora no controlada que dio lugar a la formación de hiperplasias óseas fuera de los límites de los defectos, sobre el tejido sano.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 EL METABOLISMO ÓSEO.

1.1.1 Hueso

Los defectos óseos representan problemas clínicos importantes en la cirugía reconstructiva, ortopédica y craneofacial. La pérdida ósea puede ser el resultado de varias patologías, causadas por trauma, o a consecuencia de procedimientos quirúrgicos invasivos como son: resecciones de tumores, infecciones, labio y paladar hendido, etc., que con el objetivo de proporcionar rehabilitación funcional y estética completa a los pacientes la Medicina Regenerativa, a través de la Ingeniería de Tejidos, utiliza biomateriales, células y moléculas que han mostrado resultados alentadores en la regeneración ósea (Bernabé, 2012).

El hueso es un tejido conjuntivo con múltiples funciones, tales como sostener el peso corporal, proteger órganos internos, almacenar minerales, albergar el sistema hematopoyético y multiplicar la fuerza de los músculos que mueven el esqueleto. En el ser humano, según el grado de porosidad y la microestructura, el hueso se clasifica como: cortical o compacto y trabecular o esponjoso. La mayoría de los huesos tienen una cubierta externa (periostio) y otra interna (endostio).

El hueso de tipo cortical o compacto se encuentra fundamentalmente en los huesos largos y en la capa externa de los huesos esponjosos; se forma mediante canales vasculares que invaden el hueso desde las superficies perióstica y endóstica, y su unidad estructural se denomina "osteona" o "sistema harvesiano" que consta de una lámina de forma cilíndrica que rodea un canal vascular (canal harvesiano), las osteonas se conectan entre sí mediante los canales transversales de Volkman.

El hueso trabecular se encuentra entre las superficies del hueso cortical y consiste en múltiples celdas en forma de panal con elementos hematopoyéticos en su interior. Las trabéculas se orientan predominantemente de forma perpendicular a las fuerzas externas para dar soporte estructural.

El tejido óseo incluye un componente mineral, la hidroxiapatita que contribuye sobre todo a dar rigidez; un componente orgánico, el colágeno tipo I que condiciona su resistencia y una fase acuosa. Sus componentes celulares son: las células precursoras de las células osteogénicas, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y elementos hematopoyéticos de la médula ósea (Tamayo JA, 2013).

1.1.2 Remodelación ósea.

La remodelación del tejido óseo en condiciones normales es un proceso complejo de equilibrio entre la resorción y formación controlada por los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos principalmente, y tiene fases secuenciales que incluyen el reclutamiento y la activación de los osteoclastos que resorben el hueso, seguido de la resorción ósea durante 2-4 semanas; la resorción ósea es seguida por un período prolongado de formación ósea. Los sitios de remodelación pueden desarrollarse al azar a una tasa baja, pero parecen concentrarse en áreas de micro daños que requieren reparación (Iñiguez-Ariza, 2015).

La formación, activación y reabsorción de los osteoclastos, considerada en la **fase de reabsorción**, se regula mediante la relación del ligando activador del receptor del factor nuclear κ B (RANKL) a la osteoprotegerina (OPG) y la exposición de los pre-osteoclastos a la interleucina 1 (IL -1) y la interleucina 6 (IL-6), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), la hormona paratiroidea (PTH), la 1,25-dihidroxitamina D y la calcitonina. Los osteoclastos multinucleados activados secretan iones de hidrógeno H^+ a través de bombas de protones -ATPasa y los canales de cloruro, con la finalidad de bajar el pH a 4 o 5 dentro del compartimiento de resorción ósea, lo que ayuda a solubilizar el mineral óseo. Los osteoclastos cuando están activados para digerir la matriz orgánica segregan, por medio de sus lisosomas citoplasmáticos, fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), la catepsina K, la metaloproteínasa-9 de la matriz (MMP-9), y gelatinasa, lo que resulta en la formación de lagunas de Howship que tienen forma de platillo en la superficie del hueso trabecular y forma los túneles de resorción en el hueso cortical. La fase de reabsorción se completa cuando los osteoclastos multinucleados dejan de funcionar y sufren apoptosis (Fig. 1).

En la fase de reversión o formación las señales de acoplamiento, que incluyen factores derivados de la matriz ósea como: factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β), factor de crecimiento insulínico 1 y 2 (IGF-1), (IGF-2), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) actúan en la formación de hueso y cartílago. El TGF- β liberado de la matriz ósea disminuye la resorción ósea de los osteoclastos inhibiendo la producción de RANKL por los osteoblastos (Figura 1).

La fase de inversión normalmente, tarda de 4-6 meses en completarse (en el hueso mandibular tarda 5 meses). Los osteoblastos sintetizan nueva matriz orgánica y regulan la mineralización de la matriz. Al completarse la formación ósea, alrededor del 50-70% de los osteoblastos sufren apoptosis y los restantes se convierten en osteocitos o células del revestimiento óseo. El equilibrio óseo es la diferencia entre el hueso viejo reabsorbido y el hueso nuevo formado.

Entre los principales **marcadores bioquímicos** presentes en el proceso del remodelado óseo observamos marcadores denominados de formación y de resorción.

Entre los **marcadores de formación se encuentran:**

1. Fosfatasa alcalina específica del hueso: juega un papel muy importante en la mineralización y en la formación de osteoide (Evia, 2011).
2. Osteocalcina. Es una proteína sintetizada por los osteoblastos maduros, odontoblastos y condrocitos. Se caracteriza por contener tres residuos del aminoácido ligador de calcio: ácido gamma-carboxi-glutámico. Se considera un marcador sensible y específico de la actividad osteoblástica. Aunque también puede derivar de la resorción ósea.
3. Propéptidos del procolágeno, amino y carboxi terminales, del colágeno tipo 1. Son fragmentos procedentes de la ruptura por endoproteinasas del colágeno tipo 1 recién formado. Se considera que reflejan la fase colágena de la formación ósea, aunque pueden proceder de otros tejidos (piel, tendones, cartílago, válvulas cardiacas, grandes vasos, etc.).

Marcadores de resorción ósea son:

1. Hidroxiprolina. Es un aminoácido presente en todos los tipos de colágeno, liberado tras la ruptura enzimática del colágeno 1.
2. Galactosil-hidroxilisina y glucosil-galactosil-hidroxilisina. Ambas se sintetizan durante la síntesis de pro-colágeno, para la formación de osteoide.
3. Puentes de piridinolina y desoxipiridinolina. Son lugares de unión entre las moléculas de colágeno tipo 1. Cuando el colágeno se metaboliza pueden liberarse puentes de piridinolina o desoxipiridinolina (libres o asociados a péptidos) o bien formar parte de los telopéptidos amino (N-terminal) o carboxiterminal (C-Terminal) del colágeno. Los puentes de desoxipiridinolina se consideran los marcadores más específicos del recambio óseo.
4. Los puentes de telopéptidos hacen referencia a los productos de degradación del colágeno, proceden de la región amino o carboxi terminales.
5. Fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP). Es sintetizada y secretada por los osteoclastos durante la resorción activa del hueso.
6. Sialoproteína ósea. Es una fosfoproteína no colágena abundante en el hueso. Es sintetizada por los osteoblastos y por algunos osteoclastos, se ha demostrado que refleja procesos asociados con la resorción ósea (Lafita, 2003).

En el proceso del remodelado óseo participa una compleja red de elementos celulares, bioquímicos y mecánicos que interaccionan y actúan equilibradamente, la alteración de cualquiera de esos elementos desequilibrará el proceso hacia de un balance negativo, con un predominio de la resorción que llevará a una pérdida ósea y a una alteración de la microarquitectura y, por tanto, a la osteopenia y posteriormente, a la osteoporosis. (Tejada Romero, 2014.)

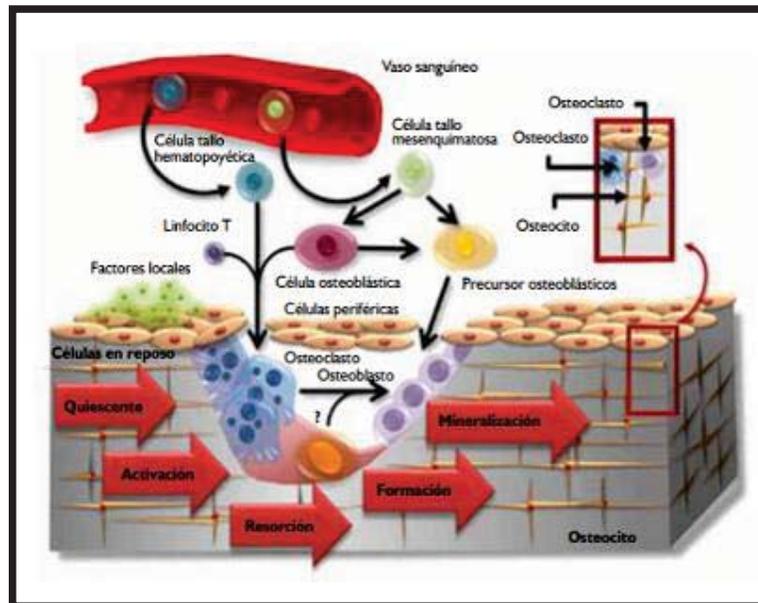


Figura 1 Fases del remodelado óseo en la superficie del hueso trabecular. Origen y localización de las células óseas (Evia, 2011).

La remodelación ósea se ve acelerada en las mujeres alrededor del tiempo de la menopausia, y continúa así durante los primeros 5 a 10 años después de la menopausia; después de este período la remodelación ósea se ralentiza, pero aún sí, continúa a un ritmo más rápido que la remodelación de las mujeres pre-menopáusicas. La remodelación ósea también aumenta ligeramente con el envejecimiento en los hombres.

Las mujeres pueden empezar a perder hueso trabecular aproximadamente a los 35 años de edad y hueso cortical aproximadamente a los 40 años. Durante su vida, las mujeres pueden perder hasta el 30 % de hueso cortical, que representa aproximadamente 4 de 5 partes del esqueleto. También pueden perder hasta el 50% de su hueso trabecular (Calleja-Quevedo E, 2009).

Durante la vida adulta, el equilibrio óseo en el área del periostio es ligeramente positivo, mientras que el equilibrio óseo endosteal y trabecular son ligeramente negativos. Normalmente, la reabsorción endosteal es más rápida que la formación periosteal durante el envejecimiento (Iñiguez-Ariza, 2015).

1.2 OSTEOPOROSIS

Desde su descubrimiento, por Albright en los años 50's, la osteoporosis ha recibido diversas e incompletas definiciones. Actualmente, la definición más aceptada es la del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (National Institute of Health (NHI), que la define como: "una enfermedad de todo el esqueleto caracterizada por una masa ósea baja y una

alteración de la micro arquitectura ósea que condiciona un hueso frágil, con el consecuente incremento en el riesgo de fracturas” (Mendoza Hermoso, 2003).

La osteoporosis se caracteriza por un desacoplamiento en el proceso de remodelado óseo, por el incremento de la resorción, y por la disminución de la formación o la alteración de ambos procesos simultáneamente. En México, la osteoporosis debe considerarse un problema de salud pública, ya que la pirámide poblacional se está invirtiendo en nuestro país debido a un número creciente de personas de edad avanzada y un aumento en la esperanza de vida de casi 39 años en promedio durante las últimas siete décadas (de 36.2 a 75 años). Actualmente, la población mayor de 50 años de 19 millones, y aumentará a 55 millones para el año 2050. Para entonces, la esperanza de vida promedio en México será de 82 años. Debido a que la osteoporosis es una enfermedad asociada a el envejecimiento, se espera que el número de fracturas osteoporóticas aumente en consecuencia.

Se prevé que las fracturas de cadera en todo el mundo aumentaran a 2,6 millones en el 2025 y a 4,5 millones en el 2050, suponiendo que no haya cambios en la incidencia específica por edad y sexo. La gran mayoría de las fracturas de cadera en el siglo XXI ocurrirán en los países en desarrollo; se estima que Asia y América Latina son las dos regiones que tendrán los mayores incrementos (Clark, 2010).

Datos recientes en la literatura sobre las tasas de osteoporosis y osteopenia en México diagnosticadas con la técnica de absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) de acuerdo con los criterios de clasificación de la OMS nos indican que diferencias significativas entre la DMO.

Datos recientes (Deleze, 2000) sobre las tasas de osteoporosis y osteopenia en mujeres mexicanas, diagnosticadas con la técnica de absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) y siguiendo los criterios de clasificación de la OMS, indican que existen diferencias significativas entre la densidad Mineral Ósea (DMO) de hueso de cuello lumbar y femoral. Delezé y cols realizaron un estudio en 4 460 mujeres de entre 20 y 69 años de edad en áreas urbanas de tres regiones de México: Mexicali, Monterrey, Obregón, Hermosillo y Durango (zona norte); Guadalajara, León, Ciudad de México y Puebla (zona central); Mérida (sureste). Los resultados indicaron que las mujeres en el

Norte tenían una DMO más alta en la columna lumbar que las mujeres del Centro o del Sur, pero también observaron que estas mujeres eran significativamente más grandes (en masa corporal) y más altas que las mujeres del centro o del sur del país.

Por su parte, en el programa: Estudio Latinoamericano de Osteoporosis Vertebral (LAVOS), se evaluó la DEXA central de columna vertebral y fémur en 807 hombres y mujeres 50 años y más. La osteoporosis se diagnosticó en el 9% de los hombres y en el 17% de las mujeres, y la osteopenia en la columna lumbar en el 30% de los hombres y en el 43% las mujeres. La osteoporosis para el fémur total se encontró en el 6% de los hombres y el 16% de las mujeres y la osteopenia en el 56% de los hombres y el 41% de las mujeres (Clark, 2010).

La osteoporosis primaria puede ocurrir en ambos sexos en todas las edades, pero a menudo se presenta después de la menopausia en las mujeres y se produce más tarde en la vida en los hombres. En general, es más frecuente en mujeres posmenopáusicas a causa de la atrofia ovárica y de la reducción en los niveles de estrógenos; que da como consecuencia una disminución en la absorción del calcio, lo que conduce a la pérdida ósea. Esta pérdida ósea conduce a un aumento de la fragilidad ósea y al riesgo de fractura; a medida que aumenta el envejecimiento de la población, la osteoporosis debe considerarse un problema de salud pública cada vez mayor (Liu Z., 2015).

La osteoporosis secundaria es el resultado del consumo de algunos medicamentos (glucocorticoides), otras afecciones o enfermedades (hipogonadismo) y enfermedad celíaca. Esta condición causa un desequilibrio entre la formación ósea y la reabsorción y conduce a la pérdida ósea. La remodelación ósea es un proceso de por vida que implica la formación ósea (mediada por osteoblastos) y la resorción ósea (mediada por osteoclastos); la osteoporosis conduce a un desequilibrio entre la formación ósea y la resorción.

1.2.1 Fisiopatología

En la osteoporosis, la reabsorción es mayor que la formación ósea, de modo que se produce un balance negativo con una pérdida neta de hueso y un creciente riesgo de fracturas, lo que ocasiona deformidades y dolor crónico. El dolor nocirreceptivo (Pedrajas Navas, 2008) se considera crónico cuando ha estado presente durante al menos 3 meses.

El desequilibrio entre la formación y la reabsorción ósea podría producirse como resultado de uno o de una combinación de los siguientes factores:

- Aumento de la reabsorción ósea dentro de una unidad de remodelación.
- Reducción de la formación ósea dentro de una unidad de remodelación.

Las hormonas gonadales, predominantemente los estrógenos, juegan un papel importante en la regulación del intercambio óseo. Los estrógenos regulan los niveles de interleucina 6 (IL-6), que es un fuerte factor pro osteoclástico. En ausencia de estrógenos durante la menopausia, los niveles de IL-6 aumentan induciendo altos niveles de actividad osteoclástica y pérdida ósea (Soler, 2014).

1.2.2 Características clínicas

La osteoporosis también es conocida como la “enfermedad silenciosa” ya que la pérdida ósea en sí, no provoca ningún síntoma. Los pacientes pueden estar asintomáticos durante años, hasta que comienzan a producirse las fracturas. La mayor parte del dolor crónico característico de la osteoporosis es el resultado de las fracturas, que se pueden desarrollar después de un traumatismo mínimo, desapercibido o inexistente. Finalmente, las múltiples fracturas torácicas por compresión provocan cifosis dorsal, con una exagerada lordosis cervical (“joroba de viuda”). El estrés anormal en los músculos espinales y los ligamentos ocasiona un dolor crónico, sordo y punzante, particularmente en la parte baja de la espalda (Pain, International Association for the Study of Pain, 2009).

Sobre la osteoporosis en mandíbula, algunos estudios epidemiológicos han informado de una correlación positiva entre la osteoporosis sistémica y la pérdida ósea en la mandíbula. Está pérdida, se ve aumentada por factores como: dientes perdidos, baja densidad mineral en la mandíbula, cambios visibles radiográficamente en la corteza inferior mandibular y la resorción residual de la cresta alveolar. Además, se ha demostrado mediante tomografía computarizada, que la densidad mineral ósea en mandíbula en el área de los cóndilos disminuye rápidamente después de la menopausia, y que esta pérdida está correlacionada con la DMO en las vértebras (Tejada Romero, 2014.).

1.2.3 Factores de riesgo

Tabla 1 Factores predisponentes para la osteoporosis. (Calleja-Quevedo E, 2009)

<p>Genéticos y constitucionales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Edad • Sexo femenino • Raza caucásica o asiática • Índice de masa corporal bajo: $<19\text{kg}/\text{m}^2$ • Menarquia tardía • Menopausia precoz (o quirúrgica) • Insuficiencia de la piel para la biotransformación de la vitamina D • Osteogénesis imperfecta • Hipofosfatemia • Hipomocistinuria 	<p>Antecedentes heredofamiliares</p> <ul style="list-style-type: none"> • Osteoporosis y/o fractura de cadera • Artritis reumatoide • Enfermedades articular degenerativa
<p>Antecedentes traumáticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inmovilización prolongada • Fracturas 	<p>Antecedentes personales patológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alcoholismo • Tabaquismo • Amenorrea prolongada • Síndrome de mala absorción • Enfermedad hepática crónica • Hipercalciuria • Litiasis renal • Hipogonadismo en varones • Diabetes mellitus
<p>Antecedentes nutricionales y de estilo de vida</p> <ul style="list-style-type: none"> • Falta de insolación • No lactar o lactar más de 6 meses • Secuestradores de calcio (café, té, embutidos) • Ingesta inadecuada de calcio y de vitamina D • Intolerancia a la lactosa • Malnutrición calórica-proteica • Ingesta excesiva de proteínas o dieta 	<p>Medicamentos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antiácidos con fosfato de aluminio • Anti depresores y ansiolíticos • Glucocorticoides • Anti andrógenos y tiroxina en exceso • Anticoagulantes • Furosemida • Litio • Quimioterápicos • Tamoxifeno

1.2.4 Diagnóstico y tratamiento

La osteoporosis se diagnostica por medio de:

- Medición de la DMO por medio de DEXA.
- La presencia de una fractura por baja DMO en la columna o la cadera.
- La intensidad del dolor nocirreceptivo, que puede medirse usando una escala de calificación numérica (Pain, 2009).

1.2.5 Criterios de la OMS para el diagnóstico con DEXA

Tabla 2 Criterios de la OMS (Calleja-Quevedo E, 2009)

Osteoporosis	T-score -2.5 o menor
Osteopenia	T-score entre -2.5 y -1
Normal	T-score >-1

T-score es igual a la densidad mineral ósea.

1.2.6 Medicamentos aprobados por la Secretaria de Salud en México para tratar la osteoporosis postmenopáusica.

Tabla 3 Medicamentos aceptados y disponibles para la osteoporosis en México (Clark, 2010).

Nombre genérico y dosificación	Indicación
Risedronato 5, 30 y 35 mg	<ul style="list-style-type: none"> • Prevención y tratamiento de osteoporosis posmenopáusica y osteoporosis inducida por esteroides. • Tratamiento para la enfermedad de Paget.
Raloxifeno 60 mg	<ul style="list-style-type: none"> • Prevención y tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. • Prevención del cáncer de mama en la osteoporosis posmenopáusica.
Solución de calcitonina 50 y 100 UI de aerosol nasal 200 UI	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de osteoporosis, dolor óseo y osteopenia.
Alendronato 10, 70 y 70 mg con vitamina D	<ul style="list-style-type: none"> • Prevención y tratamiento de osteoporosis posmenopáusica y osteoporosis inducida por esteroides. • Tratamiento para la enfermedad de Paget.
Calcitriol 0,25 µg	<ul style="list-style-type: none"> • Osteoporosis posmenopáusica, hipertiroidismo, osteodistrofia renal, hipotiroidismo, raquitismo.
Alfacalcidol	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. • Prevención de caídas.
Teriparatida 20 µg	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de osteoporosis posmenopáusica en mujeres y osteoporosis en hombres con alto riesgo de fracturas, fracturas previas y

	fracturas múltiples.
Ranelato de estroncio 2 g	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica.
Ibandronato 3 mg / ml y 150 mg	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. • Para la prevención de la osteoporosis y las fracturas por fragilidad.
Ácido Zolendrónico 5 mg / 100 ml	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica. • Prevención de fracturas. • Tratamiento de la enfermedad de Paget.

