



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGÍA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**EFFECTO TEMPRANO DE LA PARÁLISIS DEL MÚSCULO MASETERO DE  
RATÓN POR TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EN LA CALIDAD ÓSEA DE LA  
CABEZA MANDIBULAR: ANÁLISIS TRIDIMENSIONAL CON  
MICROTOMOGRFÍA COMPUTARIZADA**

**Francisco Cid Trejo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD.**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Julián Balanta Melo, DDS, PhD.**

**Prof. Viviana Toro Ibacache, DDS, PhD.**

**Adscrito a Proyectos Fondecyt 1151353-1201385 y Enlace VID ENL29/19**

**Santiago - Chile**

**2021**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS  
ÁREA DE BIOLOGÍA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**EFFECTO TEMPRANO DE LA PARÁLISIS DEL MÚSCULO MASETERO DE  
RATÓN POR TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EN LA CALIDAD ÓSEA DE LA  
CABEZA MANDIBULAR: ANÁLISIS TRIDIMENSIONAL CON  
MICROTOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA**

**Francisco Cid Trejo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD.**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Julián Balanta Melo, DDS, PhD.**

**Prof. Viviana Toro Ibacache, DDS, PhD.**

**Adscrito a Proyectos Fondecyt 1151353-1201385 y Enlace VID ENL29/19**

**Santiago - Chile**

**2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

Ante todo, agradecer a la Dra. Sonja quién me abrió las puertas de su laboratorio desde que despertó en mi el interés por la ciencia, brindandome su apoyo, tutoría y la posibilidad de hacer inmersión en la ciencia básica. Pudiendo aprender técnica y teoría. Así como también a todo el equipo del Laboratorio de Biología Celular y Molecular, sobretodo al grupo de comunicación cruzada músculo-hueso y en especial al Dr. Julián quién me guió activamente en el aprendizaje en profundidad del método científico, me brindó su conocimiento en biología ósea y facilitó el aprendizaje de análisis de la presente tesis.

A mi familia agradezco haberme brindado su apoyo incondicional durante este proceso académico, tanto material como emocional, por darme ánimo y alegría día a día. Y por haberme educado en la vida.

Por último, agradezco al destino por habernos hecho coincidir y perdurar los lazos fraternos que hemos cultivado con mis amigos, quienes han sido parte de este camino, donde hemos crecido juntos.

# ÍNDICE

1. Resumen.....	11
2. Marco Teórico.....	13
2.1. Generalidades del sistema musculoesquelético .....	13
2.1.1 Tejido muscular .....	13
2.1.2. Tejido óseo .....	14
2.1.3 Remodelación ósea .....	15
2.1.4 Calidad ósea: Relación con micro y macroestructura del hueso.....	18
2.2. Comunicación cruzada musculo-hueso .....	21
2.3. Cambios óseos producidos por atrofia y desuso muscular.....	22
2.4. Toxina Botulinica tipo A y parálisis muscular: Disminución del tejido óseo.	23
2.5. Sistema masticatorio y desórdenes temporomandibulares .....	25
2.6. Toxina botulínica tipo A: Uso en odontología y antecedentes de efectos secundarios óseos. ....	28
3. Hipótesis .....	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. Materiales y métodos.....	32
4.1 Estrategia Experimental .....	32
4.1.1 Determinar y comparar los parámetros de microestructura ósea de la cabeza mandibular de ratón luego de 2 y 7 días de inyección de BoNTA en músculo masetero. ....	32
4.2 Métodos.....	33
4.2.1 Muestras.....	33
4.2.2 Diseño experimental de inyección unilateral con BoNTA en músculo masetero.....	33

4.2.3 Captura de imágenes por MicroTC.....	35
4.2.4 Análisis de microestructura.....	35
4.3 Análisis estadístico.....	42
5. Resultados.....	43
5.1 Establecimiento de los controles negativos y positivos del protocolo.....	43
5.2 La parálisis de músculo masetero inducida por BoNTA promueve pérdida ósea temprana en la cabeza mandibular, desde los 7 días post intervención. ....	46
6. Discusión. ....	51
6.1 Validación del modelo y calibración del método de análisis .....	51
6.2 Efectos óseos de BoNTA en musculos de extremidades .....	52
6.3 Comparación del efecto de BoNTA con otros modelos de desuso muscular en extremidades.....	53
6.4 Antecedentes de efectos óseos posterior a la parálisis de músculos masticatorios inducida por BoNTA en modelo animal. ....	54
6.5 Dosis de BoNTA y su equivalencia en diferentes estudios.....	58
6.6 Antecedentes de efectos óseos posterior a la parálisis de músculos masticatorios inducida por BoNTA en humanos. ....	59
7. Conclusiones y Proyecciones .....	62
7.1 Conclusiones .....	62
7.2 Proyecciones.....	62
8. Referencias bibliográficas.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Proceso de remodelación ósea.....	14
Figura 2 Esquema de los niveles de organización de la estructura ósea de un hueso largo de humano.....	17
Figura 3 Esquema de la disposición del tejido óseo en un hueso largo.....	18
Figura 4 Factores determinantes de la resistencia y fragilidad ósea.....	19
Figura 5 Mecanismo de acción de BoNTA.....	22
Figura 6 Representación del modelo de estudio y grupos experimentales.....	32
Figura 7 Imagen de referencia que muestra la zona de segmentación de la cabeza mandibular en el programa DragonFly 2021.1.0.977.....	35
Figura 8 Imágenes representativas de una cabeza mandibular en cada uno de los pasos para el análisis de microestructura ósea en ImageJ 1.53n con BoneJ1.4.3.....	39
Figura 9 La microestructura de la cabeza mandibular adyacente al músculo masetero inyectado con solución salina (2-7-14d, control intra-individuo) es equivalente a la de animales no intervenidos.....	43
Figura 10 La inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero reduce el Tb.Th y BV/TV de la cabeza mandibular ipsilateral a los 14 días post intervención.....	44
Figura 11 La microestructura ósea de la cabeza mandibular no está alterada a los 2 días post inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero.....	46
Figura 12 La microestructura ósea de la cabeza mandibular disminuye a los 7 días post inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero.....	47

