



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS
Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

REGENERACIÓN ÓSEA MANDIBULAR EN UN MODELO DE
OSTEOPOROSIS EN RATAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (ODONTOLÓGICAS)

PRESENTA:

C.D. TOBIAS LÓPEZ LUIS FERNANDO

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



COMITÉ TUTOR:

DR. ALVAREZ PEREZ MARCO ANTONIO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM

DR. MONTESINOS MONTESINOS JUAN JOSÉ
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**
(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción 1 y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado "Regeneración ósea mandibular en un modelo de osteoporosis en ratas" que presenté para obtener el grado de Maestría en Ciencias es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Luis Fernando Tobias López

Número de cuenta: 311203781



Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte
Vo. Bo. Tutor principal

Agradecimientos.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrir incontables puertas al conocimiento, y por permitir realizar el presente trabajo.

Agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y la Facultad de Odontología para proporcionarme todo el bagaje de conocimientos y años de experiencia a través de todos los académicos con los que tuve acercamiento.

Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

Agradezco a Conacyt por proporcionarme el apoyo económico durante mis estudios.

A la Dra. Cynthia Georgina Trejo Iriarte por la confianza que depositó en mi para realizar este proyecto, y por la motivación para iniciarlo.

Al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y al Dr. Juan José Montesinos Montesinos, por el tiempo, recursos y conocimientos que me aportaron.

Agradezco a mi papá y a mi mamá, por la paciencia que me han tenido a lo largo de la realización de este trabajo y la disciplina que me inculcaron para poder cumplir mis objetivos, a mis hermanos por el apoyo que me han brindado todo este tiempo. A mi querida sobrina, que siempre me contagio de alegría cuando lo necesitaba.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Resumen.....	8
2. Introducción.....	9
3. Justificación.....	13
4. Pregunta de investigación.....	13
5. Hipótesis.....	14
6. Objetivo general.....	14
6.1. Objetivos específicos.....	14
7. Metodología.....	14
7.1 Diseño experimental.....	15
7.2 Modelo de osteoporosis.....	16
7.3 Obtención, aislamiento y cultivo de ADSC.....	17
7.4. Conteo celular con cámara Neubauer.....	18
7.5. Caracterización de las ADSC.....	19
7.6. Diferenciación al linaje osteogénico.....	21
7.7. Terapia celular con ADSC.....	21
7.8. Terapia celular con OST.....	22
7.9. Membranas de PLA.....	22
7.10. Procesamiento de las membranas de PLA.....	22
7.11. Diseño quirúrgico del defecto óseo mandibular.....	23
7.12. Adquisición de las microtomografías.....	24
7.13. Procesamiento y análisis de las microtomografías.....	25
7.13.1. Cálculo del volumen de regeneración.....	27
7.13.2. Cambios en la integridad ósea.....	27
7.13.3. Medición masa ósea.....	27
7.13.4. Grosor cortical mandibular.....	28
7.14. Análisis estadístico.....	29
8. Resultados.....	30
8.1. Aislamiento y cultivo de ADSC.....	30
8.2 Cambios en el peso entre OVX y OLD.....	31
8.3. Microtomografías.....	32
8.3.1. Volumen inicial de los defectos quirúrgicos.....	32
8.3.2. Masa ósea y grosor de la cortical.....	32
8.3.3. Reconstrucciones 3D del área del defecto.....	33
8.3.4. Porcentaje de regeneración volumétrica de los defectos.....	33

9. Análisis de resultados.	36
9.1. Volumen inicial de los defectos quirúrgicos.....	36
9.2. Volumen de masa ósea.	36
9.3. Grosor cortical.	36
9.4. Porcentaje de regeneración volumétrica de los defectos entre grupos OVX y OLD.	37
9.5. Porcentaje de regeneración volumétrica final de los defectos.....	37
9.6. Comparaciones descriptivas de los porcentajes de regeneración.	37
9.7. Cambio de peso entre OVX y OLD.	37
9.8. Crecimiento vertical del defecto.	38
9.9. Descripción morfológica del tejido regenerado en el defecto quirúrgico.	39
10. Discusión.	45
11. Conclusiones	50
12. Perspectivas.	51
13. Referencias bibliográficas.	52
14. Anexos.	61

ABREVIATURAS

Op	Osteoporosis
OVX	Ovariectomía bilateral
MSC	Mesenchymal Stem Cells, Células troncales mesenquimales
ISCT	International Society of Cell Therapy, Sociedad Internacional para la Terapia Celular
ADSC	Adipose Derived Stem Cells, Células troncales derivadas de tejido adiposo
BMSC	Bone Marrow Stem Cells, Células troncales derivadas de médula ósea
μTC	Microtomografía computarizada
OC	Osteoclastos
OB	Osteoblastos
UH	Unidades Hounsfield
SVF	Fracción estromal vascular
IT	Ingeniería de tejidos
ITO	Ingeniería de Tejidos Óseos
PLA	Ácido poliláctico
PCL	Policaprolactona
MPa	Mega pascal
MEC	Matriz extracelular

Glosario.

- **Osteoporosis.** Enfermedad metabólica del tejido óseo que se caracteriza por una densidad mineral ósea
- **Menopausia.** Cese permanente de la menstruación, confirmado tras 12 meses de amenorrea consecutiva después del último periodo menstrual¹.
- **Postmenopausia.** Periodo que inicia a partir del final de los 12 meses posteriores al último periodo menstrual¹.
- **Osteoblastos.** Células mononucleadas de origen mesenquimal que se encargan de la síntesis y mineralización de proteínas que conforman la matriz ósea².
- **Osteoclastos.** Células multinucleadas de origen hematopoyético, se encargan de la resorción ósea³.
- **Multidiferenciación.** Capacidad de las células troncales de diferenciarse en múltiples tipos celulares del cuerpo
- **Autorenovación.** Es el proceso por el cual las células troncales se dividen para perpetuar la fuente de células troncales a través de la vida de los organismos, y poder mantener un estado de diferenciación⁴
- **Plasticidad celular.** Es la capacidad de una célula de modificar su expresión fenotípica bajo distintas condiciones.
- **Fracción estromal vascular (SVF).** Es un conjunto heterogéneo de células contenidas en sitios dentro del tejido adiposo, alberga células inmunitarias (macrófagos, linfocitos T reguladores, etc) células endoteliales, pre-adipocitos, y células troncales⁵
- **Osteoinducción.** Es la inducción de células troncales mesenquimales indiferenciadas que no se encuentran comprometidas al linaje osteogénico, para formar células osteoprogenitoras, y con capacidad de producir hueso heterotópico⁶.
- **Osteoconducción.** Es la capacidad de los materiales para permitir la deposición de tejido mineral sobre su superficie y así formarse hueso nuevo⁷
- **Biocompatibilidad.** Es la habilidad de los materiales para ejercer una función esperada en un sistema vivo, sin causar daño o ejercer efectos negativos en el huésped^{8,9}.
- **Biodegradabilidad.** Es la cualidad de un material de poder ser degradado por los organismos
- **Termoestabilidad.** Es la habilidad de los materiales soportar la acción de calor sin perder drásticamente sus propiedades físico-mecánicas.
- **RUNX2.** Es un factor de transcripción crucial en la diferenciación y maduración de los osteoblastos, particularmente presente en la etapa temprana de diferenciación de MSC a pre-osteoblastos¹⁰
- **Coefficiente de atenuación.** Es la medición de que tanto es penetrado un objeto por una energía incidente. Cuantifica qué tanto se “debilita” la energía del haz al pasar por la muestra¹¹.
- **Unidades Hounsfield (UH).** Es una medición cuantitativa de la radiodensidad de un objeto tras un estudio tomográfico. Se produce una escala de grises, los tejidos más densos aparecen con aquellos tonos más brillantes, los menos densos son más opacos¹¹.

1. Resumen.

Introducción. La osteoporosis (Op) es una enfermedad del metabolismo óseo que se manifiesta con una disminución de la densidad mineral ósea y, consecuentemente, aumenta el riesgo de fractura. Las mujeres postmenopáusicas son el grupo poblacional más afectado. La Ingeniería de Tejidos Óseos (ITO), busca inducir la regeneración ósea a través de tres elementos básicos que son: el uso de un biomaterial como andamio, una fuente celular, y señalización celular que promueva esta regeneración.

Objetivo. Evaluar la regeneración ósea inducida por un constructo tricapa de membranas nanofibrilares de L-ácido poliláctico (L-PLA) y células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC) inducidas a diferenciación al linaje osteogénico, implantado en un defecto crítico óseo mandibular en un modelo de osteoporosis. **Materiales y métodos.** Se emplearon 40 ratas Wistar hembra (200+/-50 g). Se dividieron de manera aleatoria en dos grandes grupos (n=20), grupo OVX, al que se indujo Op por medio de ovariectomía bilateral (OVX), y grupo OLD, que se dejaron envejecer a la par del grupo OVX. Se extrajo el tejido adiposo (TA) de 4 ratas sanas de seis meses de edad para el aislamiento y cultivo de las ADSC. A todas se les realizaron defectos óseos críticos mandibulares (3 mm x 4 mm x 1 mm) de lado derecho para recibir las terapias (en dos grupos el lado contrario fue sham), se separaron de manera aleatoria en grupos: Sham-OLD (n=4) y Sham-OVX (n=4) que no se les administró tratamiento; ADSC-OLD (n=4) y ADSC-OVX (n=4) a los que se implantaron células, OST-OLD (n=4) y OST-OVX (n=4) grupos tratados solo con células inducidas hacia la diferenciación osteogénica; PLA-OLD (n=4) y PLA-OVX (n=4) se implantó solo el andamio de L-PLA 10%; CADSC-OLD (n=4) y CADSC-OVX (n=4) se implantó el constructo de L-PLA 10% como andamio y ADSC sembradas en él (n=4); COST-OLD (n=4) y COST-OVX (n=4) en donde se empleó el constructo usando el andamio de L-PLA 10% con por ADSC osteoinducidas. A las ratas se les realizaron estudios de microtomografía computarizada *in vivo* a los 7 y 30 días para evaluar el volumen de regeneración ósea, calculado como: **volumen de regeneración** = Volumen inicial (7 días) – Volumen final (30 días). Al término de 30 días los especímenes fueron sometidos a eutanasia. Todos los procedimientos realizados en la presente tesis fueron aprobados por la comisión de Ética folio CE/FESI/012023/1569 y por la Comisión de Bioseguridad folio: 115

Resultados. Después de realizar el análisis por medio de MicroCT y evaluar la regeneración ósea obtenida por grupo. Los grupos ADSC tuvieron la mayor regeneración tanto en OVX como en OLD. En los grupos OLD, los tratamientos ADSC, PLA y CADSC mostraron un mayor porcentaje de volumen de regeneración ósea. Los grupos OST y COST mostraron el mismo desempeño, resultando tan deficiente como los volúmenes observados en los grupos sham, tanto en OVX como en OLD.

Conclusiones. Tanto en los grupos OVX como OLD, el uso de ADSC o de PLA como tratamiento en un defecto quirúrgico crítico mandibular fueron la mejor terapia.

2. Introducción.

El hueso es un tejido altamente dinámico que se remodela continuamente para mantener su homeostasis¹⁰. Algunas condiciones sistémicas pueden alterar el equilibrio fisiológico y tener un impacto negativo en la salud ósea; la **osteoporosis (Op)**, es una enfermedad del metabolismo óseo caracterizada por la disminución en la *densidad mineral ósea (DMO)*¹² y el deterioro de su microarquitectura¹³, lo que favorece el aumento del riesgo de fractura¹⁴. Se distinguen dos tipos de osteoporosis: la *primaria* que está relacionada al sexo y a la edad¹⁵; y *secundaria*, la cual subyace a alguna enfermedad principal, como la Diabetes Mellitus, o por el uso prologando de medicamentos como glucocorticoides¹⁶.

El mayor grupo poblacional afectado por la Op son los individuos de edad avanzada (>60 años) de ambos sexos, pero presente a más temprana edad (>50 años) en las mujeres con postmenopausia¹⁷, que es el periodo que inicia a partir del final de los 12 meses posteriores al último periodo menstrual (*menopausia*)¹. Debido al cese de la actividad del folículo ovárico en la menopausia, hay un descenso tajante en la producción de estradiol. El estradiol induce diferenciación osteogénica en las **células troncales derivadas de médula ósea (BMSC, Bone Marrow MSC)** para madurar en **osteoblastos (OB)**, células que se encargan de la formación ósea), y así mismo, se encarga de inducir apoptosis en los osteoclastos (**OC**, células que se encargan de la resorción ósea). En la menopausia este desbalance genera mayor resorción ósea y menor formación ósea.

El estudio de los efectos de la Op es especialmente importante en el contexto del creciente envejecimiento poblacional en México¹⁸, pues las alteraciones óseas provocadas por la Op representan un desafío tanto en la medicina en general, como para lograr tratamientos exitosos en el área odontológica y/o cirugía maxilofacial y ortopedia¹⁹, como en la prevención, tratamiento y seguimiento de fracturas, pues los tratamientos antiosteoporóticos no son del todo efectivos para mejorar la reparación de fracturas óseas, e incluso podrían retrasar su recuperación²⁰.

Una **fractura por osteoporosis** ocurre por fuerzas de baja energía, como una caída desde altura de bipedestación o menor^{21,22}, y suelen generar defectos óseos de mayor volumen, que sanan con menor velocidad, y que tienen mayor riesgo a fracturas subsecuentes o refracturas²³, lo que genera una disminución significativa en la calidad de vida de los pacientes²⁴. Las fracturas por osteoporosis ocurren principalmente en la cadera, vertebras, muñeca, radio^{21,25}, sin embargo, hay una creciente evidencia del impacto de la Op en la región maxilofacial que ha permitido relacionar cambios morfológicos de la mandíbula, como el grosor cortical y presencia de periodontitis, con mayor riesgo de fracturas por Op^{26,27}. Además, se ha observado que la Op tiene repercusiones negativas en las funciones masticatorias en pacientes con prótesis dentales, así como mayor pérdida de hueso residual²⁸.

Se han estudiado distintos abordajes para tratar fracturas y defectos óseos, entre las que se encuentran, el uso de matrices mineralizadas xenogénicas, heterólogas o injertos autólogos, siendo estos últimos, los que se han mantenido como el estándar de oro para tratar la pérdida ósea²⁹, sin embargo, presentan limitantes como: la necesidad de un sitio donante, una segunda cirugía, alto costo, tiempos largos de recuperación, alto grado

de morbilidad, y otros riesgos asociados (infección, dolor crónico, etc). Por ello, existe una creciente necesidad de encontrar nuevas estrategias para la regeneración ósea.

La **Ingeniería de Tejidos (IT)** es una ciencia multidisciplinaria que busca la reparación, sustitución o regeneración de tejidos y/u órganos³⁰. Para lograrlo, la IT diseña terapéuticas que se basan en la mimetización de las características mecánicas del tejido y de su microambiente biológico³¹. Se distinguen tres elementos esenciales en la IT: una *f fuente celular*, *biomateriales* y *señalización*. El uso combinado de estos tres elementos se denomina **constructo**³², que es un biodispositivo que tiene como finalidad, recrear las propiedades mecánicas y funcionales, para generar una interacción de la célula-matriz del tejido al cual será implantado. Así pues, el biomaterial sirve de andamiaje, la población celular dirige el proceso regenerativo, y la señalización estimula una respuesta biológica tanto de las células sembradas como de las del huésped.

Una de las fuentes celulares más estudiadas son las **Células Troncales Mesenquimales (MSC, Mesenchymal Stem Cells)**, que son una población de células troncales adultas indiferenciadas que poseen adherencia al plástico, elevada potencialidad de diferenciación³³, capacidad de autorenovación, y capacidad inmunomoduladora³⁴, la *Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT)*, por sus siglas en inglés) recomienda identificar las MSC por exhibir en su membrana los *cluster de diferenciación (CD)* CD105, CD73 y CD90, y carecer la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α y HLA clase II.

Las MSC se alojan en sitios particulares (nichos) de diversos tejidos adultos, en donde envían y reciben señales tanto de componentes de la *matriz extracelular (MEC)* como de otras células, para llevar a cabo funciones en la modulación de los procesos de mantenimiento y reparación de los tejidos^{35,36}. Por las vastas publicaciones científicas, las **BMSC** son consideradas por algunos autores como el estándar de oro³⁷. Sin embargo, es posible aislar y cultivar MSC provenientes múltiples tejidos³⁸.

Las **Células Troncales Derivadas de Tejido Adiposo (ADSC, Adipose Derived Stem Cells)** son una población de MSC que residen en la *fracción estromal vascular (SVF)* por sus siglas en inglés) del *tejido adiposo (TA)*³⁹, tienen las características que las hace ideales para su uso en la regeneración ósea⁴⁰, como son: alta tasa de autorenovación, capacidad de mantener su multipotencialidad, liberación de factores bioactivos y modulación inmunológica, características que incluso son superiores si se les comparan con MSC provenientes de múltiples tejidos^{41,42}.

Si bien, las MSCs adultas tienen características inherentes a su calidad de troncalidad, ciertos comportamientos biológicos cambian dependiendo de las condiciones y del tejido de donde provienen. Se ha visto que, en general, las BMSC aisladas de condiciones no patológicas, muestran mayor potencial osteogénico que las ADSC^{43,44}, aunque hay creciente evidencia que señala que bajo condiciones de Op, las BMSC tienen una marcada disminución en marcadores osteogénicos^{45,46}, y una tendencia a expresar mayores niveles de citocinas proinflamatorias⁴⁷, a diferencia de las ADSC, que logran conservar su potencial osteogénico estable⁴⁸⁻⁵⁰

Por la abundancia y la localización del TA, es posible extraerlo sin necesidad de procedimientos que invadan planos profundos del cuerpo, para poder aislar y cultivar ADSC, tal y como lo demostró Zuk y cols en 2001, y de esta forma poder inducir su adhesión a un biomaterial⁵¹ orientado a una aplicación terapéutica.

Los **biomateriales** son los elementos estructurales del constructo que emulan la arquitectura de la matriz extracelular, y tienen como característica ser *biocompatibles*, *biodegradables* y mecánicamente favorables para los tejidos de interés⁵², y en la **Ingeniería de Tejidos Óseos (ITO)**, se desea que tengan propiedades *osteoaductivas*⁵³ y *osteoaductivas*⁵⁴ (ver glosario para los términos en cursivas)

Los polímeros sintéticos ofrecen una buena manipulación del material en la forma y tamaño deseado sin alteración de sus propiedades fisicoquímicas⁵⁵, lo cual es conveniente y amigable con distintas formas de fabricación para la finalidad deseada, aunado a un mejor control en su degradación⁵⁶

El **ácido poli-láctico (PLA)** es un poliéster hidrofóbico, que ha mostrado ser biocompatible, biodegradable y termoestable^{57,58}, fue aprobado por la *Foods and Drugs Administration (FDA)* de los Estados Unidos de América para su uso como dispositivo médico en el año 1970⁵⁹. Sus productos de degradación no son dañinos para el cuerpo, y al ser hidrolizado, se bioactiva por la exposición de grupos hidroxilo y carboxilo en su superficie⁶⁰, lo que favorece la adsorción de proteínas y consecuentemente, la adhesión celular^{61,62}, característica necesaria para la creación de una interfase biomaterial-célula⁶³.

La **señalización celular** es clave en la generación de una respuesta biológica coherente con el tejido de interés, en la ITO, la inducción de la osteodiferenciación de las MSC por señalización química es un método relativamente sencillo que se logra por exposición a un medio de cultivo osteogénico (MO) que propicie la expresión de genes osteoprogenitores. Los principales componentes del MO son: *dexametasona*, la cual induce la expresión de *RUNX2* mediada por la vía de señalización WNT/ β catenina⁶⁴, *ácido ascórbico*⁶⁵, el cual es necesario para la hidroxilación de lisina y prolina en procolágeno, y de esta forma sintetizar fibras colágenas y secretarlas hacia la matriz extracelular, y de *β -glicerolfosfato*, que actúa como suministro de fosfato para síntesis de hidroxiapatita y estimula la expresión de genes osteogénicos como: osteopontina⁶⁶ y BMP-2⁶⁷.

La ITO también considera escenarios clínicos que puedan obstaculizar una correcta regeneración, como lo es el impacto sistémico de la Op en la regeneración ósea, de tal forma que es atractivo desarrollar un tratamiento local que logre formar un microambiente regenerativo controlado que permita “evadir” o “neutralizar” los efectos negativos de la Op e “inducir” a las células del huésped, no sólo las células óseas, sino también a las células del tejido nervioso, vascular, linfático y del sistema inmune a la regeneración

Una forma de estudiar los efectos fisiopatológicos de la Op es a través de modelos animales⁶⁸, uno de ellos es el modelo de inducción de Op mediante la **ovariectomía bilateral (OVX)**⁶⁹, que es un modelo quirúrgico aprobado por las guías clínicas de la FDA⁷⁰, y que tiene como objetivo simular el establecimiento de Op por deficiencia de estrógenos, como ocurre en mujeres con postmenopausia o que han sido sometidas a

ooforectomía por cuestiones patológicas, por ejemplo; como consecuencia de cáncer uterino⁷¹. En ratas, este procedimiento debe llevarse a cabo después de que han alcanzado la madurez sexual, lo cual ocurre aproximadamente a las 12 semanas.

El modelo OVX ha servido para estudiar el impacto de la pérdida ósea, y el comportamiento biológico del hueso ante fracturas simuladas a través del diseño de defectos óseos en condiciones de Op⁷², además hay evidencia de que es un modelo útil para evaluar cambios morfológicos en hueso de la región maxilofacial, dichos cambios son particularmente detectables en modelos de larga duración (>12 meses de evolución)⁷³.

Los **defectos óseos de tamaño crítico** son lesiones óseas que no logran ser regeneradas a largo de la vida de un organismo^{74,75}. En osteoporosis se han estudiado diversos modelos de defecto óseo, como lo son en: la calvaria⁷⁶, hueso largos como tibia⁷² y femur⁷⁷. Pero también, se han desarrollado modelos post-extracción dental que muestran menor velocidad de recuperación en ratas con OVX⁷⁸ y se han realizado esfuerzos para estandarizar defectos óseos mandibulares, como lo muestran los trabajos de Liu y cols⁷⁹, y Trejo y cols⁸⁰ que diseñaron un defecto crítico mandibular de fácil acceso quirúrgico, en una zona rica en hueso cortical, y demostraron que es posible evaluarlo mediante microtomografía computarizada.

La **microtomografía computarizada (μ TC)**, es un método no destructivo ni invasivo que permite visualizar los tejidos mediante la proyección de múltiples rayos X desde diferentes ángulos para obtener planos en dos dimensiones, que posteriormente son reconstruidos para generar un modelo en *tres dimensiones (3D)*, por lo que es posible observar estructuras óseas, tanto *in vivo* como *ex vivo*⁸¹.

Empleado *in vivo*, permite la evaluación de los cambios en las estructuras óseas a lo largo del tiempo, ya sea en estado de enfermedad, o ante un tratamiento, por lo que es ideal para estudios pre-clínicos⁸².

La adquisición de las imágenes se logra con la configuración de parámetros que influyen directamente en la absorción de los rayos X en la muestra⁸³. El **voltaje (Kv)** corresponde a la energía de los fotones que interactúan con la muestra, por su parte, el **amperaje (mA)** determina la frecuencia con la que los fotones son proyectados. Al obtener la imagen μ TC, se arrojan valores que ayudan en su análisis, dentro de estos está el ajuste del brillo de imagen (window with = WW) y el ajuste de contraste de imagen (window level = WL), así como las **unidades Hounsfield (UH)** que representan valores de la transformación lineal del **coeficiente de atenuación** en la muestra. El **voxel** se refiere al tamaño de un píxel reconstruido en 3D tras el escaneo, un menor tamaño ofrece una visualización más detallada de las estructuras.

3. Justificación.

De acuerdo con las Perspectivas de la Población Mundial de la Organización Mundial de las Naciones Unidas (ONU), para el año 2050, México tendrá una población total de aproximadamente 145,000,000 de habitantes, de los cuales 25% tendrá más de 60 años, el panorama de envejecimiento poblacional trae consigo un aumento en la incidencia de enfermedades crónico-degenerativas como la osteoporosis, cuyo principal desenlace son las fracturas por fragilidad, las cuales, no solo disminuyen la calidad de vida de los pacientes, sino que también implica una carga económica alta, pues el costo directo por fractura (cadera, humero y vertebra) es más alto que el de infarto al miocardio, cáncer de mama o accidente cerebrovascular⁸⁴. En todo el mundo, y en específico en México, cada día se hace más común que pacientes con Op acudan a la consulta del cirujano dentista buscando mejorar su salud bucal y con ello, su salud en general; la evidencia de afectaciones de la osteoporosis en la región maxilofacial, y particularmente, su asociación a enfermedad periodontal⁸⁵, exige investigar terapéuticas que se centren en las dinámicas propias del tejido de dicha región con modelos de lesiones óseas que puedan ser comparables con la clínica. La ingeniería de tejidos óseos es un abordaje prometedor para diseñar tratamientos regenerativos que logren mejorar la calidad de vida de los pacientes de forma rápida y segura. Las células troncales mesenquimales tienen propiedades atractivas que permitirían acelerar y mejorar los procesos de regeneración de forma segura, además, actualmente se cuenta con biomateriales económicos y versátiles en cuanto a su manejo y fabricación, como lo es el ácido poliláctico, que pueden servir como nicho de las células, para dirigir las e implantarlas en defectos óseos. Por tanto, la originalidad e importancia de esta tesis radica justo en proponer una nueva terapéutica por medio de constructo diseñado con base en la ITO y analizar *in vivo* mediante μ TC, como estos pueden ser usados como tratamiento para la regeneración ósea en pacientes complejos como los que padecen Op. Por ello, nos propusimos evaluar la regeneración ósea inducida por un constructo tricapa de ácido poliláctico-L y células ADSC inducidas al linaje osteogénico en un defecto crítico mandibular en un modelo de osteoporosis.

4. Pregunta de investigación.

¿La colocación de un constructo tricapa de L-PLA sembrado con células troncales derivadas de tejido adiposo inducidas a la diferenciación osteogénica en un defecto crítico mandibular en un modelo de osteoporosis en ratas provocará su regeneración en volumen?

5. Hipótesis.

Si se implanta de un constructo tricapa de L-PLA sembrado con células troncales derivadas de tejido adiposo inducidas a la diferenciación osteogénica en un defecto crítico mandibular en un modelo de osteoporosis en ratas, entonces se tendrá un volumen de regeneración óseo mayor.

6. Objetivo general.

Evaluar mediante μ TC la regeneración ósea inducida por un constructo tricapa de membranas nanofibrilares de ácido poliláctico (PLA) y células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC) inducidas a la diferenciación de linaje osteogénico, implantado en un defecto crítico óseo mandibular en un modelo de osteoporosis por ovariectomía bilateral.

6.1. Objetivos específicos.

1. Aislar y cultivar ADSC provenientes de tejido adiposo subcutáneo de rata.
2. Estudio microtomográfico de los especímenes.
3. Análisis microtomográfico de la osteoporosis en la mandíbula.
4. Establecer la biodegradabilidad y biocompatibilidad de los constructos *in vivo*.
5. Determinar el grado de regeneración ósea mediante μ TC conseguida en los defectos mandibulares *in vivo*.

7. Metodología.

Todos los experimentos de la presente tesis se realizaron en el Grupo de Investigación en Células Troncales e Ingeniería de Tejidos (GICTIT), que forma parte del Laboratorio de Investigación de Odontología (LIO), perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM.