Los objetivos fundamentales del tratamiento para el manejo de los pacientes con osteoporosis son:

- ✓ Prevenir las fracturas.
- ✓ Reducir el dolor cuando se manifiesta.
- ✓ Mantener la función.

Como ya se sabe, la Osteoporosis afecta la remodelación ósea haciendo más lento el proceso de remodelado, ya que rompe el equilibrio entre la formación ósea por parte de los osteoblastos y la resorción ósea por parte de los osteoclastos. Es de interés para este trabajo de tesis estudiar cómo se relaciona la osteoporosis con la pérdida de hueso alveolar y cortical en la mandíbula, con el objetivo de abordar y estudiar nuevas estrategias de la ingeniería de hueso en su regeneración, cuando está presente el proceso patológico de la osteoporosis.

Entre los elementos propuestos en la Ingeniería de Tejidos, los biomateriales tienen gran potencial, ya que poseen la estructura que puede dar alojamiento a las células que pueden generar tejido óseo.

1.3 BIOMATERIALES (CERÁMICAS)

Los biomateriales pueden definirse como materiales implantables en el cuerpo humano, que en contacto con tejidos vivos, tienen como objetivo final lograr una correcta interacción biológica entre el material y el receptor.

Los andamios, que son membranas o matrices de soporte mecánico, son fundamentales para la Ingeniería de Tejidos. Idealmente deben ser biocompatibles, no inducir una respuesta tisular adversa y deben sostener temporalmente la carga mecánica sobre el tejido; también deben tener una tasa de degradación equivalente a la del proceso de regeneración del tejido, una porosidad interconectada con una distribución de tamaño de poro que promueva la invasión celular y del tejido, permitir el tráfico de metabolitos, y poseer una elevada área superficial para el anclaje celular. Debe además, propiciar el reconocimiento biológico, de tal forma que dé soporte y promueva adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. Finalmente, debe constituir un nicho adecuado para el desarrollo de tejido vivo, que permita secuestrar y liberar factores de crecimiento (Vallet-Regí, 2011).

En la Ingeniería de Tejidos óseos se requiere que el andamio actúe como una plantilla 3D para el crecimiento de hueso, que sus productos de degradación no sean tóxicos, que promueva la osteogénesis induciendo adhesión, proliferación y actividad celular, y cuente con propiedades mecánicas que se correspondan con las del hueso natural para que se adapte a la forma y tamaño de los defectos óseos. Estos andamios deben ser fabricados y esterilizados de acuerdo con las normas internacionales para la producción comercial y el uso clínico de dispositivos biomédicos. Además, si el andamio es temporal, debe reabsorberse al mismo tiempo que el hueso se repara.

En la aplicación de biomateriales en la Ingeniería de tejido óseo, las especificaciones o propiedades son:

- ✓ Osteoinducción: Se refiere a cualidad del biomaterial de reclutar e inducir a las células troncales indiferenciadas en células osteoprogenitoras.
- ✓ Osteoconducción: Es la cualidad del biomaterial de atraer a las células con potencial osteogénico a migrar a su superficie y mantenerse ahí.

- ✓ Biocompatibilidad: Es la integración adecuada del biomaterial al tejido del huésped sin generar efectos tóxicos o causar respuesta inmune. También es la tolerancia del huésped al biomaterial.
- ✓ Porosidad: Debe contener una estructura y dimensiones de poro idóneas (entre 100 y 500 μm en hueso) que permita la difusión de nutrientes, gases y desechos metabólicos. Si los poros son demasiado pequeños, la migración celular es limitada, esto a su vez puede limitar la difusión de los nutrientes y la eliminación de los residuos metabólicos generando una región necrótica dentro del constructo.
- ✓ Propiedades de la superficie: Estas controlan y afectan la adhesión y proliferación celular. Las propiedades químicas están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material.
- ✓ Propiedades mecánicas: el biomaterial debe de soportar las fuerzas a las que será sometido en el organismo para ejercer su función.
- ✓ Biodegradabilidad. Debe contar con tasas de resorción que igualen a las de formación ósea, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, el biomaterial se haya degradado totalmente.

Los biomateriales se han clasificado de diversas maneras, cuando son clasificados de acuerdo con la respuesta que produce el huésped:

- ✓ Biotolerados: Son encapsulados por una capa de tejido conjuntivo fibroso, algunos ejemplos pueden ser: el acero inoxidable y Cr-Co.
- ✓ Bioinertes: La superficie del material está cubierta por una capa de óxido estable y presenta contacto directo con el órgano a reparar.
- ✓ Bioactivos: producen un enlace químico directo gracias a su capacidad para fijar proteínas inductoras en la superficie.

Los vidrios bioactivos tienen propiedades versátiles y pueden ser diseñados apropiadamente dependiendo de su composición. El primer vidrio bioactivo fue el Bioglass[®] (un sistema $\text{SiO}_2\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$), sintetizado por Hench y cols (Hench, 1971) a principios de los años setentas, y desde entonces, muchos otros cristales de silicato, borato y fosfato han sido propuestos para su aplicación en la Ingeniería de Tejidos óseos. Se han producido y probado en forma de polvo, partículas, granulados y en diversas formas y

tamaños, y sólo un grupo limitado de investigadores los ha producido en forma de andamios porosos.

Chevalier y Gremillard clasificaron a las cerámicas usadas en la Medicina (anexo #1) (Chevalier, 2009). En cuanto a los biomateriales dedicados a la sustitución de los tejidos duros, su bioactividad debe considerar la capacidad del material para unirse al hueso, creando una interfaz estable con el hueso del huésped y eventualmente promover la regeneración natural del hueso. En esencia, esta capacidad es posible gracias a la formación de hidroxiapatita (HA) en la superficie del biomaterial, con la cual se imitan las características cristalográficas y químicas del mineral óseo.

Desde un punto de vista de composición, los vidrios bioactivos pueden ser básicamente divididos en tres grupos: 1) SiO_2 que son silicatos, 2) B_2O_3 basados en el borato, y 3) P_2O_5 basados en fosfato.

El primer grupo, de los silicatos, incluye una amplia gama de formulaciones de vidrio, incluyendo Bioglass®. El segundo grupo son menos conocidos, y presentan propiedades bioactivas incluso superiores a las de los vidrios de silicato. El tercer grupo, vidrios a base de fosfato, pueden ser tanto bioactivos como bioreabsorbibles (Baino, 2011).

1.4 FUNCIONALIZACIÓN

Con el objetivo de controlar el tamaño de poro y las propiedades de la superficie, así como proporcionar a los materiales una mayor estabilidad térmica, mecánica o estructural, a los materiales mesoporosos de sílice se les incorporan componentes orgánicos en su superficie o en su estructura (atrapados en sus canales). Esto implica la modificación con agentes sililantes portadores de especies orgánicas que reaccionan con los grupos silanol de la superficie, tanto interna como externa. De esta forma, se emplea una especie química del tipo Si-R, donde R representa un radical orgánico que se une de manera covalente al átomo de oxígeno del grupo silanol, Si-OH, formando enlaces del tipo Si-O-R. Existen dos diferentes métodos de funcionalización: el método de co-condensación y el método post-síntesis

El **método de co-condensación** consiste en la reacción entre un tetra-alcoxisilano (Si-OR₄) y uno o más organosilanos (OR₃-Si-R') que contienen al menos un enlace Si-C. En este método el precursor del grupo funcional se incorpora desde el principio al gel de síntesis desde el principio y se produce la hidrólisis conjunta de los precursores del esqueleto inorgánico de sílice y del alcóxido de silicio. Así se obtienen materiales mesoporosos funcionalizados en una sola etapa en los que los grupos orgánicos son componentes directos de la pared silíceo y están proyectados hacia el exterior. Se consigue una funcionalización homogénea ya que los grupos orgánicos se distribuyen uniformemente en los canales; además, permite ejercer un buen control en la cantidad de grupos funcionales incorporados en la estructura. Sin embargo, no es conveniente excederse con la concentración del agente funcionalizante ya que puede ocasionar una disminución en el orden de la estructura obtenida. Finalmente, la eliminación del disolvente se suele llevar a cabo por extracción química con disolventes para evitar dañar los grupos funcionales incorporados.

Un método alternativo de funcionalización es el **método post-síntesis**, también denominado método de anclaje. En este caso se hace reaccionar el alcóxido de silicio con el material mesoporoso previa eliminación del surfactante. De esta manera, todos los grupos funcionales incorporados están anclados y expuestos hacia el exterior. Mediante el anclaje post-síntesis, los materiales presentan estructuras más definidas y mayor resistencia a la hidrólisis, permitiendo además un control más sencillo del tamaño de poro.

No obstante, si los agentes sililantes reaccionan preferentemente a la entrada de los poros o se autocondensan, la difusión hacia el centro de los canales puede verse impedida. Esto conlleva una distribución poco homogénea de los grupos orgánicos y un bajo grado de ocupación. Para evitar estos inconvenientes las reacciones de funcionalización se llevan a cabo en condiciones anhidras. Así mismo, se ha estudiado el uso de catalizadores en medio polar para aumentar la cantidad de grupos orgánicos incorporados (Figura 2) (Peña J, 2000) (Peña J., 2006).

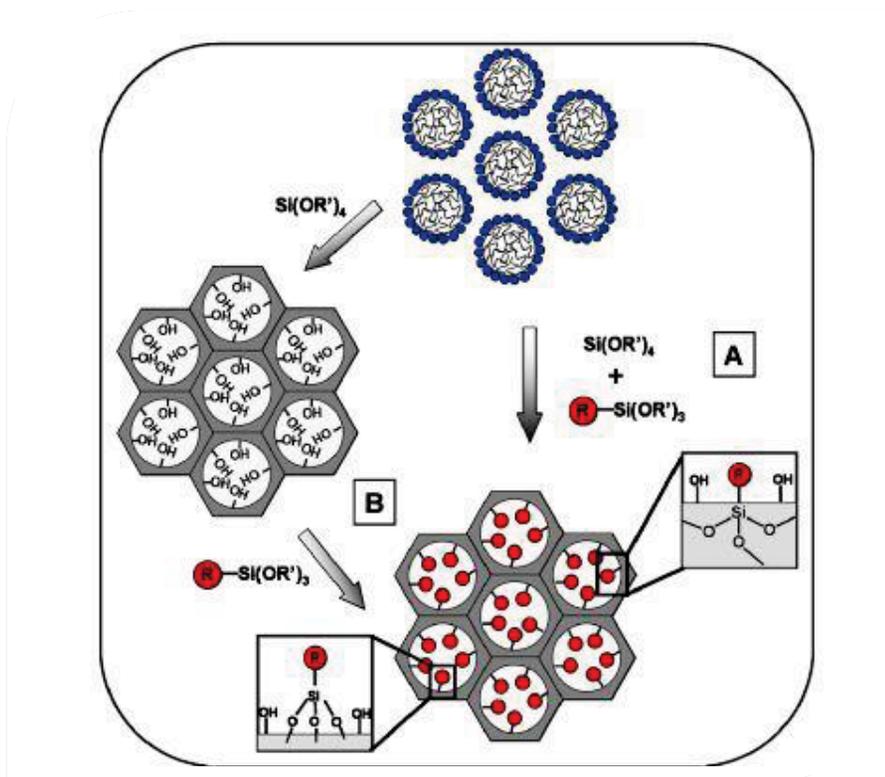


Figura 2 Imagen del método de funcionalización (Peña, 2000)

Un material diseñado y elaborado con estas características tendrá propiedades de osteoconducción para las células óseas; sin embargo para darle características de osteoinductividad se requiere de agregar moléculas o factores de crecimiento que actúen como señales para que las células e induzcan su diferenciación a la línea osteogénica y al mismo tiempo les den indicaciones para que creen un área de hueso nuevo.

1.5 HORMONA PARATIROIDEA

La hormona paratiroidea (PTH) es una hormona peptídica de 84 aminoácidos sintetizada en las células principales de las glándulas paratiroides. Es esencial para el mantenimiento de la concentración sérica de calcio a través de acciones directas sobre los huesos y los riñones, e indirectamente a través de acciones en el tracto gastrointestinal. La PTH también regula el metabolismo del fósforo, disminuye sus niveles séricos a través de la inhibición de la reabsorción renal de fosfato tanto en los túbulos proximales como distales, aunque el efecto proximal es cuantitativamente más importante.

Uno de los mecanismos clave con los que la PTH regula la homeostasis del calcio está relacionado con sus acciones para estimular la remodelación ósea, la PTH estimula la resorción ósea como la formación ósea, el resultado final en la masa ósea, ya sea catabólica o anabólica, dependerá de la dosis y la periodicidad de la señal de PTH. La exposición continua a la PTH produce efectos catabólicos en el esqueleto, mientras que las bajas dosis intermitentes producen efectos osteo-anabólicos. En humanos, el exceso de PTH se denomina hiperparatiroidismo primario (HPTP) e incluso en la forma asintomática, conduce a la pérdida ósea en el hueso cortical y trabecular (Neer, 2001).

Por el contrario, el péptido amino terminal acortado de PTH, la denominado: teriparatida [PTH (1-34)] y la molécula de longitud completa [PTH (1-84)] son considerados como péptidos osteo-anabólicos cuando se administran una vez al día en dosis bajas para el tratamiento de la osteoporosis (Neer, 2001).

Las acciones de PTH están mediadas principalmente por un receptor de PTH conocido como receptor 1 de la PTH (PTH1R). La administración continua o intermitente de PTH, pueden regular, en las células óseas, diferentes conjuntos de genes o, alternativamente, los mismos conjuntos de genes de forma sostenida o transitoria, favoreciendo la resorción ósea o la formación de hueso respectivamente (Silva, 2015).

1.6 PTHrP

La proteína relacionada con la PTH (PTHrP) se identificó inicialmente como el principal factor patogénico de la hipercalcemia tumoral de origen humoral. Posteriormente, se demostró su expresión en la mayoría de los tejidos normales, donde ejerce acciones de citoquina tisular ya sea durante el desarrollo como en el adulto. La PTHrP difiere completamente de la PTH más allá de la región homóloga N-terminal, siendo su región C-terminal más larga que en la PTH, contiene distintos epítomos singulares, asociados a efectos auto/paracrinos e intracrinos en distintos tipos celulares. Como consecuencia de su procesamiento post-trasduccional, la PTHrP puede generar distintos fragmentos bioactivos: 1) un fragmento N-terminal 1- 36; 2) uno o varios fragmentos en la región media, cuyos aminoácidos 88-91 y 102- 106 son dominios de localización nuclear/nucleolar (NLS); y 3) un fragmento C-terminal a partir del aminoácido 107, que contiene la secuencia 107-111 conocida como “osteostatina” (Ost), con propiedades antiresortivas. De modo similar a la PTH, la administración continua del fragmento N-terminal de la PTHrP aumenta la resorción, mientras su administración intermitente aumenta fundamentalmente la formación ósea (Lopez-Herradón, 2014) e inhiben la reabsorción de osteoclastos aislados con concentraciones medias máximas de 10^{-15} M (Cornish, 1997). Además, ambos péptidos C-terminales de la PTHrP también afectan a la diferenciación y supervivencia osteoblásticas, al parecer a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC); aunque aún no se ha logrado aislar un receptor para esta región C-terminal de la PTHrP.

Este receptor también está ampliamente distribuido, lo que sugiere que la PTHrP actúa de manera autocrina/paracrina en los tejidos normales. Múltiples tipos de células segregan fragmentos de PTHrP, que incluyen el dominio 1-36 y otros fragmentos C-terminales poco caracterizados. Se ha demostrado que uno de estos fragmentos putativos, PTHrP (107-139), tanto *in vitro* como *in vivo*, afecta el crecimiento y la diferenciación osteoblástica, que probablemente estén mediados por su interacción con un receptor específico no identificado, diferente del PTH1R, que también podría estar presente en otros tipos de células óseas y no óseas, y parece interactuar con la activación de la proteína quinasa (PK) (Valín, 2001).

Se ha demostrado que la PTHrP- (1-141) recombinante de longitud completa inhibe la resorción ósea por medio de la inactivación de osteoclastos aislados. Fenton y cols demostraron que los efectos anti-osteoclásticos de PTHrP residen en la región C-terminal

del péptido más allá de los residuos 106. Esta actividad ha sido denominada como: osteostatina, PTHrP- (107-139) ó PTHrP (107-111).

Cualquiera de las tres isoformas de la osteostatina posee tres dominios principales: el N-terminal, la región media y el C-terminal. **El dominio N-terminal** comprende los aminoácidos 1-36, presenta homología con la PTH (por su composición amino/acídica entre los aminoácidos 1 y 13 y estructural del 14 al 36). Este fragmento, originado por acción de endopeptidasas entre los aminoácidos 36 y 38, es secretado e interacciona con el receptor PTH1R.

Estudios recientes indican que aunque la PTH y la PTHrP interaccionan con este receptor, las vías intracelulares activadas respectivamente podrían ser diferentes.

La región media, comprendida entre los aminoácidos 38 y 106, tiene una función y tamaño exacto desconocidos. Además, podría ser transportado al núcleo y ejercer acciones intracrinias, ya que posee secuencias de localización nuclear (NLS) entre los aminoácidos 87 y 106. De hecho, recientemente se ha descrito una posible traducción alternativa de la PTHrP, a partir de codones CUG situados en la secuencia correspondiente a la pre-proteína, que liberaría a la proteína de la secuencia de enlace al retículo endoplásmico, facilitando su transporte al núcleo.

Por otro lado, el **dominio C-terminal** de la PTHrP, que confiere la diferencia a las 3 isoformas de la proteína, comprende los aminoácidos 107- 139, 107-141 o 107-173, en función de la isoforma. De esta región, los fragmentos 107-112 y 107-139, limitados por aminoácidos básicos que podrían ser reconocidos por endopeptidasas, son potentes inhibidores de la actividad osteoclástica (Esbrit P. &, 2000) (de Castro Díaz, 2009).

La proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), es un modulador clave de la formación y remodelación ósea; que ha demostrado tener efectos de tipo osteogénico en experimentos tanto in vivo como in vitro, y sugieren que puede ser un agente útil para promover la regeneración ósea y revertir la pérdida de estructura y masa óseas en individuos sanos y con osteoporosis (Lozano Borregón, 2010) (Trejo, 2010) (Lozano D. M.-R.-B., 2010).

2.1 ANTECEDENTES

En los últimos años, muchos estudios han demostrado la relación entre la osteoporosis sistémica y la pérdida de masa ósea mandibular. Las ratas ovariectomizadas han sido ampliamente utilizadas como modelo experimental para el estudio de la osteoporosis posmenopáusica en la columna vertebral y los huesos largos. Sin embargo, los estudios sobre la relación entre la pérdida ósea en la mandíbula y la deficiencia de estrógeno siguen siendo controvertidos.

Wende y cols en 1996 en su estudio evaluaron la DMO mediante el uso de absorciometría de rayos X en 70 mujeres de 51 a 78 años de edad, de Nueva York, que fueron reclutadas como voluntarias a través del Centro de Investigación de Enfermedades Periodontales y el centro de Investigación de Osteoporosis Ginecológica de la Universidad de Buffalo. Realizaron evaluaciones dentales, DMO, así como una historia médica y dental completa. En sus resultados observaron una correlación positiva entre la media de ACH (altura de la cresta alveolar interproximal) y la DMO de la espina. La relación entre los niveles de CAL (Clinical attachment loss = nivel de pérdida de la inserción clínica) y los de la DMO de la columna vertebral o el fémur no alcanzaron significación estadística. El número de dientes remanentes se correlacionó significativamente con el triángulo de Ward, por lo que concluyeron que la osteoporosis se correlaciona con la pérdida de hueso alveolar en las mujeres posmenopáusicas (Wactawski-Wende, 1996).