Figura 13 La inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero reduce la microestructura ósea de la cabeza mandibular ipsilateral de forma progresiva desde los 7 días.....48



## ABREVIATURAS

BoNTA: Toxina Botulínica tipo A.

Tb.Th: Grosor Trabecular.

BV/TV: Fracción de Volumen Óseo.

MicroTC: Microtomografía computarizada.

DTMs: Desórdenes temporomandibulares.

ATM: articulación temporomandibular.

RANKL: Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B.

BoNTA 14d: Grupo de Individuos 14 días post intervención.

BoNTA 7d: Grupo de Individuos 7 días post intervención.

BoNTA 2d: Grupo de Individuos 2 días post intervención.

NI: Grupo de Individuos 14 días no intervenidos.

ROI: Región de Interés.

MyHC: Cadena pesada de la miosina.

MEC: matriz extracelular.

TRAP: fosfatasa ácida tartrato-resistente.

CTSK: Catepsina K.

OPG: Osteoprotegerina.

BMD: Densidad mineral ósea.

SNAP-5: Sinaptosoma de 25 kDa.

+/- SEM: error estándar del promedio.

CBTC:Tomografía Computarizada ConeBeam.

## 1. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El sistema musculoesquelético posee una fisiología coordinada entre los tejidos que lo conforman. Así, alteraciones en un tejido impactan a todo el sistema. Por ejemplo, la parálisis muscular inducida por Toxina Botulínica tipo A (BoNTA) en extremidades, produce atrofia del músculo y posterior deterioro del tejido óseo subyacente. La inyección de BoNTA en músculo masetero es una práctica creciente en odontología clínica, con el fin de manejar alteraciones miofuncionales, como el bruxismo del sueño, y estéticas, como la hipertrofia maseterina. En ensayos preclínicos en ratones adultos, esta intervención induce parálisis del músculo masetero a las 24h. Paralelamente, en la cabeza mandibular del lado paralizado aumenta la expresión de marcadores de resorción ósea a los 2d y hay deterioro de su microestructura ósea los 14d post-intervención. El objetivo de este estudio fue determinar si a tiempos tempranos post inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero (2-7d) hay alteraciones en la microestructura de la cabeza mandibular ipsilateral, en ratones macho adultos.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** En imágenes de microtomografía computarizada de mandíbulas de ratón, se aisló computacionalmente la cabeza mandibular y se cuantificaron los parámetros microestructurales de Grosor Trabecular (Tb.Th) y Fracción de Volumen Óseo (BV/TV) (BoneJ, ImageJ). Las mandíbulas correspondían a los siguientes grupos de animales: "No Intervenido" (n=3); o "BoNTA", inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero derecho y solución salina en masetero izquierdo, analizados a los 2d (n=9), 7d (n=9) o 14d (n=3) post intervención.

**RESULTADOS:** Se observó una disminución significativa de Tb.Th (19 +/- 1,72%) y BV/TV (3,71 +/- 0,49%) ( $p < 0.05$ ) entre el lado BoNTA y el lado salino de ratones a los 7d post inyección. A los 14d se evidenció una profundización en la disminución de Tb.Th en el lado inyectado con BoNTA respecto a su homólogo a los 7d. El BV/TV no registró cambios significativos entre 7d y 14d.

**CONCLUSIONES:** La inyección de BoNTA en el músculo masetero conduce a un deterioro progresivo de la calidad ósea de la cabeza mandibular ipsilateral desde el

día 7 post intervención, caracterizada por una disminución de parámetros microestructurales óseos.

## **2. MARCO TEÓRICO.**

### **2.1. Generalidades del sistema musculoesquelético**

El sistema musculoesquelético es una estructura finamente coordinada, integrada por articulaciones, cartílago, ligamentos, músculos y huesos (Felsenthal y Zelzer, 2017).