Se experimentó en 40 ratas *Wistar* hembras de tres meses de edad (200 ± 50 gr), alojadas en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, con acceso *ad libitum* de agua y comida, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo anestesia general con pentobarbital (Sedalphorte 40 mg/kg) y xilacina como relajante muscular (Procin 7mg/kg), y medicación postoperatoria penicilina sódica cristalina/enfloxacin (5mg/2mg/kg) en una sola dosis, y analgésico tramadol (5mg/kg) cada 24 horas durante tres días. La eutanasia se aplicó por exposición de CO₂. El manejo de los cadáveres y los residuos biológico/infecciosos se realizó de acuerdo con la NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Los procedimientos en animales fueron aprobados por el Comité de ética (folio CE/FESI/012023/1569) y por el Comité de bioseguridad (folio 115) de la FESI.

7.1 Diseño experimental.

El diseño de estudio es una Investigación experimental con las siguientes variables.

Nombre	Tipo de variable
Condición (Ovariectomía (OVX) o no ovariectomía (OLD))	Nominal
Tratamiento recibido	Nominal
Volumen área del defecto (mm ³)	Continua
% Volumen de regeneración (mm ³)	Continua
Volumen de masa ósea (mm ³)	Continua
Grosor de la cortical (mm ²)	Continua
Peso (gramos)	Continua

Tabla 1. Cuadro de variables

Las 40 ratas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos (n=20) OVX y OLD, mismos que se subdividieron en 6 subgrupos (n=4) (**Tabla 2**). En 4 especímenes OVX y 4 OLD, el lado derecho sirvió de sham, y el lado izquierdo de administración de tratamiento, en el resto de los especímenes solo se experimentó en el lado derecho, el lado izquierdo quedó intacto y nos sirvió de referencia durante el análisis μ TC del hueso nativo.

N = 48 defectos a partir de 40 Ratas *Wistar* hembra 3 meses de edad

	OVX (Ovariectomía) n=24	OLD (Envejecidas a la par) n=24
Tratamiento administrado	Sham-ovx n=4 (lado derecho)	Sham-old n=4 (lado derecho)
	ADSC-ovx n=4	ADSC-old n=4
	OST-ovx n=4	OST-old n=4
	PLA-ovx n=4 (lado izquierdo)	PLA-old n=4 (lado izquierdo)
	CADSC -ovx n=4	CADSC-old n=4
	COST-ovx n=4	COST-old n=4

Tabla 2. Distribución de los grupos de experimentación

Los procedimientos experimentales fueron los siguientes, al grupo OVX se realizaron cirugías de ovariectomía bilateral (ovx); posteriormente al 6° mes post-ovx se llevó a cabo la extracción de tejido adiposo subcutáneo, aislamiento y cultivo de ADSC, al 8° mes se realizaron cirugías de defecto crítico mandibular y la administración de los tratamientos, a los 7 y 30 días posteriores de la cirugía de defecto mandibular se realizaron estudios *in vivo* de μ TC, para su posterior análisis, en la **Fig. 1** se resumen los procedimientos.

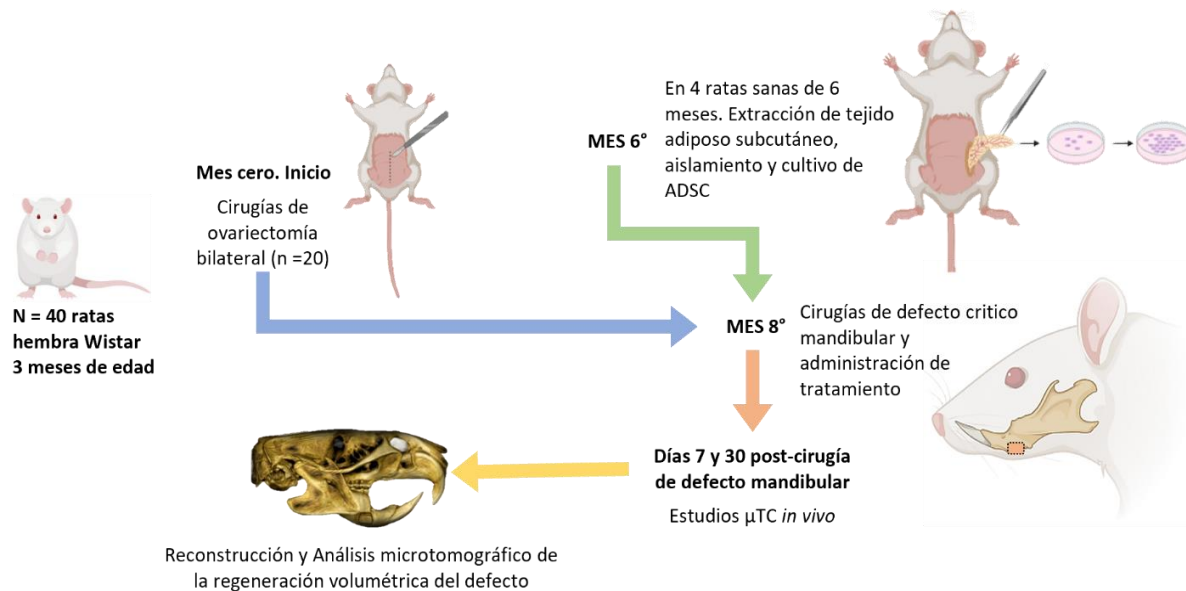


Figura 1. Resumen gráfico del diseño experimental. Se muestran los procedimientos realizados a lo largo del tiempo, desde el mes cero al mes 8 y al finalizar, y los momentos en los que se realizaron los estudios de microCT.

7.2 Modelo de osteoporosis.

Al grupo OVX se les realizó ovariectomía bilateral (OVX) para inducción de osteoporosis^{68,86}. Se administró anestesia vía intraperitoneal, posteriormente se afeitó el área quirúrgica y se desinfectó con cloruro de benzalconio (Antibenzil®). Con mango de bisturí del número 3 y bisturí 15, se realizó una incisión (2cm) de una sola intensidad en la línea media ventral a profundidad cutánea. Para acceder a la cavidad abdominal se cortó el músculo con tijera y se realizó disección roma con ayuda de unas pinzas mosquito curvas hasta visualizar la zona visceral, luego se separaron los intestinos hasta observar los ovarios (**Fig. 2**). Se ligaron las tubas uterinas en su extremo distal con sutura de seda 3-0s y se extrajeron los ovarios. Se suturó el músculo con hilo de ácido-políglucólico 4-0s (Vicryl®) con técnica de cruz, y se suturó la piel con puntos simples con hilo de seda 3-0s.

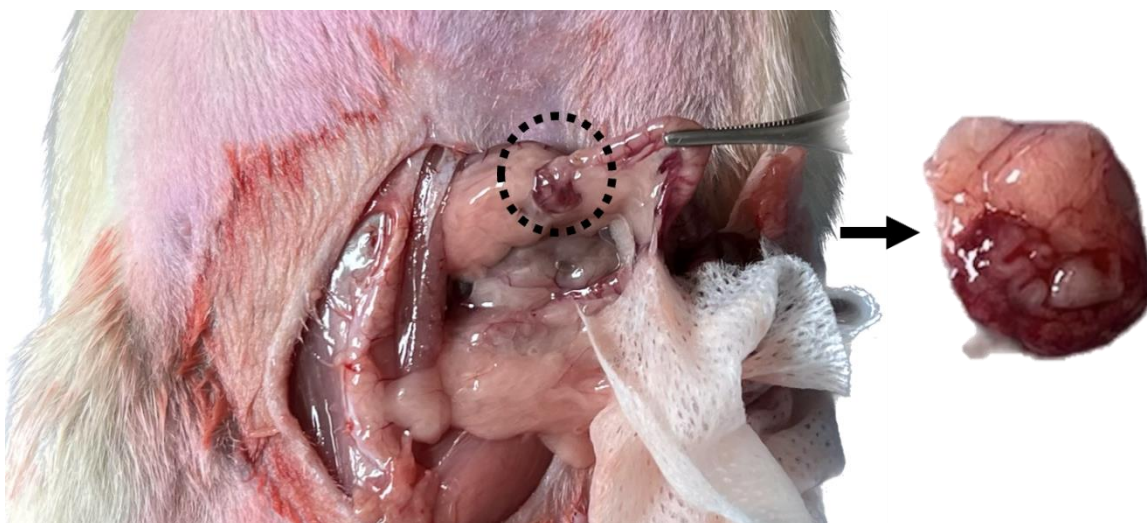


Figura 2. Ovariectomía. Vista ventral. Dentro del área con el círculo punteado negro se observa el ovario del lado izquierdo, a la derecha se observa el ovario tras ser extraído. La pinza sostiene la tuba uterina

7.3 Obtención, aislamiento y cultivo de ADSC.

Se obtuvo tejido adiposo subcutáneo inguinal de 4 ratas Wistar hembra (200 +/- 50 g) realizando una incisión (2cm) de una sola intensión con bisturí #15 en la zona ventral, con disección roma con pinzas de mosco-curvas se tomaron aproximadamente 3gr de tejido adiposo (**Fig. 3-A**). Inmediatamente el tejido se colocó en solución balanceada de Hanks 1% (HBSS, Biowest®) (**Fig. 3-B**). Se suturaron los especímenes con hilo seda 3-0s con técnica de puntos simples.

En una cabina de Seguridad Biológica de Clase II tipo A2 (Gabinete de Seguridad Biológica Clase II Tipo A2 de acuerdo con la Norma Americana NSF/ANSI 49, EN 12469. Modelo LABGARD NU- 540-400 Marca NuAire), el tejido obtenido se lavó 3 veces con HBSS 1% (HBSS c/calcio c/magnesio c/sodio, c/bicarbonato, c/rojo fenol, marca: Biowest®), y posteriormente, se disgregó mecánicamente con dos hojas de bisturí del #11 sobre caja Petri (**Fig. 3-C**), para la digestión enzimática se incubó en condiciones estándar de cultivo por 45 minutos con 3 ml de colagenasa tipo 1 al 0.01% (Thermo Fisher Scientific Gibco®). La actividad de la colagenasa se inactivó en proporción 2:1 con DMEM completo (DMEM alto en glucosa enriquecido con glutamina y piruvato de sodio y antibióticos Biowest®) que se denomina completo cuando es suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS México, USDA, Biowest, USA) y antibiótico al 1% (Antibiótico Gibco™, Thermo Fisher Scientific.). A continuación, el tejido, producto de la digestión enzimática fue filtrado con micro-malla de poro de 100 µm, y posteriormente, se centrifugó a 1040 rpm durante 10 minutos para obtener tres fases: una fase lipídica, una fase acuosa y una fase celular (pellet). Se retiró el sobrenadante y se añadieron 3 ml de DMEM completo al pellet, se re-suspendió y se centrifugó a 1040 rpm durante 10 minutos, se repitió este procedimiento dos veces más (**Fig. 3-D**).

El pellet celular se resuspendió en 3 ml de DMEM completo y se sembró en un frasco de cultivo de 25 cm² y se incubó en condiciones de cultivo estándares: 5% de CO₂, a 37° C y con ambiente húmedo, dentro de la incubadora (NuAire, USA).

Cuando el cultivo celular llegó a la confluencia (cuando la población celular ocupó el 80% de la superficie del frasco de cultivo), se realizaron los subcultivos.

El procedimiento para el subcultivo fue: lavar el cultivo con HBSS 1% y agregar tripsina (tripsina/EDTA al 0.25% en HBSS, Biowest®). Se incubó a 37°C durante 3 minutos, posteriormente se inactivó la tripsina con DMEM completo en proporción 2:1. Se centrifugó a 1040 rpm por 10 minutos, se realizó conteo celular y se sembraron las células nuevamente, esta vez se toma solo un tercio de las células para cada cultivo nuevo.

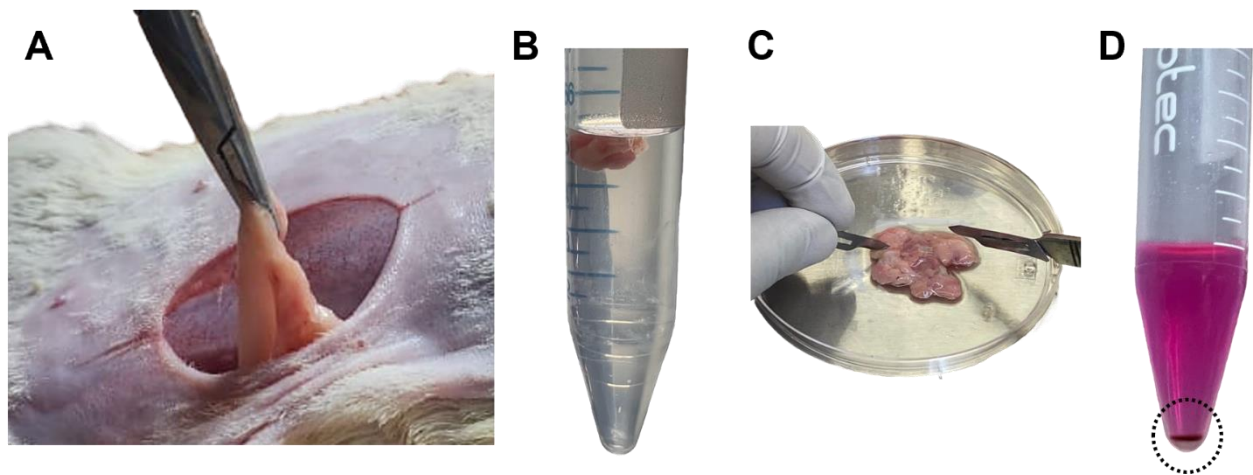


Figura 3. Obtención de tejido adiposo y aislamiento de ADSC. **A.** Tejido adiposo subcutáneo. **B)** Tejido adiposo en solución de Hanks listo para su transportación al cuarto de cultivos del LIO Almaraz. **C)** Disgregación mecánica del tejido adiposo. **D)** Pellet (señalado en líneas discontinuas) celular en DMEM.

7.4. Conteo celular con cámara Neubauer

Para el procedimiento de conteo celular, primero se retiró el medio de cultivo y se lavó con HBSS 1%, posteriormente, como en el procedimiento de subcultivo las células fueron levantadas con tripsina durante máximo 3 minutos, posteriormente se neutralizó la acción de la tripsina con DMEM completo, se centrifugó a 1040 rpm durante 10 minutos, y luego se re-suspendió el pellet en 1 ml de DMEM completo, del cual, se tomaron 50µl y se agregó 50µl de azul de tripano agregados a un tubo tipo eppendorf®, se mezcló bien y, con una micropipeta se tomó 10µl y se colocó en la cámara Neubauer (**Fig. 4-A**) para el conteo celular.

El conteo en la cámara de Neubauer se realizó en el microscopio PrimoVert Zeiss® (**Fig. 4-B**). Se empleó la siguiente fórmula para la dilución de concentraciones, que es:

$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$ Donde: C1 = es la concentración de la solución que hará un soluto el volumen inicial V1; V2 = es el volumen a preparar y C2 = es la concentración de la solución final.

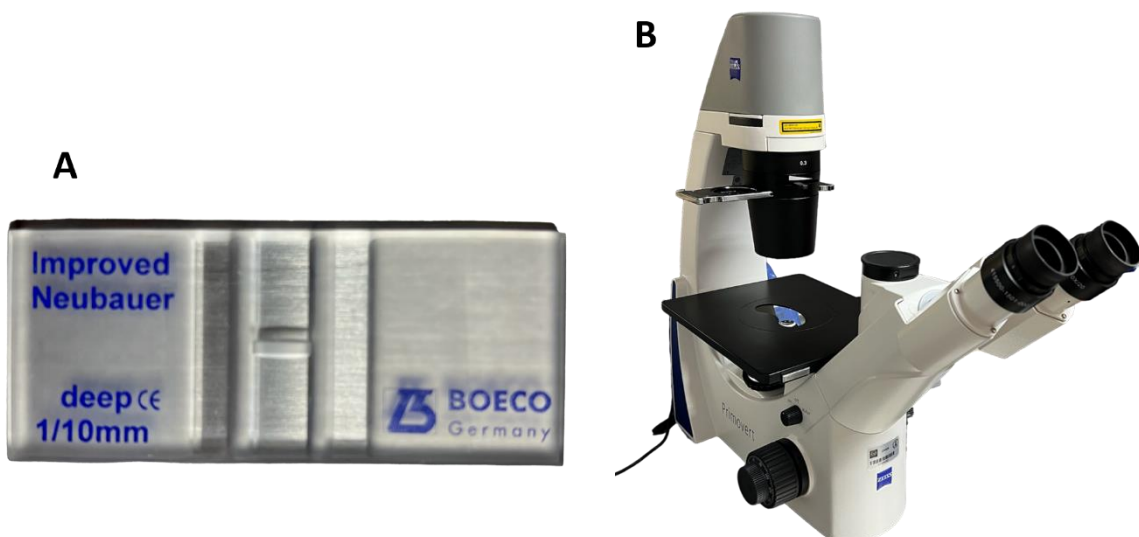


Figura 4. Equipo para conteo celular. **A.** Se muestra la cámara Neubauer utilizada. **B)** Microscopio utilizado PrimoVert Zeiss®.

7.5. Caracterización de las ADSC.

Las ADSC aisladas con la metodología que empleamos ya han sido previamente caracterizadas y reportadas por Trejo y cols en 2021⁸⁷, y en la tesis de Yudho⁸⁸. Las células ADSC las caracterizaron en cultivo, morfológicamente se observaron cómo células alargadas y aplanadas en forma de huso, firmemente adheridas al sustrato, similares a fibroblastos y con un núcleo grande y central, que formaban colonias similares a CFU-F, con prolongaciones de su citoplasma y varios nucléolos (**Fig. 5**).

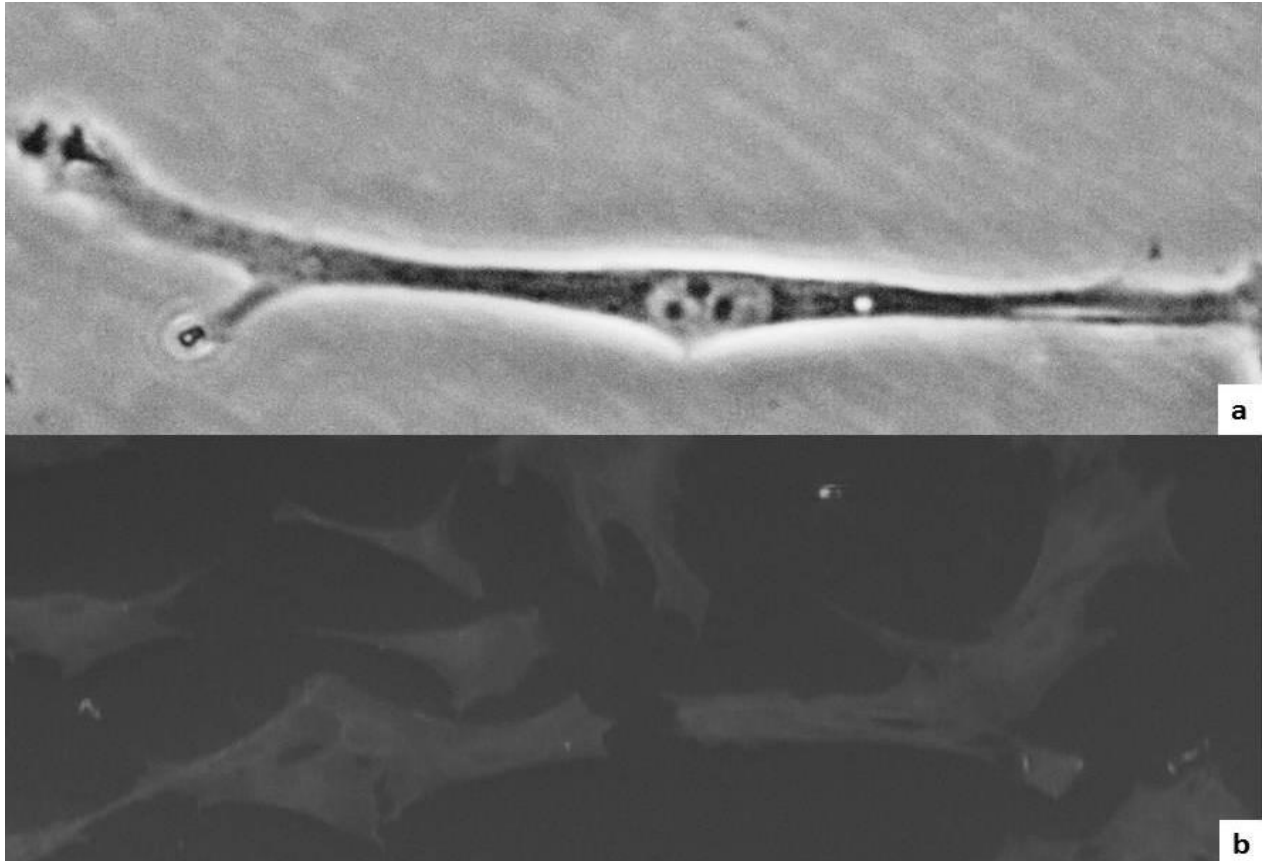


Figura 5. ADSCs primer subcultivo. (a) Observación en microscopio invertido 40x. **(b)** fotografía en microscopía electrónica de barrido, 129X. Tomada de: Yudho R. 2017

Observaron que las ADSC mantuvieron esta morfología uniforme durante los tres subcultivos y desde el cultivo primario alcanzaron la confluencia entre los días 7 y 9 de cultivo. Las células de cultivo fueron positivas a los marcadores específicos CD73, CD90 y CD105 y Vimentina (**Fig. 6**).

También mostraron positividad a ensayos adipodiferenciación y ostediferenciación, a este último ensayo se realizaron tinciones de fosfatasa alcalina (ALP) y Von Kossa, igualmente positivos.

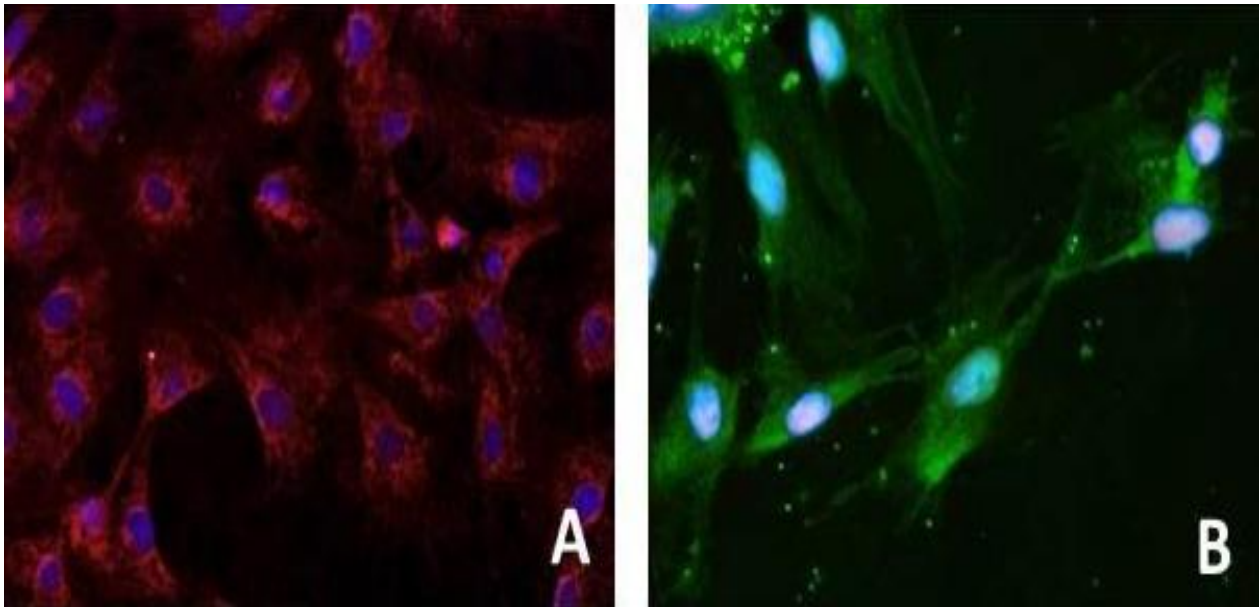


Figura 6. Se observa prueba con inmunohistofluorescencia. **A)** Se observa la expresión de CD90 con Cy3 (marcaje en rojo y los núcleos fueron contrastados con DAPI (azul). **B)** Expresión positiva de Vimentina con marcaje con FITC (verde) 63X. **Tomada de: Yudho R. 2017**

La inducción de las ADSCs a la diferenciación osteogénica cultivadas en medio de cultivo osteogénico produjo cambios en su morfología desde las 96 h observándose una forma cuboide con un núcleo central y un solo nucléolo visible, la velocidad de división celular disminuyó por lo que tardaron más en llegar a confluencia. Las células secretaron cristales de calcio extracelular indicado por la presencia de nódulos de mineralización observados macroscópicamente, esto fue comprobado a 21 días por medio de la tinción de rojo de Alizarina, mientras que no se observó calcificación en las células suplementadas con el medio control (**Fig. 7**)

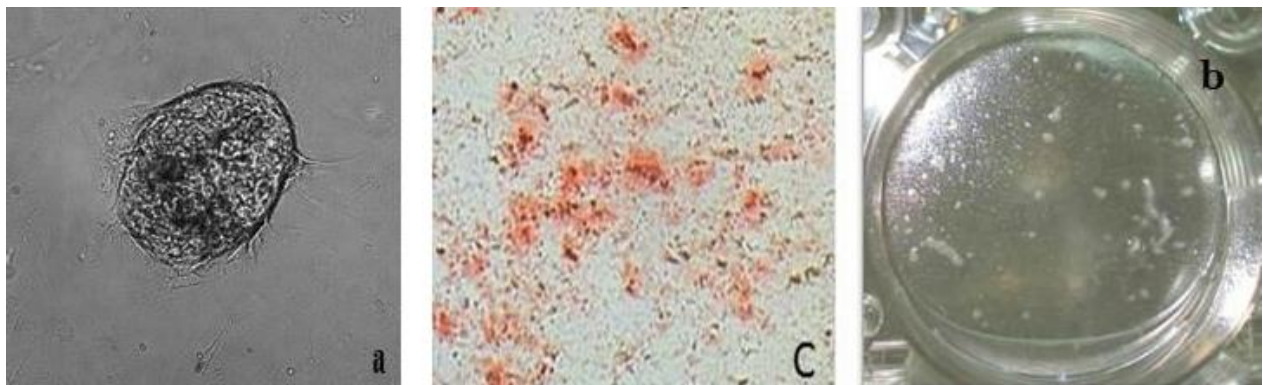


Figura 7. Inducción osteogénica de las ADSCs a través de un medio de cultivo osteogénico. **a)** Evidencia microscópica, se observan nódulos de mineralización, desde el día 7. 4X. **b)** Se observan nódulos de mineralización teñidos con rojo de alizarina a los 21 días de diferenciación. 40X. **c)** Macroscópicamente, se observan nódulos de mineralización al día 21 en cultivo con medio de inducción osteogénica. **Tomada de: Yudho R. 2017**

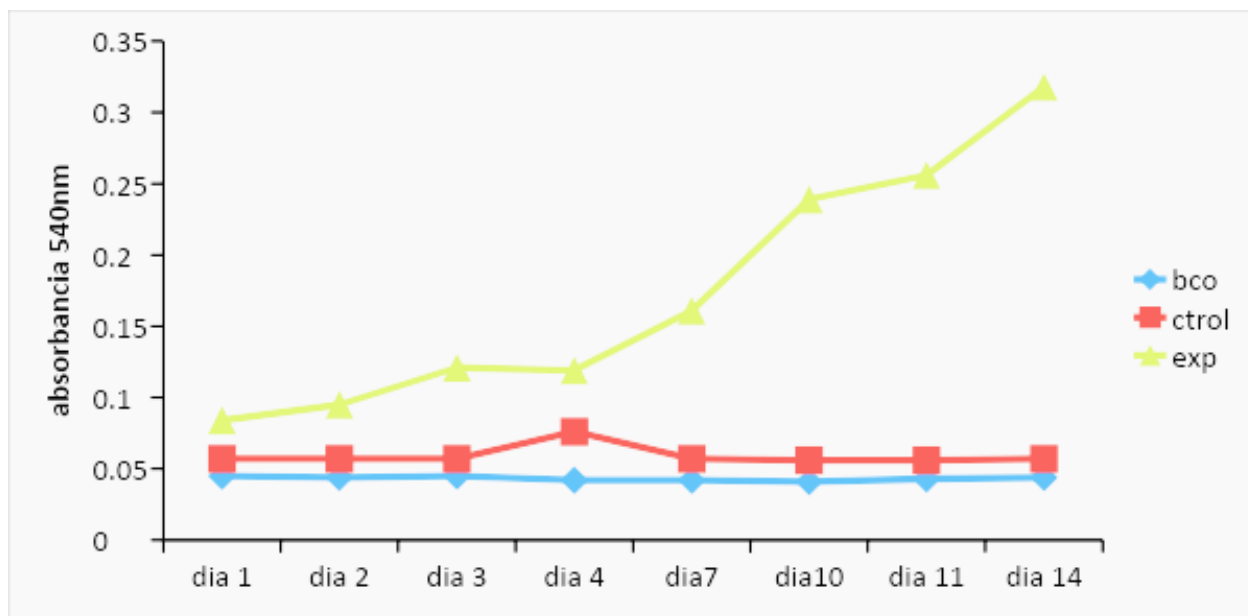


Figura 8. Resultados del ensayo de MTT para determinar la viabilidad y proliferación de las células obtenidas. Tomada de: Yudho R. 2017

También evaluaron la viabilidad y proliferación por medio de MTT, evaluado a 1, 2, 3, 4, 7, 10, 11 y 14 días, la absorbancia medida fue a 540 nm, que es directamente proporcional a la viabilidad y proliferación de las células. Demostrando así su capacidad proliferativa y de autorrenovación. Se obtuvo una gráfica ascendente (**Fig. 8**).