Anteriormente Kribbs y cols. (Kribbs, 1989) reportaron un estudio en el que evaluaron la masa ósea mandibular mediante radiografías en 85 mujeres posmenopáusicas de 50 a 84 años de edad con osteoporosis. Todas las participantes tenían evidencia radiográfica de fracturas y se sometieron a TBC (determinación y cuantificación de la masa ósea radial y vertebral). Para la evaluación a cada paciente se le realizó un examen intra-oral y radiografías periapicales, oclusales y panorámicas. Demostraron que hay relaciones significativas entre las mediciones de masa, densidad y grosor cortical mandibulares y la masa ósea del esqueleto en una población de mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, por lo que afirman que la osteopenia esquelética y mandibular está

relacionada. La masa ósea mandibular fue un mejor indicador de la masa esquelética que la DMO mandibular. La altura de la cresta alveolar edéntula se correlaciono con TBC, lo que sugiere que aquellas pacientes con osteoporosis más severa retienen menos hueso alveolar una vez que se extraen los dientes

Tanaka y cols (Tanaka, 2003) compararon el volumen y grosor del hueso trabecular mandibular, así como su reabsorción en un estudio en modelo de ratas con osteoporosis versus ratas sanas. Para su estudio emplearon 18 ratas Fischer hembras de 6 meses de edad 170-240g. Para obtener los datos de referencia se sacrificaron 6 ratas el día 0, las 12 ratas restantes se dividieron en 2 grupos de 6 ratas cada uno; un grupo fue OVX bilateralmente y el otro grupo se sometió a una operación simulada. Un año después, los animales fueron sacrificados y se realizó un estudio de micro CT en las mandíbulas derechas, y las mandíbulas izquierdas se fijaron en etanol para histomorfometría ósea. En sus resultados observaron que las trabéculas alveolares de ratas del grupo simulado tenían estructuras de red, mientras que las trabéculas de ratas del grupo OVX se fragmentaron. El volumen, el número y el grosor del hueso trabecular en el grupo OVX fueron significativamente más bajos que los encontrados en el grupo simulado, y la separación trabecular fueron 4 veces mayor en el grupo OVX que en el grupo simulado. La actividad formativa y de resorción ósea pareció ser moderadamente más alta en el grupo OVX que en el grupo simulado, pero solo la diferencia en la formación ósea fue de significación estadística. Concluyeron que la ovariectomía causa la resorción ósea muy acelerada en el hueso alveolar mandibular

Liu Zhongshuang y cols (Liu, 2015) realizaron un estudio en el que evaluaron el espesor trabecular y la separación trabecular en la modulación de la arquitectura trabecular del hueso mandibular en ratas ovariectomizadas. Emplearon 14 ratas hembras Wistar que dividieron al azar, en dos grupos: 1) ovariectomía bilateral (OVX grupo), y 2) cirugía simulada (grupo de tratamiento simulado). Cinco meses después de la cirugía, escanearon las mandíbulas con micro-CT. Y concluyeron que la pérdida ósea inducida por ovariectomía en el hueso mandibular puede estar relacionada con las variaciones de distribución de espesor trabecular y la separación que afectan profundamente la modulación de la arquitectura trabecular.

Bernabe y cols en 2012 realizaron un estudio en el que evaluaron la regeneración ósea en tibia de 64 ratas machos con GenOx[®] (matriz orgánica Baumer SA, Sao Paulo, Brasil; es un xenoinjerto bovino obtenido a través de la desproteínización de hueso a altas temperaturas entre 950°C y 1000°C) y GenDerm[®] (membrana ósea cortical descalcificada) en defectos óseos de tamaño crítico en tibias de ratas sanas. Los animales que fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos (n=16): el grupo I (control); grupo II (defecto cubierto de GenOx[®]); grupo III (defecto cubierto por GenDerm[®]); grupo IV (defecto cubierto de GenOx[®] y cubierto por GenDerm[®]). Los animales fueron sacrificados a los 30 y 90 días después de la cirugía. Después de evaluar los resultados todos los grupos experimentales demostraron una curación del hueso superior en comparación con el grupo control. Sin embargo, en muestras grupo IV se evidenció una curación más avanzada en ambos tiempos de estudio (30 y 90 días después de la cirugía) en comparación con los otros grupos experimentales, concluyeron que los resultados proporcionan evidencia de que el uso de biomateriales clasificados como sustitutos de hueso puede ser una opción clínica para la reconstrucción de defectos óseos extensos en tibia, debido al potencial de regeneración de los materiales y sus características físicas y biológicas (Bernabé, 2012).

En 2010, Lozano y cols. (Lozano D. M.-R.-B., 2010) observaron en cultivos de células osteoblásticas los efectos de los biomateriales mesoporosos SBA-15 cargados o no con osteostatina. Concluyeron que los biomateriales SBA-15 cargados con PTHrP (107-111) (osteostatina) presentan características osteogénicas en las células osteoblásticas. Esto se suma al conocido efecto inhibitor de este péptido sobre la resorción ósea, que podría mejorar la osteointegración y respaldan la hipótesis de que el recubrimiento de osteostatina confiere características osteogénicas a las cerámicas mesoporosas, lo que las hace adecuadas como supuestos biomateriales para acelerar la reparación ósea. Posteriormente, en otro estudio (Lozano D. T.-B., 2012), observaron la regeneración ósea en defectos de tamaño crítico de conejos con osteoporosis a través de implantes de biomateriales SBA15 funcionalizados con C8 de sílice cargados con osteostatina (PTHrP). Concluyeron que las cerámicas basadas en SBA15 que contienen PTHrP son biocompatibles e inducen el reclutamiento y la activación de osteoprogenitores para promover la regeneración ósea en conejos osteoporóticos.

En contraste, Moriya y cols en 1998 reportaron en 1998 un estudio en el que su objetivo fue observar la pérdida de hueso alveolar en ratas con OVX; para ello usaron 20 ratas Sprague-Dawley que dividieron en 2 grupos ratas con ovariectomía y ovariectomía simulada, que a su vez dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n=5) donde a cada grupo se les dio una dieta diferente. Grupo A= ovariectomía y dieta sólida estándar; Grupo B= ovariectomía y dieta deficiente en calcio; Grupo C= ovariectomía simulada y dieta sólida estándar; Grupo D= ovariectomía simulada y dieta deficiente en calcio; el tiempo de estudio fue de 4 semanas. La pérdida de hueso alveolar se midió desde la unión cemento-esmalte (CEJ) hasta la cresta ósea en el centro de la raíz mesial de los molares (M1, M2 y M3) utilizando el sistema de análisis de imagen computarizado. Las DMO de los maxilares, mandíbulas, fémures y tibias en el grupo C fueron significativamente más altos que en los Grupos B y D, pero no más altos que en el Grupo A. Concluyeron que la ovariectomía puede no ser capaz de causar destrucción periodontal y la pérdida de hueso alveolar (Moriya,1998).

En las publicaciones actuales no se encuentro registro de artículos utilizando el biomaterial APTS en la Ingeniería de Tejidos por ello los antecedentes citados el biomaterial es similar al nuestro, ya que tienen propiedad de biocerámicos y macroporosos. En los artículos revisados, encontramos que la biocerámica es un biomaterial ideal para la regeneración ósea en mandíbula y huesos largos por lo que se decidió utilizar el biomaterial APTS en un defecto crítico en mandíbula de rata.

2.2. JUSTIFICACIÓN

En México la osteoporosis y la fractura por fragilidad se han convertido en un problema de salud pública, reconocido por los Institutos Nacionales de Salud, ya que según datos del 2009, el 17% de la población total tiene 50 años o más, y se espera que para 2050, este sector de la población alcance hasta un 37%. En la actualidad el 17% de las mujeres y el 9% de los hombres padecen osteoporosis de la columna lumbar; el 16% de las mujeres y el 6% de los hombres tienen osteoporosis en la cadera; y una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres mayores de 50 años sufrirán fractura de cadera. En 2005 el número total de casos reportados de fractura de cadera fue de aproximadamente 21,000, y se proyecta que para el año 2050 alcancen los 110,055 casos, lo que representará un incremento del 431% (Clark, 2010).

En 2006, en México se reportó que el sector salud gastó más de \$97 millones de dólares por costos directos de fractura de cadera; la proyección para 2025 oscila entre \$213 a más de \$466 millones de dólares, y para el 2050 de \$555 a \$4088 millones de dólares (Clark, 2010).

En la práctica odontológica, uno de los más grandes retos es la reposición de tejidos que se han perdido por lesiones o patologías, en especial la reposición de hueso alveolar y cortical mandibular. Aunque el hueso sano conserva siempre su capacidad de regeneración, existen pérdidas óseas por procesos traumáticos o infecciosos que requieren tratamientos de regeneración; ejemplo de ello es la extracción dental que provoca la pérdida de hueso alveolar del 40 al 60% en los dos a tres primeros años de realizada, y que continua a través de la vida, sin tener en cuenta sexo, edad ni condición social. Esta atrofia ósea que se experimenta después de la pérdida de órganos dentarios es uno de los aspectos más preocupantes de la cavidad oral. Además de la recuperación del contorno, altura y forma ósea, también es importante la calidad ósea después de la eliminación de procesos destructivos que afectan los huesos maxilares. Esta pérdida ósea se ve acentuada por padecimientos sistémicos como la osteoporosis (Gómez Arcila, 2014).

Un reborde alveolar adecuado es fundamental para el éxito de la rehabilitación funcional de las arcadas dentarias. En pacientes con atrofia alveolar se requieren técnicas

que permitan aumentar el tejido óseo antes de implementar una rehabilitación protésica convencional o a colocar implantes osteointegrados, y aunque existen algunos métodos para la regeneración ósea que ya son usados en clínica, todos ellos requieren ciertas indicaciones específicas y tienen varias limitaciones (Gómez Arcila, 2014).

La ingeniería tisular propone nuevas terapias que implican la regeneración o reemplazo de tejidos u órganos a través de constructos tridimensionales tisulares que les devuelven la forma y función. Ésta se basa en tres pilares fundamentales: células madre y células progenitoras, andamiajes (biomateriales naturales y sintéticos) y factores bioquímicos (señales y factores de crecimiento). El objetivo de la presente tesis fue evaluar el uso de un biomaterial mesoporoso bioactivo cargado con PTHrP en un modelo de osteoporosis.

2.3 OBJETIVO

Evaluar mediante estudios histológicos el efecto de un andamio macroporoso de biovidrio de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, funcionalizado con un grupo Amino-Propil-Trietoxi-Silano (APTS) y cargado con la proteína PTHrP, en la regeneración osteogénica en un defecto óseo mandibular en ratas con osteoporosis.

2.4 HIPÓTESIS

El implante de un biomaterial macroporoso bioactivo funcionalizado y cargado con PTHrP, promoverá la regeneración osteogénica en un defecto óseo mandibular en ratas con osteoporosis.

3. METODOLOGÍA

Los estudios presentados en esta tesis, fueron parte de la colaboración con el Grupo de Investigación Traslacional en Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad de Alcalá, que dirige la Dra. Julia Buján Varela; los materiales fueron elaborados por el Dr. Juan Peña, y suministrados por el Grupo de investigación Biomateriales inteligentes y VERDI (Polyvalent mesoporous nanosystem for bone diseases) del Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España, dirigido por la Dra. María Vallet Regí. La PTHrP fue suministrada por el Dr. Pedro Esbrit, quien dirige la Unidad de Investigación Ósea y Articular, Institución de Investigación en Salud (IIS) -Fundación Jiménez Díaz, UAM, Madrid, España.

La presente tesis cuenta con el aval del Comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM (número de folio 1089) El cuidado y uso de animales de laboratorio se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana “NORMA Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999”. Los desechos orgánicos se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana “NOM-087-ECOL-SSA12002”, y con la aprobación de la Comisión de Bioseguridad de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, (folio 035) y de acuerdo a la “Guía técnica” de la misma.

Los estudios se realizaron en el Bioterio de la FES Iztacala, Unidad de Aislamiento Animal y Bioterio de la unidad de investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán (FESC) y en el Laboratorio de Investigación en Odontología Almaraz.

3.1 Diseño del estudio

Se utilizaron un total de 48 ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 200-250 g., el tiempo de estudio fue de 4 semanas (4s). En el lado derecho se realizó un defecto óseo que se rellenó con los diferentes andamios y en el lado izquierdo se realizó el defecto que se mantuvo sin relleno, este fue nuestro control, y denominado sham (grupo control de cirugía simulada).

Se colocaron el andamio APTS (A), la biomolécula PTHrP y APTS funcionalizado (Af) organizados en los siguientes grupos (n=6):

NOMECLATURA GRUPOS:

S= sana.

A= APTS.

Af= APTS Funcionalizado.

O= ovariectomía.

PTHrP= Osteostatina o Péptido relacionado con la PTH.

Sham= Cirugía simulada

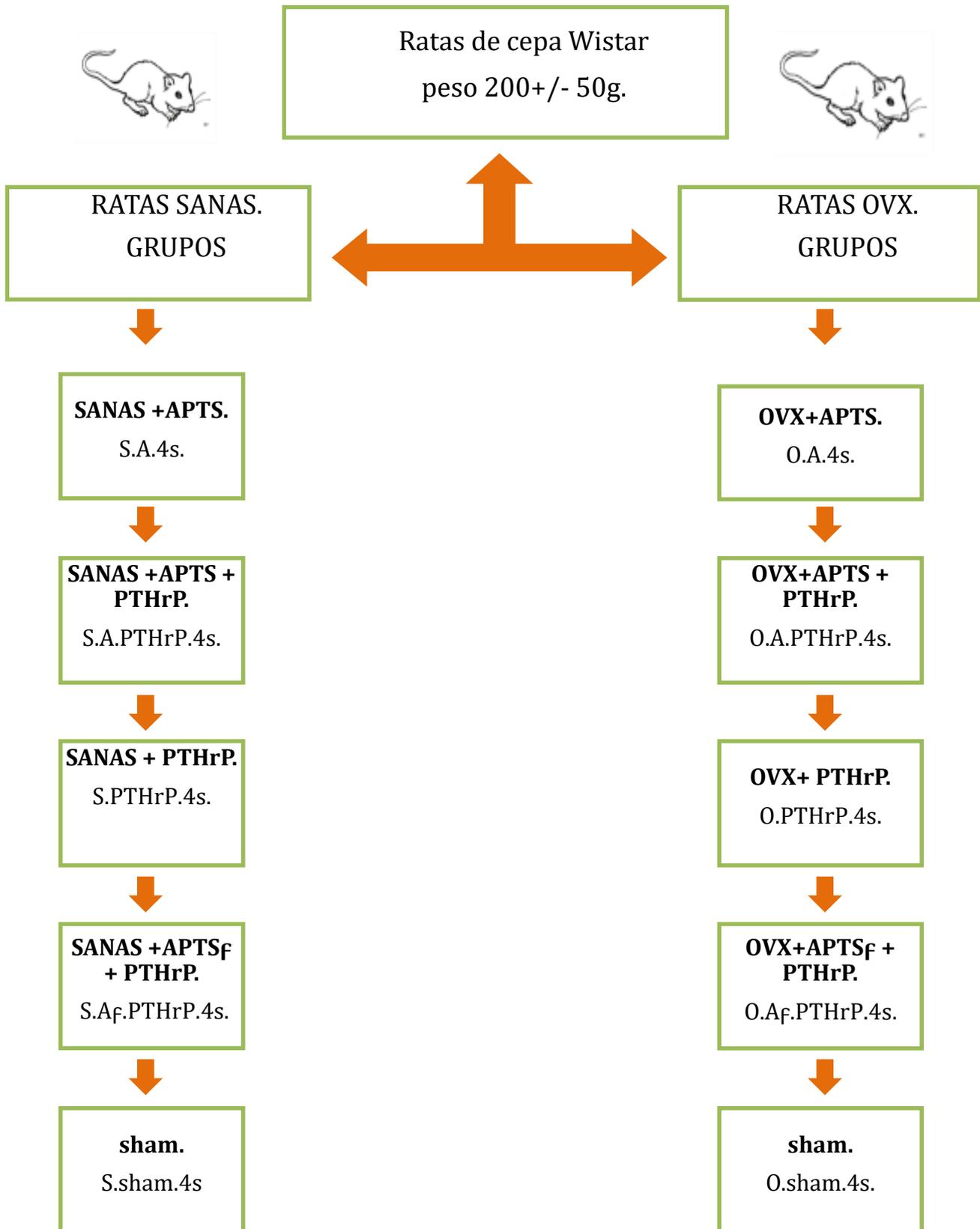
4s= 4 semanas.

Grupo sin osteoporosis:

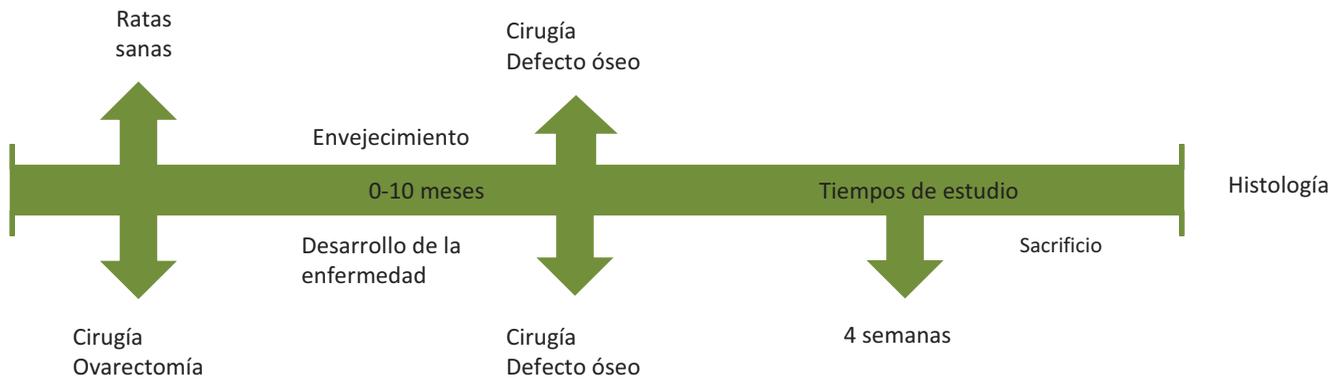
S.A.4s	Especímenes sanos con el biomaterial APTS implantado a cuatro semanas.
S.A.PTHrP.4s	Especímenes sanos con el biomaterial APTS funcionalizado y con PTHrP implantado a cuatro semanas.
S. PTHrP.4s	Especímenes sanos con PTHrP implantado a cuatro semanas.
S.Af.PTHrP.4s	Especímenes sanos con el biomaterial APTS funcionalizado y con PTHrP implantado a cuatro semanas.
S.sham.4s	Especímenes sanos sham a cuatro semanas.

Grupo Experimental con Ovariectomía (OVX) con osteoporosis (O)

O.A.4s	Especímenes con ovariectomía, con el biomaterial APTS implantado a cuatro semanas.
O.A.PTHrP.4s	Especímenes con ovariectomía, con el biomaterial APTS funcionalizado y con PTHrP implantado a cuatro semanas.
O. PTHrP.4s	Especímenes con ovariectomía, con PTHrP implantado a cuatro semanas.
O.Af.PTHrP.4s	Especímenes con ovariectomía, con el biomaterial APTS funcionalizado y con PTHrP implantado a cuatro semanas.
O.sham.4s	Especímenes con ovariectomía sham a cuatro semanas.



3.2 Línea del tiempo experimental.



Los especímenes se mantuvieron en Unidad de Aislamiento Animal y Bioterio de la unidad de investigación Multidisciplinaria de la FESC con una temperatura constante de entre 21-27°C, una humedad relativa de 45-55% y en un fotoperiodo de 12/12 horas con acceso *ad libitum* al agua y alimento.

Todas las intervenciones se realizaron en condiciones de asepsia, en una sala de cirugía limpia y se utilizaron campos y material quirúrgico estériles (Figura 3).



Figura 3 Imagen de la mesa de trabajo para ovariectomía

3.3 Modelo animal osteoporótico.

Para la realización de ovariectomía experimental se emplearon 24 ratas Wistar de un peso de 200-250g., los animales fueron pesados con una báscula digital y anestesiados vía intraperitoneal con una combinación de anestésico general ANESKET® (Clorhidrato de Ketamina, 60mg/kg de peso) y un relajante muscular PROCIN® (Xilacina, 7mg/kg de peso) según el peso del espécimen.

El área quirúrgica fue rasurada y desinfectada con una solución antiséptica de cloruro de benzalconio (Antibenzil; Farmacéuticos Altamirano de México). Con un bisturí se realizó una incisión en la zona central ventral anterior. Se utilizaron pinzas tipo mosco para realizar la disección roma. Se realizó una segunda incisión en el musculo oblicuo externo, sobre la pared abdominal para descubrir las vísceras y los ovarios. Se identificaron las tubas uterinas y los ovarios (derecho e izquierdo) y se realizó una disección para separar los ovarios de los demás tejidos; se pinzaron y se ligaron las tubas uterinas con sutura y se retiraron los ovarios. Se suturó la herida utilizando la técnica por planos con suturas absorbibles de ácido poli-glicòlico de 3-0 en el caso de la pared abdominal (musculo) y se empleó sutura de seda 3-0 en el caso de la piel (Figura 4).