#### **2.1.1 Tejido muscular**

El músculo esquelético representa alrededor del 40% del peso corporal en humanos, y contiene entre el 50 al 75% del total de proteínas del cuerpo (Frontera y Ochala, 2015). Es un tejido altamente dinámico, capaz de remodelarse en respuesta a estímulos metabólicos, condiciones fisiológicas como el ejercicio o patológicas como una injuria local o enfermedad sistémica. Su unidad celular es la fibra muscular, que se puede clasificar en diferentes tipos según la expresión de diferentes isoformas de la cadena pesada de la miosina (MyHC) (S. Schiaffino y Reggiani, 1994; Picard y cols., 2020). Existe una gran variedad de MyHCs (Sciote & Kentish, 1996; Korfage y cols., 2005), que determinan la velocidad de acortamiento de las fibras musculares (Larsson y Moss, 1993). Se distinguen dos grandes grupos de fibras musculares: tipo I y tipo II. Éstas tienen características diferentes en cuanto a velocidad de contracción, resistencia a la fatiga, tipo de metabolismo (oxidativo/glucolítico), calibre de la fibra y cantidad de mitocondrias (Pette y Staron, 2000; Cobos y Segade, 2001; Picard y cols., 2020). El tipo de fibra que se establece está determinado principalmente por el patrón de descarga de la neurona motora que la inerva (Korfage y cols., 2005; Blaauw y cols., 2013). Dentro de un mismo músculo la composición de fibras es heterogénea, con diferentes propiedades de velocidad (tiempo de contracción inducido por un estímulo/potencial de acción) y fatigabilidad (disminución de la fuerza de contracción durante una contracción tetánica)(Schiaffino y Reggiani, 1994). Esta heterogeneidad es lo que le permite utilizar el mismo músculo para diversas tareas (Casas y cols., 2014) y es la base de la plasticidad muscular que permite la adaptación frente a una determinada demanda funcional o estado metabólico (Qaisar y cols., 2016).

### 2.1.2. Tejido óseo

El tejido óseo es una especialización del tejido conectivo, cuya característica principal es presentar una elevada mineralización de su matriz extracelular (MEC), confiriéndole gran rigidez y dureza para proteger los órganos vitales y estabilizar el sistema musculoesquelético (Morgan y Gerstenfeld, 2021).

A nivel histológico, la MEC se compone en un 70% de materia inorgánica (99% de sales fosfatos de calcio), 25% de materia orgánica (donde 90% es colágeno y el 10% restante son distintas proteínas estructurales no-colágenas como proteoglicanos, sialoproteínas y glicoproteínas) y 5% de agua. La MEC rodea distintos tipos de células especializadas y presenta un gran número de factores de crecimiento y citoquinas (Kini y Nandeesh, 2012).

Las células óseas juegan un rol determinante en la mantención de la funcionalidad de la MEC en hueso:

- **Células osteoprogenitoras** (“bone lining cells”): Son células alargadas derivadas de pre-osteoblastos latentes. Su diferenciación permite la generación de osteoblastos en hueso medular. Están ubicadas en la superficie del tejido óseo, en endostio y periostio (Everts y cols., 2002; Voegeli, 2004; Andersen y cols., 2009; Cediél y cols., 2009; Ibrahim et al., 2017).
- **Osteoblastos**: Corresponden a células mononucleadas diferenciadas derivadas de células osteoprogenitoras, cuya función principal es la síntesis y organización de los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz ósea. Están ubicados en el periostio y endostio. Algunos quedan inmersos dentro de una “laguna” de calcificación de matriz para diferenciarse a osteocitos (Voegeli, 2004; Fitzgerald RH, 2004; Cediél y cols., 2009; Kini y Nandeesh, 2012; Blair y cols., 2017).
- **Osteocitos**: Corresponden alrededor de 90-95% del total celular óseo. Son células maduras propias del tejido óseo, que sintetizan y resorben limitadamente componentes de la matriz ósea. Presentan largas prolongaciones comunicadas entre sí o en contacto con la periferia del tejido

óseo, formando una red de canalículos. Sus principales funciones son la transducción de estímulos mecánicos para generar diversos flujos de calcio y la modulación de la calcemia.