7.6. Diferenciación al linaje osteogénico.

Para llevar a cabo la inducción al linaje osteogénico, 5 días después del primer subcultivo, un número de células aproximadamente 350,000 a 400,000 se cultivaron en medio osteogénico de acuerdo con el protocolo de Zuk y cols⁸⁹: DMEM, FBS 10%, suplementado con dexametasona 0.1 μ M, ascorbato-2-fosfato 50 μ M, β glicerolfosfato 10 Mm, 1% antibiótico y antimicótico. Se realizó cambio de cultivo cada 3 días durante 14 días. En el día 7, las células del grupo COST fueron sembradas en la superficie del L-PLA y se dejaron en cultivo con él durante 7 días más para hacer un total de 14 días en MO.

7.7. Terapia celular con ADSC.

Se tomaron y contaron aproximadamente entre 45 000 y 50 000 células vivas para cada espécimen de estos grupos, las células se centrifugaron a 1040 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet que fue traslado en hielo a -20 grados inmediatamente antes de su colocación de los defectos mandibulares.

Se realizó el defecto, se inhibió el sangrado con una gasa estéril y se colocaron directamente en él las células *in situ*, dejaron reposar durante 5 minutos y se procedió al cierre de la herida quirúrgica.

7.8. Terapia celular con OST.

Después de 14 días de inducción osteogénica, las células se levantaron y se contaron aproximadamente entre 40 000 y 45 000 células vivas para cada espécimen de estos grupos, las células se centrifugaron a 1040 rpm durante 10 minutos para obtener un pellet que fue trasladado en hielo a -20°C inmediatamente antes de su colocación de los defectos mandibulares.

Se realizó el defecto, se inhibió el sagrado con una gasa estéril y se colocaron directamente en él las células in situ, dejaron reposar durante 5 minutos y se procedió al cierre de la herida quirúrgica.

7.9. Membranas de PLA.

Se obtuvieron membranas nanofibrilares de PLA 10%, donadas por el Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, Facultad de Odontología, UNAM, dirigido por el Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez. Se fabricaron con 10 g de PLA, 75 ml de cloroformo y 25 ml de etanol y sintetizadas mediante hilado jet-air, que ya han sido caracterizadas⁵⁷.

7.10. Procesamiento de las membranas de PLA.

Las membranas de PLA se cortaron en rectángulos de 4x3 mm y se esterilizaron por exposición a UV por 30 minutos. Posteriormente, se colocaron en una placa de 96 pocillos con medio de cultivo y se incubaron en condiciones estándar por 7 días.

A los grupos PLA se les implantó un andamio constituido por tres membranas recortadas con las medidas antes mencionadas (**Fig. 4-A**). El caso es que en los constructos se sembraron las células y luego ya se colocaron como injertos en el defecto.

A los grupos CADSC se sembraron aproximadamente 1,250 ADSC mm² en tres membranas de PLA al llegar a confluencia en el tercer subcultivo, a COST se les sembró aproximadamente 45,000 células (1250xmm²), y luego se incubaron 7 días más para promover la adhesión de al L-PLA. Justo antes de implantar los constructos al defecto de los especímenes, se sacaron los andamios sembrados de la incubadora, se les quito el medio de cultivo y se colocaron capa sobre capa, tres membranas a modo de “sándwich” sembrados de células para dar forma al diseño de constructo en 3D. (**Fig. 9-B**).

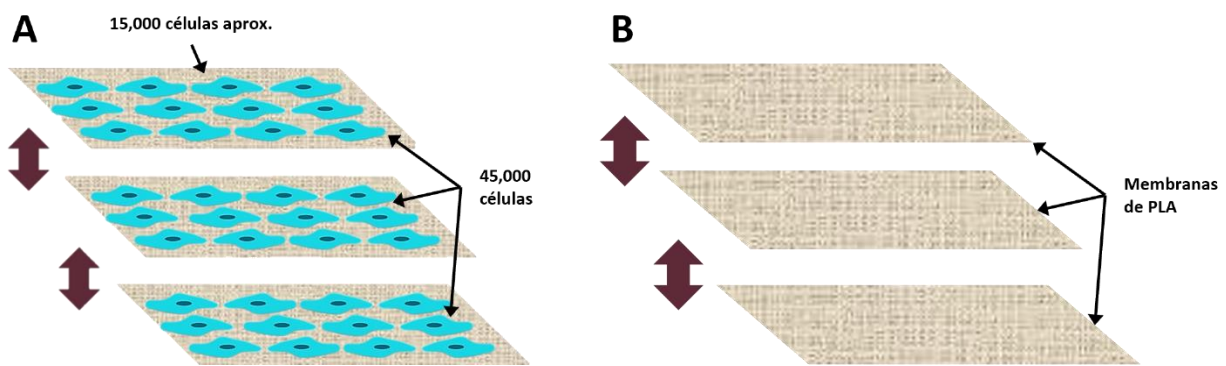


Figura 9. Diseño del andamio. A) Andamio colocado en los grupos CADSC y COST tanto OVX como OLD, consta de tres capas de PLA, entre cada capa se sembraron aprox 15,000 células, dando un total de 45,000 células por andamio. **B)** Andamio colocado en los grupos PLA-ovx y PLA-old

7.11. Diseño quirúrgico del defecto óseo mandibular.

A los 8 meses post-ovx se llevaron a cabo las cirugías de defecto mandibular. Se realizó una incisión de 1.5cm a lo largo del borde inferior izquierdo de la mandíbula y se diseccionó con punta roma para separar delicadamente los músculos masetero y buccinador y exponer el hueso. Con micromotor y fresa de bola del #1/10 mm a baja velocidad (<1000 rpm) y abundante irrigación de cloruro de sodio pH 7, se realizó un defecto debajo de la línea oblicua externa (4x3x1 mm³) (**Fig. 10**).

Se administraron dentro del defecto los diferentes tratamientos (**Tabla 3**). En 4 especímenes OVX y 4 OLD, el lado derecho sirvió de sham, y el lado izquierdo de administración de tratamiento, en el resto de los especímenes solo se experimentó en el lado derecho

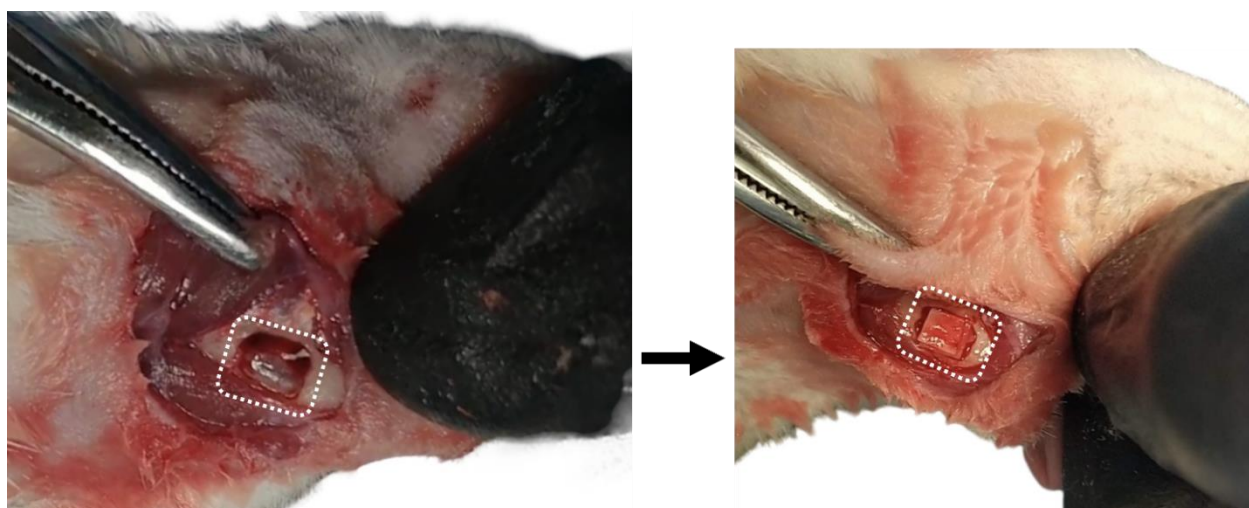


Figura 10. Cirugía de defecto crítico mandibular. A la izquierda se observa el defecto quirúrgico vacío, a la derecha se observa el defecto con la implantación de andamio de PLA

Tratamiento	Descripción
Sham	Realización de defecto sin tratamiento
ADSC	Administración de ADSC sin diferenciar
OST	Administración de ADSC osteodiferenciadas
PLA	Colocación de andamio tricapa de membranas de PLA
CADSC	Andamio tricapa con ADSC sembradas sin diferenciación
COST	Andamio tricapa con ADSC osteodiferenciadas

Tabla 3.

7.12. Adquisición de las microtomografías.

Los estudios se realizaron *in vivo* con el microtomógrafo Albira® (**Fig. 11**) en la modalidad μ TC, de la Unidad de Investigación Biomédica en cáncer de INcan/UNAM. Los especímenes fueron anestesiados con isoflurano/oxígeno a 20% v/v. Los parámetros de la microtomografía fueron 35kv, 0.4mA, 600 movimientos y 1000 proyecciones sobre 360°, alta resolución, alta definición y alto voltaje



Figura 11. Microtomógrafo Albira® de la Unidad de Investigación Biomédica en cáncer INcan/UNAM que se empleó para la adquisición de las imágenes μ TC.

7.13. Procesamiento y análisis de las microtomografías.

Se utilizó el software Horos® para el procesamiento y análisis de las tomografías. Primero, se ubicó espacialmente la **región de interés (ROI)** en las reconstrucciones en 3D (Fig. 12), la ROI corresponde al área del defecto quirúrgico mandibular (Fig. 13-F).



Figura 12. Reconstrucción 3D del cráneo de rata. A) Vista lateral derecha, se puede visualizar el defecto quirúrgico, B) Vista frontal.

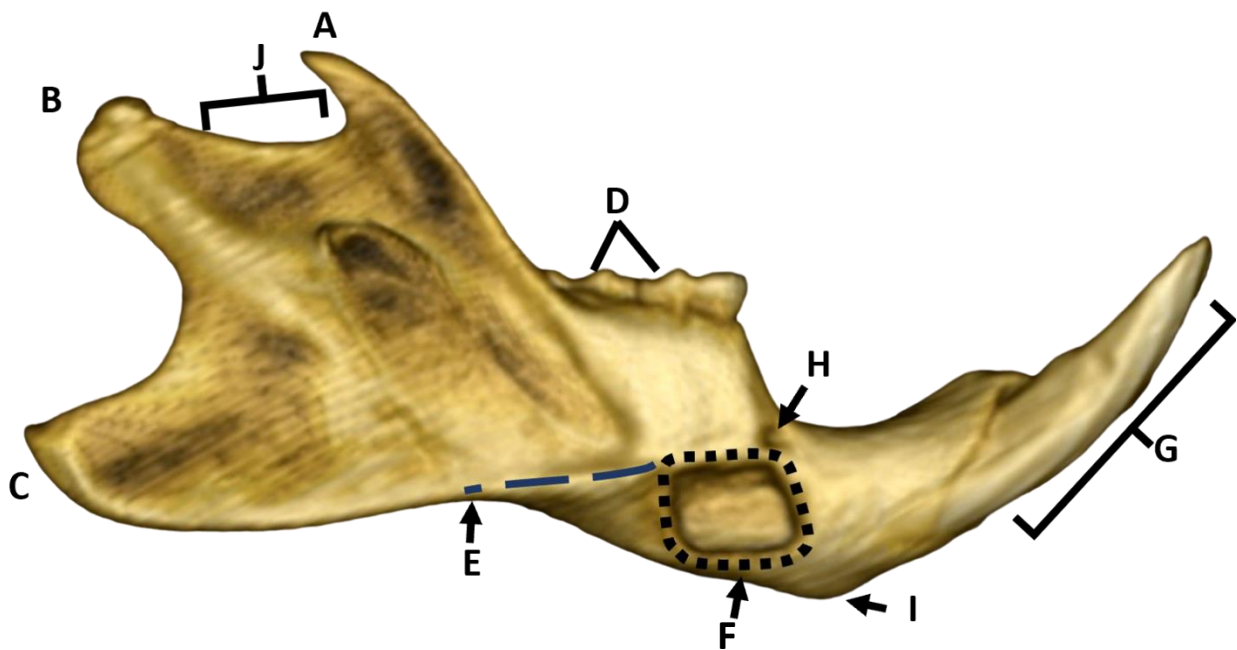


Figura 13. Vista lateral 3D de la hemimandíbula derecha. A) Proceso coronoides, B) Proceso condilar, C) Proceso angular, D) Molares, E) Línea oblicua externa, F) ROI = Defecto quirúrgico, G) Incisivos, H) Foramen mentoniano I) Proceso o protuberancia mental, J) Escotadura sigmoidea

Posteriormente, se exploraron los cortes microtomográficos en 2D con vista frontal para hallar la parte más anterior del defecto y comenzar a marcar cuidadosa y manualmente la ROI, se tomaron como referencia los valores HU del hueso del lado mandibular sin defecto, los valores mayores a 10,000 HU corresponden al hueso maduro, por lo tanto, los valores por debajo de 10,000 no se consideraron hueso (Fig. 14). Dicho procedimiento se llevó a cabo, en promedio, 36 veces por archivo, correspondiente a cada corte μ TC en el que se encontraba el defecto.



Figura 14. Corte frontal 2D. En amarillo se muestran los límites del defecto, el valor máximo (Max) no debe exceder 10,000 UH. El punto 1 (morado) corresponde al hueso maduro de la hemimandíbula contraria, los valores deben ser mayores a 10,000. El punto 2 (verde) muestra un punto dentro del defecto, los valores deben ser inferiores a 10,000. El punto 3 (rojo) señala el hueso adyacente al defecto óseo, valor > 10,000. El punto 4 (azul) muestra área del defecto contiguo a hueso, su valor debe ser >10,000.

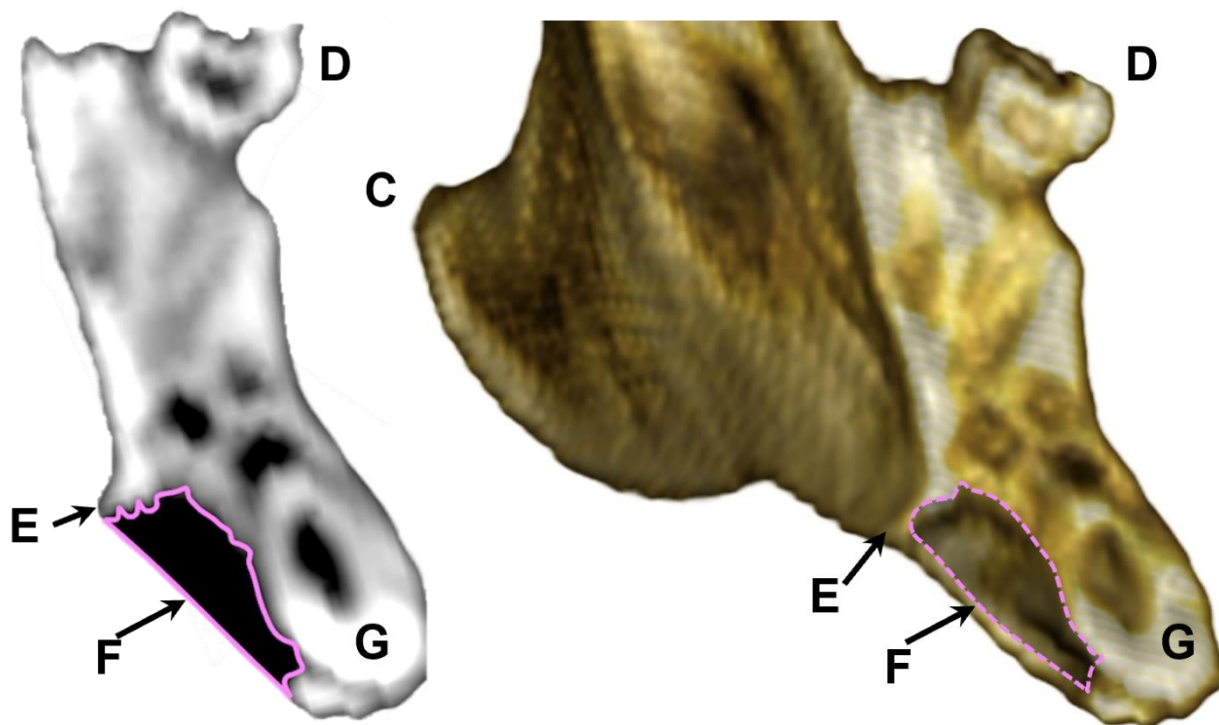


Figura 15. Comparación de las estructuras anatómicas y de la ROI. A la izquierda vista frontal 2D de un corte de la hemimandíbula. A la derecha, una reconstrucción 3D. Se señalan las estructuras comunes. C) Proceso angular, D) Molares, E) Línea oblicua externa, F) ROI = Defecto quirúrgico, G) Incisivo

Al delimitar la ROI de cada corte tomográfico, se generó un modelo 3D del volumen del defecto con sus valores en mm³ (**Fig. 16**).

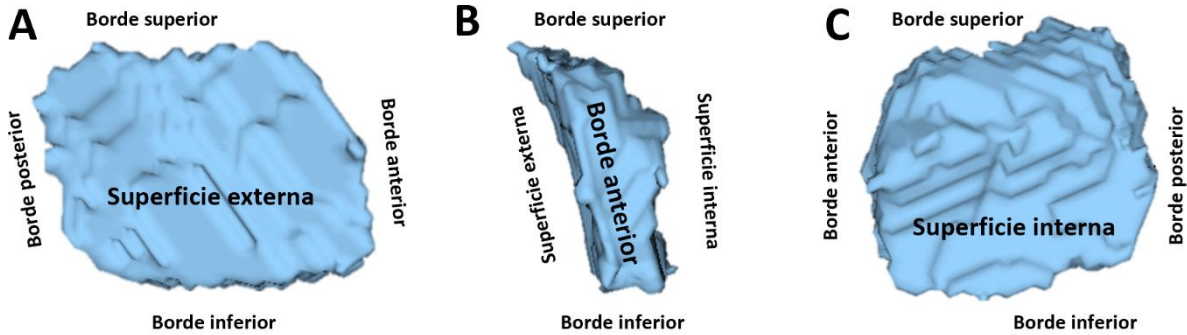


Figura 16. Reconstrucción 3D del volumen de defecto óseo. A) Vista lateral externa del defecto exhibiendo superficie externa. **B)** Vista frontal del defecto, **C)** Vista lateral con superficie interna

7.13.1. Cálculo del volumen de regeneración.

Primero se obtuvo el *volumen de regeneración* (*Vol. Reg*), que es la diferencia entre el volumen inicial (7 días) y final (30 días) de los defectos.

$$\text{Volumen de regeneración} = \text{Volumen inicial} - \text{Volumen final}$$

Después se calculó el *porcentaje de regeneración* (*% Reg*), de la siguiente forma:

$$\% \text{ Regeneración} = \frac{\text{Volumen de regeneración} \times 100}{\text{Volumen inicial}}$$

7.13.2. Cambios en la integridad ósea.

Para la evaluación de cambios cuantitativos y cualitativos en el tejido óseo entre OVX y OLD, se midió el grosor cortical y la masa ósea total mandibular (**Fig.17 y 18**).

7.13.3. Medición masa ósea.

Se implementó el parámetro al que denominamos: **masa ósea**, la definimos como la cuantificación volumétrica, que incluye tanto a hueso cortical como trabecular, del total de las estructuras con la radiodensidad mínima (UH) necesaria para ser consideradas hueso en una región particular, en este caso la región fue una zona mandibular rica en hueso trabecular.

La región fue delimitada de la siguiente manera: se dibujó el plano 1, que va de la parte más posterior e inferior del foramen mentoniano al punto más posterior del proceso angular (**Fig. 17-A1**), el plano 2 se dibujó del punto más inferior del proceso o protuberancia mental al punto más cóncavo de la escotadura sigmoidea (**Fig. 17-A2**), el plano 3 delimitado en la parte superior y anterior por el proceso alveolar de la pared

mesial del primer molar hasta encontrarse con el punto del foramen mentoniano (**Fig. 17-A3**), y el plano 4 fue dibujado paralelo al plano 1 desde donde comienza el proceso alveolar, que casi siempre coincide con la línea amelocementaria de los molares hasta converger con los planos 2 y 3 (**Fig. 17-A4**), de esta manera al unir los 4 planos se formó una figura geométrica similar a un romboedro o paralelepípedo oblicuo.

Una vez delimitada esta región, solo se seleccionaron las estructuras con valores por arriba de 10,000 HU y luego, se excluyeron las estructuras dentarias (**Fig. 17-C**), a partir de esa región se generó un modelo 3D que arroja los valores del volumen de la masa ósea, los cuales fueron cuantificados y también, cualitativamente nos permite visualizar el grosor y la interconexión trabecular.

7.13.4. Grosor cortical mandibular.

Las mediciones se realizaron a los 30 días, y se tomó la porción más prominente de la línea oblicua externa, y se midió en corte 2D en mm^2 (**Fig. 18**).

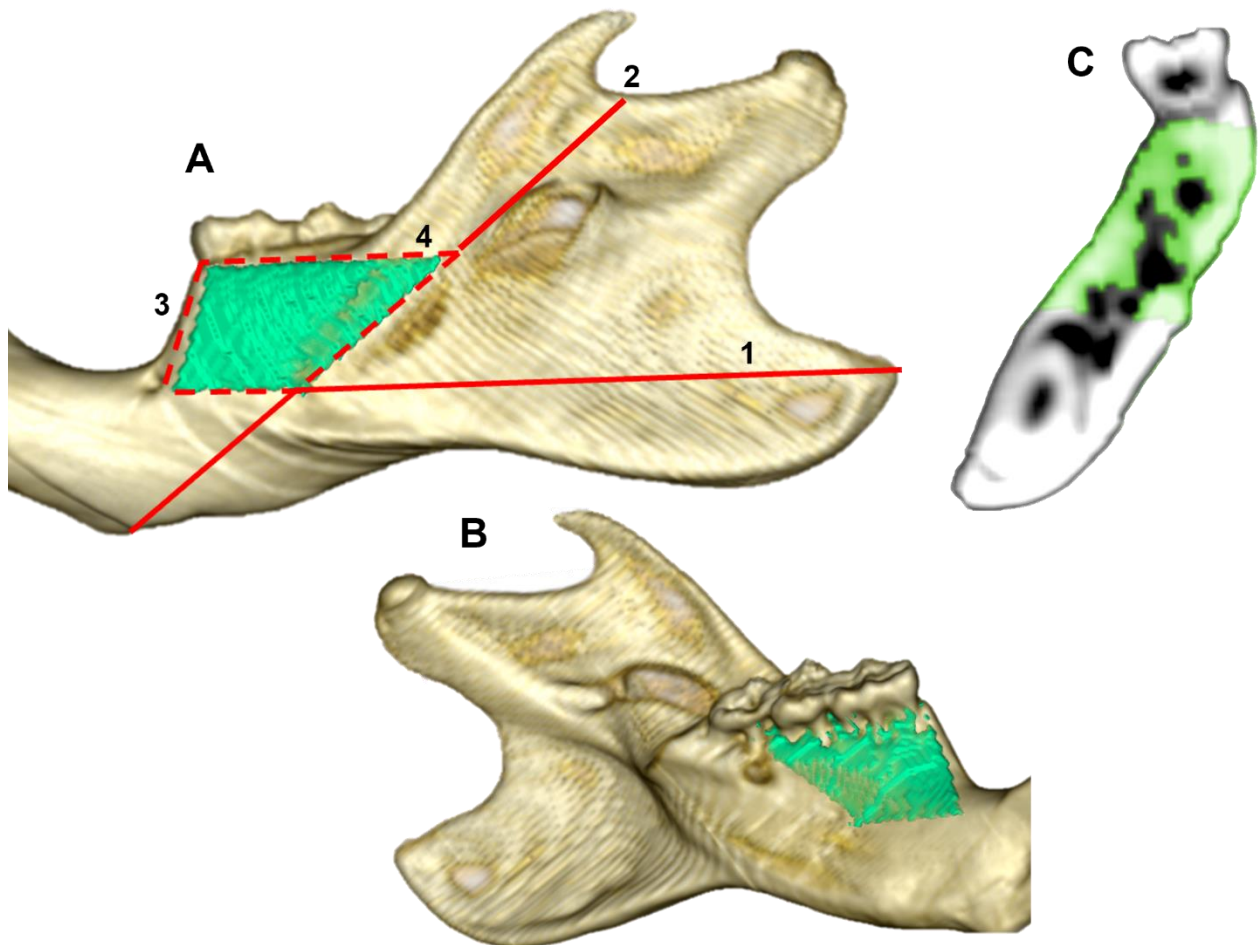


Figura 17. Medición volumen de la masa ósea. A. Trazado (rojo) para determinar la región de la masa ósea interés (verde), los números indican el plano. **B)** Vista lingual del área de la masa ósea. **C)** Vista frontal de un corte 2D de la ROI trazada para medir

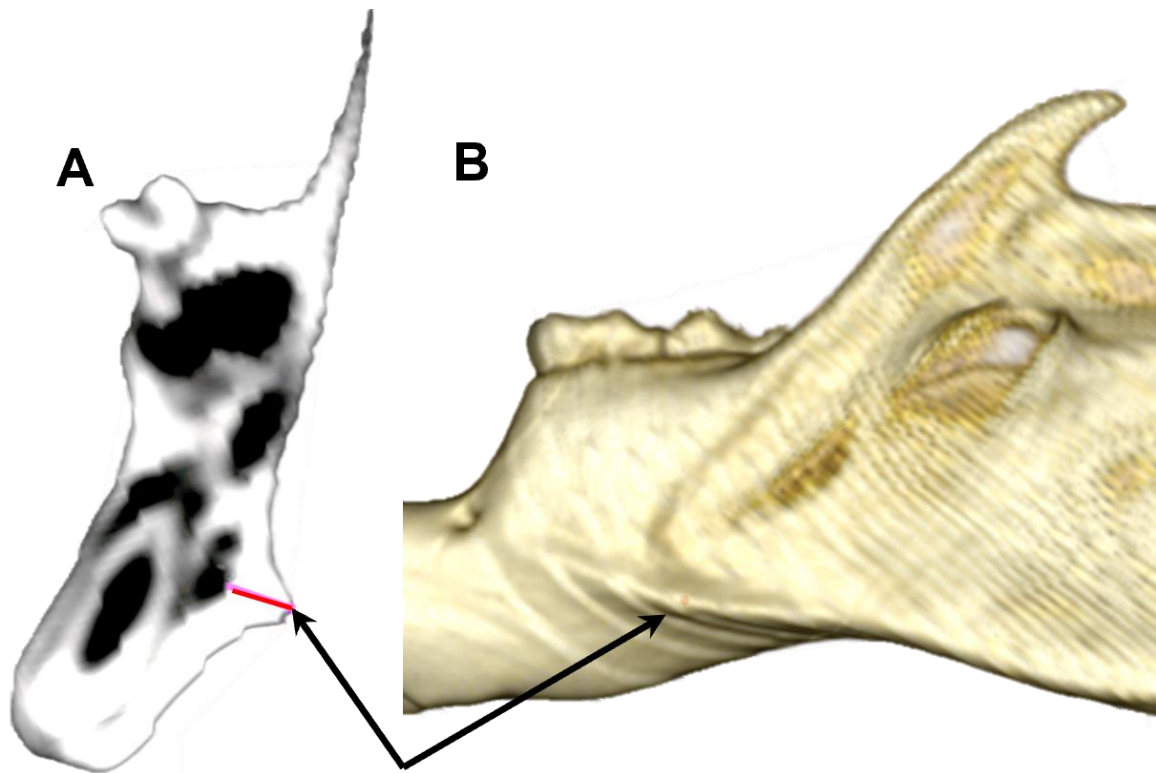


Figura 18. Medición de grosor de cortical. A. Vista 2D frontal, la línea roja mide en milímetros el grosor de la línea oblicua externa. B) Vista 3D lateral donde se observa el punto donde se encuentra la medición del grosor

7.14. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo en GraphPad Prism 10. Se aplicó Kruskal-Wallis para evaluar diferencias en los valores de porcentaje de regeneración final entre todos los grupos, y como post hoc prueba de Dunn pareadas. Para comparar el volumen inicial de los defectos entre todos los grupos se utilizó Kruskal-Wallis. Se utilizó la prueba Mann-Whitney para comparar: los valores del grosor de la cortical entre especímenes OVX y OLD, así como para comparar la masa ósea entre especímenes OVX y OLD, para comparar el porcentaje de regeneración volumétrica de los defectos entre grupos OVX y OLD, y también para comparar los pesos (gramos) entre ratas OVX y OLD.