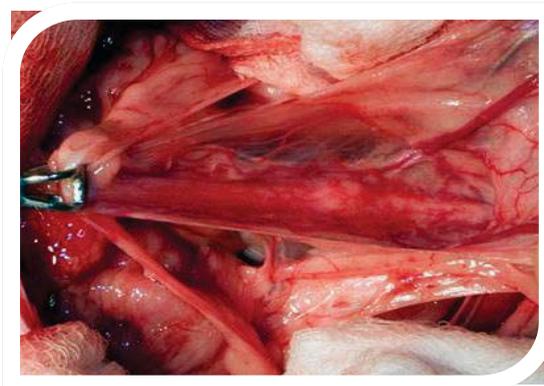


Figura 4 Imagen de la cirugía de ovariectomía experimental

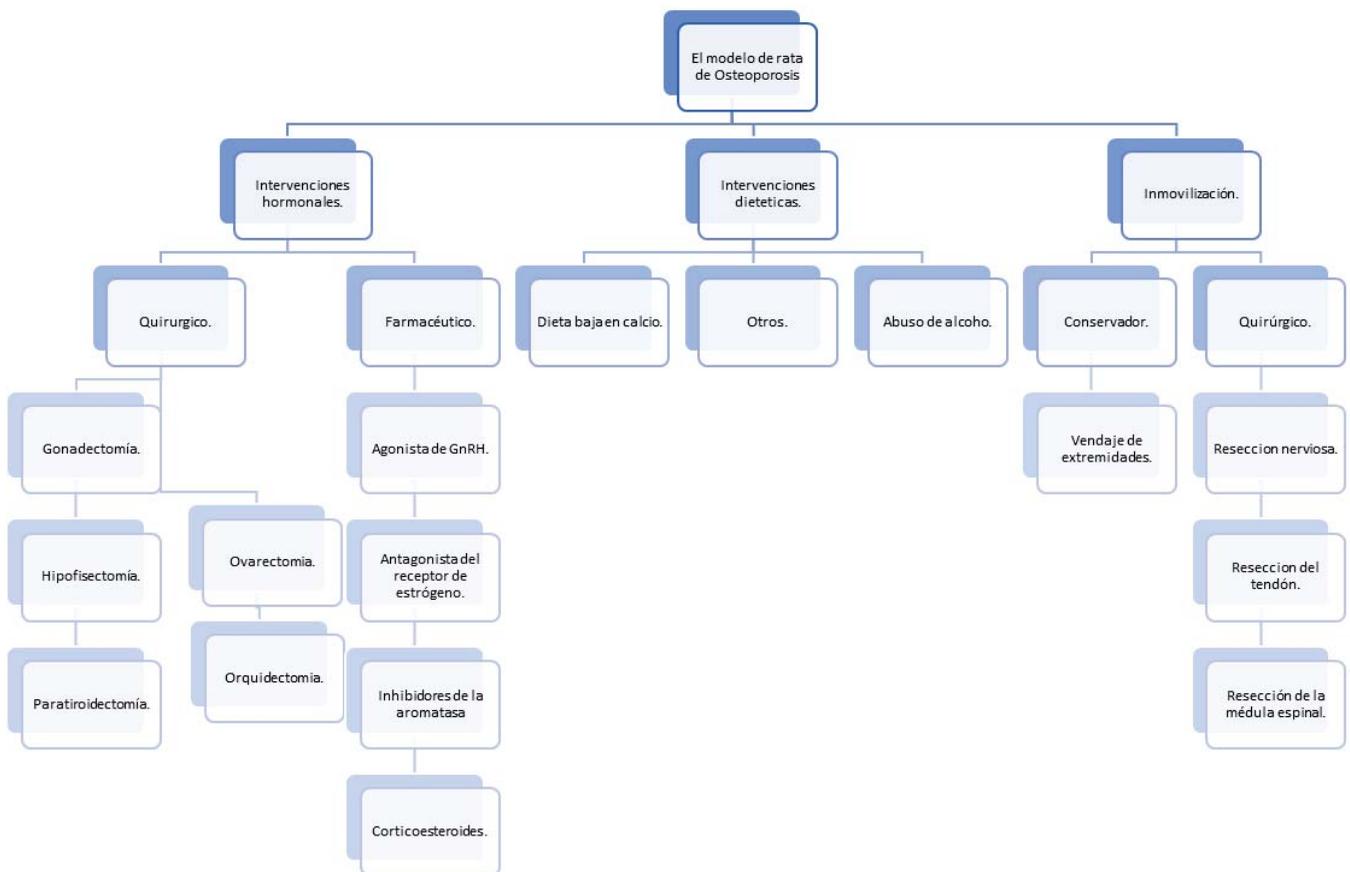


Figura 5 Algoritmo para la selección de intervenciones experimentales para inducir osteopenia u osteoporosis en la rata de laboratorio (Mourelle, 2013).

3.4 Diseño Quirúrgico del defecto mandibular.

Diez meses después de la ovariectomía los animales fueron pesados con una báscula digital, anestesiados y preparados como se describió anteriormente. Con material quirúrgico estéril se ejecutó una incisión de 1.5 cm a lo largo del borde inferior de la mandíbula en el lado derecho, realizando disección roma se separaron los músculos masetero y buccinador, y retirando el periostio se dejó expuesto el hueso mandibular. El defecto se realizó con un micromotor (Strong 210® Korea) y una fresa de bola de ½ a una velocidad menor a 1000rpm, durante la cirugía se realizó irrigación constante con solución fisiológica estéril, las dimensiones del defecto se midieron con una sonda periodontal. El

defecto fue diseñado con dimensiones de: 3mm de largo siguiendo el cuerpo de la mandíbula, por debajo de la línea oblicua externa, 2mm de ancho y 1mm de profundidad. En los grupos experimentales se implantaron los biomateriales en el defecto, según correspondía a cada grupo. Se suturo la herida utilizando la técnica por planos con suturas absorbibles de ácido poli-glicòlico de 3-0 estériles en el caso del músculo y suturas estériles de seda 3-0 en el caso de la piel. Para evitar infecciones secundarias las ratas fueron medicadas con antibiótico Enroxil® 5% inyectable 20 ml (enrofloxacin 10mg/kg dosis única postquirúrgica), tratadas con analgésico Pisadol® (Tramadol 5mg/kg) durante 3 días cada 24horas) y mantenidas y monitoreadas hasta el sacrificio de acuerdo con los tiempos de estudio (Figura 6).

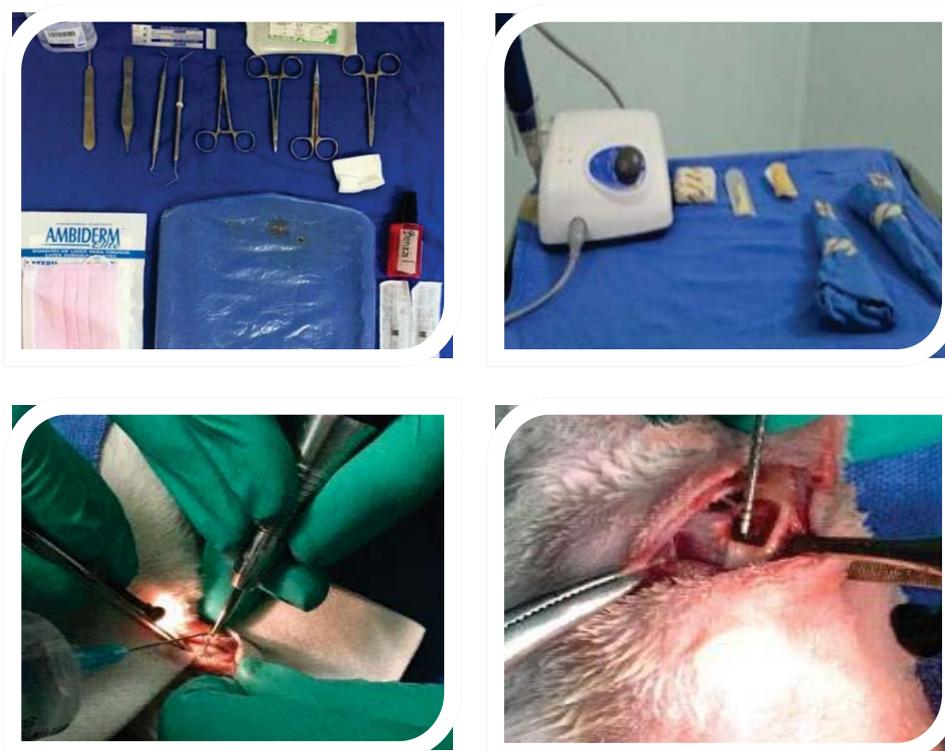


Figura 6 (A) Mesa de trabajo con el instrumental ordenado que se utiliza para la cirugía de defecto, (B) Mesa de mayo con micromotor, (C) Foto clínica de la realización del defecto crítico. (D) defecto crítico.

3.5 Implantación de constructos

Los biomateriales utilizados como andamios tienen una composición es: SiO_2 85% - CaO 10%- P_2O_5 5% funcionalizados con un grupo Amino- Propil Trietoxi- Silano (APTS_f); son materiales mesoporosos bioactivos, adicionados con y sin PTHrP (Figura 7).



Figura 7 Imagen del biomaterial APTS

3.6 Método de funcionalización.

Con el objetivo de injertar grupos de ácido carboxílico en la superficie externa de APTS, la funcionalización se llevó a cabo en APTS antes de someterse al proceso de extracción de surfactante. Por lo tanto, se colocaron 500 mg de APTS que contenía CTAB en un matraz de fondo redondo de tres bocas y se secaron a 80 °C bajo vacío durante 24 h. Luego, se añadieron 125 ml de tolueno seco y el matraz se colocó en un baño ultrasónico durante varios ciclos de sonicación de 5 minutos hasta que se logró una buena suspensión de nanopartículas. Después de eso, se añadieron 300 μL de TEPSA, manteniendo la reacción en atmósfera de nitrógeno a 90 °C durante 24 h. A continuación, se añadieron 40 ml de agua ligeramente acidificada para hidrolizar los grupos succínicos a grupos de ácido carboxílico, para después secar al vacío a 40 °C. Para la caracterización de estos MSN de ácido carboxílico, la eliminación de tensioactivo se realizó por extracción con disolvente como se ha mencionado anteriormente, proporcionando grupo amino.

3.7 Método de la elaboración del biomaterial con la biomolécula PTHrP.

Los andamios APTS se cargaron con PTHrP (Esbrit, 2000) (Esbrit P. H.-N.-P., 2016) (Valín, 1997) sumergiéndolos en una solución del péptido (a 100 nM) en 1ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS a pH 7.4) con agitación constante a 4 °C durante 24h.

3.8 Evaluación clínica y sacrificio

Se evaluó la mortalidad, morbilidad y la capacidad de alimentarse de los animales. Lo especímenes se pesaron en el momento de la cirugía y en la cuarta semana de estudio (tabla 4 y 5). Se realizó la observación clínica del área intervenida y se documentó con fotografías, realizando el registro de inflamación y cicatrización de la herida. Pasado los tiempos experimentales los animales fueron sacrificados por sobreexposición a CO₂, se tomaron las muestras de estudio (hemimandíbulas derecha e izquierda), las muestras se fijaron en paraformaldehído al 4% pH 7.4 durante 24 horas para su siguiente procesamiento.

Tabla 4 Peso de especímenes sanos. a) peso inicial b) peso en el momento de la cirugía. c) peso en la cuarta semana de estudio.

Tabla 5 Peso de especímenes OVX. a) peso inicial b) peso en el momento de la cirugía. c) peso en la cuarta semana de estudio

# de especímenes sanos	a)	b)	c)	# de especímenes OVX	a)	b)	c)
1	200	246	325	1	200	367	385
2	210	252	352	2	210	424	458
3	240	262	335	3	240	399	436
4	250	263	331	4	250	398	420
5	200	262	350	5	200	341	367
6	210	256	360	6	210	410	450
7	215	262	350	7	200	341	367
8	200	256	360	8	210	434	469
9	245	220	300	9	240	403	444
10	240	275	320	10	210	410	450
11	210	252	352	11	200	399	436
12	200	262	335	12	215	410	450

3.9 Procesamiento histológico de la muestra.

Para observar el estado de osteoporosis en las ratas con OVX, luego de 10 meses post cirugía realizamos radiografías (equipo de rayos x dental digital 70 plus USV marca: CORAMEX®, a un Voltaje de línea: 120V. + / - 10% (109-132VAC), 50/60 Hz). La zona de interés fue el miembro anterior izquierdo, se observó anatómicamente: el hueso radio y cubito (unla); los huesos de la muñeca: carpal y metacarpal.

Una vez realizados los estudios radiológicos la muestra se fijó y decalcificó con osteosoft® durante 4 semanas, para su posterior procesamiento histológico.

Para su estudio, las muestras se deshidrataron para su inclusión en parafina, siguiendo el protocolo de rutina.

Posterior a la deshidratación, y una vez transcurrido el tiempo en Parafina II las muestras fueron colocadas en moldes con parafina líquida a 60°C y orientadas en la posición correcta para ser cortadas con un micrótopo (Figura 8).



Figura 8 (A) Baño para extensión de preparaciones (B) Micrótopo Leica.

Se realizaron cortes seriados de la parte central del defecto de 5-7 μ de espesor y puestos para su expansión en un baño de agua, siendo pescados con porta objetos previamente poli-lisinados por 5 minutos y llevados al horno durante 1 hora para lograr adherencia de la muestra en estos y se realizó la tinción H&E con el protocolo de rutina.

3.10 Análisis histológico e histomorfométrico.

Se realizó la tinción de Hematoxilina – Eosina (H&E) para observar las características morfológicas.

Las observaciones se realizaron bajo un microscopio óptico, después de calibrar el sistema con la platina micrométrica de Zeiss (Modelo: Axio Lab.A1 marca: Carl Zeiss), se realizó la digitalización de las imágenes magnificadas a 5 aumentos para la evaluación descriptiva y a 40 aumentos para la evaluación histomorfométrica.

Se tomaron 6 fotos de cada muestra, para realizar la imagen panorámica a una aumento de 5x, 4 fotos para realizar la imagen panorámica de la zona del defecto a un aumento de 5x, por último se tomaron 2 fotos a un aumento de 40x en la zona del defecto.

Las imágenes se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS y se realizaron correcciones de nitidez, brillo y contraste.

4. RESULTADOS.

4.1 Evaluación histológica

Para la descripción histológica de nuestras muestras cabe mencionar que, hacemos uso de las siguientes definiciones.

Tejido osteoide: es la porción orgánica sin mineralizar de la matriz ósea que se forma con anterioridad a la maduración del tejido óseo, y para que este tejido se calcifique será necesario que las concentraciones locales de iones calcio y fosfato alcancen valores adecuados, para el depósito de las sales de fosfato/calcio en la matriz, descriptivamente el tejido osteoide se observa como: matriz extracelular organizada pero aún no está ordenada en forma de láminas tejido en el hueso cortical, y en el hueso trabecular se observan espículas y pequeñas trabéculas con grandes espacios de tejido conectivo y/o medular (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, 2006), para fines prácticos, también lo hemos denominado tejido de neoformación ósea.

Cavidad medular: Los espacios entre las trabéculas son las cavidades medulares, las cuales se encuentran llenas de otra variedad especial del tejido conjuntivo que recibe el nombre de tejido hematopoyético, encargado de la producción de células sanguíneas.

Hueso trabecular: posee grandes espacios denominados cavidades vasculares, ocupados por vasos sanguíneos y elementos hematopoyéticos. Estas cavidades están delimitadas por trabéculas óseas en las cuales las fibras de colágeno pueden estar dispuestas de manera entrecruzada (hueso trabecular no laminar) o bien ordenadas en laminillas óseas (hueso trabecular laminar).

Hueso cortical: El hueso compacto o cortical no posee cavidades vasculares, sino que su matriz extracelular se ordena en laminillas óseas, las cuales se pueden disponer de manera paralela o de manera concéntrica alrededor de un canal.

Osteogénesis: es un proceso en el que el colágeno se distribuye al azar y los osteocitos no tienen una distribución regular, hay formación de nuevas trabéculas en formación

rodeadas de osteoblastos, los espacios entre las trabéculas son amplios en donde anidaran las células formadoras de la sangre (médula ósea) y los requerimientos mecánicos son mayores los espacios cada vez serán más escasos por lo que transcurren vasos sanguíneos; en ambos tipos de hueso las células se coordinan formando las unidades de remodelación ósea o también llamadas unidades multicelulares básicas (Aldo R. Eynard).

Tejido inflamatorio: el tejido se encuentra invadido por gran cantidad de células mononucleares, histiocitos y macrófagos, puede haber demarcación de los márgenes de la herida por polimorfonucleares, presencia de fibroblastos, todos estos tipos celulares van aumentando o disminuyendo según el tiempo que lleva instaurado el proceso inflamatorio (Cabrerizo Medina, 2015) (véase anexo #2).

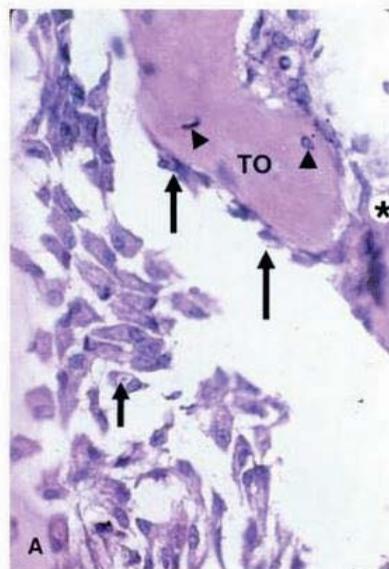
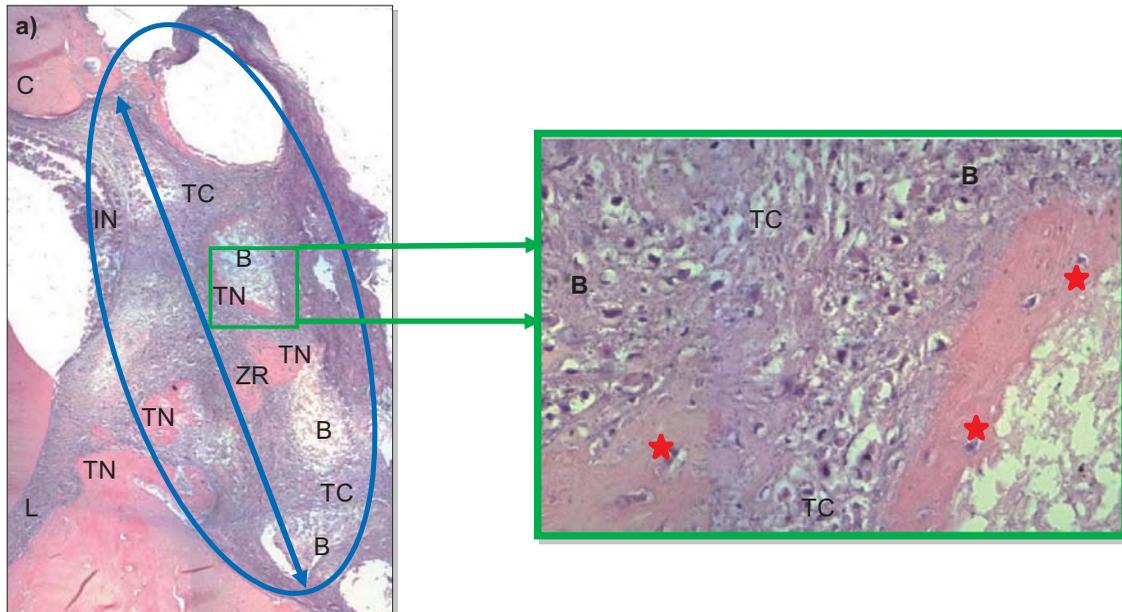


Fig. 8-17. A. Zona de osteogénesis en la superficie de una trabécula ósea (TO) donde se ordenan los osteoblastos, cuyas vacuolas citoplasmáticas corresponden al voluminoso aparato de Golgi (flechas). En el interior de la trabécula se alojan osteocitos (cabezas de flecha), a la derecha hay un osteoclasto (*), HE, 400×. **B.** Aspecto ultraestructural de osteoblastos (flechas). **C.** Un osteocito encerrado en la matriz ósea (MO); prolongaciones citoplasmáticas en los canaliculos óseos (flechas), núcleo (N), ME, 4.000×.

1. En el grupo S.A.4s los defectos se observan ocupados un 80% por tejido conectivo e infiltrado inflamatorio rodeando los restos del biomaterial.



8 Grupo S.A.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L- Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN- Tejido de Neoformación, B- Biomaterial, IN- Inflamación ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original. En la imagen se observa el defecto relleno por tejido conectivo en casi su totalidad, pero contiene a manera de islotes áreas con tejido óseo neoformado y restos del biomaterial que se integra en el tejido conectivo. En el área cercana al ligamento periodontal se observa inflamación con células mononucleares.

2. En cuanto al grupo O.A.4s se observan los defectos ocupados en un 30-40% por tejido conectivo fibroso y tejido de neoformación ósea con grandes espacios medulares. En el biomaterial se observó en todos los especímenes.