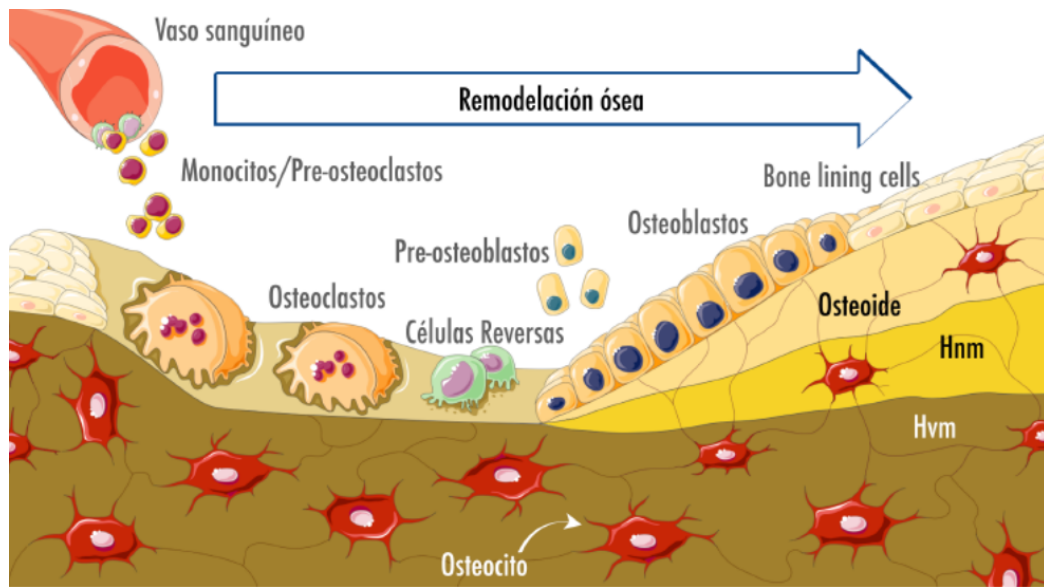
(Fitzgerald y cols., 2004; Clarke, 2008; Cediel y cols., 2009; Florencio-Silva y cols., 2015; Plotkin y Bellido, 2016; Robling y Bonewald, 2020)

- **Osteoclastos:** Células gigantes multinucleadas cuya función principal es la resorción ósea.(Boyle y cols., 2003; Charles y Aliprantis, 2014)

La actividad de las células óseas y de factores extrínsecos permiten generar cambios macroscópicos como microscópicos en las características del hueso; por ello se le considera un tejido dinámico y metabólicamente activo (Cediel y cols., 2009), siendo capaz de adaptar su estructura frente a estímulos y reparar daños estructurales a través del proceso de remodelación (Robling y cols., 2006). También posee un rol importante en el metabolismo y homeostasis sérica pues contiene elevadas reservas de iones fosfato y calcio (Fitzgerald, 2004).

### **2.1.3 Remodelación ósea**

La naturaleza dinámica del hueso se observa en su constante capacidad para modelar (evento superficial donde no existe coordinación entre células óseas) y remodelar (sincronismo entre los cuatro tipos celulares) su estructura de manera fisiológica a medida que se presenta requerimientos físicos y biológicos. (Cediel et al., 2009; Huo y cols., 2021) Esta remodelación permite la mantención de las dimensiones de los huesos y la homeostasis de minerales propios de la matriz ósea(Voegeli, 2004;Morgan y Gerstenfeld, 2021). (**Figura 1**)



**Figura 1 Proceso de remodelación ósea.** Los osteoclastos derivados de monocitos eliminan hueso dañado y los osteoblastos lo reemplazan por osteoide inmaduro, que se convierte después en hueso. Los osteoblastos embebidos en el nuevo tejido se diferencian en osteocitos. Abreviaturas: *Hvm*, hueso antiguo maduro; *Hnm*, hueso nuevo maduro. *Imagen tomada de Balanta-Melo (Tesis de Doctorado en Ciencias Odontológicas, Universidad de Chile, 2019).*

Los principales eventos desencadenados por células óseas para la remodelación ósea son:

- *Diferenciación osteoclástica*

Los osteoblastos funcionales al igual que los osteocitos dañados por cargas mecánicas excesivas, secretan factores quimioattractantes que reclutan monocitos en la superficie ósea a remodelar. La diferenciación de los osteoclastos involucra la proliferación de las células troncales hematopoyéticas, su conversión a macrófagos, el progreso a un estado de progenitor de osteoclasto temprano con expresión de receptor de calcitonina y fosfatasa ácida tartrato-resistente, (TRAP) y la fusión celular (Soysa y cols., 2012). Tanto del estroma de la médula ósea, de los osteoblastos y osteocitos, derivan dos factores esenciales en la diferenciación de



los osteoclastos: el *ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B* (RANKL) y el *factor estimulante de colonias de macrófagos*. Éstos promueven la expresión de genes característicos en la tipificación de linaje osteoclástico, como TRAP, catepsina K (CTSK), metaloproteinasa 9, receptor de calcitonina e integrina- $\beta$ 3. (Soysa y cols., 2012)

- *Activación osteoclástica*

Este proceso involucra la polarización del osteoclasto diferenciado y la síntesis de proteínas que participarán en el proceso de resorción ósea, tales como anhidrasa carbónica, CTSK y ATPasa lisosomal. (Soysa y cols., 2012) Es comandado principalmente por RANKL.

La interacción de RANKL con la molécula RANK presente en la membrana de los osteoclastos diferenciados permite su activación. Esta vía de activación osteoclástica es controlada negativamente por osteoprotegerina (OPG), secretada por los osteoblastos, osteocitos o por células osteogénicas del estroma (Sims y Gooi, 2008; Udagawa y cols., 2021).