8. Resultados.

8.1. Aislamiento y cultivo de ADSC.

Se obtuvieron las células aisladas derivadas del tejido adiposo subcutáneo (**Fig. 19**).

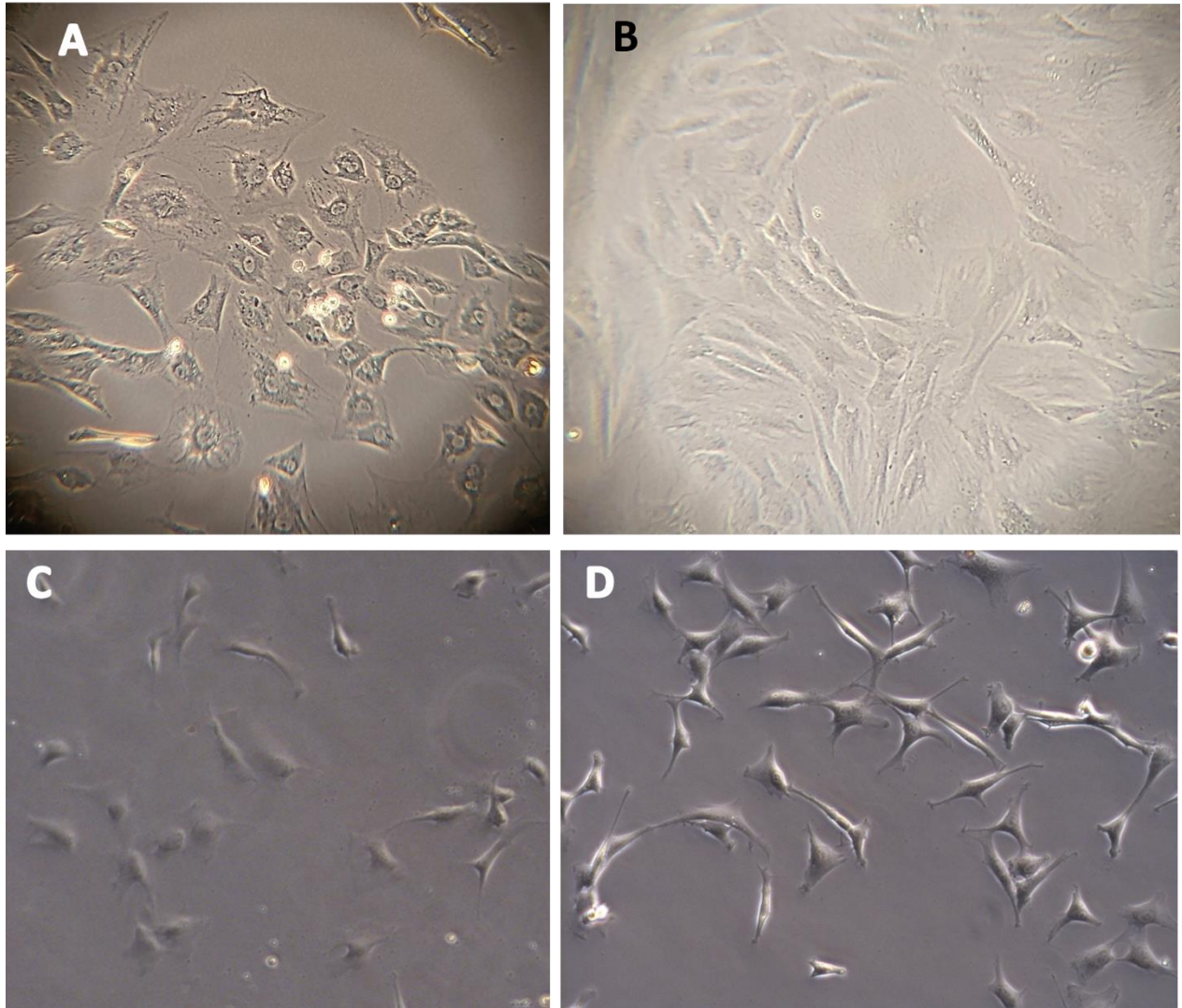


Figura 19. A) 1er subcultivo a 24 hrs. **B)** 2° subcultivo 7 días en DMEM. **C).** Primer subcultivo osteoinducidas a los 7 días (20x) **D)** Segundo subcultivo osteoinducidas a los 4 días (20x)

8.2 Cambios en el peso entre OVX y OLD.

En el grupo OVX el peso final fue de $\bar{x}=427.26\text{g}$, $\text{DE}=56.65$, y en el OLD $\bar{x}=382.18\text{g}$, $\text{DE}=7.7$. En la **Fig. 20** se muestra la gráfica de los pesos

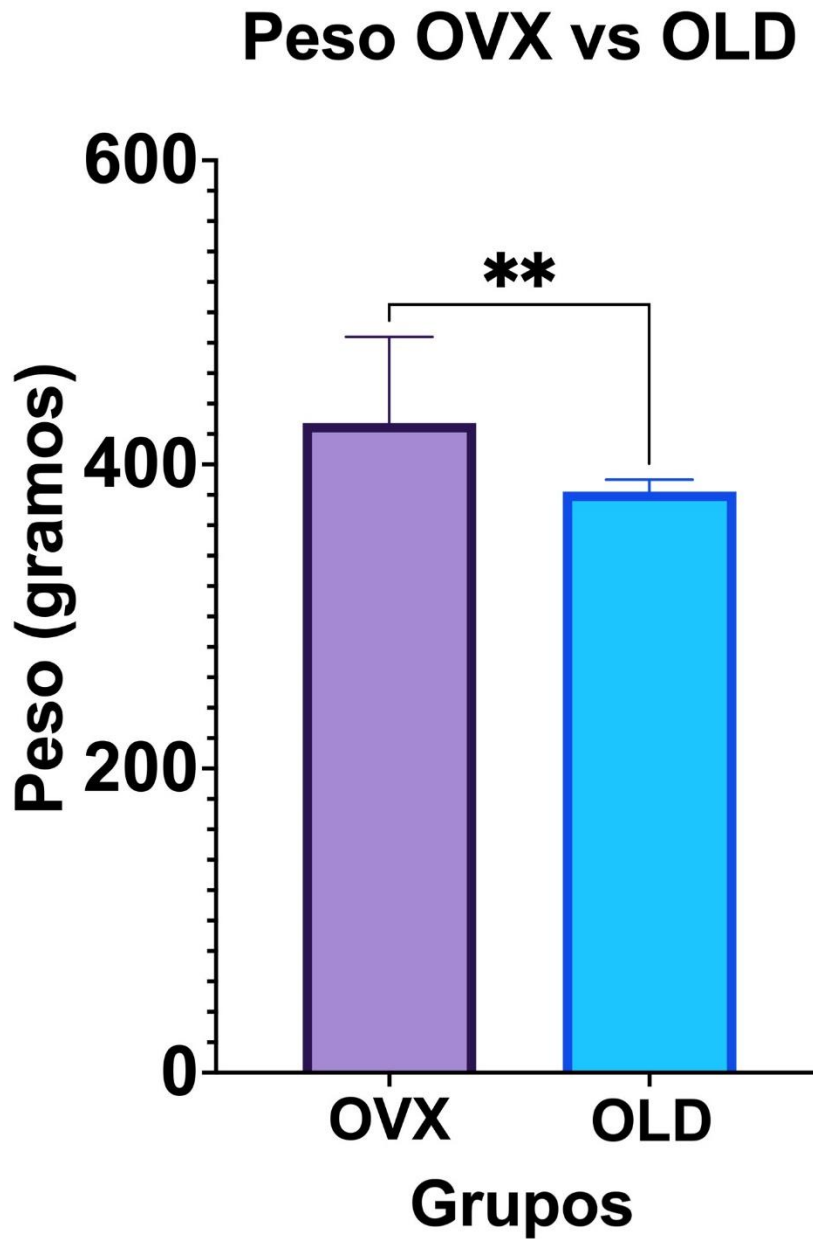


Figura 20. Comparación de los pesos entre especímenes OVX y OLD. $**=p<0.01$

8.3. Microtomografías.

Se obtuvieron 52 archivos DICOM, correspondientes a los estudios μ TC a los 7 y 30 días de 26 especímenes de todos los grupos de experimentación. Se descartaron del análisis los archivos DICOM que no tenían la claridad suficiente para visualizar las reconstrucciones 3D, posiblemente debido a movimiento de la rata durante la toma, o porque las ratas murieron por factores externos antes de la toma del estudio a los 30 días, por lo que sus archivos a 7 días se excluyeron del análisis.

De cada archivo DICOM se obtuvieron los valores en milímetros cúbicos (mm^3) del área del defecto quirúrgico, y de la masa ósea (**Fig. 21**), así como de los valores en milímetros cuadrados (mm^2) del grosor de la cortical de la línea oblicua externa, en la **tabla 4** se agrupan los valores.

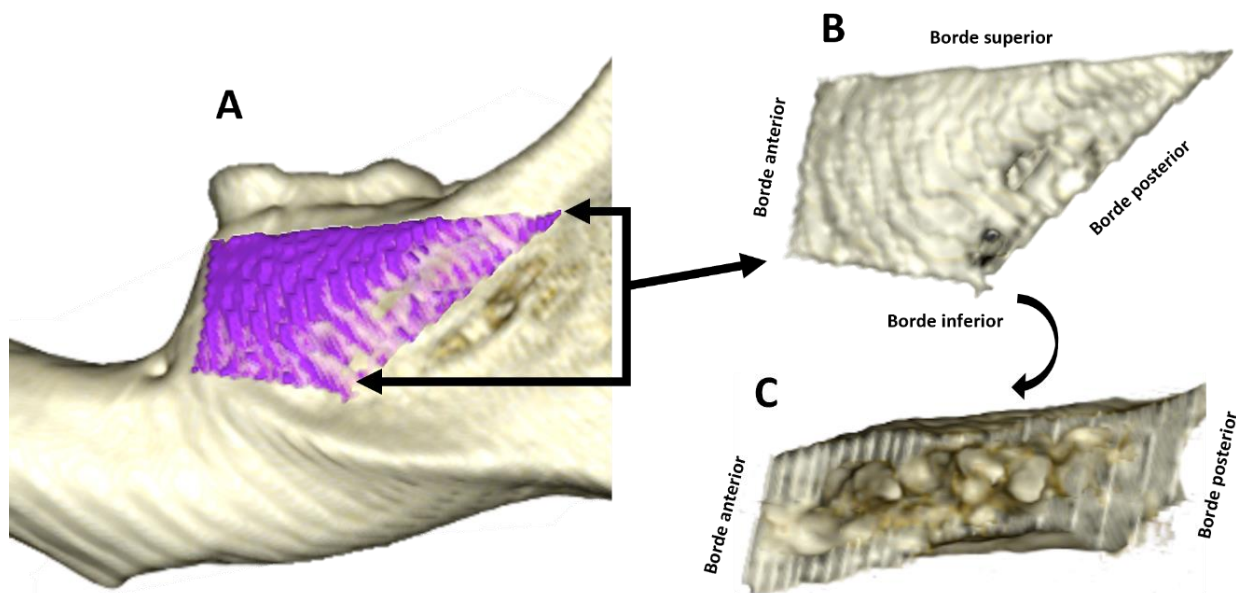


Figura 21. A) Se muestra la región de la masa ósea en vista lateral. B. Vista lateral de la masa ósea recortada. C. Vista inferior de la masa ósea de la ROI.

8.3.1. Volumen inicial de los defectos quirúrgicos.

En el grupo OVX el volumen inicial (7 días) fue de $\bar{x}=8.1 \text{ mm}^3$, $DE = 1.2$, y en el OLD $\bar{x}=6.6 \text{ mm}^3$, $DE = 0.9$.

8.3.2. Masa ósea y grosor de la cortical.

Para el grupo OVX, el volumen de la masa ósea fue de $\bar{x}=30.29 \text{ mm}^3$, $DE = 4.4$ y el grosor de la cortical de $\bar{x}=1.12 \text{ mm}^3$, $DE = 0.17$. En el grupo OLD la masa ósea fue de $\bar{x}=32.07 \text{ mm}^3$, $DE = 3.04$, el grosor cortical fue de $\bar{x}=1.07 \text{ mm}^3$, $DE = 0.17$.

8.3.3. Reconstrucciones 3D del área del defecto.

Las reconstrucciones volumétricas generadas a partir de la ROI coinciden en tamaño y forma con los defectos quirúrgicos. En la **Fig. 22** se muestra una reconstrucción 3D del área del defecto dentro del defecto quirúrgico mandibular.

8.3.4. Porcentaje de regeneración volumétrica de los defectos.

Los porcentajes de regeneración final en los grupos OVX fueron: en sham 15.6%, los grupos con mayor porcentaje fueron ADSC (71.4%) y PLA (66%). Los grupos con el menor porcentaje fueron OST (22.2%), CADSC (27.4%) y POST (15.6%).

En los grupos OLD: sham (16.8%), los grupos con mayor porcentaje fueron ADSC (77.4%), PLA (67.5%) y CADSC (78.6%). Los grupos con menor desempeño fueron OST (37%) y POST (3.5%).

En la **Fig. 23** se muestra una gráfica con los porcentajes de regeneración por grupo.

GRUPOS OVX								
GRUPO	Espécimen	Volumen defecto (mm ³)		Volumen regeneración			Masa ósea mm ³	Grosor cortical mm ²
		7 días	30 días	Vol. Reg mm ³	% Vol. Reg	\bar{x} % Vol. Reg		
SHAM-OVX	1	7.7181	7.4246	0.2935	3.80	15.64	29.30	0.953
	2	7.3796	5.3517	2.0279	27.48		29.60	1.005
ADSC-OVX	3	8.8604	2.7907	6.0697	68.50	71.44	31.10	1.146
	4	9.5039	4.3391	5.1648	54.34		25.60	0.894
	5	9.7096	0.8287	8.8809	91.47		25.70	1.332
OST-OVX	6	9.3123	6.7492	2.5631	27.52	22.22	34.50	1.156
	7	7.911	6.5726	1.3384	16.92		33.70	1.443
PLA-OVX	8	6.1504	1.6009	4.5495	73.97	66.006671	28.1	0.898
	9	6.9548	0.7463	6.2085	89.27		35.8	1.091
	10	8.452	5.5124	2.9396	34.78		30.4	1.268
CADSC-OVX	11	6.6316	4.0092	2.6224	39.54	27.442772	24.7	1.07
	12	8.7363	6.1084	2.6279	30.08		32.8	1.033
	13	7.004	4.6694	2.3346	33.33		23.4	0.953
	14	6.1751	5.7543	0.4208	6.81		35.8	1.015
COST-OVX	15	9.3868	9.2218	0.165	1.76	15.630111	38.2	1.103
	16	8.043	7.3752	0.6678	8.30		25.2	1.164
	17	9.7807	6.1785	3.6022	36.83		31.1	1.469
							\bar{x} 30.29	\bar{x} 1.12

GRUPOS OLD								
GRUPO	Espécimen	Volumen defecto mm ³		Volumen regeneración			Masa ósea mm ³	Grosor cortical mm ²
		7 días	30 días	Vol. Reg mm ³	% Vol. Reg	\bar{x} % Vol. Reg		
SHAM-OLD	1	6.9387	5.0371	1.9016	27.41	16.80	28.6	1.01
	2	5.9595	5.4621	0.4974	8.35		33.6	1.11
	3	8.5463	5.8735	2.6728	31.27		26.7	1.117
	4	5.5569	5.5468	0.0101	0.18		32.3	0.931
ADSC-OLD	5	6.832	2.4783	4.3537	63.73	77.42	30.6	1.127
	6	6.0661	0.5393	5.5268	91.11		33.6	1.043
OST-OLD	7	7.9721	3.4216	4.5505	57.08	37.01	28.3	0.977
	8	5.9608	5.4499	0.5109	8.57		33.4	1.364
	9	7.0768	3.8654	3.2114	45.38		32.7	0.845
PLA-OLD	10	6.1532	1.3664	4.7868	77.79	67.55	31.1	1.242
	11	6.983	3.2381	3.7449	53.63		34.9	1.306
	12	6.5209	1.8759	4.645	71.23		28.6	1.101
CADSC-OLD	13	5.9193	1.2631	4.6562	78.66	78.66	33.3	1.243
COST-OLD	14	5.6919	5.5191	0.1728	3.04	3.52	35.9	0.763
	15	7.2772	6.9859	0.2913	4.00		37.4	0.923
							\bar{x} 32.06	\bar{x} 1.07

Tabla 4. Se muestran los valores obtenidos tras el análisis de las microtomografías. La numeración de espécimen es para identificación. Las mediciones de la masa ósea y el grosor cortical fueron a los 30 días. (Vol. Reg mm³ = Volumen regenerado en milímetros cúbicos, es la diferencia entre el volumen del defecto a los 7 días y a los 30 días. %Vol. Reg = Porcentaje volumétrico de regeneración, se calcula Vol. Reg mm³ x 100 / Volumen defecto 7 días. \bar{x} % Vol. Reg = media grupal del porcentaje de

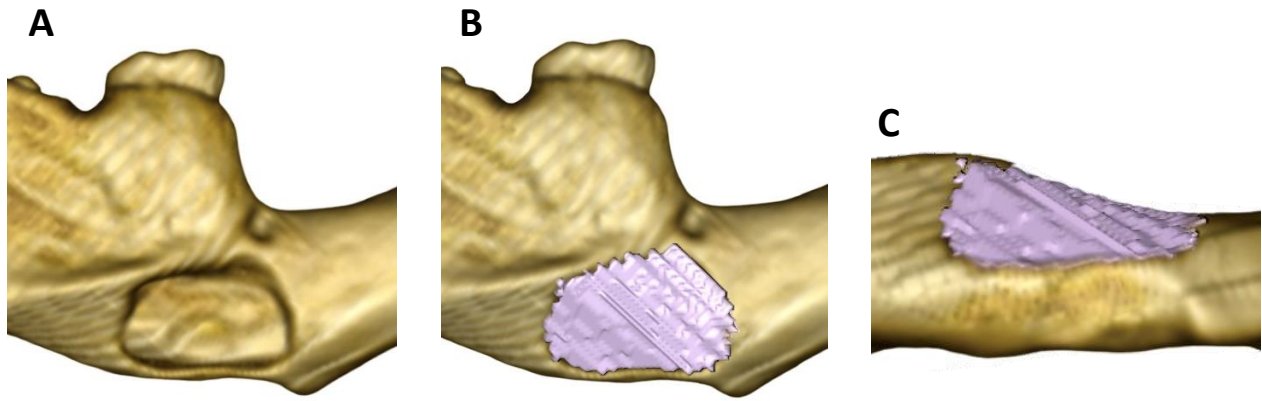


Figura 22. Reconstrucción volumétrica de los defectos. A) Se observa el defecto quirúrgico. Se muestra la reconstrucción 3D del área del defecto reconstruido dentro del defecto, vista lateral B) e inferior C)

Comparación de regeneración

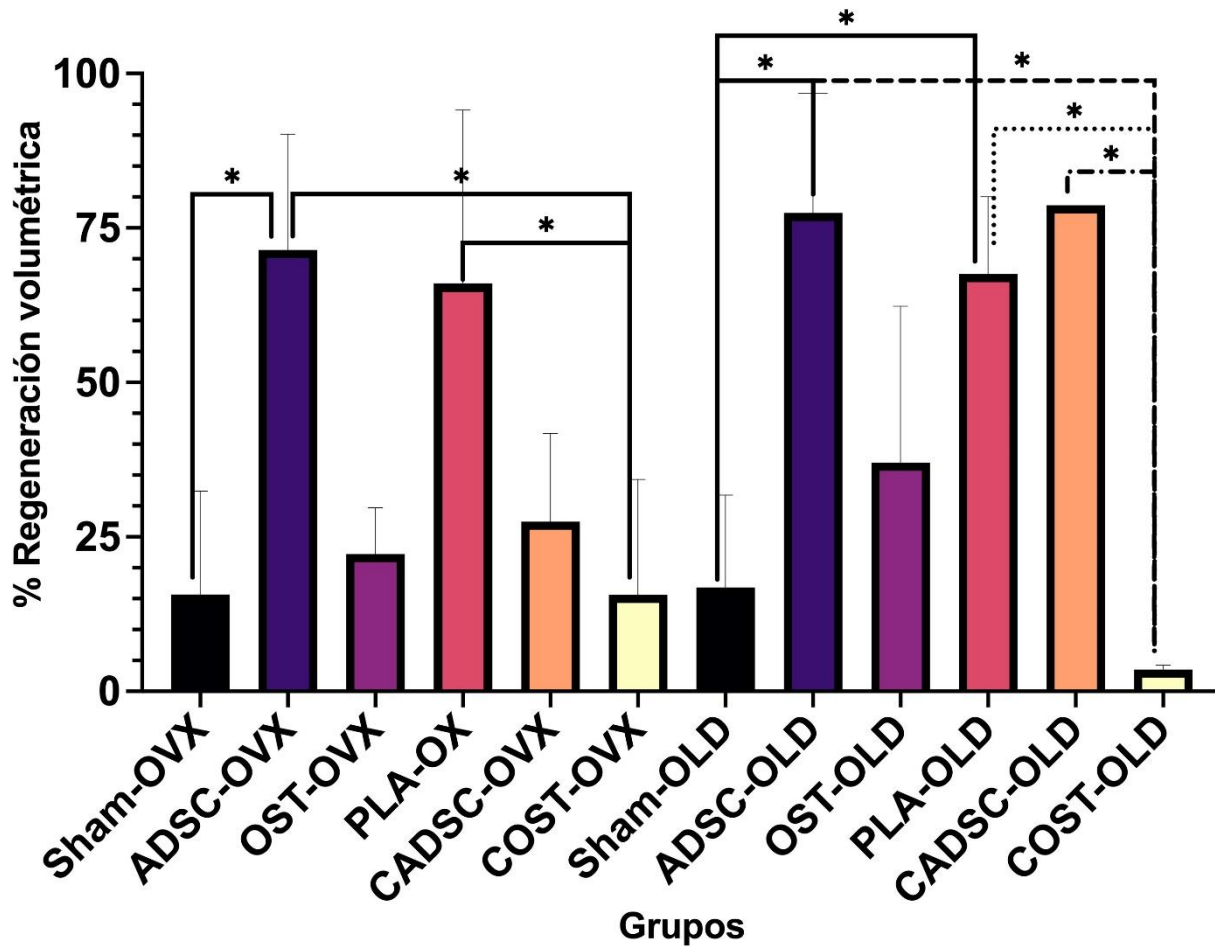


Figura 23. Se muestran los porcentajes de regeneración volumétrica de cada grupo. Las líneas muestran las comparaciones pareadas con diferencia estadística (* = $p < 0.05$)

9. Análisis de resultados.

9.1. Volumen inicial de los defectos quirúrgicos.

El volumen inicial (7 días) de los defectos no demostró diferencia significativa entre los grupos. Lo cual nos indica que los especímenes iniciaron experimentación con un defecto quirúrgico estandarizado y en las mismas condiciones.

9.2. Volumen de masa ósea.

Los valores en mm^3 de masa ósea en el grupo OVX ($\bar{x}=30.29$, $DE =4.43$) fueron ligeramente menores que los del grupo OLD ($\bar{x}=32.06$, $DE=3.04$) pero sin diferencia estadística entre ellos. Visualmente es posible observar diferencias en la arquitectura trabecular entre especímenes OVX y OLD (**Fig. 24**).