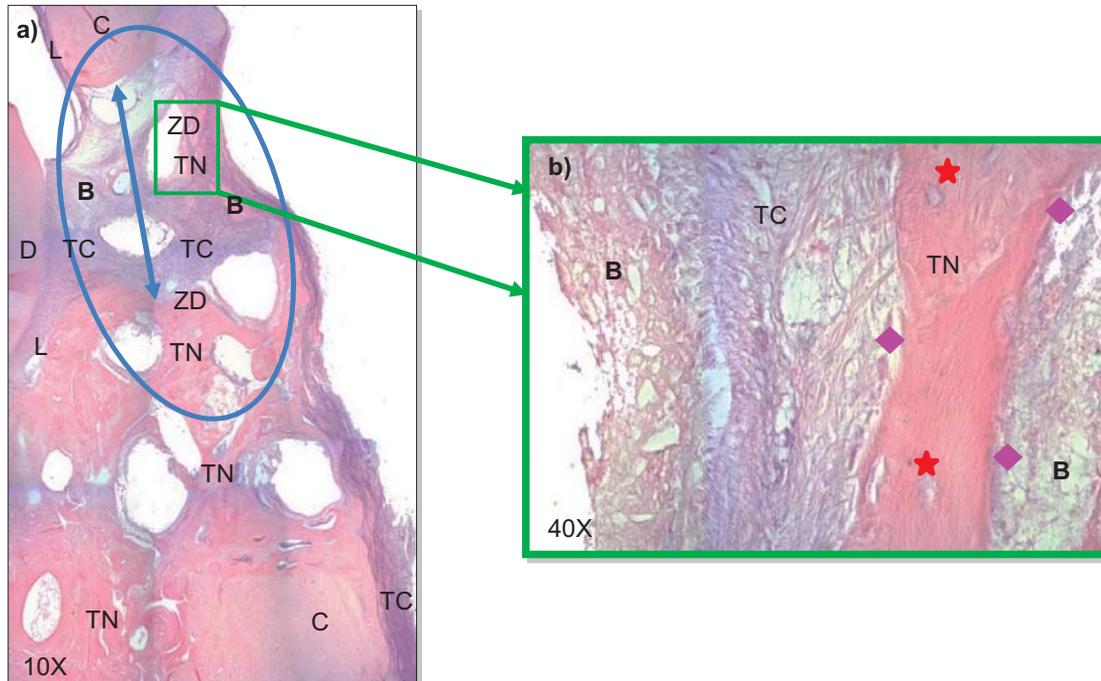


Figura 9 Grupo O.A.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN- Tejido de Neoformación, B- Biomaterial, ★- Osteocito, ◆ Osteoblasto, ↔- dimensiones del defecto original.

En la imagen, en el centro del defecto hacia el área externa se observan espículas óseas con osteocitos con tejido conectivo. Se observan restos del biomaterial.

3. En el grupo S.A.PThrP.4s el tejido que ocupa la zona de la lesión se observa extruido, el biomaterial se encuentra rodeado por tejido conectivo con infiltrado inflamatorio.

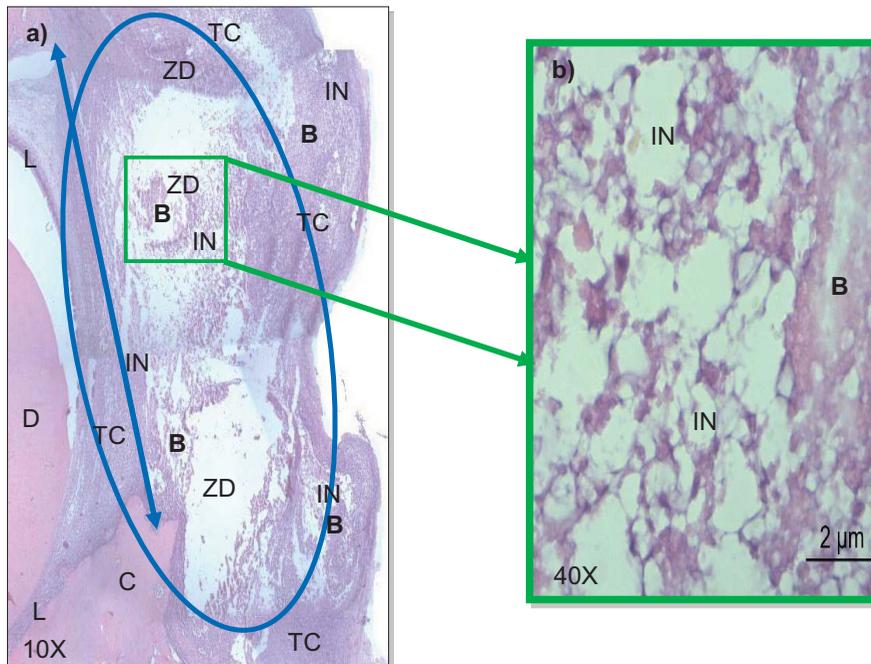


Figura 10 Grupo S.A.PThrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x, b) Zona del defecto óseo a 40x ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC- Tejido Conectivo, B-Biomaterial, IN- Inflamación, ↔- dimensiones del defecto original. En la imagen se observa infiltrado inflamatorio en una matriz mucoide, con restos del biomaterial y en algunas zonas formación de hueso.

4. En el grupo O.A.PTHrP.4s los defectos se observaron ocupados en un 100% por tejido conectivo fibroso y restos del biomaterial, y solo en algunos casos se observó tejido óseo de neoformación en los bordes del defecto. En la zona basal mandibular, lejos de la lesión observamos hiperplasia ósea.

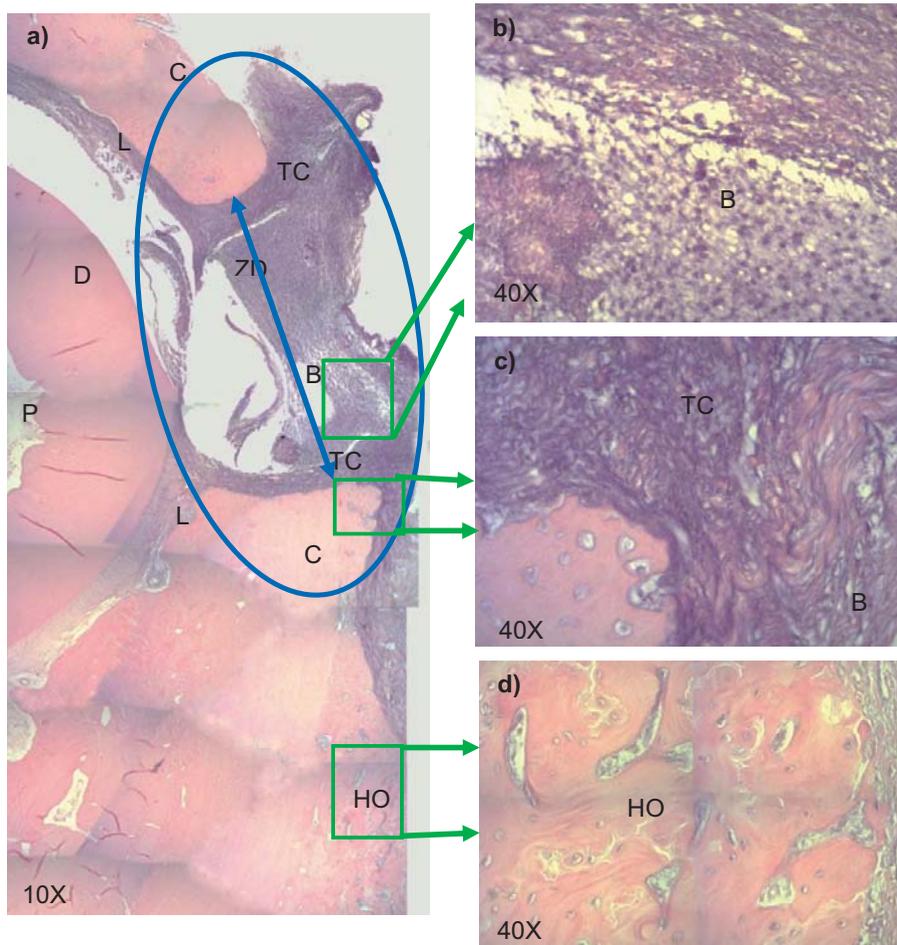


Figura 11 Grupo O.A.PTHrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. c) Zona del defecto óseo a 40x. d) Zona de hiperplasia ósea a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, P-Pulpa, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, B-Biomaterial, ↔- dimensiones del defecto original.

En la imagen se observa tejido conectivo fibroso que ocupa el área central del defecto, presenta infiltrado inflamatorio. El biomaterial aún ocupa el espacio del defecto con tejido conectivo que lo encapsula.

5. En el grupo S.PTHrP.4s se observa cerrado la zona del defecto por tejido óseo neoformado.

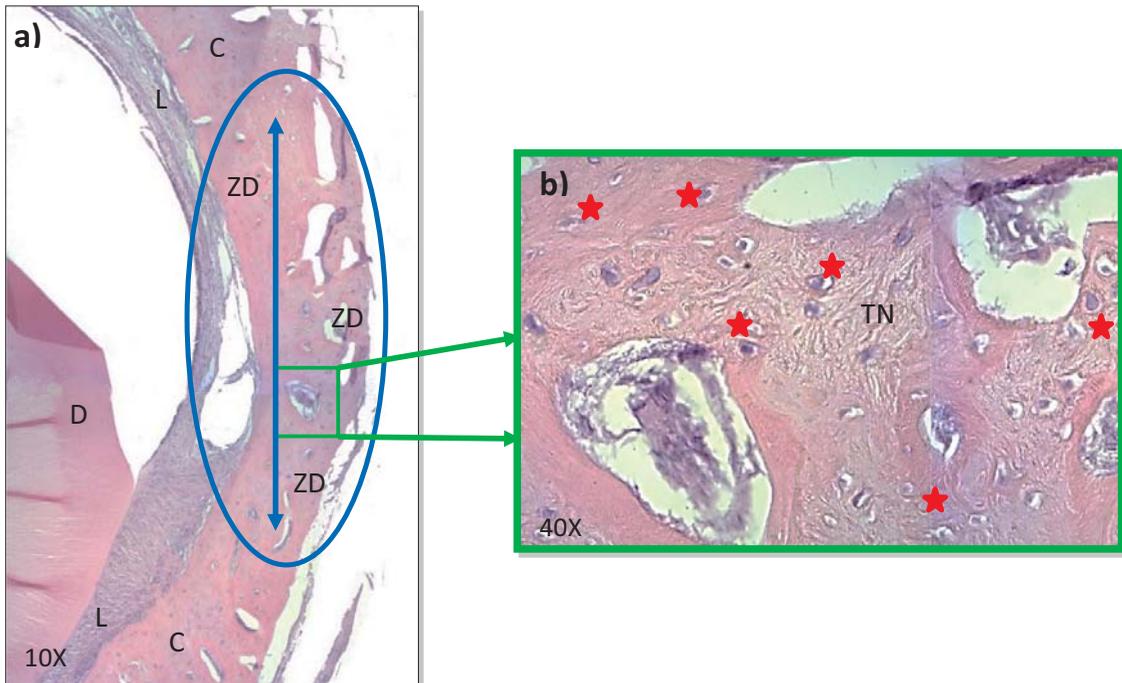


Figura 12 Grupo S.PTHrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, M-Médula, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original.

6. En cuanto al grupo O.PTHrP.4s. Se observa los defectos ocupados en una 85-90% de tejido óseo neoformado y el 10-15% por tejido conectivo. Los bordes del defecto se observan casi confluentes.

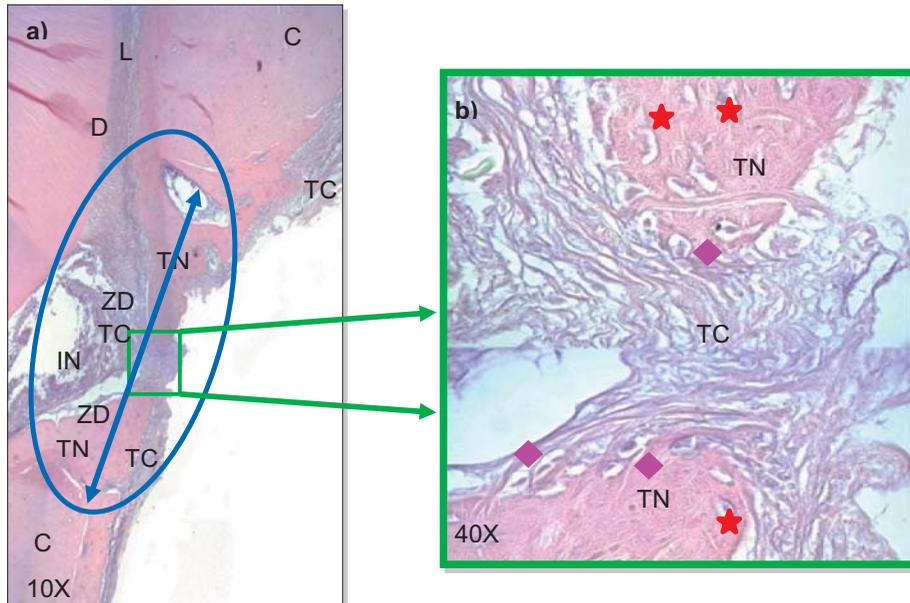


Figura 13 Grupo O.PTHrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) ZD-zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, IN- Inflamación, ★- Osteocito, ◆ Osteoblasto, ↔- dimensiones del defecto original.

En la imagen se observa que la cavidad ha sido ocupada en su mayor parte por tejido óseo de neoformación. La zona del defecto que no ha sido cubierta por tejido óseo está ocupada por tejido conectivo fibroso. En los bordes de los procesos óseos en regeneración se observan osteoblastos con una fuerte actividad de secreción de osteoide.

7. En el grupo S.Af.PTHrP.4s En general, en este grupo el biomaterial se observó casi intacto dentro de los defectos y rodeado de tejido conectivo e infiltrado inflamatorio crónico. En las zonas adyacentes superior e inferior al sitio de la lesión se observa tejido óseo de neoformación que rebasa los límites de la morfología normal de la mandíbula (hiperplasia ósea).

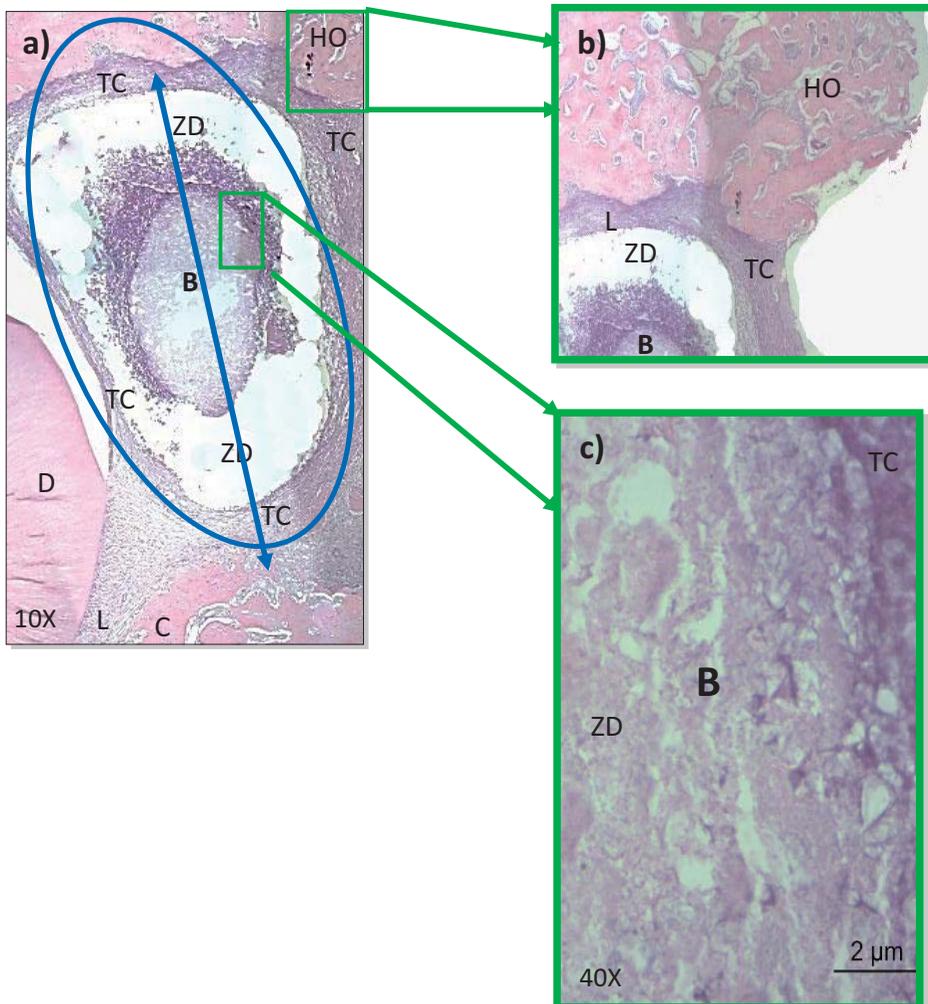


Figura 14 Grupo S.Af.PTHrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x; b) Hiperplasia ósea vecina al defecto en apical de la mandíbula a 10x; c) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, B- Biomaterial, HO- Hiperplasia ósea, ↔ dimensiones del defecto original.

En la imagen se observa la zona del defecto ocupada por el biomaterial rodeado y encapsulado por tejido conectivo fibroso con infiltrado inflamatorio crónico en contacto directo con el biomaterial. En las zonas adyacentes superior e inferior al sitio de la lesión se observa tejido óseo de neoformación que rebasa los límites de la morfología normal de la mandíbula (hiperplasia ósea).

8. En el grupo O.Af.PTHrP.4s, en general los defectos se observan ocupados en un 40% de tejido conectivo y en un 60% de tejido óseo de neoformación. Se observa restos del biomaterial.

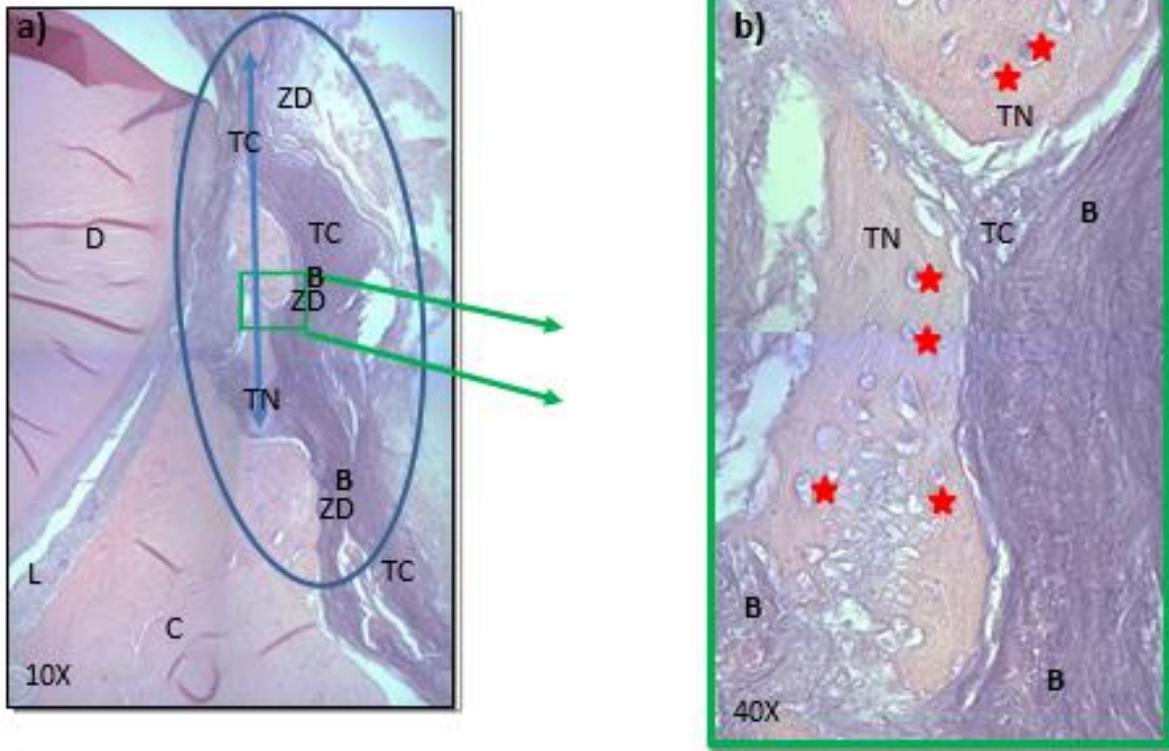


Figura 16 Grupo O.Af.PTHrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona de defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, B-Biomaterial ★- Osteocito, ↔ dimensiones del defecto original.

En la imagen se observa el defecto óseo ocupado por tejido óseo de neoformación que en su interior contiene fragmentos del biomaterial, también se observan residuos del biomaterial en el tejido conectivo fibroso que ocupa la lesión.