Se ha descrito que la presencia de “cracks” en el tejido óseo y/o cargas mecánicas de elevado impacto sobre el hueso son reconocidos por los osteocitos ubicados en sus lagunillas, los que mediante sus proyecciones dendríticas tienen la capacidad de comunicarse con osteoclastos para fomentar la resorción ósea. Esto es fundamental considerando que, antes de sintetizar nuevo tejido óseo por parte de los osteoblastos, es necesario remover el tejido dañado. (Sims y Gooi, 2008; Crockett y cols., 2011).

Está descrito que los procesos de diferenciación y maduración osteoclástica en modelo murino toma entre 7 y 14 días en completarse (Marks y Seifert, 1985; McDonald y cols., 2021).

- *Aposición ósea*

La aposición o formación de hueso es controlada por factores locales y sistémicos (Kini y Nandeesh, 2012). Un ejemplo de ello es la concentración de vitamina D3 y

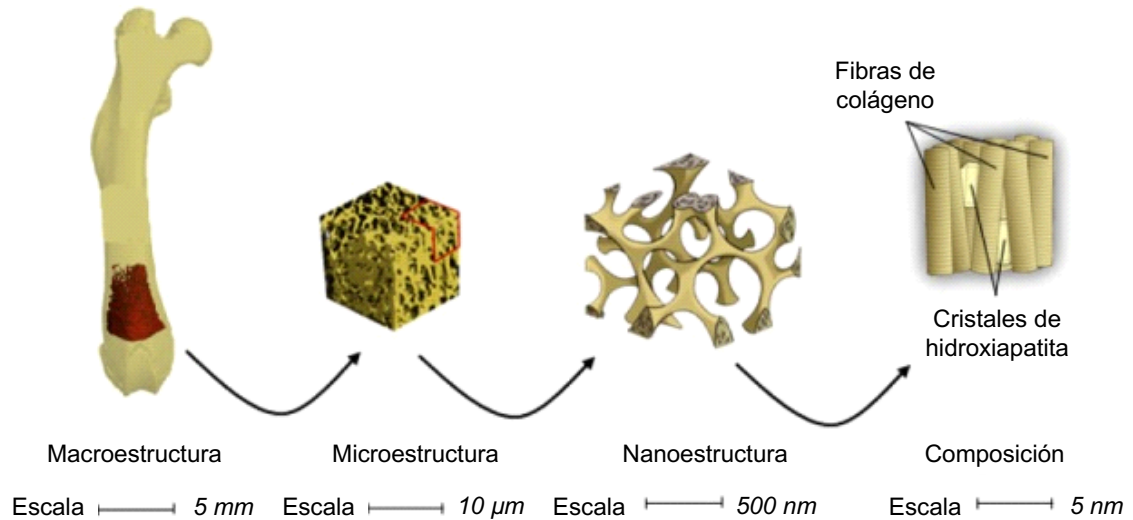
prostaglandina E2, que tienen efecto sinérgico junto al factor local de crecimiento insulínico 1 (IGF-1); permiten la maduración de osteoblastos e intercomunicación con osteoclastos por medio de la expresión de RANKL y/o mediante la presencia de Runx2. Según los requerimientos fisiológicos presentes, los osteoblastos pueden diferenciarse en células “bone lining cells” o quedar inmersos en lagunillas de la matriz ósea como osteocitos.(Crockett y cols., 2011)

#### **2.1.4 Calidad ósea: Relación con micro y macroestructura del hueso**

El tejido óseo posee una compleja estructura, de la cual dependen sus propiedades mecánicas. Se distinguen dos grandes niveles estructurales (Caeiro y cols., 2005; Caeiro y cols., 2013; Roschger y cols., 2017) (**Figura 2**).

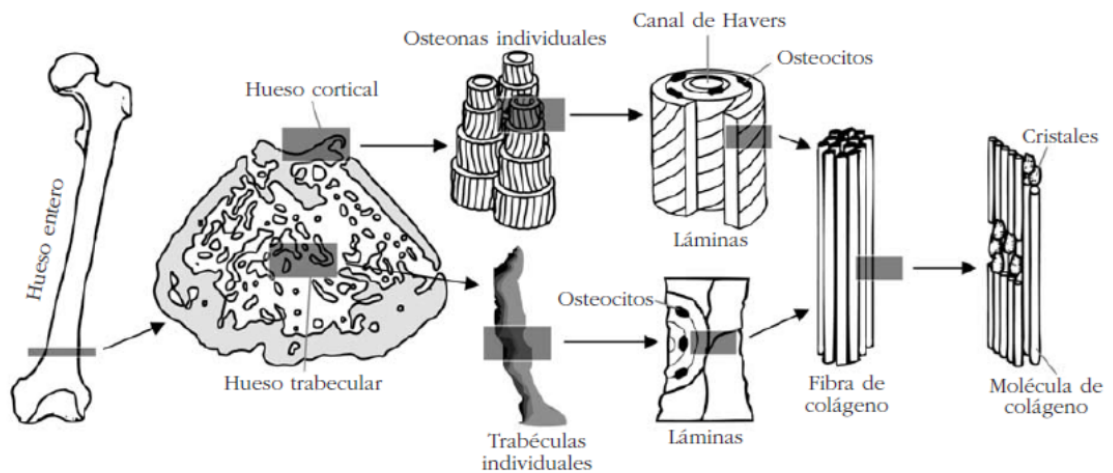
-El **nivel microestructural** describe al tejido según la distribución espacial de los materiales que lo componen. Así, el hueso cortical se presenta como una estructura compacta de distribución lamelar, que confiere armazón a la unidad. El hueso trabecular, por su parte, es una estructura mineralizada tipo panal, formada por varas y placas interconectadas entre sí y con la superficie interna de la cortical; es capaz de deformarse almacenando energía. Este tipo de arquitectura proporciona una gran rigidez al armazón cortical y permite a la unidad ósea adaptarse a los requerimientos biomecánicos (Caeiro y cols., 2005; Roschger y cols., 2017) (**Figura 3**).