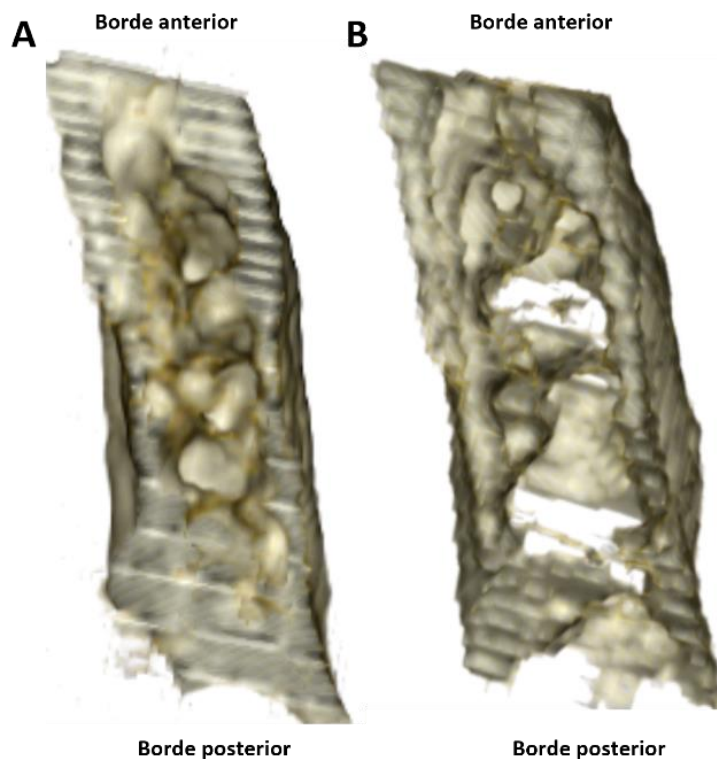


Figura 24. Vista inferior de la masa ósea de un espécimen OLD (A) y un OVX (B)

9.3. Grosor cortical.

Los valores en mm^2 del grosor de la cortical ósea fueron levemente más altos en el grupo OVX ($\bar{x}=1.11$, $DE=0.17$) que en el OLD ($\bar{x}=1.07$, $DE=0.17$), no se identificó diferencia significativa.

9.4. Porcentaje de regeneración volumétrica de los defectos entre grupos OVX y OLD.

No se encontró diferencia significativa en los porcentajes de regeneración entre OVX y OLD, lo cual indica que los diferentes tratamientos actúan de forma similar tanto en los especímenes OVX como en los OLD.

9.5. Porcentaje de regeneración volumétrica final de los defectos.

Se observó diferencia significativa global ($p < 0.05$) en los porcentajes de regeneración final entre todos los grupos.

Comparaciones de Dunn pareadas. Las comparaciones pareadas con la prueba post Hoc de Dunn mostraron las siguientes diferencias estadísticamente significativas (**Fig. 23**).

Entre los grupos OVX:

- Existe diferencia significativa entre sham-ovx y ADSC-ovx.
- Los grupos ADSC-OVX y PLA-OVX son significativamente mayor en comparación con COST- OVX.

Entre los grupos OLD:

- Existe diferencia significativa entre sham-OLD, y los grupos ADSC-OLD y PLA- OLD
- Los grupos ADSC-OLD, PLA-OLD y PLA-ADSC-OLD, son significativamente mayor en comparación con COST- OLD.

9.6. Comparaciones descriptivas de los porcentajes de regeneración.

Los especímenes sham-OVX y sham-OLD presentaron porcentajes de regeneración final similares (15.6% y 16.8%, respectivamente).

Los tratamientos ADSC (71.4%) y PLA (66%) del grupo OVX, tuvieron un comportamiento similar a los tratamientos de su contraparte OLD, ADSC (77.4%) y PLA (67.5%).

Los tratamientos OST y POST tuvieron el mismo comportamiento que sham, tanto en especímenes OVX como OLD.

El porcentaje de regeneración de los tratamientos CADSC (78.6%) y OST (37%) en el grupo OLD fue ligeramente mayor que en los tratamientos CADSC-OVX (27.4%) y OST-OVX (22.2%), pero sin diferencia estadísticamente significativa.

El tratamiento COST-OVX (15.6%) regeneró levemente más volumen que COST-OLD (3.5%), pero sin diferencia estadística.

9.7. Cambio de peso entre OVX y OLD.

Existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre las ratas OVX y OLD. Siendo las OVX las que mostraron mayor incremento de peso.

9.8. Crecimiento vertical del defecto.

También es posible observar que los grupos con mejor desempeño, ADSC, PLA (tanto OVX como OLD) y CADSC-OLD, logran regenerar tejido en sentido vertical, como se puede observar en la **Fig. 25**. Los grupos OST y COST carecen de esta característica.

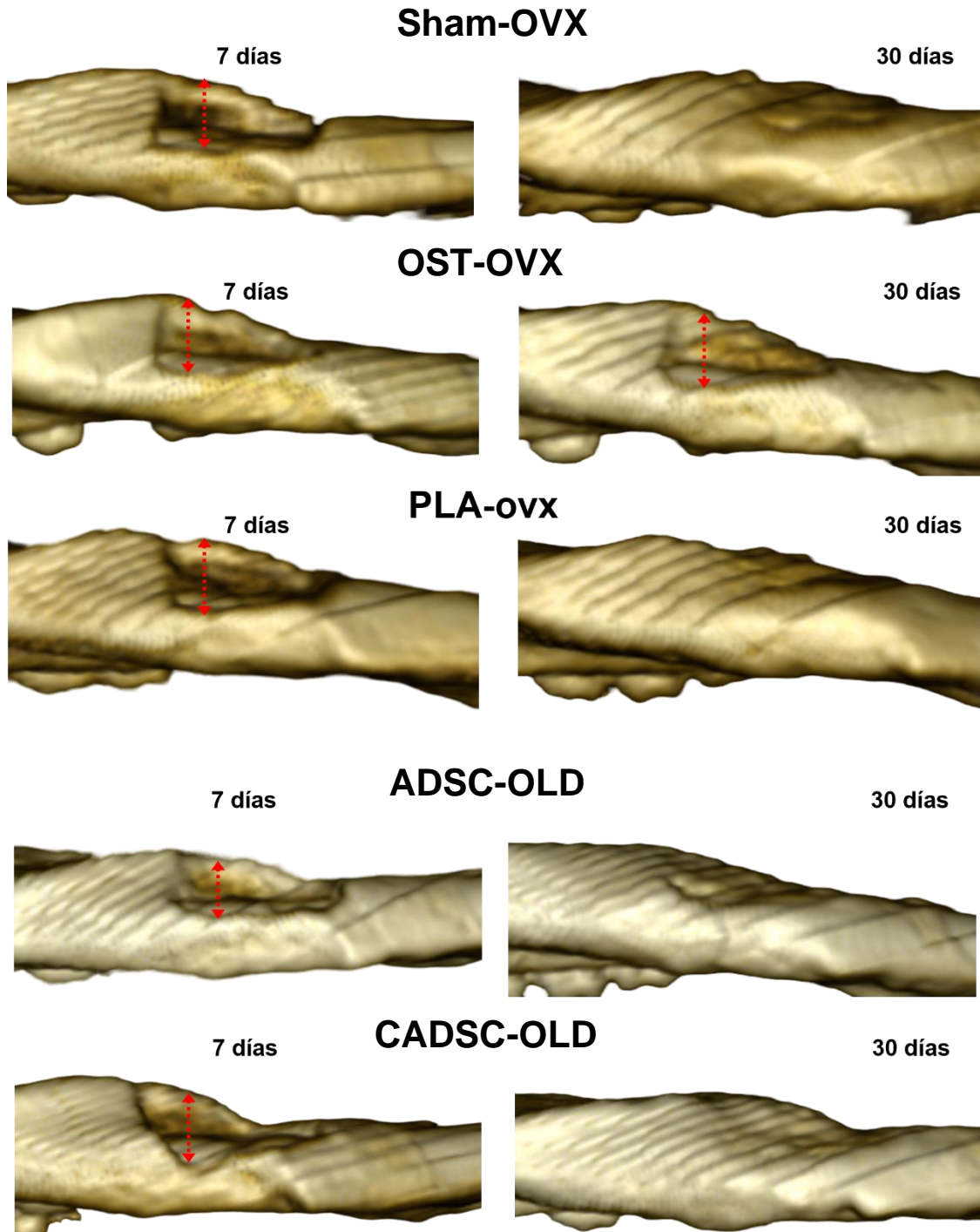


Figura 25. Crecimiento vertical del defecto. Se muestra la vista inferior de la zona del defecto a los 7 días (lado izquierdo) y a los 30 días (lado derecho) de especímenes representativos. En los grupos ADSC-OVX, PLA-OVX, ADSC-OLD y CADSC-OLD un buen crecimiento vertical, a diferencia del grupo OST-PVX donde el crecimiento vertical fue

9.9. Descripción morfológica del tejido regenerado en el defecto quirúrgico.

Los especímenes OVX que no recibieron tratamiento (**Sham-ovx, Fig.26**) mostraron una capacidad de regeneración limitada. A los 30 días es posible observar regiones óseas que forman una especie de escalón en el borde superior del defecto (flecha roja de doble cabeza). Las flechas azules muestran área de formación de tejido en los bordes del defecto, particularmente observable en la región posterior del defecto.

De los grupos OVX, en general, **ADSC-OVX** fue el que mostró una mayor regeneración a lo largo y ancho del defecto, y con un crecimiento vertical mayor. Un espécimen (**Fig. 26**) de este grupo logró 91.4% de regeneración y mostró bastante crecimiento vertical, pero con algunas irregularidades en su superficie (flecha roja de una cabeza). En otro espécimen de este grupo la regeneración fue de 54.34%, sin embargo, muestra indicios de regeneración moderada de volumen en borde superior, además se aprecia un patrón de regeneración de volumen diagonal, por lo que es posible que pudiera haber continuado con su proceso de regeneración.

En tanto, uno de los tratamientos más deficientes en términos de porcentaje, **OST-OVX (Fig. 26)**, mostró una leve disminución a lo largo y ancho del defecto, pero es posible observar zonas de regeneración (flechas azules), el crecimiento vertical fue pobre.

A su vez, el grupo **PLA-OVX**, en dos especímenes se observa un crecimiento a lo largo y ancho del defecto, uno de ellos con excelente crecimiento vertical, aunque con algunas irregularidades en su superficie (flechas rojas) (**Fig. 27**). Un espécimen de este grupo mostró un desempeño deficiente, con una pequeña reducción a lo largo y ancho del defecto, pero con mínimo crecimiento vertical.

En general, el tratamiento **CADSC-OVX** mostró una capacidad de regeneración limitada, particularmente en sentido vertical, es posible observar disminución a lo largo y ancho de los defectos. Con excepción del borde superior en un espécimen que muestra un patrón diagonal (**Fig. 27**), los bordes del defecto se observan verticales con respecto a su base, por lo que es posible que la capacidad regenerativa de este tratamiento no hubiese sido suficiente de continuar.

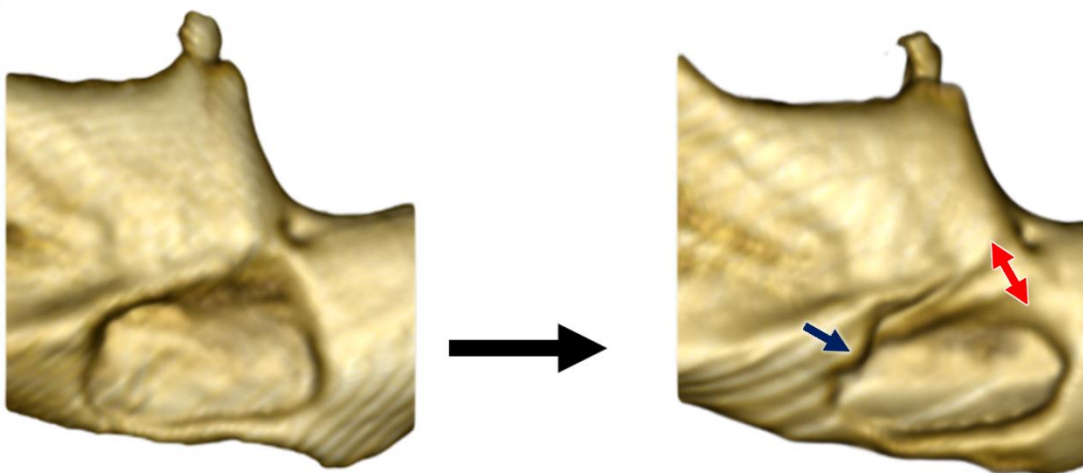
El tratamiento **COST-OVX (Fig. 37)** tuvo una capacidad de regeneración deficiente, es posible observar el crecimiento de pequeños escalones en el borde superior del defecto (flechas rojas de doble cabeza). Casi no es posible observar disminución en el tamaño del defecto, el crecimiento vertical fue casi nulo.

Grupos OVX

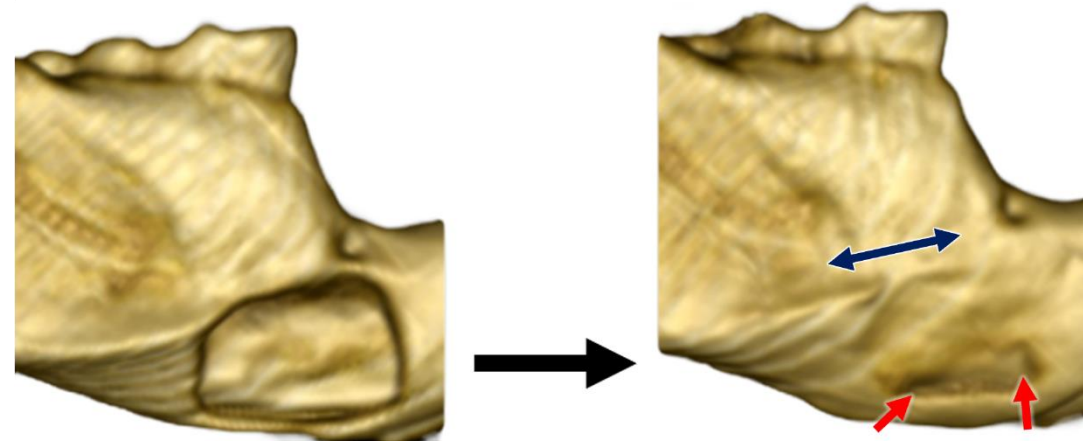
7 días

30 días

SHAM



ADSC



OST

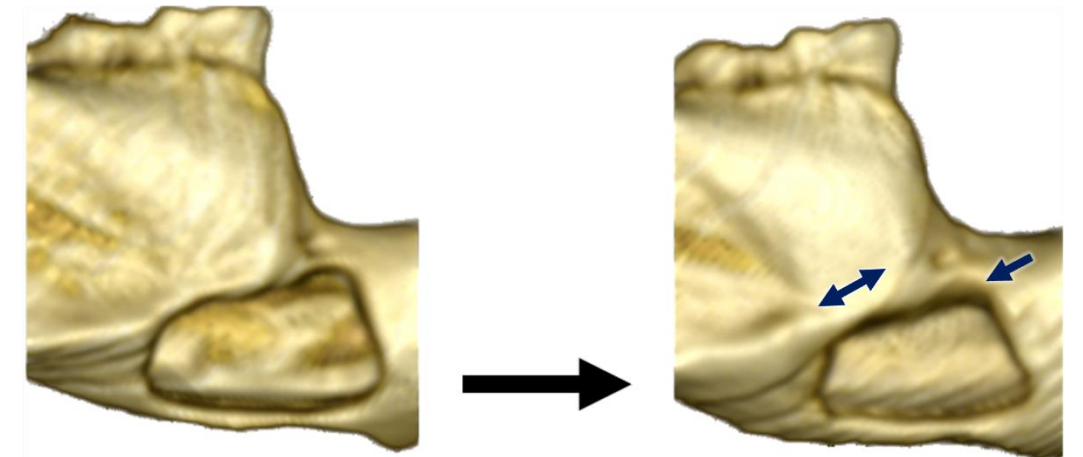


Figura 26. Grupos OVX. Se muestra la vista lateral de los defectos de especímenes representativos para cada grupo, *Sham*, *ADSC* y *OST*. Las flechas azules de doble cabeza indican regeneración a lo largo de la zona de la línea oblicua externa, las flechas rojas de una cabeza indican zonas con poco volumen de regeneración. Las flechas rojas de doble cabeza indica un patrón de regeneración en forma de “escalón”.

Grupos OVX

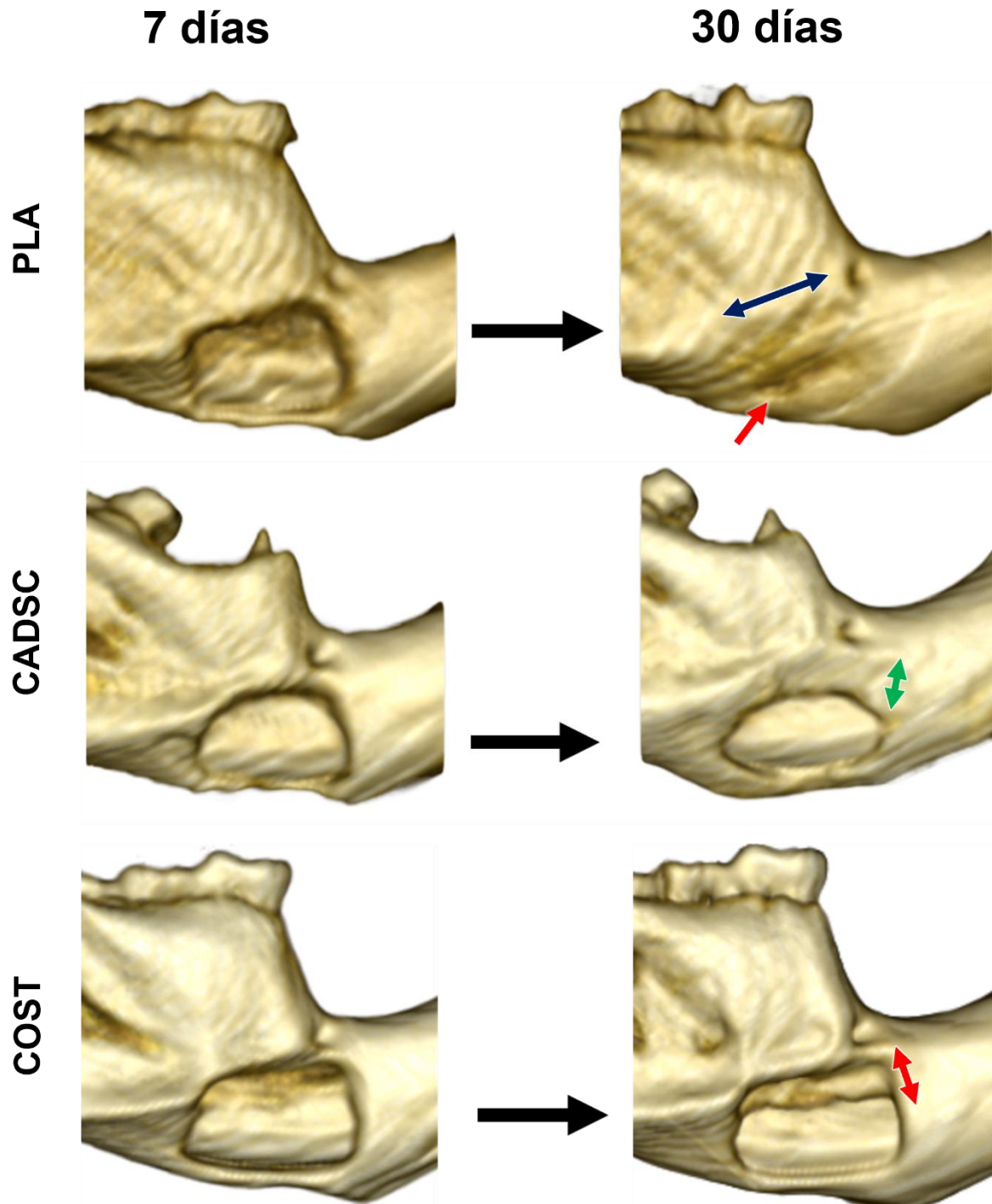


Figura 27. Grupos OVX. Se muestra la vista lateral de los defectos de especímenes representativos para cada grupo, **PLA**, **CADSC** y **COST**. Las flechas azules de doble cabeza indican regeneración a lo largo de la zona de la línea oblicua externa, las flechas rojas de una cabeza indican zonas con poco volumen de regeneración. Las flechas rojas de doble cabeza indica un patrón de regeneración en forma de "escalón". La flecha verde de doble cabeza indica una zona con crecimiento en patrón diagonal.

Por otra parte, en los especímenes OLD, el grupo **Sham-OLD (Fig. 32)** mostró una capacidad de regeneración escasa. Se observan escalones de regeneración (flecha roja de doble cabeza) en el borde superior del defecto. El crecimiento vertical fue casi nulo, y no se aprecia una disminución importante del defecto.

El grupo **ADSC-old** fue uno de los tratamientos que exhibió regeneración mayor a lo largo y ancho del defecto y por tanto una considerable disminución en el tamaño del defecto. Un espécimen (**Fig. 33**) de este grupo logró 91.1% de regeneración y mostró un buen crecimiento vertical, pero irregularidades en la superficie (flechas rojas), particularmente en la región inferior.

Al igual que en OVX, el grupo **OST-old (Fig. 34)** tuvo un desempeño reducido, es posible observar una leve disminución a lo largo y ancho del defecto. El crecimiento vertical fue pobre.

El otro tratamiento en el que se observó un mayor porcentaje de regeneración fue **PLA-OLD**. Dos especímenes mostraron abundante crecimiento vertical, uno de ellos con irregularidades en su superficie como en forma de cráter, el otro espécimen con una superficie más uniforme, pero con menor volumen en la región inferior (**Fig. 35**). La rata restante, a pesar de tener un buen volumen de regeneración, mostró una formación de tejido muy irregular, y con una especie de excrescencia ósea en la parte inferior del defecto.

A diferencia de los especímenes OVX, el espécimen OLD que recibió constructo con células ADSC (**CADSC-OLD, Fig. 36**) tuvo un buen porcentaje de regeneración y se observa una importante disminución en el tamaño del defecto a lo largo y ancho, el crecimiento vertical fue bueno y con una superficie uniforme, aunque con una disminución de altura en la zona anterior y media del defecto (flecha roja).

En cuando al grupo **COST-OLD (Fig. 37)**, tuvieron una regeneración pobre, casi no se observan diferencia en el tamaño y forma de los defectos, el crecimiento vertical se observa prácticamente nulo, aunque se pueden apreciar zonas de regeneración (flechas azules) y también un escalón de regeneración (flecha roja de doble cabeza).

Ir a Anexos para ver las comparaciones del resto de los especímenes por grupo.

Grupos OLD

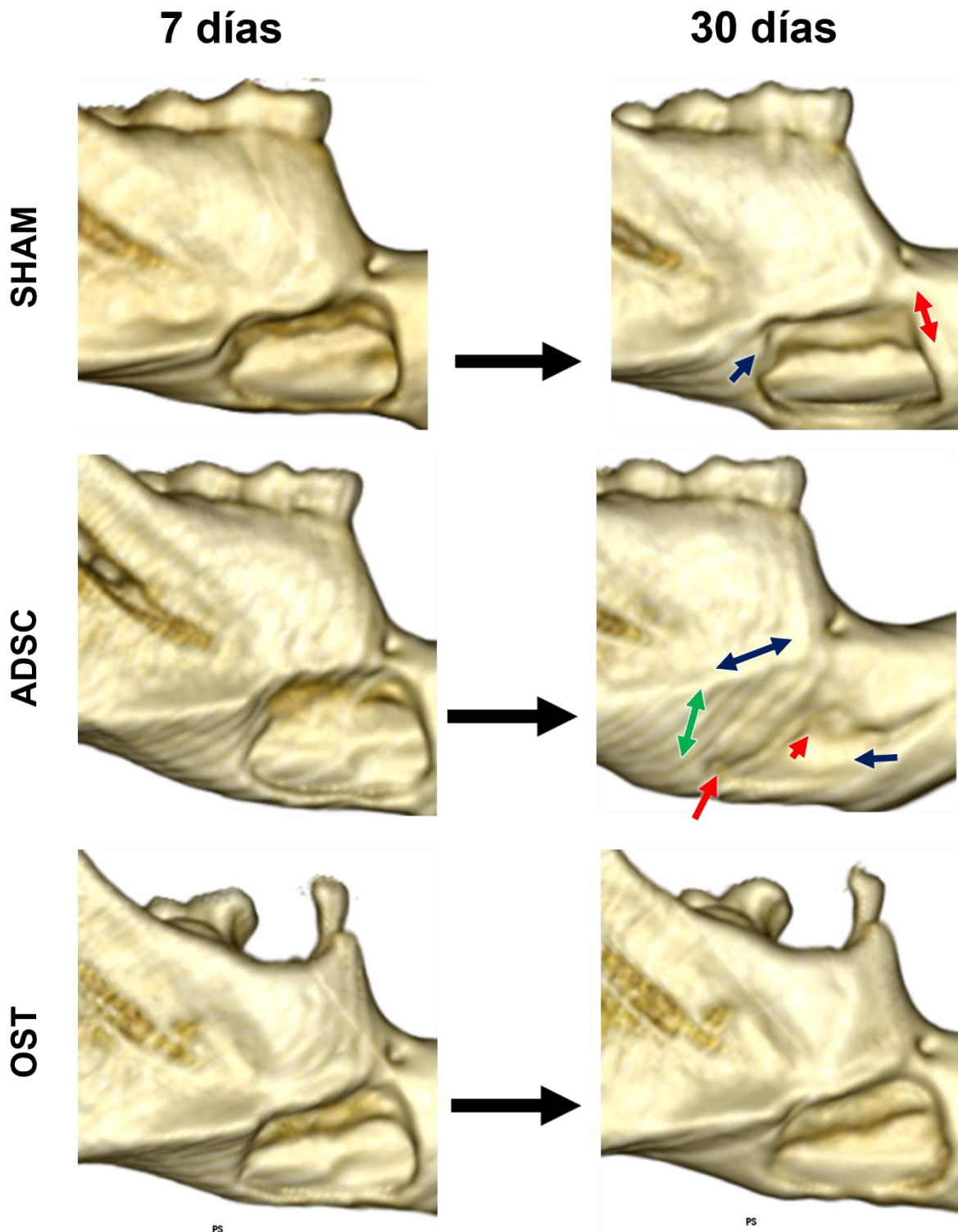


Figura 28. Grupos OLD. Se muestra la vista lateral de los defectos de especímenes representativos para cada grupo, **Sham**, **ADSC** y **OST**. Las flechas azules de doble cabeza indican regeneración a lo largo de la zona de la línea oblicua externa, las flechas rojas de una cabeza indican zonas con poco volumen de regeneración. Las flechas rojas de doble cabeza indica un patrón de regeneración en forma de “escalón”. La flecha verde de doble cabeza indica una zona con crecimiento en patrón diagonal.