9. En el grupo S.sham.4s los defectos cerraron con tejido óseo de neoformación en un 95% y entre los procesos de regeneración ósea que todavía no confluyen observamos tejido conectivo fibroso con presencia de infiltrado inflamatorio crónico.

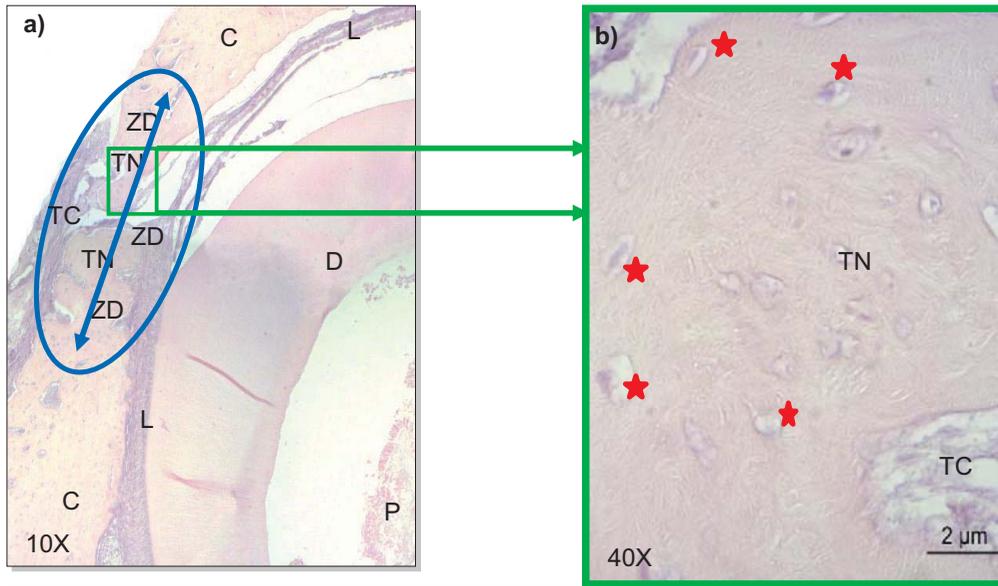


Figura 17 Grupo S.sham.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona Del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, P-Pulpa, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, ★- Osteocito, ↔ dimensiones del defecto original.

En la imagen se observa que el proceso de formación de hueso casi ha cubierto la lesión.

10. En el grupo O.sham.4s la zona de la lesión se observa entre un 20% con tejido conectivo y un 80% por tejido de neoformación ósea. Los bordes de los defectos ya no se observaron claramente definidos

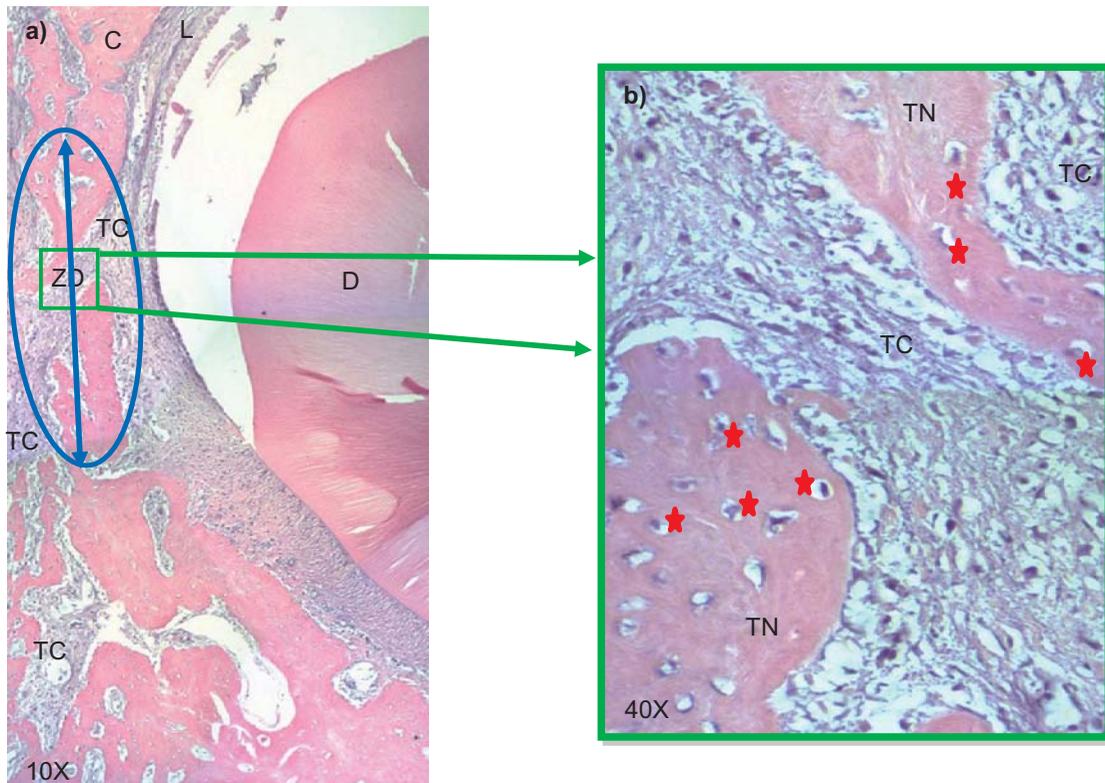


Figura 18 Grupo O.sham.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona Del defecto óseo a 40x. ZD-zona del defecto óseo. D-Diente, L- Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original.

En la imagen se observa el defecto con tejido óseo de neoformación y las lagunas de los osteocitos se observan grandes y se observan espacios medulares amplios.

4.2 Comparaciones de 4 semanas sin OVX y 4 semanas con OVX

En los grupos de especímenes **sin OVX a las 4 semanas**, de manera general, observamos que solo en el grupo S.PTHrP.4s se observó un cierre total del defecto que está ocupado de tejido óseo.

En el grupo S.A.4s se observó en el centro del defecto, áreas con tejido de neoformación ósea, con una formación de tejido parecida a lo que observamos en el grupo S.sham.4s.

En el grupo S.Af.PTHrP.4s observamos la reacción inflamatoria más intensa al biomaterial con encapsulación del mismo por tejido conectivo y al parecer, la liberación de la PTHrP que provocó una regeneración ósea del defecto, pero también formación de hiperplasia ósea por fuera de los límites del defecto y por encima de la cápsula que rodeaba al biomaterial.

En el grupo S.A.PTHrP.4s se observó una reacción inflamatoria leve en el tejido conectivo que rodeo al biomaterial.

En el grupo S.A.4s se observó el biomaterial dentro del tejido conectivo de la lesión, también se observan zonas con características de tejido óseo de neoformación dentro del defecto.

Se observó el cierre total del defecto solo el grupo S.PTHrP.4s.

En los grupos **con OVX a las 4 semanas**, de manera general se observó regeneración ósea, ya que los defectos se observaron rellenos con tejido óseo de neoformación en más del 50%.

En el O.sham.4s el defecto cerro por relleno de tejido de neoformación ósea, sin embargo, la cortical mandibular quedo sumamente delgada en comparación con todos los otros grupos.

Solo en el grupo O.PTHrP.4s observamos un cierre casi total del defecto, relleno por tejido óseo de neoformación; este tejido óseo nuevo pareció formarse desde de la periferia al centro del defecto.

En los grupos que contenían el biomaterial con y sin funcionalizar se observó la formación de tejido conectivo (intensamente teñido con la hematoxilina).

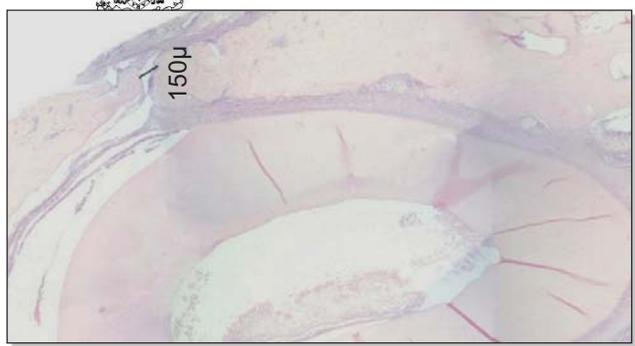
El grupo O.Af.PTHrP.4s no presento regeneración ósea.



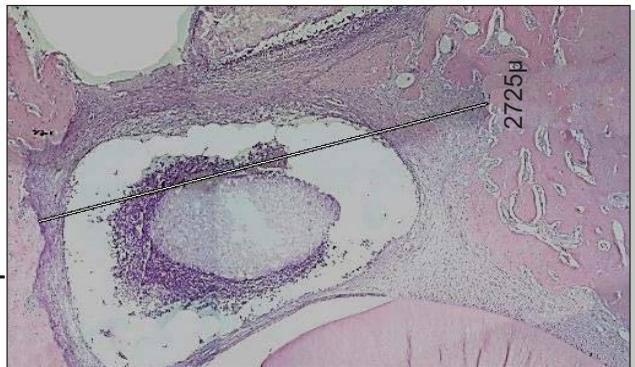
En todos los grupos la actividad de la PTHrP sobre las células parece favorecer la remodelación y regeneración ósea en el área del defecto, pero en áreas vecinas de tejido sano actuó de manera incontrolada, como en el caso de los grupos: S.Af.PTHrP.4s y O.A.PTHrP.4s que presentaron hiperplasia ósea en la región anatómica vecina al defecto.



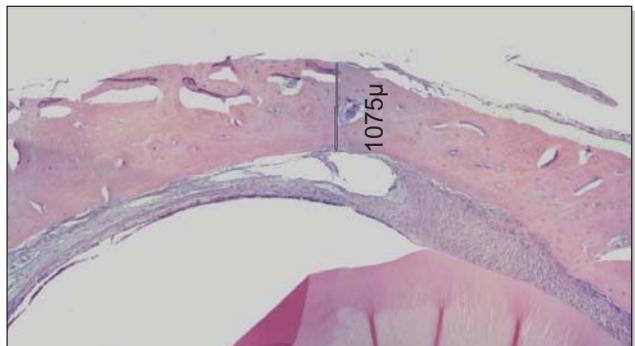
S.sham.4s



S.Af.PTHrP.4s



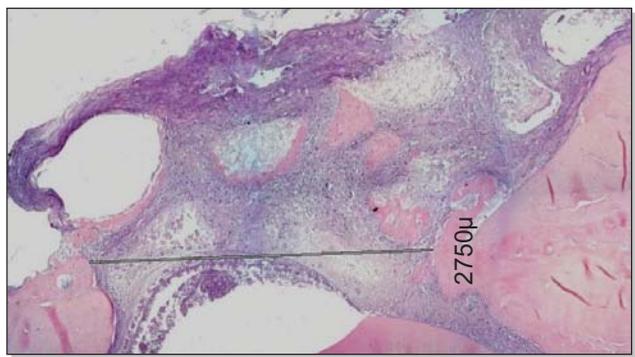
S.PTHrP.4s



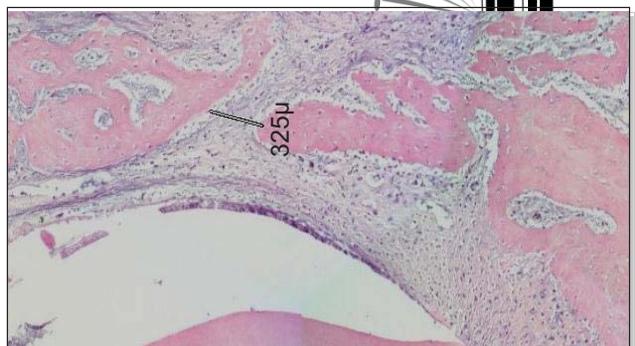
S.A.PTHrP.4s



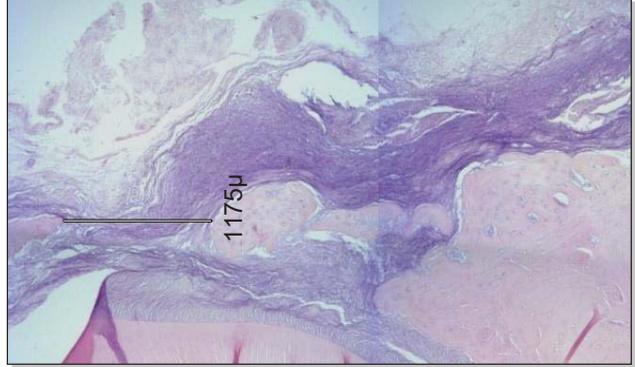
S.A.4s



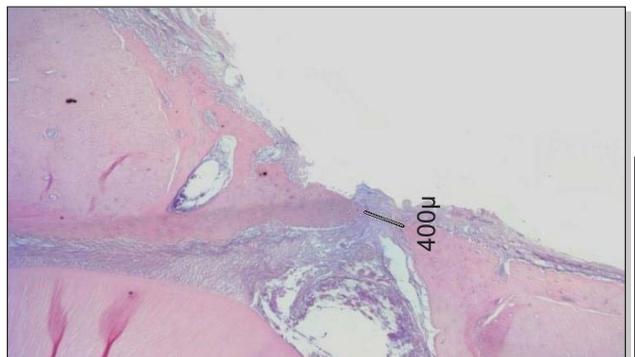
O.sham.4s



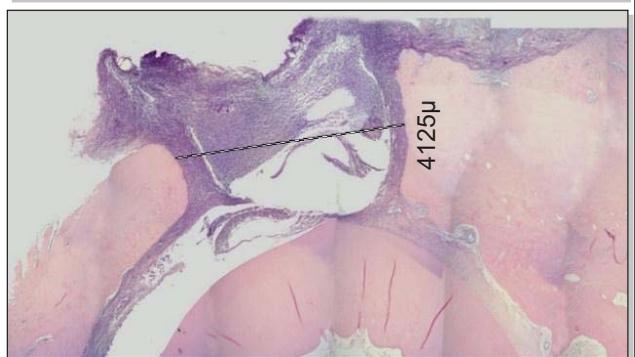
O.Af.PTHrP.4s



O.PTHrP.4s



O.A.PTHrP.4s



O.A.4s

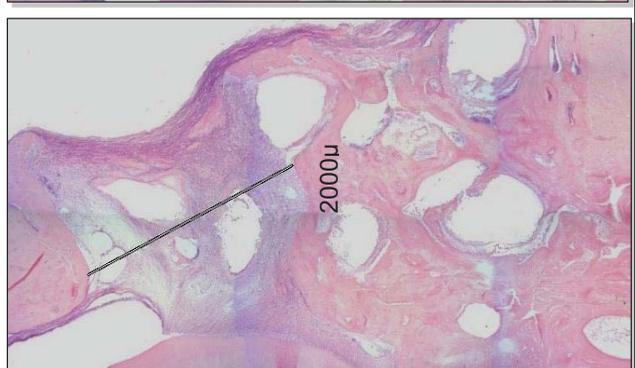
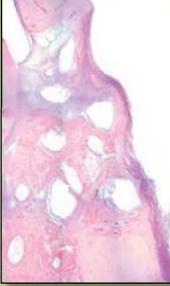


Figura 19 Comparación de los grupos sin y con OVX a las 4 semanas.

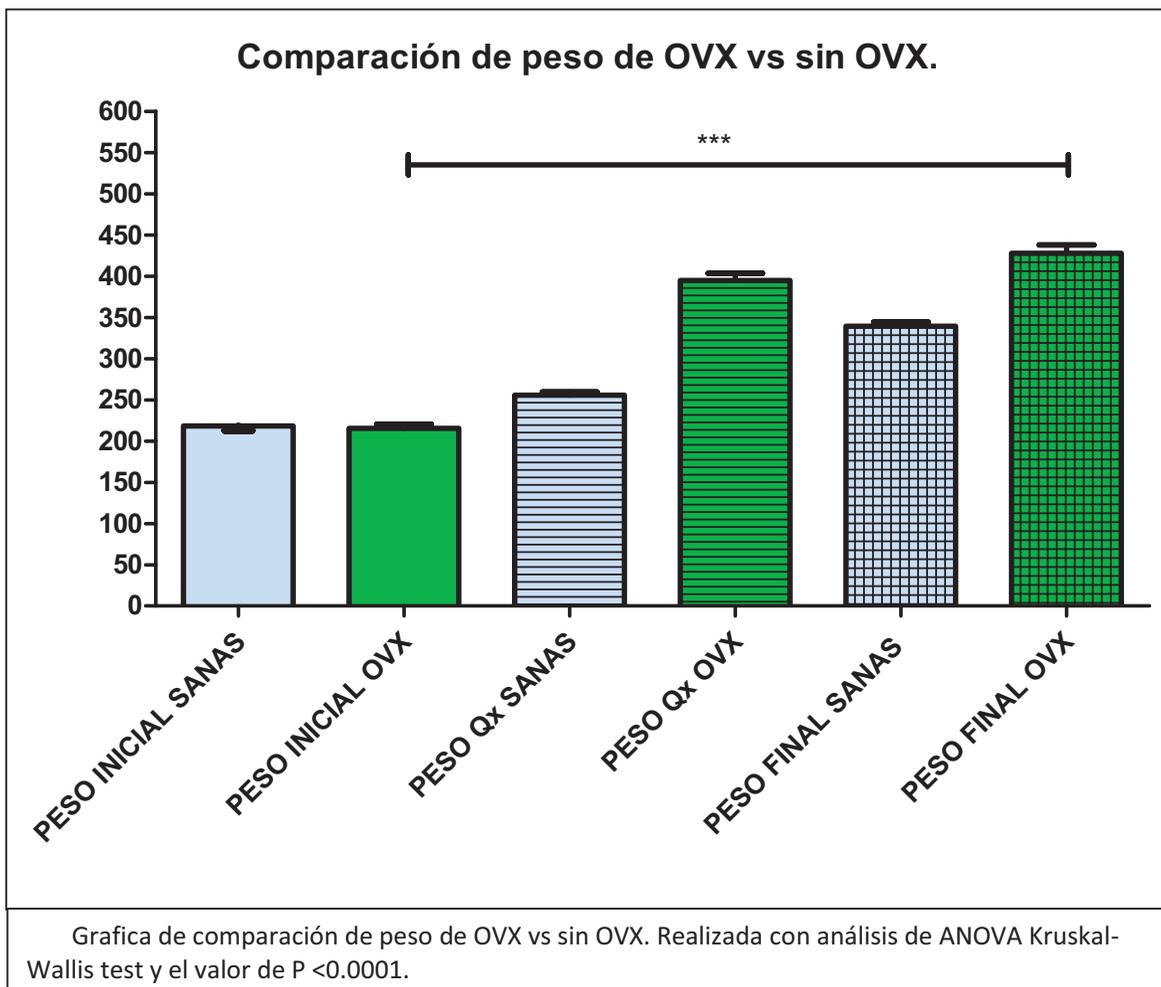
4.3 Hallazgos histológicos a las 4 semanas

Grupos sin OVX 4 semanas		Grupos OVX 4 semanas	
<p>S.A.4s</p> 	<p>Los defectos se observan ocupados un 80% por tejido conectivo e infiltrado inflamatorio rodeando los restos del biomaterial.</p>	<p>O.A.4s</p> 	<p>Se observan los defectos ocupados en un 30-40% por tejido conectivo fibroso y tejido de neoformación ósea con grandes espacios medulares. En el biomaterial se observó en todos los especímenes.</p>
<p>S.A.PTHrP.4s</p> 	<p>El tejido que ocupa la zona de la lesión se observa extruido, el biomaterial se encuentra rodeado por tejido conectivo con infiltrado inflamatorio.</p>	<p>O.A.PTHrP.4s</p> 	<p>Los defectos se observaron ocupados en un 100% por tejido conectivo fibroso y restos del biomaterial, y solo en algunos casos se observó tejido óseo de neoformación en los bordes del defecto. En la zona basal mandibular, lejos de la lesión observamos hiperplasia ósea.</p>
<p>S.PTHrP.4s</p> 	<p>Se observa cerrado la zona del defecto por tejido óseo neoformado.</p>	<p>O.PTHrP.4s</p> 	<p>Se observa los defectos ocupados en una 85-90% de tejido óseo neoformado y el 10-15% por tejido conectivo. Los bordes del defecto se observan casi confluentes.</p>

<p>S.Af.PThrP.4s</p> 	<p>En general, en este grupo el biomaterial se observó casi intacto dentro de los defectos y rodeado de tejido conectivo e infiltrado inflamatorio crónico. En las zonas adyacentes superior e inferior al sitio de la lesión se observa tejido óseo de neoformación que rebasa los límites de la morfología normal de la mandíbula (hiperplasia ósea).</p>	<p>O.Af.PThrP.4s</p> 	<p>En general los defectos se observan ocupados en un 40% de tejido conectivo y en un 60% de tejido óseo de neoformación. Se observa restos del biomaterial.</p>
<p>S.sham.4s</p> 	<p>Los defectos cerraron con tejido óseo de neoformación en un 95% y entre los procesos de regeneración ósea que todavía no confluyen observamos tejido conectivo fibroso con presencia de infiltrado inflamatorio crónico.</p>	<p>O.sham.4s</p> 	<p>La zona de la lesión se observa entre un 20% con tejido conectivo y un 80% por tejido de neoformación ósea. Los bordes de los defectos ya no se observaron claramente definidos.</p>

4.4 Análisis comparativos de peso de especímenes sin y con OVX

Se realizó una comparación de los pesos de los especímenes con y sin OVX (tabla 4 y 5) donde el peso inicial fue tomado cuando se obtuvieron del Bioterio, el peso de Qx fue el peso al momento de hacer la cirugía de los defectos óseos y el peso final fue al momento del sacrificio a las 4 semanas, el análisis se realizó con ANOVA Kruskal-Wallis test y el valor de $P < 0.0001$, se coloca la gráfica y los datos del análisis (véase en anexo #3) (Turner,2001).