-El **nivel macroestructural** define las características estructurales del hueso por sus características de forma, tamaño y geometría. (Caeiro y cols., 2005; Roschger y cols., 2017).



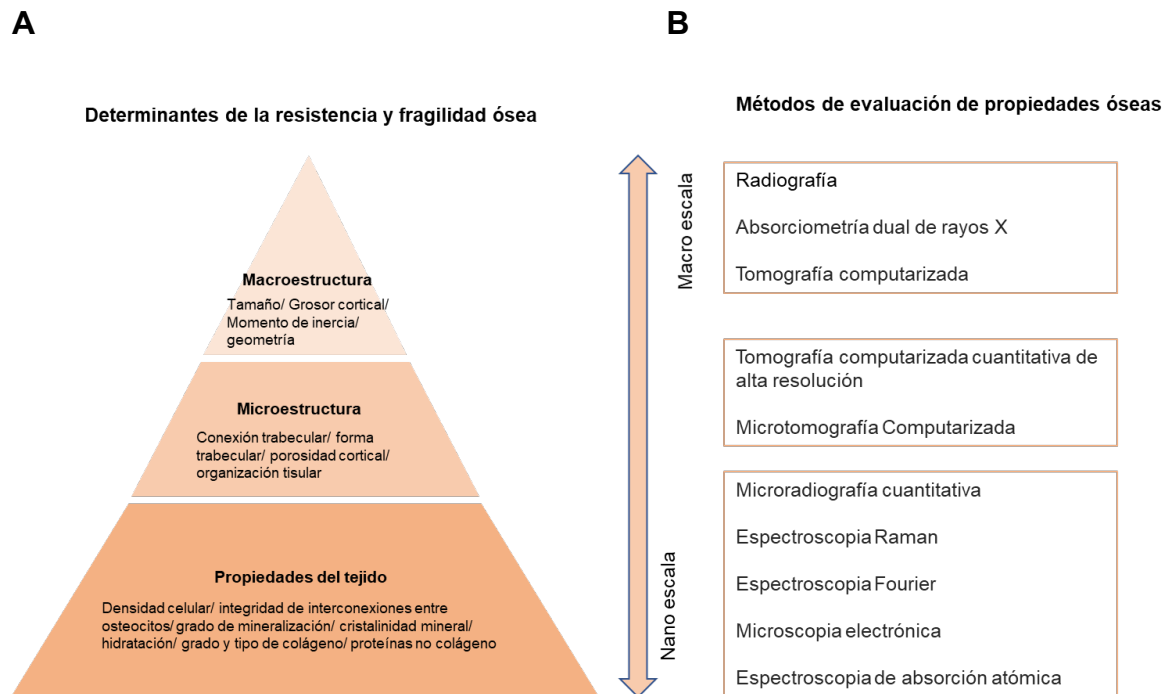
**Figura 2 Esquema de los niveles de organización de la estructura ósea de un hueso largo de humano.** Desde lo macro (izquierda) a la composición molecular del hueso (derecha). *Adaptación de Oftadeh y cols., 2015.*

El hueso trabecular (en el centro del hueso), al igual que hueso cortical (en la periferia), se compone de hidroxiapatita, colágeno, agua y células óseas. Comprende un mayor volumen del hueso y se remodela a una tasa mayor que el hueso cortical. También poseen un comportamiento biomecánico diferente. La fracción de volumen óseo (parámetro que refleja la pérdida o ganancia de hueso) (Torrubia y cols., 2020), las propiedades minerales del tejido trabecular y su arquitectura determinan las propiedades mecánicas de este subtejido



**Figura 3 Esquema de la disposición del tejido óseo en un hueso largo.** En la periferia toma lugar el hueso cortical, mientras que en el centro el trabecular. Cada subtejido exhibe una conformación diferente, pero una composición molecular idéntica. *Imagen extraída de Caeiro y cols., 2013.*

La calidad ósea considera los factores predictivos del riesgo de fractura de un hueso (Samelson et al., 2019), entre los cuales se encuentra la macroestructura (morfología y geometría ósea) (Bouxsein y Karasik, 2006) la microestructura (Borah y cols., 2002; Boruah y cols., 2017; Popp et al., 2019), los daños microestructurales asociados a la fatiga (viendo el hueso como biomaterial) y la nanoestructura, representada por variables como el grado de mineralización ósea (p.ej.) (Donnelly, 2011; Fonseca y cols., 2014). Por último, cabe señalar que la característica del tejido trabecular es determinante para la rigidez de estructuras óseas tales como el proceso condilar mandibular (Van Eijden y cols., 2004) (**Figura 4**).