Grupos OLD

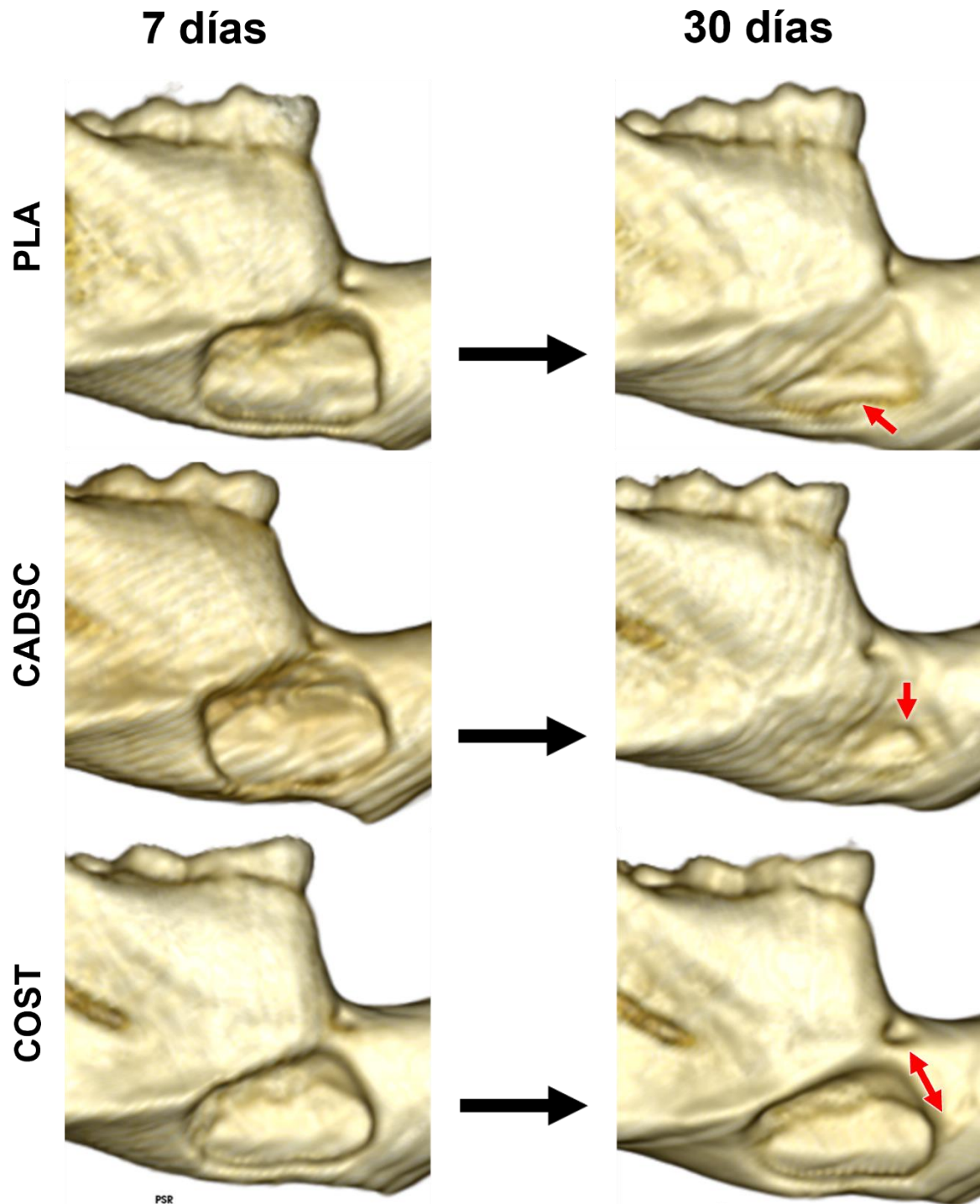


Figura 29. Grupos OLD. Se muestra la vista lateral de los defectos de especímenes representativos para cada grupo, PLA, CADSC y COST. La flecha roja de una cabeza indican zonas con poco volumen de regeneración. La flecha roja de doble cabeza indica un patrón de regeneración en forma de "escalón".

10. Discusión.

En esta tesis se evaluó el potencial regenerativo de un constructo constituido por un andamio de ácido poliláctico y ADSC con y sin inducción osteogénica, implantado dentro de un defecto óseo mandibular en un modelo de osteoporosis por ovariectomía bilateral. Se realizó cirugías de OVX en especímenes de al menos 3 meses de edad, ya que se ha mostrado ser efectiva la inducción⁹⁰, puesto que ya han alcanzado madurez sexual y ósea, por lo que es un modelo adecuado para estudiar pérdida ósea postmenopáusica. Tras 8 meses de la OVX los especímenes se consideraron osteoporóticas, elegimos este tiempo, ya que fue el tiempo en el que observamos claras diferencias radiográficas entre los grupos OLD y OVX (imágenes no mostradas), esto contrasta con otros estudios que reportaron que los especímenes muestran evidencia de osteoporosis a las 6 semanas^{91,92}, 2 meses⁷⁸ y 3 meses⁷⁷, sin embargo, hay evidencia de que los efectos de la osteoporosis son más evidentes entre los meses 6 y 9 post-ovx⁶⁹. Además, cuando comparamos la ganancia de peso de las ratas al final de nuestro experimento, demostró ser significativamente mayor en las ratas OVX, lo cual es un efecto derivado de los cambios metabólicos tras la ovariectomía y que se asocian al establecimiento del modelo de osteoporosis⁷⁰.

Empleamos un diseño quirúrgico de defecto óseo mandibular de tamaño crítico que ya ha sido previamente caracterizado⁸⁰ y que no genera un riesgo en la vida de los especímenes estudiados, y tampoco compromete estructuras anatómicas que pueda causar una morbilidad asociada. Contar con un defecto crítico óseo estandarizado y apropiado para la aplicación clínica, como el usado en este estudio, nos permite tener resultados que pueden ser trasladables a la clínica (con humanos). Pues el defecto empleado es comparable con la pérdida ósea que se da en los humanos en la periodontitis donde ocurre una pérdida de altura ósea con una base horizontal y perpendicular a las paredes del defecto⁹³ y que se han visto también en pacientes con osteoporosis⁹⁴.

En 2019, Liu y cols⁷⁹ llevaron estudios anatómicos y de μ TC en la mandíbula con la finalidad de estandarizar un defecto óseo adecuado, el defecto que estandarizaron coincide en forma rectangular y localización anatómica con el defecto estandarizado por Trejo y cols⁸⁰, mismo que aquí empleamos. En el presente trabajo, el tamaño inicial de los defectos óseos que realizamos no mostró diferencia estadística entre los grupos, lo cual indica que los especímenes iniciaron experimentación con un defecto quirúrgico del mismo tamaño y con el que es posible comparar diferentes tratamientos. Además, se refuerza la validez del defecto, pues los grupos que no recibieron tratamiento mostraron una casi nula regeneración volumétrica.

Otros diseños de defecto quirúrgico mandibular utilizados para estudiar regeneración en Op, como los defectos de tipo circular⁹⁵⁻⁹⁷, que contrastan con nuestro defecto, en donde es posible evaluar tanto el largo y ancho, así como el crecimiento vertical, elemento es de suma importancia en la aplicación clínica odontológica, donde se busca un soporte óseo suficientemente alto para tratamientos de carácter rehabilitador⁹⁸, además, este defecto se encuentra en una zona compleja que sirve para valorar el potencial de los tratamientos para regenerar con una forma anatómica adecuada.

En esta tesis se utilizó la μ TC como método de análisis *in vivo* para evaluar la regeneración ósea de los tratamientos, así como para evaluar si la Op influía en el grosor cortical y de la masa ósea de la mandíbula. Nuestros resultados muestran que el grosor de la cortical ósea en el área de la línea oblicua externa no exhibió cambios a lo largo del tiempo (9 meses) entre los grupos OVX y OLD, lo cual es consistente con los reportado por Hsu y cols⁹⁹ que evaluaron el grosor mandibular en la misma región que nosotros estudiamos en esta tesis, en tanto que si se observaron diferencias cuando analizamos la arquitectura trabecular entre especímenes OVX y OLD (**Fig. 24**).

La resolución obtenida en nuestras μ TC (125 micras) brinda suficiente detalle para evaluar con precisión los cambios volumétricos tanto en los defectos quirúrgicos como en el volumen óseo total, sin embargo, no lo suficiente como para poder medir a detalle el grosor o número de las trabéculas óseas mandibulares, es por ello que empleamos el parámetro al que denominamos: “*masa ósea*” que es la cuantificación volumétrica del total de las estructuras con la radiodensidad (HU) mínima necesaria para ser considerado hueso en una región particular, este total incluye tanto a hueso cortical como trabecular, proponemos que sea un término que se continúe empleando como una herramienta en el análisis de la regeneración ósea mediante μ TC, y particularmente en casos donde la resolución no permite un análisis detallado de la microarquitectura.

Utilizando este parámetro observamos que la masa ósea del grupo OVX muestra valores volumétricos inferiores en comparación con el grupo OLD, y aunque el análisis estadístico no encontramos diferencias significativas entre ambos, en nuestro análisis morfológico son evidentes cambios morfológicos en los especímenes OVX, mismos que se ven manifestados en un hueso trabecular delgado, discontinuo, con espacios amplios entre las trabéculas y con poca interconexión entre ellas. Hsu y cols⁹⁹ y Lee y cols¹⁰⁰ realizaron ovariectomía en ratas, y mediante μ TC evaluaron la microarquitectura del hueso trabecular mandibular, ambos reportaron disminución significativa del grosor, volumen y separación trabecular en los grupos ovariectomizados en comparación con los grupos control.

En esta tesis se aislaron células troncales derivadas de tejido adiposo subcutáneo inguinal, ya que se ha observado que en ratas este tejido adiposo es fuente de ADSC, además, las células aisladas de TA inguinal muestran mayor plasticidad celular a diferencia del TA visceral¹⁰¹. No se observaron reacciones adversas en nuestros especímenes tras implantarles las células alogénicas, esto debido a que las ADSC han mostrado poseer capacidad inmunomoduladora similar a cualquier otra MSC proveniente de otros tejidos⁴¹, por lo que su uso de forma alogénica no provoca daño, y por el contrario, ejercen actividad inmunomoduladora para favorecer el proceso regenerativo. A las células osteoinducidas se les mantuvo en medio osteogénico por 14 días, se ha reportado que a partir de los 7 días comienza la expresión de genes asociados a la diferenciación osteogénica, pero alcanzan un mayor nivel de expresión a los 14 días sin mostrar mayor expresión a los 21 días¹⁰².

También existe evidencia que sugiere que dependiendo del origen de las MSCs, estas células tendrán respuestas biológicas distintas, por ejemplo: ADSC aisladas de individuos que padecen Op mostraron poseer una buena capacidad de osteodiferenciación y la

expresión de marcadores osteogénicos, a diferencia de las BMSC, también provenientes de estos individuos que padecen Op, en las que encontraron una disminución en la expresión de marcadores osteogénicos, y una tendencia a expresar mayores niveles de citocinas proinflamatorias. Este comportamiento de las ADSC nos incentivó en el desarrollo de esta tesis, ya que existe evidencia de su alto potencial regenerativo óseo. Jin y cols¹⁰³, compararon el potencial regenerativo de las ADSC vs PDLMSCs (células troncales derivadas de ligamento periodontal) cuando las implantaron *in situ sembradas* en un hidrogel, como en nuestra metodología, en un defecto mandibular en ratas, al término de 6 semanas observaron que las ADSC mostraron mayor capacidad de regeneración ósea.

Los grupos ADSC tuvieron significativamente mejor desempeño que los grupos sham y OST, y a su vez, sham y OST tuvieron la misma efectividad, tanto en OVX como en OLD. Estos resultados contrastan con lo reportado por Yoshida y cols¹⁰⁴, quienes compararon cultivos celulares laminares (2D) de ADSC y ADSC-ost (*osteodiferenciadas*) en un defecto de fémur en ratas, encontraron que las ADSC-ost formaron más hueso nuevo, y con mayor densidad que las ADSC. De forma similar, Yoon y cols¹⁰⁵ también evaluaron cultivos laminares de ADSC y ADSC-ost sembrados en un modelo de fractura de radio en perros Beagle, en donde la administración ADSC-ost mostró mayor formación de hueso maduro, y menor formación de callo óseo, lo que mejoró el proceso regenerativo.

La poca efectividad del grupo OST en nuestros resultados podría ser consecuencia de la incapacidad de los especímenes OVX y OLD para modular o dirigir las respuestas de las células con inducción osteogénica, en las OVX derivado de un proceso patológico y en las OLD como parte del proceso de envejecimiento, además, las células OST administradas ya se encuentran comprometidas a un linaje y podrían estar limitadas en cuanto a las funciones de las ADSC, y por lo tanto no llevan a cabo el proceso de regeneración adecuadamente.

En la presente tesis, empleamos dos grupos de ratas, en ambos con y sin ovariectomía, las ratas se podrían considerar como: “envejecidas” ya que contaban con al menos 11 de meses de edad al momento de realizarles el defecto crítico mandibular, por lo que ya se encontraban en la perimenopausia⁷¹, como bien se sabe es parte del proceso de envejecimiento que haya una disminución en la tasa de regeneración de todos los tejidos y en específico en el hueso, esto lo puso de manifiesto Park y cols¹⁰⁶, quienes compararon ADSC extraídas de pacientes >70 años y de <30 años, y observaron que las ADSC aisladas de pacientes de más de 70 años mostraron menor potencial de diferenciación osteogénica y menor expresión del receptor BMP1A, esta disminución en su expresión podría evitar que la inducción osteogénica se dé adecuadamente. Por su parte, Kornicka y cols¹⁰⁷ detectaron menos formación de nódulos de mineralización y menor actividad de fosfatasa alcalina en las ADSC aisladas de pacientes de >50 años, en comparación con las células ADSC provenientes de los pacientes jóvenes (de 20-29 años); y a su vez, Zhu¹⁰⁸ halló una disminución el potencial osteogénico en ADSC aisladas de mujeres de entre 40-50 años, que propusieron es debido a los cambios relacionados a la disminución de estrógeno durante la perimenopausia. Todo lo anterior, sería la razón por la cual tuvieron menor eficacia en cuanto la regeneración, lo que se

puede observar al comparar este estudio con el de Yoshida y cols¹⁰⁴ quienes emplearon constructos con ADSC inducidas a la osteogénesis en ratas jóvenes (7 semanas), y que concluyeron que son una prometedora terapia para la reconstrucción de defectos óseos.

Es interesante que el andamio tricapa de membranas nanofibrilares de PLA, mostró buenos resultados, pues presentó un alto volumen de regeneración tanto en el grupo OVX como en el grupo OLD. Nosotros atribuimos estos buenos resultados a que las membranas nanofibrilares de L-PLA al 10% que usamos para conformar este andamiaje tricapa, que ya han sido previamente caracterizadas^{57,58}, y en esta caracterización se demostró que las nanofibras tienen una interconexión que permite la formación de microporos en los cuales pueden movilizarse tanto las células, como nutrientes o metabolitos celulares, lo que es adecuado para la osteogénesis. En las membranas de L-PLA que utilizamos, las nanofibras están orientadas de forma aleatoria, esta característica ha mostrado ser superior en cuanto a la inducción de la actividad osteogénica que las membranas con fibras orientadas en forma paralela o hiperparalela¹⁰⁹. Se ha visto que sustratos relativamente rígidos (0.8, 4.7, 223.7 y 309.9 MPa) pueden llegar a inducir respuesta osteogénica en MSC, que se ve manifestada en expresión de RUNX2, osteocalcina y actividad de fosfatasa alcalina¹¹⁰, por tanto, consideramos que es posible que la efectividad de los grupos PLA (tanto OVX como OLD) se debe a que este material provee un medio tridimensional con propiedades mecánicamente favorables (módulo elástico de las membranas usadas en esta tesis, es de 26.2 ± 4 MPa⁵⁷) para permitir la organización de las células residentes del huésped y reclutar células osteogénicas.

El uso del constructo (PLA+ADSC) no fue más efectivo que los grupos con solamente PLA o ADSC, lo cual diverge de diversos estudios, donde se ha observado que el uso de células en combinación con un biomaterial como andamiaje, obtiene mejores resultados^{91,96,97,111}. Hejazi y cols⁷⁷ evaluaron la regeneración de un defecto en fémur de 3mm de diámetro en ratas ovariectomizadas colocando un andamio 3D de policaprolactona (PCL)/elastina/nanopartículas de hidroxapatita con y sin BMSC sembradas, reportaron que los grupos con el constructo (andamio + BMSC) mostraron una ligera mejora en las características histológicas pero sin diferencia estadística en el volumen total óseo con respecto a solo el andamio. Así pues, si bien nuestros resultados muestran que el constructo no regenera más volumen que PLA o ADSC de forma individual, sería importante valorar las características histomorfológicas del tejido creado por el constructo.

La elección de un tratamiento debe optarse por su efectividad, pero también por sus costos y riesgos asociados, en este estudio tanto ADSC como PLA tuvieron buenos resultados, sin embargo, debe de considerarse cuál de los tratamientos es más realista en su aplicación para la práctica clínica, por un lado, las ADSC son un elemento biológico que presenta ventajas inherentes a este estado como son la capacidad inmunomoduladora y de ser reclutar de las propias células del huésped y como desventaja es que a pesar de mostrar ser un tratamiento seguro, se debe tomar en cuenta el material e infraestructura necesaria para garantizar su expansión y sobrevivencia, esterilidad y conservar sus propiedades de troncalidad.

Y por el otro lado, el L-PLA es un biomaterial inerte que termina por activarse dentro de los organismos, que es biodegradable, y con el potencial de poder fabricarse en masa, por lo que sus costos pueden verse mejorados y como desventaja es posible que cuando no se emplee como relleno, por ejemplo, en defectos segmentarios, no induzca adecuadamente la regeneración y que a final de cuentas justo al ser un material inerte carece de propiedades osteoinductivas.

11. Conclusiones.

Todo lo anterior nos permite elevar a nuestra hipótesis alterna a la categoría de tesis, pues al evaluar mediante μ TC la regeneración ósea inducida por un constructo tricapa de membranas nanofibrilares de ácido poliláctico (L-PLA) y células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADSC) inducidas a la diferenciación de linaje osteogénico, implantado en un defecto crítico óseo mandibular en un modelo de Op por OVX bilateral, no resultó más eficiente que el uso solo de PLA o solo de ADSC, por tanto dada la facilidad para su potencial uso en clínica y sus costos más asequibles, es el PLA el tratamiento más adecuado para mejorar la regeneración ósea en un modelo de Op en un defecto crítico mandibular.

Se demostró que el uso de ADSC con y sin inducción a la diferenciación osteogénica es seguro.

Tanto en los grupos OVX como en OLD, los tratamientos que demostraron ser más efectivos, en cuanto el porcentaje de regeneración, fueron ADSC y PLA.

El tratamiento con células ADSC inducidas al linaje osteogénico fue deficiente en nuestros especímenes OVX y OLD.

12. Perspectivas.

Adquirir μ TC con mayor resolución permitiría realizar un análisis exclusivo de la microarquitectura ósea, en especial del hueso trabecular, para estudiar los efectos de la Op.

Una limitante en este estudio fue no haber obtenido microTC de huesos largos como fémur, tibia o radio, para poder comparar los efectos de la OVX entre estos huesos y la mandíbula.

Nosotros elegimos el tiempo de estudio de 30 días post defecto quirúrgico dado los resultados encontrados previamente en la tesis de Gutierrez, R¹¹² pero como en este caso lo que estamos evaluando, además del defecto quirúrgico es la presencia de la Op, quizás convendría estudiar tiempos más largos hasta observar el cierre total del defecto.

Sería importante realizar estudios similares, tanto de la masa ósea, como de la medida de la cortical, con nuestros mismos parámetros, para poder compararlos entre ratas sanas jóvenes, OVX y las envejecidas.

También es necesario estudiar los elementos moleculares involucrados en el proceso regenerativo del L-PLA y las ADSC, bajo las condiciones de Op y envejecimiento, así como también identificar qué factores osteogénicos y qué vías de señalización se encuentran involucrados o no.

13. Referencias bibliográficas.

1. Harlow SD, Gass M, Hall JE, et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):1159-1168. doi:10.1210/jc.2011-3362
2. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.* 2011;343(2):289-302. doi:10.1007/s00441-010-1086-1
3. Maciel GBM, Maciel RM, Danesi CC. Bone cells and their role in physiological remodeling. *Mol Biol Rep.* 2023;50(3):2857-2863. doi:10.1007/s11033-022-08190-7
4. He S, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:377-406. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113248
5. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2016;69(2):170-179. doi:10.1016/j.bjps.2015.10.015
6. Weber FE. Reconsidering Osteoconduction in the Era of Additive Manufacturing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25(5):375-386. doi:10.1089/ten.TEB.2019.0047
7. Koons GL, Diba M, Mikos AG. Materials design for bone-tissue engineering. *Nature Reviews Materials.* 2020;5(8):584-603. doi:10.1038/s41578-020-0204-2
8. Huzum B, Puha B, Necoara RM, et al. Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review). *Exp Ther Med.* 2021;22(5):1315. doi:10.3892/etm.2021.10750
9. Tyan YC, Yang MH, Chang CC, Chung TW. Biocompatibility of Materials for Biomedical Engineering. In: Chun HJ, Reis RL, Motta A, Khang G, eds. *Biomimicked Biomaterials: Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* Springer Singapore; 2020:125-140. doi:10.1007/978-981-15-3262-7_9
10. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res.* 2022;10(1):48. doi:10.1038/s41413-022-00219-8
11. DenOtter TD, Schubert J. Hounsfield Unit. [Updated 2023 Mar 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-.
12. Kanis JA on behalf of the World Health Organization Scientific Group. *Assessment of Osteoporosis at the Primary Health-Care Level. Technical Report.* World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases; 2007.
13. Sözen T, Özişik L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4(1):46-56. doi:10.5152/eurjrheum.2016.048
14. Coughlan T, Dockery F. Osteoporosis and fracture risk in older people. *Clin Med (Lond).* 2014;14(2):187-191. doi:10.7861/clinmedicine.14-2-187
15. Ji MX, Yu Q. Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Dis Transl Med.* 2015;1(1):9-13. doi:10.1016/j.cdtm.2015.02.006

16. Sobh MM, Abdalbary M, Elnagar S, et al. Secondary Osteoporosis and Metabolic Bone Diseases. *J Clin Med*. 2022;11(9). doi:10.3390/jcm11092382
17. Salari N, Darvishi N, Bartina Y, et al. Global prevalence of osteoporosis among the world older adults: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2021;16(1):669. doi:10.1186/s13018-021-02821-8
18. Angel JL, Vega W, López-Ortega M. Aging in Mexico: Population Trends and Emerging Issues. *Gerontologist*. 2017;57(2):153-162. doi:10.1093/geront/gnw136
19. Pesce V, Speciale D, Sammarco G, Patella S, Spinarelli A, Patella V. Surgical approach to bone healing in osteoporosis. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2009;6(2):131-135.
20. Gorter EA, Reinders CR, Krijnen P, Appelman-Dijkstra NM, Schipper IB. The effect of osteoporosis and its treatment on fracture healing a systematic review of animal and clinical studies. *Bone Rep*. 2021;15:101117. doi:10.1016/j.bonr.2021.101117
21. Zhu Y, Xing X, Liu S, Chen W, Zhang X, Zhang Y. Epidemiology of low-energy wrist, hip, and spine fractures in Chinese populations 50 years or older: A national population-based survey. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(5):e18531. doi:10.1097/MD.0000000000018531
22. Woltman K, den Hoed PT. Osteoporosis in patients with a low-energy fracture: 3 years of screening in an osteoporosis outpatient clinic. *J Trauma*. 2010;69(1):169-173. doi:10.1097/TA.0b013e3181ca081f
23. Wong RMY, Wong PY, Liu C, et al. The imminent risk of a fracture-existing worldwide data: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2022;33(12):2453-2466. doi:10.1007/s00198-022-06473-0
24. Guirant L, Carlos F, Curiel D, et al. Health-related quality of life during the first year after a hip fracture: results of the Mexican arm of the International Cost and Utility Related to Osteoporotic Fractures Study (MexICUROS). *Osteoporos Int*. 2018;29(5):1147-1154. doi:10.1007/s00198-018-4389-9
25. Izquierdo-Avino R, Cebollada-Gadea L, Jordan-Jarque M, Bordonaba-Bosque D, López-Cabanas JA. Risk of osteoporotic fracture and refracture: the importance of index fracture site. *Arch Osteoporos*. 2023;18(1):27. doi:10.1007/s11657-023-01213-1
26. Kalinowski P, Różyło-Kalinowska I, Piskórz M, Bojakowska-Komsta U. Correlations between periodontal disease, mandibular inferior cortex index and the osteoporotic fracture probability assessed by means of the fracture risk assessment body mass index tool. *BMC Med Imaging*. 2019;19(1):41. doi:10.1186/s12880-019-0337-1
27. Suzuki T, Katsumata A, Mastumoto Y, et al. Features of mandibular cortical bone morphology in osteoporotic fracture patients. *Oral Radiol*. 2022;38(4):550-557. doi:10.1007/s11282-022-00596-0
28. Singhal S, Chand P, Singh BP, et al. The effect of osteoporosis on residual ridge resorption and masticatory performance in denture wearers. *Gerodontology*. 2012;29(2):e1059-1066. doi:10.1111/j.1741-2358.2011.00610.x

29. Schmidt AH. Autologous bone graft: Is it still the gold standard? *Injury*. 2021;52 Suppl 2:S18-S22. doi:10.1016/j.injury.2021.01.043
30. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-926. doi:10.1126/science.8493529
31. Shih YV, Varghese S. Tissue engineered bone mimetics to study bone disorders ex vivo: Role of bioinspired materials. *Biomaterials*. 2019;198:107-121. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.06.005
32. Lo C, Hickerson D, Yoo JJ, Atala A, Allickson J. Chapter 3 - Moving into the clinic. In: Lanza R, Langer R, Vacanti JP, Atala A, eds. *Principles of Tissue Engineering (Fifth Edition)*. Fifth Edition. Academic Press; 2020:53-61. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00003-4
33. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
34. Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(9):653-664. doi:10.1016/j.tips.2020.06.009
35. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):11-21. doi:10.1038/nrm2319
36. Sagaradze GD, Basalova NA, Efimenko AY, Tkachuk VA. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:576176. doi:10.3389/fcell.2020.576176
37. Tatara AM, Mikos AG. Tissue Engineering in Orthopaedics. *J Bone Joint Surg Am*. 2016;98(13):1132-1139. doi:10.2106/JBJS.16.00299
38. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19-31. doi:10.1002/cyto.a.23242
39. Ramakrishnan VM, Boyd NL. The Adipose Stromal Vascular Fraction as a Complex Cellular Source for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018;24(4):289-299. doi:10.1089/ten.TEB.2017.0061
40. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402-1416. doi:10.1016/j.exphem.2005.07.003
41. Kim JH, Jo CH, Kim HR, Hwang YI. Comparison of Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells from the Periodontal Ligament, Umbilical Cord, and Adipose Tissue. *Stem Cells Int*. 2018;2018:8429042. doi:10.1155/2018/8429042
42. Kozłowska U, Krawczyński A, Futoma K, et al. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J Stem Cells*. 2019;11(6):347-374. doi:10.4252/wjsc.v11.i6.347