4.5 Resultados. Evaluación Radiográfica

En las ratas sanas (con la misma edad que las ratas OVX) se observó, de manera general, un hueso trabecular compacto con adecuada densidad ósea. En la zona del cúbito (ulna) y del radio se observan áreas de marcada radiopacidad en lo que corresponde a sus corticales; en la zona del carpo y metacarpo la radiopacidad se ve intensa (casi se ve blanca el área) (Figura 20).

En las ratas del grupo OVX se observaron trabéculas amplias (no compactas) y con baja densidad ósea. La radiopacidad del radio en la zona central fue evidente. Este análisis confirmó la osteoporosis en el grupo de ratas OVX (Figura 21).



Figura 20 Radiografía de miembro anterior izquierdo de ratita sana.



Figura 21 Radiografía de miembro anterior izquierdo de ratita ovx.

4.6 Resultados. Análisis macroscópico de las lesiones.

En el análisis macroscópico se observaron las hemimandíbula *postmortem*, sin procesamiento de ningún tipo, en las que podemos apreciar la anatomía ósea en tres zonas distintas: 1) una zona posterior en la que se localiza la rama de la mandíbula con el proceso condilar, además del proceso coronoides y el angular; 2) la zona media, que es parte del cuerpo de la mandíbula, en donde existe hueso cortical poco invadido, se observa la línea oblicua externa y por arriba de ella el agujero mentoniano que conduce a el nervio mentoniano, en la parte superior de esta zona localizamos los molares; y 3) la zona anterior, que se compone de hueso alveolar que recubre la raíz del incisivo central y la corona de este.

Se realizó el defecto óseo en la zona del cuerpo de la mandíbula sobre la cortical externa y debajo de línea oblicua externa de la mandíbula y se continúa hasta borde basal mandibular y llega justo por debajo de las raíces de los molares inferiores.

A las 4 semanas, en las ratas sanas aun observamos el defecto que no encuentra relleno. En las ratas OVX, la zona del defecto ya no se aprecia y se encuentra relleno por tejido blando vascularizado. En 2 de los especímenes del grupo S.Af.PTHrP mostro edema. En los grupos sham se observó la zona del defecto aun delimitada pero sus dimensiones eran menores a comparación con el grupo sham2s.

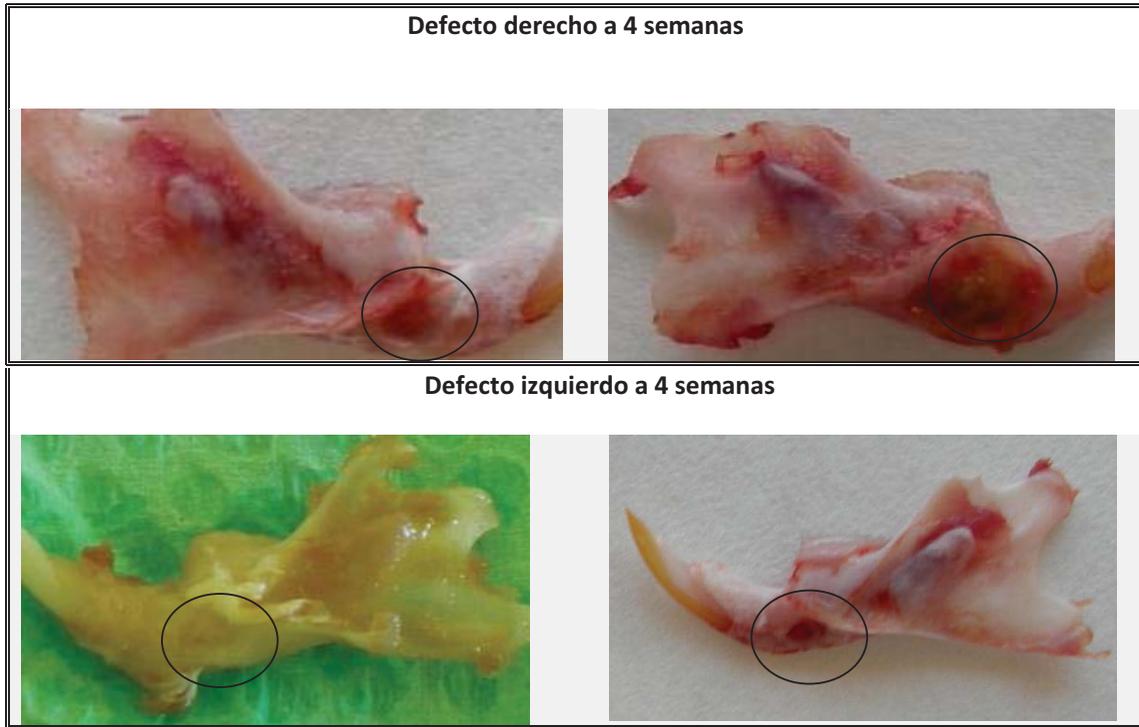


Figura 22 Fotos de las evaluaciones clínicas post-mortem representativas a los tiempos experimentales de 4 semanas donde se indica la zona del defecto dentro del círculo negro.

DISCUSIÓN

Para la cirugía ortopédica, maxilofacial y odontológica es importante el estudio de nuevos tratamientos y biomateriales que estimulen la reparación y regeneración ósea, debido a que la pérdida ósea causa elevados costos económicos, así como periodos de tratamiento prolongados que además, pueden llegar a complicarse.

En su vida profesional, el Cirujano Dentista implementa diferentes tratamientos que conllevan la regeneración ósea en el paciente; sin embargo, la efectividad de muchos de estos tratamientos está limitada por factores asociados al estado sistémico del paciente y al hueso de baja calidad y cantidad; situaciones que afectan una rehabilitación exitosa (Al Qabbani, 2018). En la presente tesis se utilizó un modelo de defecto óseo en la mandíbula de la rata para emular la situación de pérdida ósea que se puede dar en la cortical mandibular de pacientes que son sometidos a una extracción dental (Simons, 2015), traumatismo, lesiones, en pérdida de los órganos dentarios, uso prolongado de prótesis desajustadas y/o en mal estado (Shanbhag, 2016); así como de resecciones radicales óseas por tumores y neoplasias; y que además se ven afectados por osteoporosis.

Cada vez son más los pacientes que se presentan a la consulta con enfermedades óseas metabólicas, como la osteoporosis, que conducen a la desmineralización ósea, como resultado de ciclos de remodelación desequilibrados (Alexei DeCastro MD, 2018). La osteoporosis se caracteriza por una disminución de la masa ósea esquelética y fragilidad ósea que causan fracturas. Dado que la pérdida ósea en la osteoporosis es una condición generalizada, también afecta al esqueleto craneal, habiendo evidencia de pérdida de hueso alveolar como manifestación de osteoporosis. Estudios, como el Tanaka y cols indican que, en ratas con ovariectomía, la deficiencia de estrógenos causa adelgazamiento del hueso alveolar y del tabique interradicular del primer molar en las mandíbulas dentadas (Tanaka, 2003).

En la consulta dental, es común recibir a pacientes que padecen osteoporosis y que además, sufren de pérdida ósea mandibular, la relación entre estas dos pérdidas debe ser considerada por el Cirujano en el momento de la planeación del tratamiento, considerando

que a partir de la menopausia en las mujeres, y de más de 50 años de edad en los hombres, existe pérdida fisiológica progresiva de la masa ósea de aproximadamente un 0.5% por año (Alonso-Bouzon, 2011). Adicionalmente, esta pérdida puede verse aumentada por factores genéticos y nutricionales, así como la actividad física y el recambio óseo de cada paciente (Soler, 2014), (Betancourt, 2014).

Experimentalmente, la tasa de pérdida de masa ósea inducida por osteoporosis puede depender del método empleado; sin embargo, la ovariectomía bilateral se considera el procedimiento más confiable en modelos de osteoporosis (Lelovas, 2008) ya que se ha reportado que después de la cirugía (OVX), la enfermedad se desarrolla a partir de los 3 meses; algunos autores como López y cols reportaron cambios óseos desde las 6 semanas (Lopez-Grueso, 2010).

En esta tesis se decidió usar un modelo de osteoporosis por OVX y defecto óseo mandibular para estudiar la relación de la regeneración ósea mandibular cuando hay pérdida ósea sistémica (Iriarte, 2010; Ramirez-Porras, 2015; Gutiérrez-Escalona, 2018). Los primeros cambios luego de la OVX se pueden observar en el ancho del hueso cortical a los 180 días (Lelovas, 2008); sin embargo, en nuestros especímenes observamos estos cambios visibles radiográficamente aun en menos días. En nuestro modelo, las ratas sanas y con OVX de la misma edad, presentaron diferencias entre la ganancia de peso, ya que las ratas OVX presentaron un aumento de peso de 201 ± 35 g en comparación con las sanas que aumentaron 123.8 ± 29.5 g. Incluso se observó que con el paso de los meses, las ratas OVX mostraron fragilidad ósea ya que dos de los especímenes presentaron luxación de tobillo y fractura de la tibia (Richette, 2009) (Pineda).

Cabe mencionar que adicionalmente se observaron diferencias histológicas en ambos grupos, ya que en los especímenes con OVX observamos trabéculas con espacios amplios con medula y en el hueso típicamente cortical, observamos osteocitos que presentaron lagunas osteocitarias de mayores dimensiones en comparación con los especímenes sin OVX, en los que se observó un hueso cortical denso sin presencia médula ósea y con osteocitos distribuidos de manera regular en el tejido; se dice que en el hueso cortical, la ampliación de la cavidad medular es una medida indirecta de la pérdida ósea; y en este caso es así, ya que solo los especímenes con OVX presentaron espacio medular.

También se dice que el análisis de la mitad del área interna del eje en los huesos corticales es un índice sensible de pérdida ósea, y así lo pudimos observar, ya que en los especímenes con OVX, aunque, el grosor de la cortical no se presentó disminuido, sí se observó con hueso con apariencia trabecular con espacios medulares amplios.

Los biomateriales usados como andamios deben poseer función mecánica, arquitectura altamente porosa y rendimiento biológico favorable para promover el crecimiento rápido del tejido óseo y la vascularización (Wang, 2015). El biomaterial que empleamos en la presente tesis es un andamio poroso que posee macroporos (poros de 10 a 100 nm) que permiten mantener la estabilidad estructural del andamio, promueven la adhesión y proliferación celular, y permiten el transporte de nutrientes (Manzano M., 2018), además, es denominado bioactivo cuando es funcionalizado, ya que controla la liberación de moléculas, en este caso de la PTHrP; sin embargo al colocarlo en los especímenes tanto en los grupos con y sin OVX la liberación de la molécula provocó hiperplasia, evidente en los grupos S.Af.PTHrP.4s y O.Af.PTHrP.4s.

El andamio utilizado en este trabajo se fabricó de SiO_2 85% - CaO 10%- P_2O_5 5% por lo que es degradable y debería ser reabsorbido dentro del defecto óseo al mismo tiempo que permite la regeneración, al respecto en los grupos en lo que el APTS estuvo funcionalizado, observamos, tanto en ratas sanas como en OVX que una formación de tejido conectivo fibroso lo rodeó y encapsuló, lo que llama la atención, ya que se ha reportado que el sílice puede ser un material adecuado y similar a la apatita (Vallet-Regí, 2011) (Vallet-Regí M. , 2010) (Wu, 2012) y cuando el APTS fue implantado sin funcionalizar y sin la PTHrP, entonces actuó como un andamio con propiedades osteoconductoras que permitió la invasión de las células con potencial osteogénico dentro del mismo con una reabsorción gradual.

Se esperaría, entonces que APTS con PTHrP (no funcionalizado) mostrara propiedades osteoinductoras como las que ya han sido reportadas por otros autores), y que le atribuyen a la PTHrP la capacidad de inducir el reclutamiento y la activación de osteoprogenitores, sobretodo en especímenes osteoporóticos (Lozano D. M.-R.-B., 2010) (Lozano D. T.-B., 2012) (Portal-Núñez, 2018) (Quinlan, 2017) y en nuestros resultados, si bien, la PTHrP



promovió la regeneración de manera intensa y el defecto se cerró; la actividad de la PTHrP no fue contralada en los grupos y solo en el grupo S.PTHrP.4s. se observó una actividad adecuada, en donde promueve la regeneración de manera eficaz mostrando un incremento en la cantidad y calidad ósea.

CONCLUSIÓN

El andamio macroporoso de biovidrio (sin funcionalizar) APTS presentó propiedades osteoconductoras al comportarse como un relleno de lenta reabsorción en los defectos, dando lugar a que el propio tejido del huésped regenerara alrededor del él y lo integrará con el tejido conectivo durante su degradación.

El biomaterial funcionalizado APTS_F no presentó propiedades osteoconductoras y se encapsuló en los grupos en los que se implantó (S.A_F.PTHrP.4s y O.A_F.PTHrP.4s), por lo que no fue posible observar que su uso como vehículo de liberación lenta y controlada de la PTHrP diera buen resultado. Por su parte, el grupo S.A_F.PTHrP.4s presentó inflamación crónica y un tejido conectivo fibroso que encapsuló al biomaterial y evitó la regeneración ósea, además de que el biomaterial no se observó degradado.

De manera general podemos decir que en todos los grupos la PTHrP favoreció la formación de tejido óseo y se comporta como una molécula osteoinductora no controlada, favoreciendo la formación de hiperplasias en áreas vecinas a donde se implantó, siendo su acción más evidente en los grupos: O.A_F.PTHrP.4s y S.A_F.PTHrP.4s.

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1 Fases del remodelado óseo en la superficie del hueso trabecular. Origen y localización de las células óseas (Evia, 2011).	14
Figura 2 Imagen del método de funcionalización (Peña, 2000)	25
Figura 3 Imagen de la mesa de trabajo para ovariectomía	40
Figura 4 Imagen de la cirugía de ovariectomía experimental	41
Figura 5 Algoritmo para la selección de intervenciones experimentales para inducir osteopenia u osteoporosis en la rata de laboratorio (Mourelle, 2013).	42
Figura 6 (A) Mesa de trabajo con el instrumental ordenado que se utiliza para la cirugía de defecto, (B) Mesa de mayo con micromotor, (C) Foto clínica de la realización del defecto crítico. (D) defecto crítico.	43
Figura 7 Imagen del biomaterial APTS	44
Figura 8 (A) Baño para extensión de preparaciones (B) Micrótopo Leica.	46
Figura 9 Grupo S.A.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN- Tejido de Neoformación, B-Biomaterial, IN- Inflamación ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original. En la imagen se observa el defecto relleno por tejido conectivo en casi su totalidad, pero contiene a manera de islotes áreas con tejido óseo neoformado y restos del biomaterial que se integra en el tejido conectivo. En el área cercana al ligamento periodontal se observa inflamación con células mononucleares.	57
Figura 10 Grupo O.A.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, B- Biomaterial, ★- Osteocito, ◆ Osteoblasto, ↔- dimensiones del defecto original.	51
Figura 11 Grupo S.A.PThrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x, b) Zona del defecto óseo a 40x ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, B-Biomaterial, IN- Inflamación, ↔- dimensiones del defecto original.	52
Figura 12 Grupo O.A.PThrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. c) Zona del defecto óseo a 40x. d) Zona de hiperplasia ósea a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, P-Pulpa, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, B-Biomaterial, ↔- dimensiones del defecto original.	53
Figura 13 Grupo S.PThrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, M-Médula, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original.	54
Figura 14 Grupo O.PThrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) ZD-zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, IN- Inflamación, ★- Osteocito, ◆ Osteoblasto, ↔- dimensiones del defecto original.	55
Figura 15 Grupo S.Af.PThrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x; b) Hiperplasia ósea vecina al defecto en apical de la mandíbula a 10x; c) Zona del defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, B- Biomaterial, HO- Hiperplasia ósea, ↔- dimensiones del defecto original.	56
Figura 16 Grupo O.Af.PThrP.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona de defecto óseo a 40x. ZD- zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, B-Biomaterial ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original.	57
Figura 17 Grupo S.sham.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona Del defecto óseo a 40x. ZD-zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento	

<i>periodontal, P-Pulpa, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original.</i>	58
<i>Figura 18 Grupo O.sham.4s. Corte histológico con tinción H&E a) Corte transversal de la mandíbula a nivel del defecto óseo a 10x b) Zona Del defecto óseo a 40x. ZD-zona del defecto óseo. D-Diente, L-Ligamento periodontal, C-Hueso Cortical, TC-Tejido Conectivo, TN-Tejido de Neoformación, ★- Osteocito, ↔- dimensiones del defecto original.</i>	59
<i>Figura 19 Comparación de los grupos sin y con OVX a las 4 semanas.</i>	62
<i>Figura 20 Radiografía de miembro anterior izquierdo de rata sana.</i>	66
<i>Figura 21 Radiografía de miembro anterior izquierdo de rata ovx.</i>	66
<i>Figura 22 Fotos de las evaluaciones clínicas post-mortem representativas a los tiempos experimentales de 4 semanas donde se indica la zona del defecto dentro del círculo negro.</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1 Factores predisponentes para la osteoporosis. (Calleja-Quevedo E, 2009)</i>	18
<i>Tabla 2 Criterios de la OMS (Calleja-Quevedo E, 2009)</i>	19
<i>Tabla 3 Medicamentos aceptados y disponibles para la osteoporosis en México (Clark, 2010).</i>	19
<i>Tabla 4 Peso de especímenes sanos. a) peso inicial b) peso en el momento de la cirugía. c) peso en la cuarta semana de estudio.</i>	45
<i>Tabla 5 Peso de especímenes OVX. a) peso inicial b) peso en el momento de la cirugía. c) peso en la cuarta semana de estudio</i>	45

TRABAJOS CITADOS

- Al Qabbani, A. A. (2018). Three-Dimensional Radiological Assessment of Alveolar Bone Volume Preservation Using Bovine Bone Xenograft. *Journal of Craniofacial Surgery*, 29(2), e203-e209.
- Aldo R. Eynard, M. A. (s.f.). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*.
- Alexei DeCastro MD, S. B. (2018). Osteoporosis. En R. D. Kellerman, & E. T. Bope, *Conn's Current Therapy* (págs. 891-895). Elsevier, Inc.
- Alonso-Bouzon, C. &. (2011). . Osteoporosis senil: una actualización. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 46(4), 223-229.
- Baino, F. &.B. (2011). Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: Current trends and forecasts for the future. *Journal of biomedical materials research Part A*, 97(4), 514-535.
- Bernabé, P. F.-F. (2012). Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clinical oral implants research*, 23(3), 384-388.
- Bernabé, P. F.-F. (2012). Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clinical oral implants research*, 23(3), 384-388.
- Betancourt, S. O. (2014). Bone mineral density, dietary calcium and risk factor for presumptive osteoporosis in Ecuadorian aged women. *Nutricion hospitalaria*, 30(2), 372-384.
- Bucchi, C. B. (2017). Radiopacity of alloplastic bone grafts measured with cone beam computed tomography: An analysis in rabbit calvaria. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 17(1), 61.
- Cabrerizo Medina, E. V. (2015). Estudio histopatológico de la evolución temporal de las lesiones. *Cuadernos de Medicina Forense*, 21(3.4), 127-134.
- Calleja-Quevedo E, C. M.-A.-S.-M. (11 de Noviembre de 2009). *FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOPOROSIS POSMENOPÁUSICA. ASPECTOS CLÍNICOS Y PERSPECTIVAS DE TRATAMIENTOS*. Obtenido de http://www.facmed.unam.mx/sms/temas/2009/11_nov_2k9.pdf
- Chevalier, J. &. (2009). Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society*, 29(7), 1245-1255.
- Clark, P. C. (2010). Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico. *Archives of osteoporosis*, 5(1-2), 9-17.
- Cornish, J. C. (1997). Parathyroid hormone-related protein-(107–139) inhibits bone resorption in vivo. *Endocrinology*, 138(3), 1299-1304.
- de Castro Díaz, L. A. (2009). *Acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) sobre la regeneración ósea comprometida por glucocorticoides y en la osteoporosis experimental por depleción estrogénica en ratón*. (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).
- Deleze, M. C.-M.-T.-G.-R. (2000). Geographic differences in bone mineral density of Mexican women. *Osteoporosis international*, 11(7), 562-569.
- Develos Godoy, D. J. (2018). Collagen and mPCL-TCP scaffolds induced differential bone regeneration in ovary-intact and ovariectomized rats. *Bio-medical materials and engineering*, 29(3), 389-399.
- Esbrit, P. &. (2000). The emerging role of parathyroid hormone-related protein as a renal regulating factor. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(8), 1109-1111.
- Esbrit, P. H.-N.-P. (2016). Parathyroid hormone-related protein analogs as osteoporosis therapies. *Calcified tissue international*, 98(4), 359-369.
- Evia, J. B. (2011). Marcadores del Remodelado Óseo y Osteoporosis. *Revista Mexicana Patología Clínica*, 58(3), 113-137.
- Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I. A. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 11(1), 47-51.