**Figura 4 Factores determinantes de la resistencia y fragilidad ósea. (A)** Factores que determinan la resistencia y la fragilidad según el nivel estructural. **(B)** Diferente métodos existentes para la evaluación de los determinantes de fragilidad y resistencia ósea según el nivel estructural. *Adaptación de Fonseca y cols., 2014.*

## 2.2. Comunicación cruzada musculo-hueso

Históricamente la interacción musculo- hueso se ha considerado como una unión netamente mecánica, donde el hueso proporciona un sitio de unión para los músculos, los que le aplican carga al hueso de manera directa (en el sitio de unión) e indirecta (al deformarse la estructura ósea bajo la acción de la carga) y éste responde como mecanorreceptor modificando su estructura (Colaiani y cols., 2016). Sin embargo, se ha reportado la liberación de más de 600 proteínas que incluyen factores de crecimiento, citoquinas y metaloproteasas desde líneas mioblasticas C2C12 durante su diferenciación (Guo y cols., 2017). Por otra parte, se ha demostrado que las células óseas tienen función endocrina, mediante la producción y secreción de factores circulantes como FGF23, osteocalcina, entre

otros (Brotto y Johnson, 2014; Han y cols., 2018). Tanto músculo como hueso se pueden considerar órganos endocrinos, pues liberan moléculas que ejercen su acción a nivel sistémico en tejidos como hígado, páncreas y sistema cardiovascular. (Pedersen y Febbraio, 2008; Brotto y Johnson, 2014). Por lo tanto, con mayor razón podrán ellos estar afectando la fisiología de sus tejidos adyacentes. Por eso es que en los últimos años ha surgido la idea que músculos y huesos presentan una comunicación cruzada a través de moléculas secretadas (Pedersen y Febbraio, 2008; Takahashi y cols., 2016). Esto denota una relación íntima y dinámica entre ambos tejidos, que también se describe en el sistema masticatorio (Buvinic y cols., 2021). Existe, entonces, una relación tanto biomolecular como mecánica entre huesos y músculos. Las bases moleculares de esta comunicación cruzada aún son motivo de estudio (Brotto y Bonewald, 2015; Karsenty y Mera, 2018).

### **2.3. Cambios óseos producidos por atrofia y desuso muscular**

Debido a la íntima relación entre tejido óseo y muscular es que varios estudios han demostrado que la atrofia muscular afecta negativamente la calidad ósea del hueso subyacente (Bettis y cols., 2018). Además, se documenta que existe relación entre osteoporosis (disminución de la mineralización ósea) y sarcopenia (disminución de la masa y fuerza muscular) (Hirschfeld y cols., 2017).

Por su parte, el desuso muscular por reposo de larga duración (Krasnoff y Painter, 1999) o por microgravedad (McCarthy, 2011; Ausk y cols., 2012), genera atrofia muscular que precede a la disminución de masa ósea (Lloyd y cols., 2014). También se ha observado un efecto similar posterior a lesiones de la médula espinal, donde se genera denervación traumática de los músculos de extremidades inferiores, provocando su atrofia y posterior disminución de masa ósea (Qin y cols., 2010); esto se revierte parcialmente si se estimula eléctricamente el músculo denervado (Shields y Dudley-Javoroski, 2006). Lo mismo se observa al generar inmovilización de las extremidades, mediante diferentes modelos, como la suspensión por cola en roedores, a fin de reducir la carga de las extremidades. Bajo este modelo, aplicado por 3 semanas, se genera atrofia significativa del músculo Gastrocnemio a los 7 días y disminución de hueso cortical de tibia y fémur a los 14 días (Lloyd y cols.,

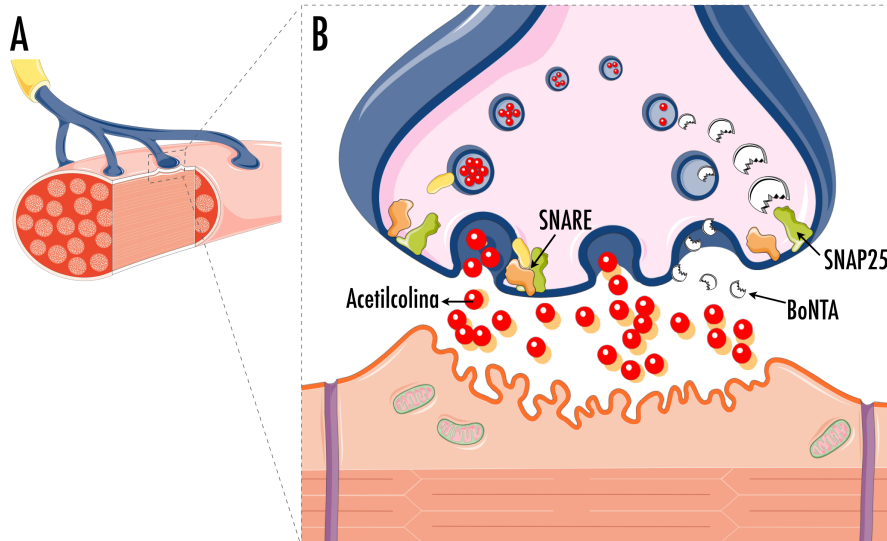
2014). También, se ha reportado aumento en la apoptosis de osteocitos y la producción de RANKL previo al aumento de la resorción ósea en las superficies endocorticales y trabeculares del fémur (Cabahug-Zuckerman y cols., 2016).