43. Xu L, Liu Y, Sun Y, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):275. doi:10.1186/s13287-017-0716-x
44. Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells.* 2014;7(2):135-142. doi:10.15283/ijsc.2014.7.2.135
45. Huang T, Yu Z, Yu Q, et al. Inhibition of osteogenic and adipogenic potential in bone marrow-derived mesenchymal stem cells under osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;525(4):902-908. doi:10.1016/j.bbrc.2020.03.035
46. Gao Y, Jiao Y, Nie W, Lian B, Wang B. In vitro proliferation and differentiation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from ovariectomized rats. *Tissue Cell.* 2014;46(6):450-456. doi:10.1016/j.tice.2014.08.006
47. Huang Y, Yin Y, Gu Y, et al. Characterization and immunogenicity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under osteoporotic conditions. *Sci China Life Sci.* 2020;63(3):429-442. doi:10.1007/s11427-019-1555-9
48. Boeloni JN, Ocarino NM, Goes AM, Serakides R. Comparative study of osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue of osteoporotic female rats. *Connect Tissue Res.* 2014;55(2):103-114. doi:10.3109/03008207.2013.860970
49. Zheng CX, Sui BD, Liu N, et al. Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytotherapy. *Sci Rep.* 2018;8(1):5215. doi:10.1038/s41598-018-23098-8
50. Veronesi F, Pagani S, Della Bella E, Giavaresi G, Fini M. Estrogen deficiency does not decrease the in vitro osteogenic potential of rat adipose-derived mesenchymal stem cells. *Age (Dordr).* 2014;36(3):9647. doi:10.1007/s11357-014-9647-y
51. Kung FC, Lin CC, Lai WFT. Osteogenesis of human adipose-derived stem cells on hydroxyapatite-mineralized poly(lactic acid) nanofiber sheets. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014;45:578-588. doi:10.1016/j.msec.2014.10.005
52. Wang L, Wang C, Wu S, Fan Y, Li X. Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: current progress and challenges. *Biomater Sci.* 2020;8(10):2714-2733. doi:10.1039/d0bm00269k
53. Minardi S, Corradetti B, Taraballi F, et al. Evaluation of the osteoinductive potential of a bio-inspired scaffold mimicking the osteogenic niche for bone augmentation. *Biomaterials.* 2015;62:128-137. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.05.011
54. Sun YX, Zhang JF, Li DJ, et al. Comparing the osteoconductive potential between tubular and cylindrical beta-tricalcium phosphate scaffolds: An experimental study in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018;106(5):1934-1940. doi:10.1002/jbm.b.34011
55. Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Adv.* 2019;9(45):26252-26262. doi:10.1039/c9ra05214c

56. COURY AJ, LEVY RJ, MCMILLIN CR, et al. CHAPTER 6 - Degradation of Materials in the Biological Environment. In: Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE, eds. *Biomaterials Science*. Academic Press; 1996:243-281. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-050014-0.50011-0>
57. Granados-Hernández MV, Serrano-Bello J, Montesinos JJ, et al. In vitro and in vivo biological characterization of poly(lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(6):2435-2446. doi:10.1002/jbm.b.34053
58. Suarez-Franco JL, Vázquez-Vázquez FC, Pozos-Guillen A, Montesinos JJ, Alvarez-Fregoso O, Alvarez-Perez MA. Influence of diameter of fiber membrane scaffolds on the biocompatibility of hPDL mesenchymal stromal cells. *Dent Mater J*. 2018;37(3):465-473. doi:10.4012/dmj.2016-329
59. Li G, Zhao M, Xu F, et al. Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid. *Molecules*. 2020;25(21). doi:10.3390/molecules25215023
60. Vaid R, Yildirim E, Pasquinelli MA, King MW. Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid Fibers as a Function of pH and Exposure Time. *Molecules*. 2021;26(24). doi:10.3390/molecules26247554
61. Atthoff B, Hilborn J. Protein adsorption onto polyester surfaces: is there a need for surface activation? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80(1):121-130. doi:10.1002/jbm.b.30576
62. Woo KM, Chen VJ, Ma PX. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(2):531-537. doi:10.1002/jbm.a.10098
63. Dhowre HS, Rajput S, Russell NA, Zelzer M. Responsive cell-material interfaces. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(5):849-871. doi:10.2217/nnm.14.222
64. Hamidouche Z, Haÿ E, Vaudin P, et al. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB J*. 2008;22(11):3813-3822. doi:10.1096/fj.08-106302
65. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*. 1992;7(2):235-246. doi:10.1002/jbmr.5650070216
66. Fatherazi S, Matsa-Dunn D, Foster BL, Rutherford RB, Somerman MJ, Presland RB. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res*. 2009;88(1):39-44. doi:10.1177/0022034508328072
67. Tada H, Nemoto E, Foster BL, Somerman MJ, Shimauchi H. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*. 2011;48(6):1409-1416. doi:10.1016/j.bone.2011.03.675
68. Sophocleous A, Idris AI. Rodent models of osteoporosis. *Bonekey Rep*. 2014;3:614. doi:10.1038/bonekey.2014.109
69. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. *EXCLI J*. 2020;19:89-107. doi:10.17179/excli2019-1990
70. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. 1995;17(4 Suppl):125S-133S. doi:10.1016/8756-3282(95)00285-I

71. Diaz Brinton R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*. 2012;153(8):3571-3578. doi:10.1210/en.2012-1340
72. Kido HW, Bossini PS, Tim CR, et al. Evaluation of the bone healing process in an experimental tibial bone defect model in ovariectomized rats. *Aging Clin Exp Res*. 2014;26(5):473-481. doi:10.1007/s40520-014-0199-x
73. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int*. 2015;2015:635023. doi:10.1155/2015/635023
74. Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2018;28(3):351-362. doi:10.1007/s00590-017-2063-0
75. Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT. Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? *J Orthop Trauma*. 2018;32 Suppl 1:S7-S11. doi:10.1097/BOT.0000000000001115
76. Kadiroğlu ET, Akbalık ME, Karaöz E, et al. Calvarial bone defects in ovariectomised rats treated with mesenchymal stem cells and demineralised freeze-dried bone allografts. *Folia Morphol (Warsz)*. 2020;79(4):720-735. doi:10.5603/FM.a2020.0001
77. Hejazi F, Ebrahimi V, Asgary M, et al. Improved healing of critical-size femoral defect in osteoporosis rat models using 3D elastin/polycaprolactone/nHA scaffold in combination with mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(3):27. doi:10.1007/s10856-021-06495-w
78. Chen CH, Wang L, Serdar Tulu U, et al. An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair. *Bone*. 2018;112:212-219. doi:10.1016/j.bone.2018.04.019
79. Liu G, Guo Y, Zhang L, et al. A standardized rat burr hole defect model to study maxillofacial bone regeneration. *Acta Biomater*. 2019;86:450-464. doi:10.1016/j.actbio.2018.12.049
80. Trejo-Iriarte CG, Serrano-Bello J, Gutiérrez-Escalona R, et al. Evaluation of bone regeneration in a critical size cortical bone defect in rat mandible using microCT and histological analysis. *Arch Oral Biol*. 2019;101:165-171. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.01.010
81. Fragogeorgi EA, Rouchota M, Georgiou M, Velez M, Bouziotis P, Loudos G. In vivo imaging techniques for bone tissue engineering. *J Tissue Eng*. 2019;10:2041731419854586. doi:10.1177/2041731419854586
82. Shim J, Iwaya C, Ambrose CG, Suzuki A, Iwata J. Micro-computed tomography assessment of bone structure in aging mice. *Sci Rep*. 2022;12(1):8117. doi:10.1038/s41598-022-11965-4
83. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010;25(7):1468-1486. doi:10.1002/jbmr.141
84. International Osteoporosis Foundation (2022) LATAM Audit 2021: Apartado México en LATAM Audit 2021: Epidemiología, costo e impacto de las fracturas por fragilidad en América Latina.

85. Peng J, Chen J, Liu Y, Lyu J, Zhang B. Association between periodontitis and osteoporosis in United States adults from the National Health and Nutrition Examination Survey: a cross-sectional analysis. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):254. doi:10.1186/s12903-023-02990-4
86. Parra M, Romero I, Olate S. Análisis Descriptivo de un Modelo de Osteoporosis Inducida en Ratas (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology*. 2021;39:282-286.
87. Trejo-Iriarte CG, Ortega MA, Asúnsolo Á, et al. Mesenchymal adipose stem cells maintain the capacity for differentiation and survival in culture beyond the long term. *J Histotechnol*. 2021;44(4):217-233. doi:10.1080/01478885.2021.1953248
88. Yudho R. *Terapia Con Células Troncales Mesenquimales Autólogas de Tejido Adiposo En Un Defecto Mandibular, En Un Modelo de Rata Wistar*. UNAM; 2017.
89. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228. doi:10.1089/107632701300062859
90. Leitner MM, Tami AE, Montavon PM, Ito K. Longitudinal as well as age-matched assessments of bone changes in the mature ovariectomized rat model. *Lab Anim*. 2009;43(3):266-271. doi:10.1258/la.2008.008045
91. Camacho-Alonso F, Tudela-Mulero MR, Buendía AJ, Navarro JA, Pérez-Sayáns M, Mercado-Díaz AM. Bone regeneration in critical-sized mandibular symphysis defects using bioceramics with or without bone marrow mesenchymal stem cells in healthy, diabetic, osteoporotic, and diabetic-osteoporotic rats. *Dent Mater*. 2022;38(8):1283-1300. doi:10.1016/j.dental.2022.06.019
92. van Houdt CIA, Ulrich DJO, Jansen JA, van den Beucken JJP. The performance of CPC/PLGA and Bio-Oss® for bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(1):131-142. doi:10.1002/jbm.b.33801
93. Debnath K, Chatterjee A. Treatment of horizontal defect with and without platelet-rich fibrin matrix: A randomized comparative clinical study. *J Indian Soc Periodontol*. 2018;22(5):406-413. doi:10.4103/jisp.jisp_129_18
94. Munhoz L, Takahashi DY, Nishimura DA, Ramos EADA, Tenorio J da R, Arita ES. Do Patients with Osteoporosis Have Higher Risk to Present Reduced Alveolar Ridge Height? An Imaging Analysis. *Indian J Dent Res*. 2019;30(5):747-750. doi:10.4103/ijdr.IJDR_497_18
95. Amin LE, Salama N. Osteoprotective Effect of Enamel Matrix Derivatives on the Regeneration of Mandibular Defects in Experimentally Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. *Int J Dent*. 2021;2021:8659010. doi:10.1155/2021/8659010
96. Ahmed RY, Elsherbini AM, Elkhier MTA, Soussa EF. A comparison of the early therapeutic effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells and calcitonin on the healing of surgically induced mandibular bone defects in osteoporotic rats. *Arch Oral Biol*. 2020;120:104934. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104934
97. Awadeen MA, Al-Belasy FA, Ameen LE, Helal ME, Grawish ME. Early therapeutic effect of platelet-rich fibrin combined with allogeneic bone marrow-derived stem cells on rats' critical-sized mandibular defects. *World J Stem Cells*. 2020;12(1):55-69. doi:10.4252/wjsc.v12.i1.55

98. Ramanauskaite A, Sader R. Esthetic complications in implant dentistry. *Periodontol 2000*. 2022;88(1):73-85. doi:10.1111/prd.12412
99. Hsu PY, Tsai MT, Wang SP, Chen YJ, Wu J, Hsu JT. Cortical Bone Morphological and Trabecular Bone Microarchitectural Changes in the Mandible and Femoral Neck of Ovariectomized Rats. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154367. doi:10.1371/journal.pone.0154367
100. Lee C, Lee JH, Han SS, et al. Site-specific and time-course changes of postmenopausal osteoporosis in rat mandible: comparative study with femur. *Sci Rep*. 2019;9(1):14155. doi:10.1038/s41598-019-50554-w
101. Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, André M, Pénicaud L, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*. 2006;312(6):727-736. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.021
102. Chen YQ, Liu YS, Liu YA, et al. Bio- chemical and physical characterizations of mesenchymal stromal cells along the time course of directed differentiation. *Sci Rep*. 2016;6:31547. doi:10.1038/srep31547
103. Jin Q, Yuan K, Lin W, Niu C, Ma R, Huang Z. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):1577-1584. doi:10.1080/21691401.2019.1594861
104. Yoshida Y, Matsubara H, Fang X, et al. Adipose-derived stem cell sheets accelerate bone healing in rat femoral defects. *PLoS One*. 2019;14(3):e0214488. doi:10.1371/journal.pone.0214488
105. Yoon Y, Khan IU, Choi KU, et al. Different Bone Healing Effects of Undifferentiated and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stromal Cell Sheets in Canine Radial Fracture Model. *Tissue Eng Regen Med*. 2018;15(1):115-124. doi:10.1007/s13770-017-0092-8
106. Park JS, Park G, Hong HS. Age affects the paracrine activity and differentiation potential of human adipose-derived stem cells. *Mol Med Rep*. 2021;23(2):160. doi:10.3892/mmr.2020.11799
107. Kornicka K, Marycz K, Tomaszewski KA, Marędzia M, Śmieszek A. The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:309169. doi:10.1155/2015/309169
108. Zhu M, Kohan E, Bradley J, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3(4):290-301. doi:10.1002/term.165
109. Wang B, Cai Q, Zhang S, Yang X, Deng X. The effect of poly (L-lactic acid) nanofiber orientation on osteogenic responses of human osteoblast-like MG63 cells. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(4):600-609. doi:10.1016/j.jmbbm.2011.01.008
110. Olivares-Navarrete R, Lee EM, Smith K, et al. Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170312. doi:10.1371/journal.pone.0170312

111. Probst FA, Fliefel R, Burian E, et al. Bone regeneration of minipig mandibular defect by adipose derived mesenchymal stem cells seeded tri-calcium phosphate- poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds. *Sci Rep.* 2020;10(1):2062. doi:10.1038/s41598-020-59038-8
112. Gutiérrez-Escalona R. *Evaluación de Dos Modelos de Defectos En La Cortical Mandibular de Rata Wistar Por Medio de Micro-CT.* UNAM.

Sham-ovx

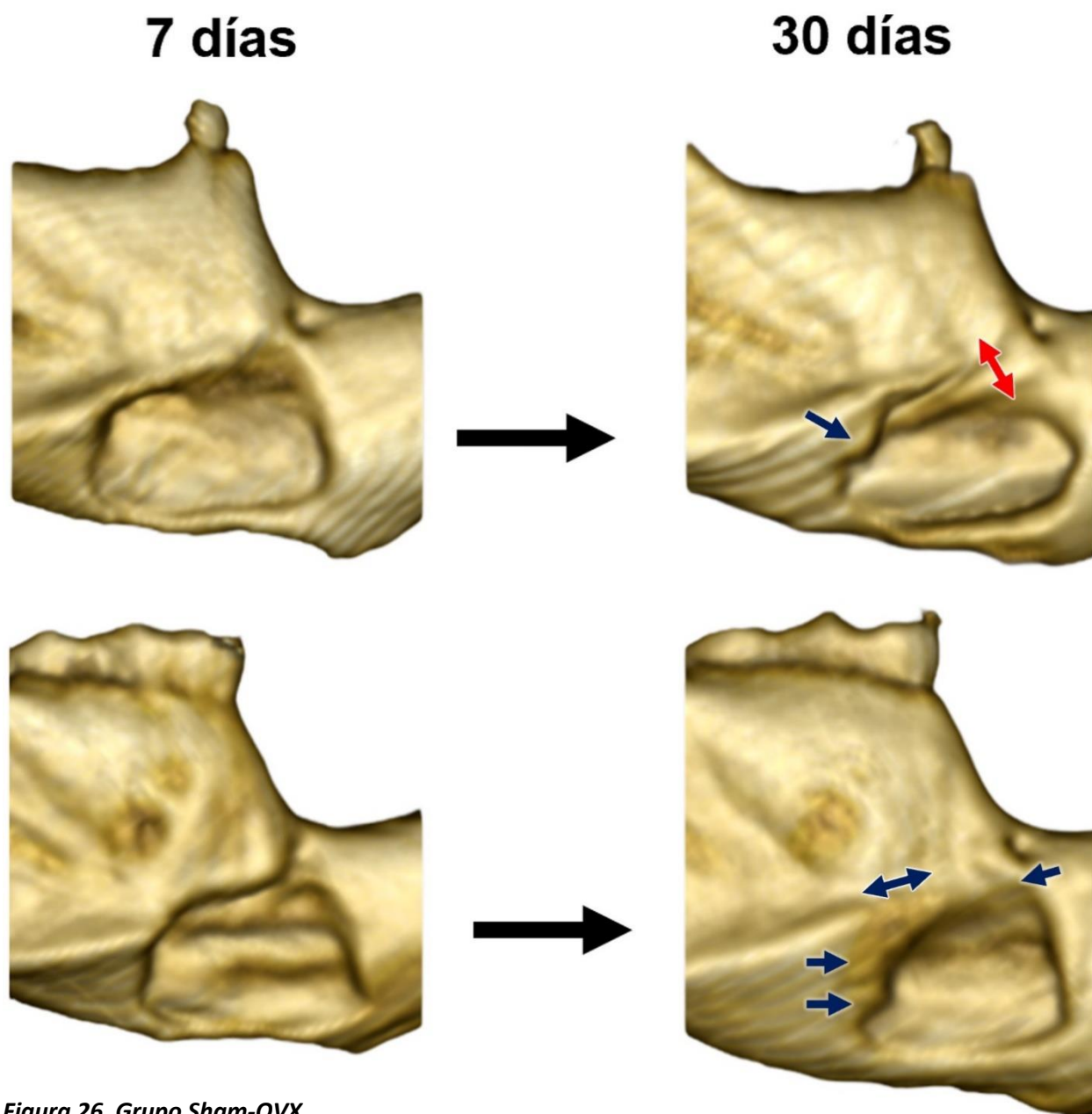


Figura 26. Grupo Sham-OVX

ADSC-ovx

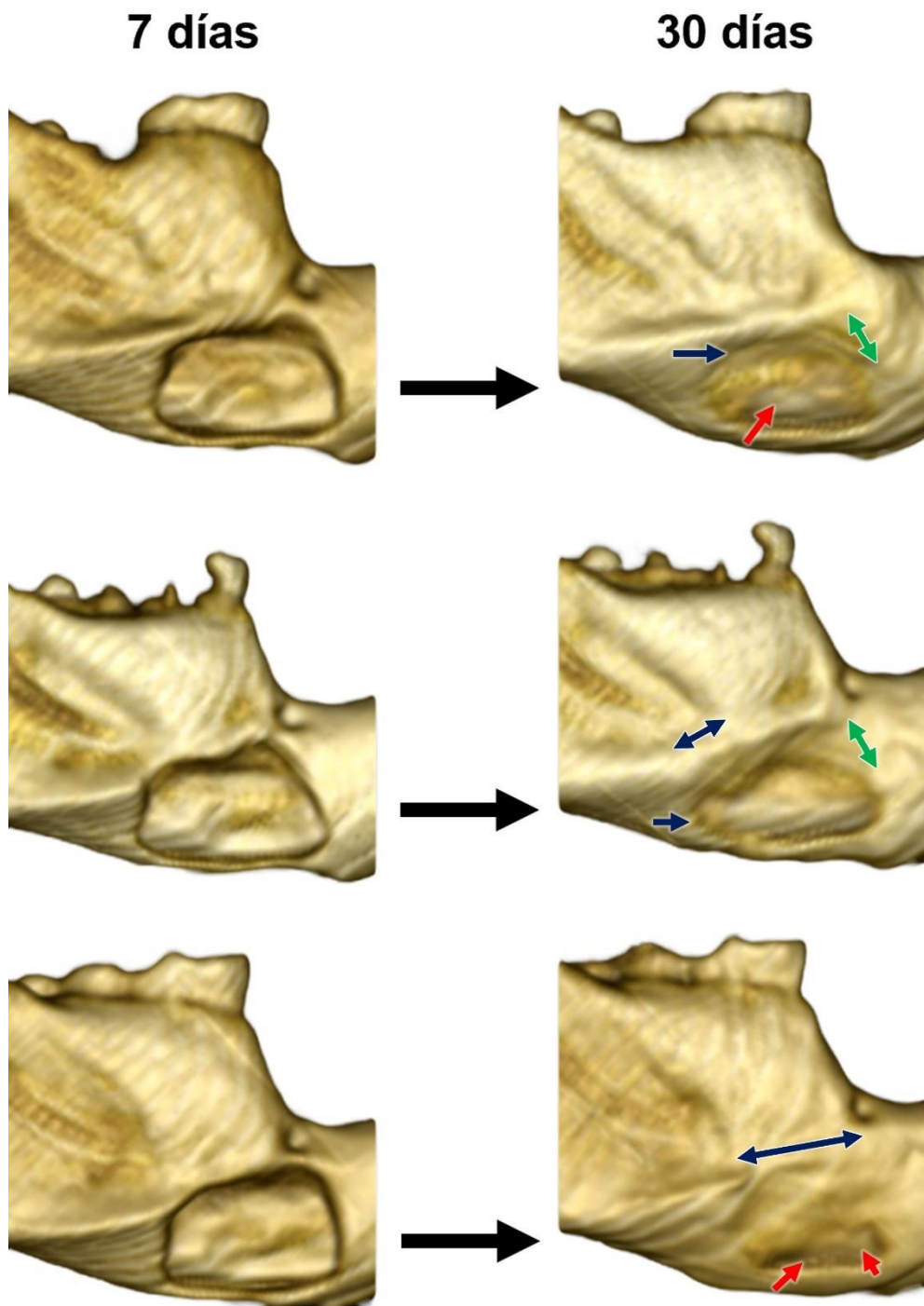


Figura 27. Grupo ADSC-OVX. Las flechas azules de doble cabeza muestran zonas de la línea oblicua externa que se vieron afectadas por el defecto quirúrgico

OST-ovx

7 días

30 días

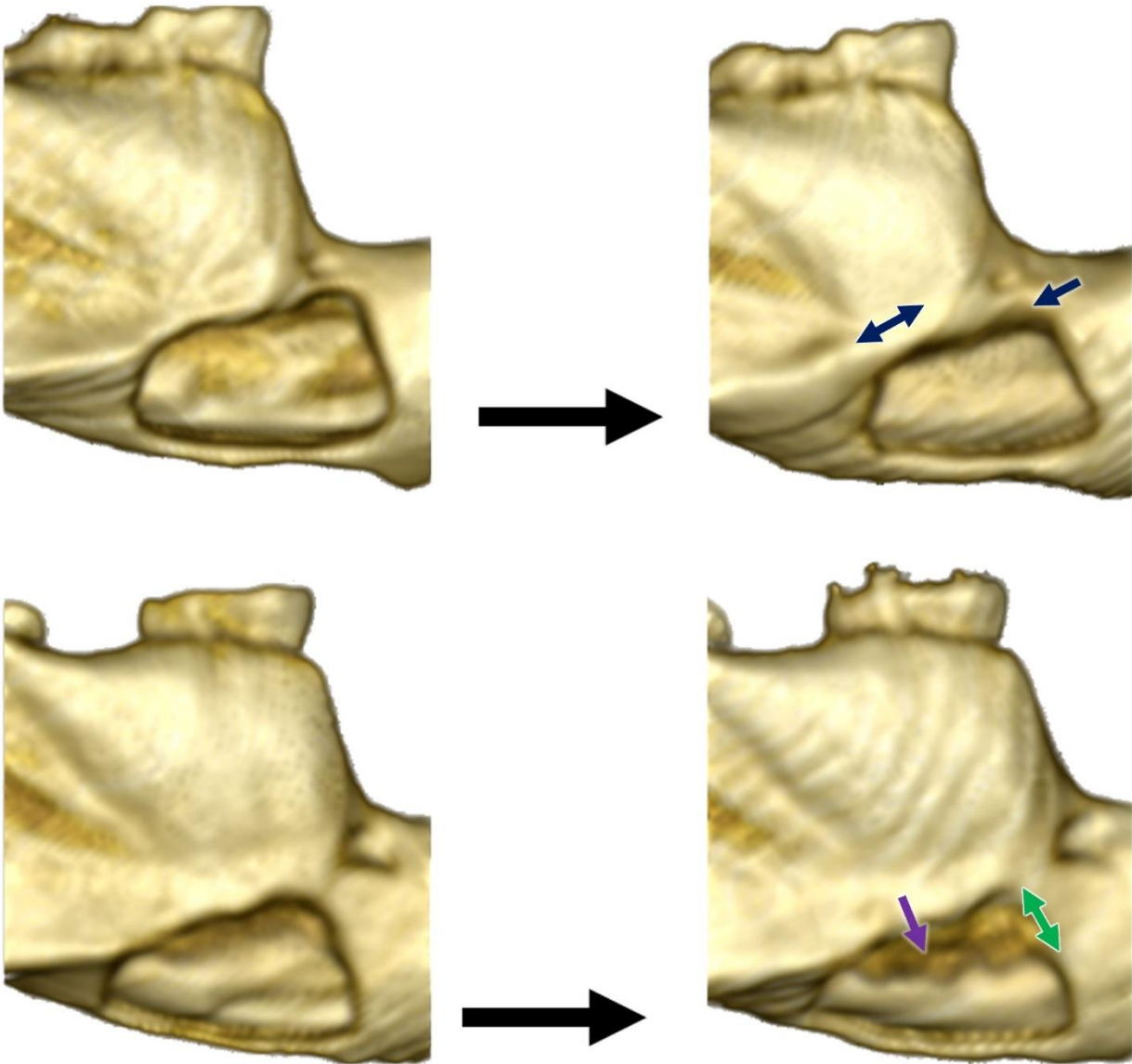


Figura 28. Grupo OST-OVX.