- Gómez Arcila, V. B. (2014). Regeneración ósea guiada: nuevos avances en la terapéutica de los defectos óseos. *Revista Cubana de Estomatología*, 51(2), 187-194.
- Guercio Mónaco, E. (1999). La osteoporosis. Sus efectos sobre la cavidad bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 37(2), 95-97.
- Gutiérrez Escalona, R. (2018). *Evaluación de dos modelos de defectos en la cortical mandibular de rata wistar por medio de micro-CT*. México: UNAM, Iztacala.
- Hench, L. S. (1971). Mecanismos de unión en la interfaz de materiales protésicos cerámicos. *Journal of Biomedical Materials Research Parte A*, 5(6), 117-141.
- Herradón, A. L. (2014). *Acciones osteogénicas de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en modelos experimentales de diabetes mellitus tipo 1 y con déficit del factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I)*. (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Iñiguez-Ariza, N. &. (2015). Biología ósea, vías de señalización y dianas terapéuticas para la osteoporosis. *Maturitas.*, 82(2), 245 – 255.
- Iriarte, C. G. (2010). *Terapia celular para la reparación ósea de la cavidad bucal. Modelo experimental de defecto mandibular*. España: Universidad de Alcalá.
- Kribbs, P. J. (1989). Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *The Journal of prosthetic dentistry*, 62(6), 703-707.
- Kumar, V. A. (2010). *Patología estructural y funcional de Robbins y Cotran*. (No. 8A QY 4 ROB ROB).
- Lafita, J. (2003). Fisiología y fisiopatología ósea. In Anales del sistema sanitario de Navarra. *Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.*, 26, 7-17.
- Lelovas, P. X. (2008). La rata de laboratorio como modelo animal para la investigación de la osteoporosis. *Medicina comparativa*, 58(5), 424-430.
- Liu Z., Y. C. (2015). Distributional variations in trabecular architecture of the mandibular bone: an in vivo micro-CT analysis in rats. *PloS one*, 10(1).
- Liu, Z. Y. (2015). Distributional variations in trabecular architecture of the mandibular bone: an in vivo micro-CT analysis in rats. *PloS one*, 10(1).
- Lopez-Grueso, R. B. (2010). Aging and ovariectomy cause a decrease in brain glucose consumption in vivo in Wistar rats. *Revista española de geriatría y gerontología*, 45(3), 136-140.
- Lozano Borregón, D. (2010). Acciones osteogénicas del fragmento C-terminal de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) en la regeneración ósea.
- Lozano, D. M.-R.-B. (2010). Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta biomaterialia*, 6(3), 797-803.
- Lozano, D. T.-B. (2012). Osteostatin-loaded onto mesoporous ceramics improves the early phase of bone regeneration in a rabbit osteopenia model. *Acta biomaterialia.*, 8(6), 2317-2323.
- Manzano M., &. V.-R. (2018). Mesoporous silica nanoparticles in nanomedicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(5), 65.
- Manzano, M. &. -R. (2010). New developments in ordered mesoporous materials for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry*, 20(27), 5593-5604.
- McGovern, J. A. (2018). Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease models & mechanisms*, 11(4).
- Mendoza Hermoso, M. T. (2003). Classification of osteoporosis. Risk factors. Clinical manifestations and differential diagnosis. . In *Anales del sistema sanitario de Navarra.*, 26, 29-52.
- Moriya, Y. I. (1998). Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *Journal of oral Science*, 40(4), 171-175.
- Mourelle, A. C. (2013). Recomendaciones para manipulación y sujeción de ratas y ratones de laboratorio.
- Neer, R. A. (2001). Efecto de la hormona paratiroidea (1-34) sobre fracturas y densidad mineral ósea en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 344(19), 1434-1441.
- Pain, I. A. (2009). *International Association for the Study of Pain*. Obtenido de <https://s3.amazonaws.com/rdcms->

iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/GlobalYearAgainstPain2/MusculoskeletalPainFactSheets/Osteoporosis_Spanish.pdf

- Pain, I. A. (2009). *osteoporosis*. Obtenido de https://s3.amazonaws.com/rdcms-iasp/files/production/public/Content/ContentFolders/GlobalYearAgainstPain2/MusculoskeletalPainFactSheets/Osteoporosis_Spanish.pdf
- Pedrajas Navas, J. M. (2008). Bases neuromédicas del dolor. *Clínica y Salud*, 19(3), 277-293.
- Peña J, A. N.-R. (2000). *Aplicaciones biomédicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón*. Universidad Complutense de Madrid.
- Peña J., C. T.-B.-R. (2006). Long term degradation of poly (ϵ -caprolactone) films in biologically related fluids. *Polymer Degradation and Stability*, 91(7), 1424-1432.
- Pineda, R. L. (s.f.). MENOPAUSIA. RIESGOS Y BENEFICIOS DE LA TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO. . *Menopausia-Andropausia*.
- Portal-Núñez, S. A.-B. (2018). Parathyroid hormone-related protein exhibits antioxidant features in osteoblastic cells through its N-terminal and osteostatin domains. *Bone & joint research*, 7(1), 58-68.
- Quinlan, E. L.-N. (2017). La liberación controlada de factor de crecimiento endotelial vascular a partir de micropartículas de alginato secadas por pulverización en andamios de colágeno-hidoxiapatita para promover la vascularización y reparación ósea. *Revista de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa*.
- Ramirez Porras, M. E. (2015). *Validación de defecto crítico en hueso mandibular de rata en la cepa wistar*. México: UNAM, Fes Iztacala.
- Ramírez, M. (2015). *Validación de defecto crítico en hueso mandibular de rata*. México.
- Regí, M. V. (2011). Fármacos, nanomedicina y biomateriales: un objetivo común. *Discursos*.
- Richette, P. (2009). Generalidades sobre la artrosis: epidemiología y factores de riesgo. *EMC-Aparato Locomotor*, 42(1), 1-6.
- Rimondini, L. (2005). In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.
- Sanz-Ruiz, P. C.-H.-M.-D.-M. (2017). Biarticular total femur spacer for massive femoral bone loss: the mobile solution for a big problem. . *Arthroplasty Today*.
- Schulz, M. C. (2017). Site-specific variations in bone mineral density under systemic conditions inducing osteoporosis in minipigs. *Frontiers in physiology*, 8, 426.
- Shanbhag, S. P. (2016). Alveolar bone tissue engineering in critical-size defects of experimental animal models: a systematic review and meta-analysis. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*.
- Silva, B. y. (2015). Hormona paratiroidea: acciones anabólicas y catabólicas sobre el esqueleto. *Opinión actual en farmacología*, 22, 41-50.
- Simons, W. F. (2015). The proportion of cancellous bone as predictive factor for early marginal bone loss around implants in the posterior part of the mandible. *Clinical oral implants research*, 26(9), 1051-1059.
- Soler, P. A. (2014). El anciano con osteoporosis. En S. B. Naranjo, *Tratado de medicina geriátrica+ acceso web: Fundamentos de la atención sanitaria a los mayores* (págs. 670-678). Elsevier Health Sciences.
- Strube, P. M. (2009). Sexspecific compromised bone healing in famel rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone*, 1065-72.
- Tamayo JA, L. E. (2013). *Osteoporosis*. Mexico: Mc Graw Hill educación.
- Tanaka, M. T. (2003). Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. Oral Radiology, and Endodontology.*, 95(4), 495-502.
- Tejada Romero, M. G. (2014.). Osteoporosis: definición, tendencia epidemiológica, avances en la fisiopatología y clínica. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.*, 11(60), 3527-3534.

- Trejo, C. G. (2010). The osteoinductive properties of mesoporous silicate coated with osteostatin in a rabbit femur cavity defect model. *Biomaterials*, 31(33), 8564-8573.
- Turner, A. S. (2001). Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *Eur Cell Mater*, 1(13), 66-81.
- Valín, A. G. (2001). C-terminal parathyroid hormone-related protein (PTHrP)(107–139) stimulates intracellular Ca²⁺ through a receptor different from the type 1 PTH/PTHrP receptor in osteoblastic osteosarcoma UMR 106 cells. *Endocrinology*, 142(7), 2752-2759.
- Valín, A. G.-O. (1997). Antiproliferative effect of the C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107–111) and (107–139), on osteoblastic osteosarcoma cells. *Journal of cellular physiology*, 170(2), 209-215.
- Vallet-Regí, M. &.-H. (2011). Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine. *Advanced Materials*, 23(44), 5177-5218.
- Vallet-Regí, M. (2006). Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Transactions*, 44, 5211-5220.
- Vallet-Regí, M. (2010). Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine. *Journal of internal medicine*, 267(1), 22-43.
- Wactawski-Wende, J. G. (1996). The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 67(10s), 1076-1084.
- Wang, J. W. (2015). Biomimetically Ornamented Rapid Prototyping Fabrication of an Apatite–Collagen–Polycaprolactone Composite Construct with Nano–Micro–Macro Hierarchical Structure for Large Bone Defect Treatment. *ACS applied materials & interfaces*, 7(47), 26244-26256.
- Weitzman, M. P. (2006). Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest*, 94-186.
- Wu, C. &. (2012). Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application. *Interface Focus*, rfs20110121.
- Wu, C. R. (2009). The effect of mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug-release properties of poly (DL-lactide-co-glycolide) films. *Biomaterials*, 30(12), 2199-2208.
- Yang, T. H. (2017). Fabrication of hierarchical macroporous biocompatible scaffolds by combining pickering high internal phase emulsion templates with three-dimensional printing. *ACS applied materials & interfaces*, 9(27), 22950-22958.

ANEXOS

ANEXO 1

Método	Descripción
Métodos de recubrimiento	Los cuerpos porosos poliméricos (por ejemplo, espumas, estructuras fibrosas y mallas) se recubren homogéneamente mediante una capa de partículas de vidrio (cerámica) mediante inmersión en suspensión. Este método es análogo a la técnica de replicación de esponja, pero los polímeros porosos revestidos de vidrio no se tratan térmicamente para eliminar la fase orgánica y sinterizar la inorgánica.
El autoensamblaje inducido por evaporación (EISA)	Permite producir mesofases de sílice pura y gafas mesoporosas basadas en sílice. Comenzando con una solución homogénea de alcóxidos metálicos y tensioactivos preparados en disolvente de agua / etanol, la evaporación preferencial de etanol da como resultado la concentración de la película de depósito en agua y el agente tensioactivo no volátil y las especies de sílice. La concentración progresivamente creciente de tensioactivos impulsa el autoensamblaje de la micela de sílice / tensioactivo y su posterior organización en mesofases cristalinas líquidas. La eliminación del tensioactivo a través de la calcinación finalmente produce el marco mesoporoso abierto. Mediante la variación de algunos parámetros de síntesis, tales como el tipo de tensioactivo y alcóxidos, relación molar etanol / agua / surfactante, temperatura y pH, es posible obtener materiales con diferentes mesoestructuras finales y tamaños de poro.
H ₂ O ₂ espuma	Polvo de vidrio se mezcla homogéneamente con H ₂ O ₂ soluciones; después, la mezcla se funde en moldes y se mantiene a 60 ° C en un horno. Después del proceso de formación de espuma, las muestras pueden sinterizarse para obtener andamios de vidrio / vitrocerámica.
Espumación <i>in situ</i>	Los polvos de vidrio Sol-gel se dispersan en un lote de monómeros líquidos apropiados; después de la polimerización completa, se obtuvieron espumas poliméricas cargadas de vidrio, y un tratamiento térmico final permitió la combustión del polímero y el sinterizado de partículas de vidrio.
Sinterización de microesferas	Las microesferas cerámicas (vidrio) / polímero compuestas sintetizadas mediante el método de emulsión / evaporación del disolvente se sinterizan en moldes apropiados para obtener las estructuras porosas 3D finales.
Quemado de fase orgánica	Los compactos de polvos ("cuerpos verdes") se obtienen mediante prensado de mezclas de partículas de cerámica (vidrio) y gránulos de fase orgánica (por ejemplo, polietileno). Los "verdes" se tratan térmicamente para eliminar las fases poliméricas,

Método	Descripción
Sol gel	<p>actuando como formadores de poros, y para sinterizar las partículas de vidrio.</p> <p>Este proceso permite la síntesis de materiales cerámicos de alta pureza y homogeneidad mediante técnicas de preparación diferentes de las tradicionales. Una solución de alcóxidos metálicos (por ejemplo, TEOS) conduce a la formación de una nueva fase (sol) mediante reacciones de hidrólisis y condensación. El sol está hecho de partículas sólidas nanométricas suspendidas en una fase líquida; tras el envejecimiento, las partículas se condensan en un material similar al gel. Después de secar a baja temperatura (<200 ° C), el material se somete a un tratamiento a alta temperatura (> 500 ° C) para eventualmente obtener monolitos de vidrio, revestimientos o polvos.</p>
Sol-gel de espumación	<p>Las alícuotas de sol, que se han preparado para obtener vidrio sol-gel de la composición deseada, se espuman mediante agitación vigorosa con la adición de un detergente apropiado. A medida que se alcanza el punto de gelificación, las soluciones espumadas obtenidas se moldean en moldes, se envejecen, se secan y finalmente se sinterizan para obtener andamios de vidrio / vitrocerámica.</p>
Fabricación de forma libre sólida (SFF)	<p>Grupo de técnicas, a menudo denominadas métodos de prototipado rápido, que implican un enfoque de diseño y fabricación asistido por ordenador (CAD / CAM). Los datos digitales adquiridos por técnicas de imágenes de alta resolución (por ejemplo, microtomografía computarizada) permiten un diseño exacto de la estructura del andamio. El modelo de andamio derivado de CAD se utiliza como entrada para un sistema CAM (por ejemplo, modelado de deposición fundido, impresión por chorro de tinta) capaz de reproducir, capa por capa, su arquitectura 3D.</p>
Lixiviación de disolventes / lixiviación de partículas (SCPL)	<p>Se disuelve un polímero en un disolvente orgánico y luego se añaden partículas de sal con dimensiones específicas a la solución. Se pueden añadir partículas de cerámica o de vidrio a la mezcla que se moldea en su geometría final moldeándola en un molde. Cuando el disolvente se evapora, crea una estructura de material compuesto que consiste en las partículas junto con el polímero. El material compuesto se coloca entonces en un baño que disuelve los granos de sales, dejando atrás una estructura porosa.</p>
Replicación de esponja	<p>Implica la impregnación de una plantilla polimérica porosa (por ejemplo, una esponja de poliuretano comercial) con una suspensión de cerámica (vidrio), seguida por la eliminación de la fase orgánica (combustión) y el sinterizado de las partículas inorgánicas a través de un tratamiento térmico. El polímero se empapa en la suspensión que se filtra en la estructura, de modo que las partículas de cerámica (vidrio) se adhieran a las superficies de la plantilla. La suspensión excesiva se elimina de los poros dejando un revestimiento homogéneo sobre los puntales de espuma. Después de la sinterización, se obtiene finalmente una réplica cerámica</p>

Método	Descripción
<p>Consolidación de almidón</p>	<p>(derivada de vidrio) de la arquitectura de la esponja, imitando estrechamente el hueso esponjoso.</p> <p>Las partículas de almidón derivadas de maíz, arroz o patata y polvo de vidrio se mezclan con agua destilada para obtener una suspensión que se agita continuamente y se mantiene a 70-80°C. El almidón experimenta hinchamiento debido a la absorción de agua, dando lugar a un material similar al gel que, después de la consolidación, es tratado térmicamente para eliminar la fase orgánica y sinterizar la inorgánica.</p>
<p>La separación de fases inducida térmicamente (TIPS)</p>	<p>Se disuelve un polímero en un disolvente adecuado y se agita para obtener una solución polimérica homogénea a la que se puede añadir una cantidad dada de vidrio o polvo cerámico. A continuación, la mezcla se vierte en moldes, se somete a ultrasonidos y se transfiere a un baño de enfriamiento conectado a una bomba de vacío. El disolvente es finalmente sublimado, dejando así una estructura compuesta polimérica / vidrio (cerámica) solidificada porosa.</p>

ANEXO 2

Tabla 1.
Comparación de los cambios histológicos en los tejidos en función del tiempo de evolución de la lesión.

Tiempo de evolución	Dettmeyer Acording Janssen ²	Sauko y Knight ³	Betz ¹⁰	Umani Ronchi ⁴
<1 hora	Invasión de granulocitos: marginación en la intima del vaso	Marginación de polimorfonucleares Depósito de fibrina	Aparición de neutrófilos (20-30 min)	Ausencia de cualquier signo histológico de inflamación
2-4 horas	Desgranulación de mastocitos Invasión de monocitos Reacción fagocitaria	Desgranulación de mastocitos	Presencia de macrófagos	Aparición de células mononucleares Fagocitosis
4-6 horas	Aumento de la reacción de hiperemia en la periferia Depósito de fibrina	Inicio de migración de polimorfonucleares extravascular		Aumento de la hiperemia, depósito de fibrina, aumento de células mononucleares
6-8 horas	Necrobiosis de células y tejido Delimitación del foco inflamatorio Aumento de la fagocitosis			
8-12 horas	Mayor aumento de células mononucleares y de histiocitos, invasión de macrófagos simples			Más polimorfonucleares que macrófagos, con una proporción 5:1 Necrosis inminente de la zona central de la herida
12-24 horas	12-16 horas: Predominio de células mononucleares Descomposición de leucocitos polimorfonucleares	Demarcación de los márgenes de la herida por polimorfonucleares Progresivo reemplazo de polimorfonucleares por células mononucleares Activación de fibroblastos e inicio de la reepitelización	20 horas: Macrófagos > polimorfonucleares	16 horas: Aumento relativo de macrófagos; la proporción de granulocitos/macrófagos se reduce a 0,4:1
24-72 horas	16-32 horas: Movilización de macrófagos, proliferación de células con incremento de fibroblastos, inicio de la angiogénesis 32-72 horas: Formación de tejido de granulación con fibras de colágeno y capilares sanguíneos Siderófagos y lipófagos	Máxima infiltración de polimorfonucleares a las 48 horas Inicio de la reparación con aumento de fibroblastos y tejido de granulación	1 día: Fibroblastos 2 días: Migración de queratinocitos	32 horas: Necrosis evidente de la zona central de la herida 48 horas: Máxima concentración de macrófagos en los bordes 32-72 horas: Formación de tejido de granulación
3-6 días	Aumento del colágeno, disminución importante de macrófagos, regeneración de mastocitos, posibilidad de células gigantes de cuerpo extraño	Proceso de reparación florido Revitalización evidente	3 días: Lipófagos, eritrófagos, siderófagos 5 días: Reepitelización completa	Inicio de la angiogénesis Visualización de la fibra de colágeno
10-15 días	Tejido cicatricial más denso con menor celularidad Disminución de la vascularización	Gradual regresión del contenido celular Epidermis completa, pero adelgazada Depósito de colágeno Fibras elásticas escasas		Inicio de la formación de la cicatriz

Table Analyzed	Data 1		
Kruskal-Wallis test			
P value	< 0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	10		
Kruskal-Wallis statistic	86.85		
Dunn's Multiple Comparison Test			
	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
PESO INICIAL SANAS vs PESO FINAL SANAS	-35.25	Yes	**
PESO Qx SANAS vs PESO Qx OVX	-27.25	No	ns
PESO FINAL SANAS vs PESO FINAL OVX	-20.5	No	ns
PESO INICIAL OVX vs PESO FINAL OVX	-57	Yes	***

ANEXO 4



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



DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

Estudio de la respuesta osteoconductor de biomateriales e Ingeniería de tejidos en defectos mandibulares de ratas con osteoporosis

que será sometido a la convocatoria: PAPIIT.

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 11 días del mes de enero del 2017

Biol. MUÑOZ LOPEZ JOSE LUIS
Presidente





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



Los Reyes Iztacala a 14/09/2017

Oficio: **CE/FESI/092017/1089**

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 **Estudio de la respuesta osteoconductor de biomateriales e Ingeniería de tejidos en defectos mandibulares de ratas con osteoporosis**, que va a someter a **COLABORACIÓN CON EL GRUPO (GITBIT) de la Universidad de Alcalá y un PAPIIT 2017 y tesis.**

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