PLA-OVX

7 días

30 días

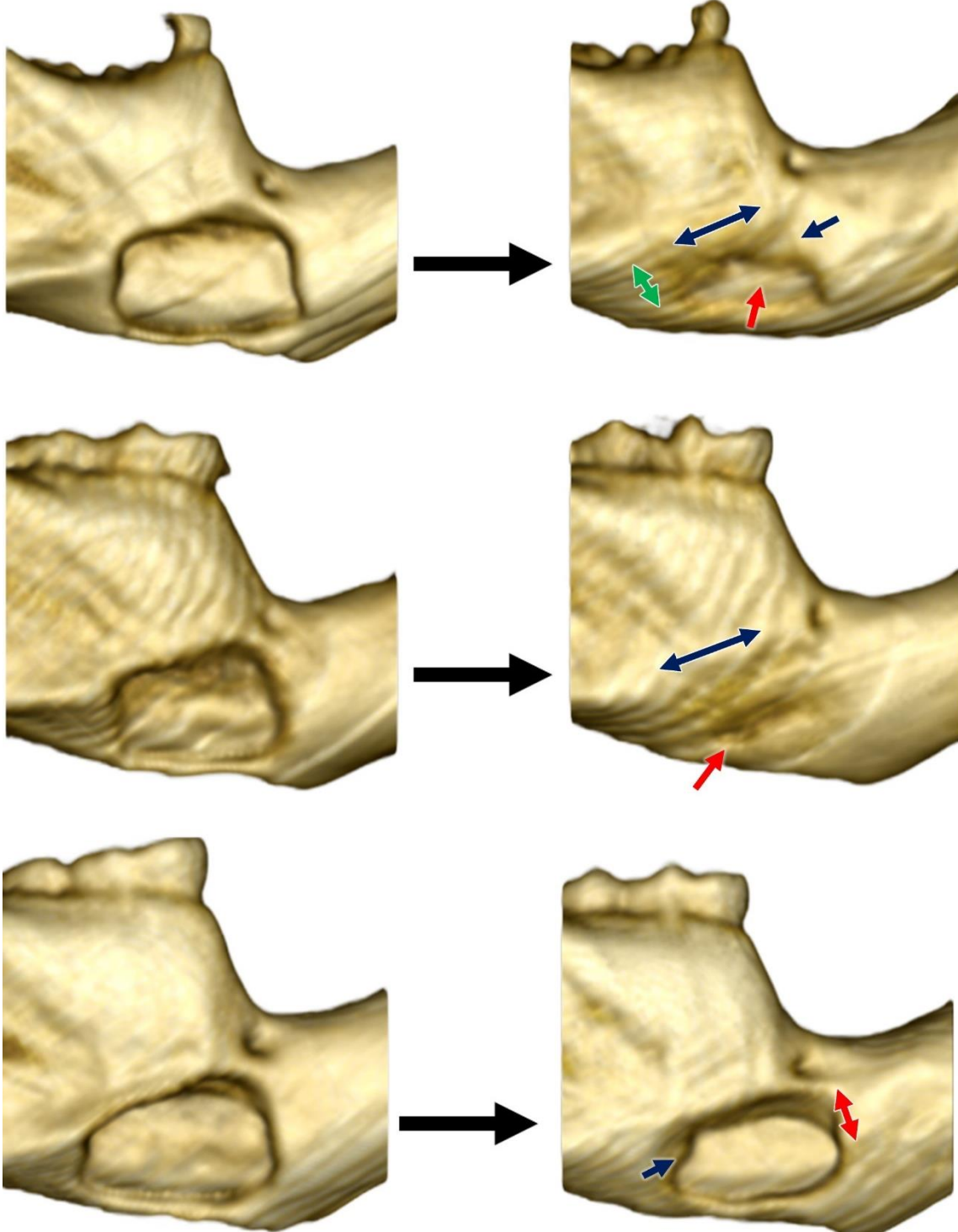


Figura 29. Grupo PLA-OVX. Las flechas azules de doble cabeza muestran zonas de la línea oblicua externa que se vieron afectadas por el defecto quirúrgico. La línea verde de doble cabeza muestra una zona con crecimiento diagonal

COST-OVX

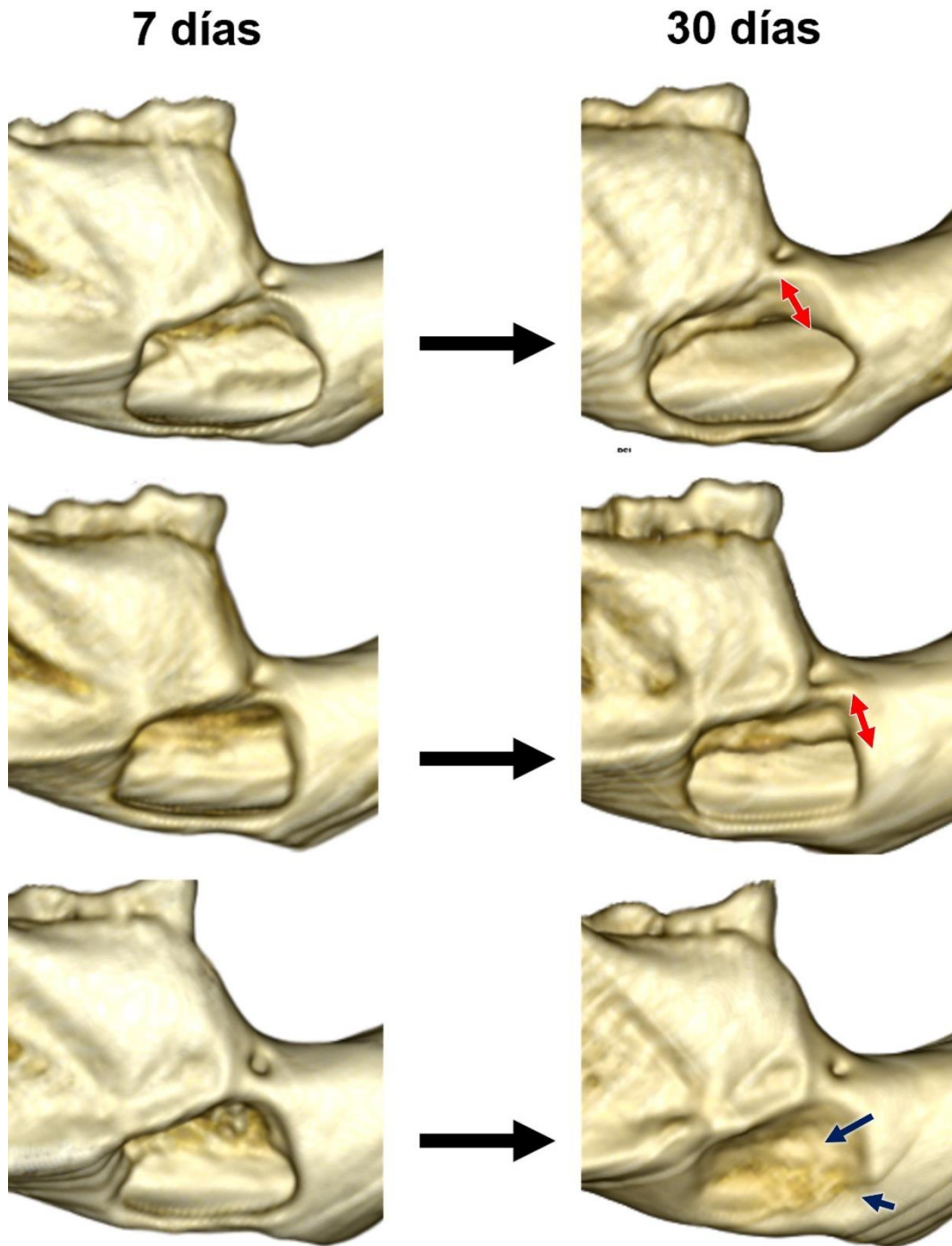


Figura 30. Grupo COST-OVX. Las flechas azules indican zonas de regeneración.

CADSC-OVX

7 días

30 días

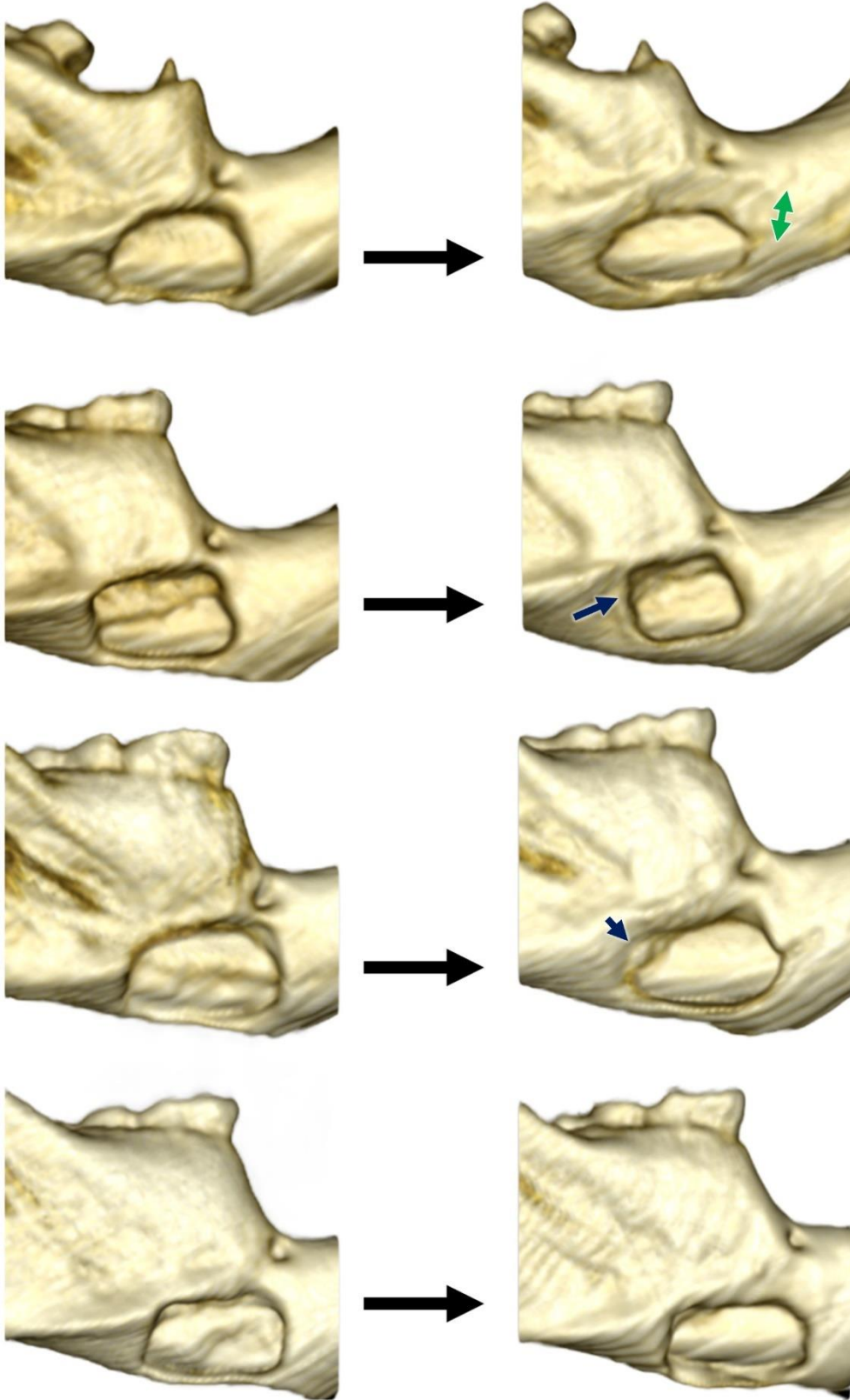
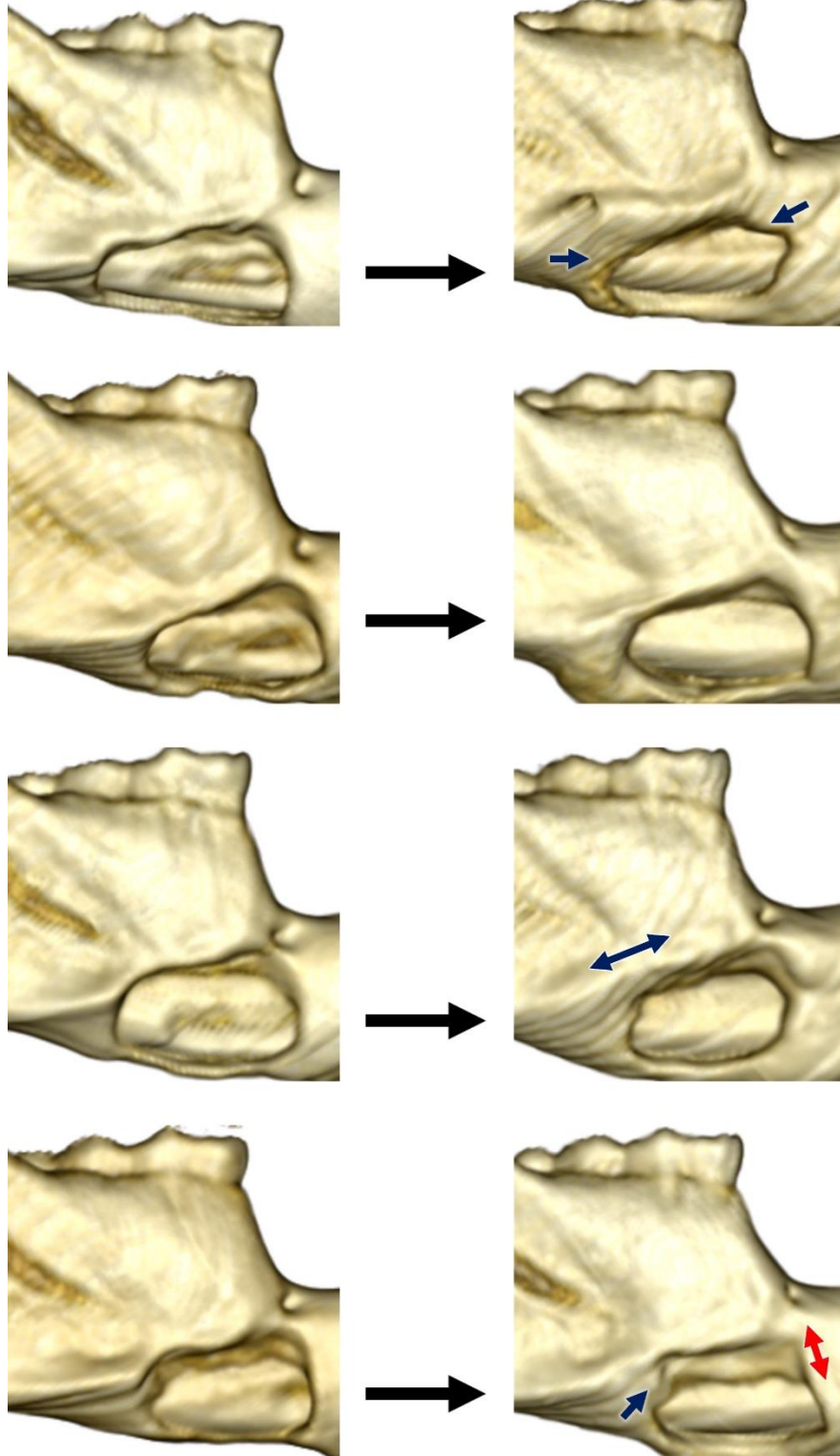


Figura 31. Grupo CADSC-OVX.

Sham-OLD

7 días

30 días



E

Figura 32. Grupo Sham-OLD. Las flechas azules indican zonas de regeneración.

ADSC-OLD

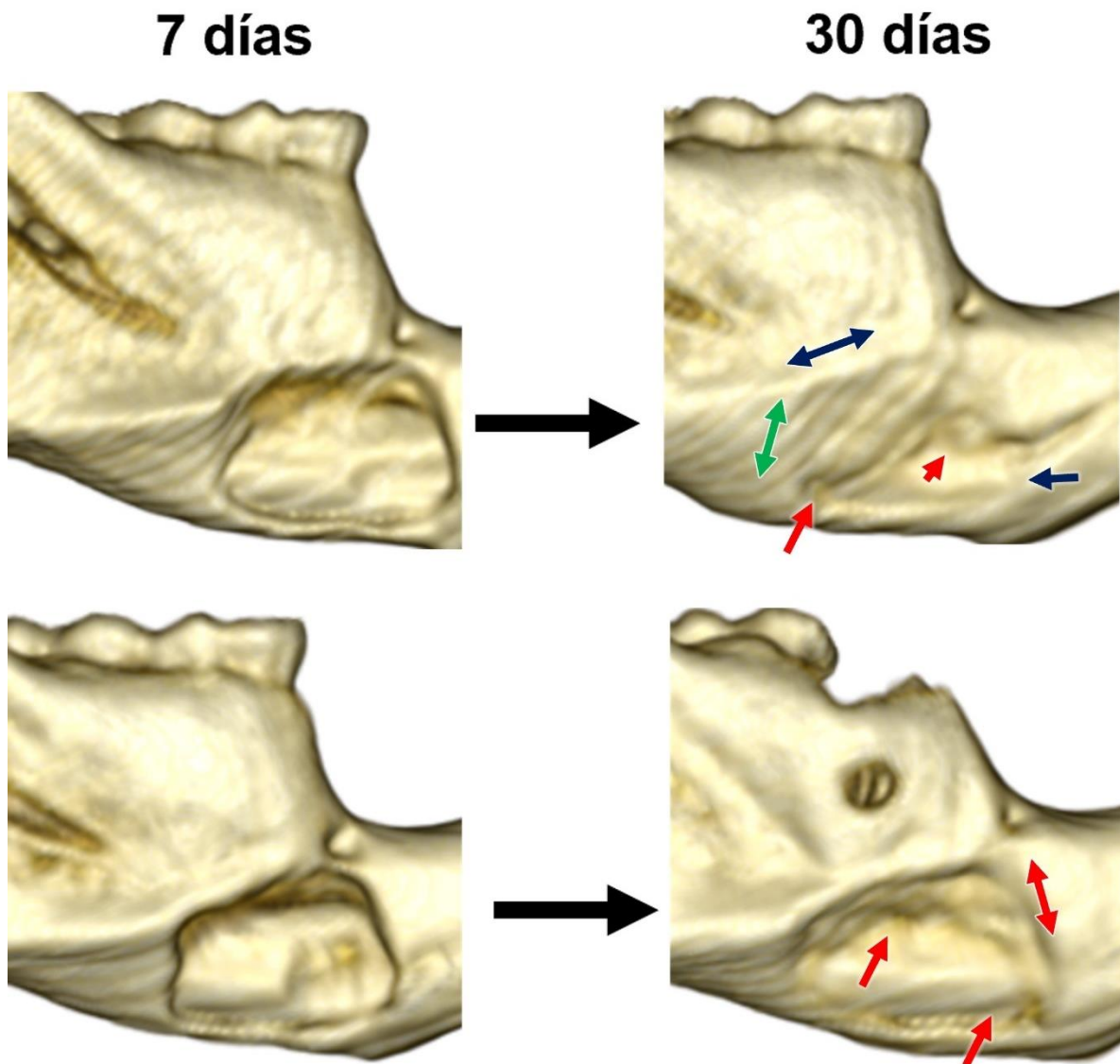


Figura 33. Grupo ADSC-OLD. Las flechas azules de una cabeza indican zonas de regeneración, la flecha azul de doble cabeza indica regeneración de una zona de la línea oblicua que se vio afectada por el defecto, la flecha verde indica patrón diagonal. La flecha roja de dos cabezas indica escalón de regeneración. Las flechas rojas de una cabeza muestran zonas de regeneración deficientes

PLA-OLD

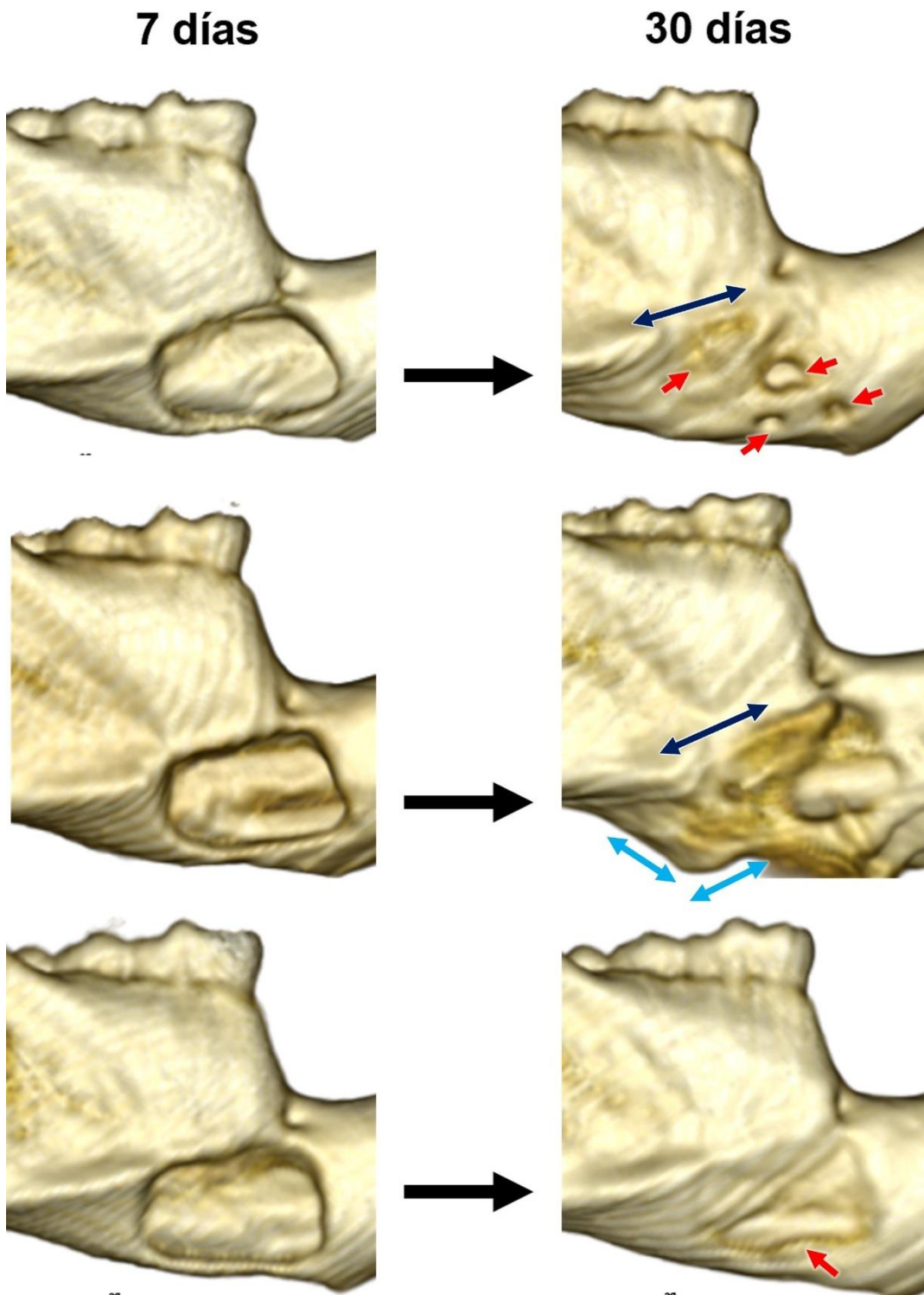


Figura 35. Grupo PLA-ADSC. Las flechas azul celeste de doble cabeza indican zonas de regeneración tipo excrescencia ósea

CADSC-OLD

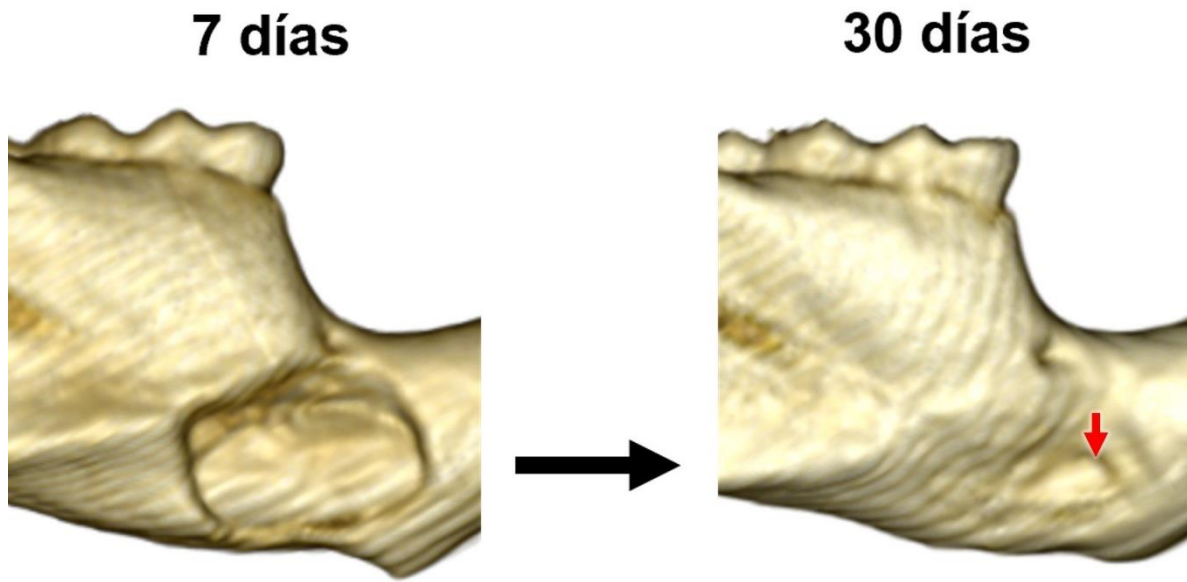


Figura 36. Grupo CADSC-OLD

COST-OLD

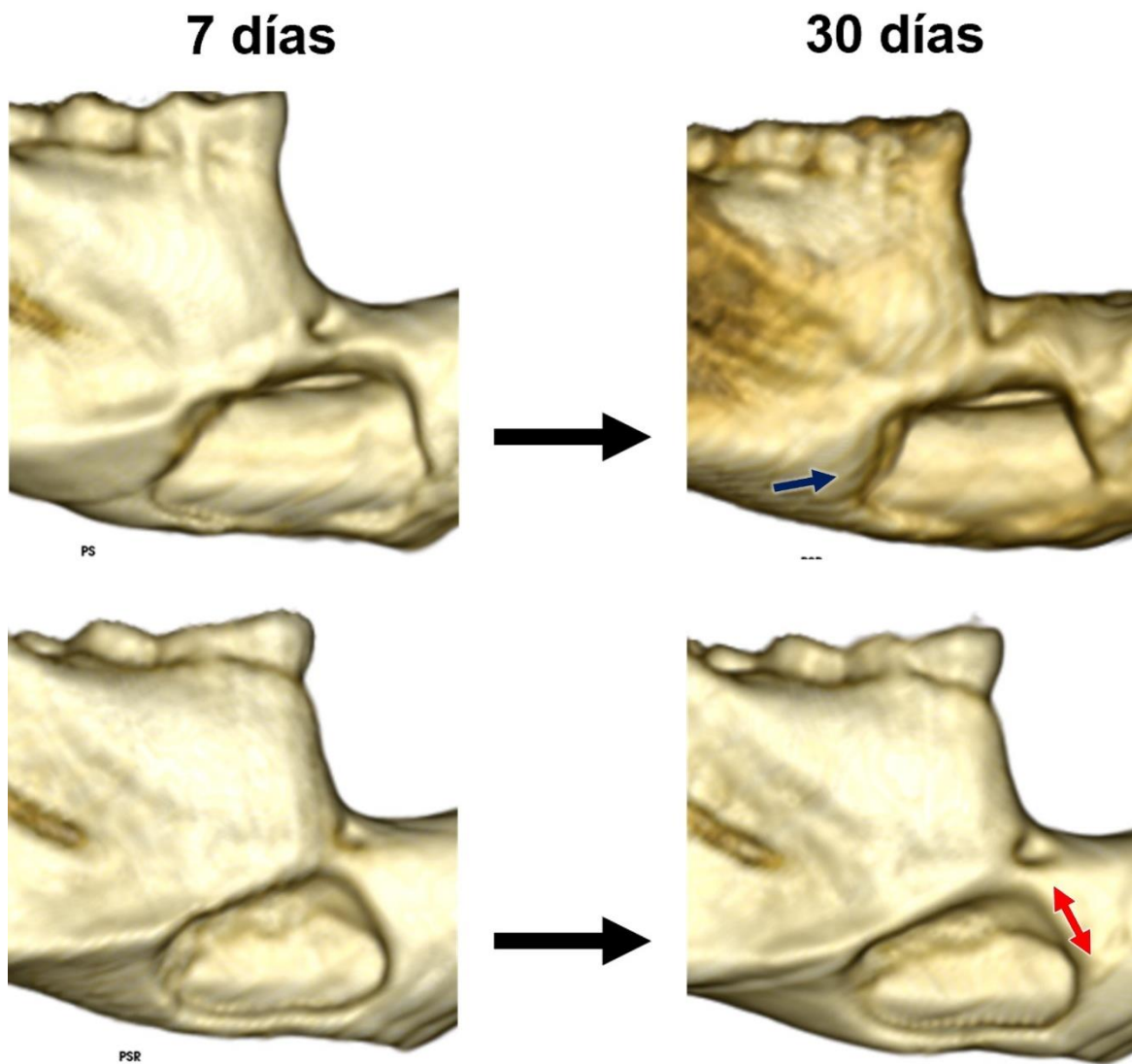


Figura 37. Grupo COST-OLD

Avala Comité de ética FES Iztacala.



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



Los Reyes Iztacala a 10/01/2023

Oficio: CE/FESI/012023/1569

DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **Regeneración ósea mandibular en un modelo de osteoporosis en ratas (Recomendaciones folio 1492)**, que va a someter a **PARA TESIS DE MAESTRÍA DE LUIS FERNANDO TOBIAS LÓPEZ**.

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

Avalado sin recomendaciones

Con vigencia del **1 de agosto del 2021** al **31 de julio del 2023**.

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.C. Federico Sandoval Olvera
Presidente





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



DRA. TREJO IRIARTE CYNTHIA GEORGINA
PRESENTE

Por este medio informo a Usted que su proyecto:

Regeneración ósea mandibular en un modelo de osteoporosis en ratas

que será sometido a la convocatoria: Tesis de maestría.

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 20 días del mes de enero del 2023

Atentamente

M.C. Federico Sandoval Olvera
Presidente