Otro modelo de desuso muscular que ha sido ampliamente estudiado es la parálisis transitoria del músculo por inyección de Toxina Botulinica tipo A (BoNTA) (Bettis y cols., 2018).

#### **2.4. Toxina Botulinica tipo A y parálisis muscular: Disminución del tejido óseo.**

La toxina botulínica es una neurotoxina polipeptídica producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. Existen 7 serotipos: A(BoNTA), B(BoNTB), C(BoNTC), D(BoNTD), E(BoNTE), F(BoNTF) y G(BoNTG), siendo BoNTA el serotipo más potente. Esta toxina bloquea la exocitosis de acetilcolina por parte de la neurona motora, inhibiendo la contracción muscular de forma temporal (Rossetto y cols., 2014; Miller y Clarkson, 2016). BoNTA es endocitado de manera específica por los terminales nerviosos colinérgicos. Una vez en el ambiente intracelular, la cadena liviana de BoNTA corta proteolíticamente a la proteína asociada a sinaptosoma de 25 kDa (SNAP-5), que forma parte del complejo proteico necesario para la exocitosis de acetilcolina (**Figura 5**). En humanos, la recuperación de la función contráctil comienza de manera progresiva a los 2-3 meses luego de la intervención, tomando en total 6 meses aproximadamente en recuperar la función similar al estado basal (Huang y cols., 2000); esto en ratones toma alrededor de 21-30 días (De Paiva y cols, 1999; Dressler y Saberi, 2005). En ratones, durante las primeras dos semanas post-intervención, las fibras musculares no reciben ningún estímulo de tipo neuronal (Montecucco y Molgó, 2005). Esto se ve parcialmente compensado posteriormente por la aparición de retoños neuromusculares (fenómeno de "sprouting"), que desaparecen aproximadamente 4-6 semanas después de la intervención con BoNTA. Se propone que la aparición de los retoños con capacidad de generar exocitosis de acetilcolina es necesaria para la recuperación inicial de la unión neuromuscular. En una segunda etapa, la terminal nerviosa original comienza a recuperar su capacidad de exocitosis a través de la metabolización intracelular de BoNTA y la recuperación de SNAP25 funcional (Tsai y cols., 2015; Yoshimi y cols.,

2017). Dadas las características de este periodo de tiempo, se señala que las 2 semanas post-intervención con BoNTA como “etapa temprana” o “aneural” de la parálisis inducida por esta neurotoxina en modelo murino (Worton y cols., 2018).



**Figura 5 Mecanismo de acción de BoNTA. (A)** Cada fibra muscular es inervada por una neurona motora, formando un complejo llamado unión neuromuscular. **(B)** En la neurona motora, la liberación de acetilcolina (en color rojo), necesaria para la contracción del músculo esquelético, depende del complejo SNARE conformado por tres proteínas: sinaptobrevina, (en color amarillo), syntaxina (en color naranja) y SNAP25 (en color verde). *Imagen tomada de Balanta-Melo (Tesis de Doctorado en Ciencias Odontológicas, Universidad de Chile, 2019).*

Se ha demostrado que la parálisis muscular provocada por inyecciones de BoNTA genera debilidad y atrofia muscular en extremidades (Vegger y cols., 2016), aumento de marcadores de atrofia a nivel proteico y ARNm (Atrogin-1 y MuRF-1), disminución de peso húmedo del músculos y aumento de IL-6 sérica a las 3 semanas post intervención (Pingel y cols., 2017).

La inyección de BoNTA en músculos de la pantorrilla de ratones hembra adultas induce resorción ósea en la tibia a los 3 días post intervención, a través de una masiva sobreexpresión de RANKL, que se mantiene a los 7 días. Además, aumenta



del número de osteoclastos a los 5 días post intervención (Aliprantis y cols., 2012). Mediante microtomografía computarizada (microTC) se ha evidenciado que existe disminución de la calidad ósea de la tibia, específicamente en la metáfisis, posterior a la parálisis de músculos de extremidad inferior en ratones, siendo significativa a los 3 días, y profundizada y mantenida a los 5-12 días (Poliachik y cols., 2010). Otro reporte constata un máximo de pérdida de masa ósea a los 14 días, y recuperación de los parámetros basales a los 21 días (Warner y cols., 2006).

En la actualidad, BoNTA es ampliamente usada en el territorio maxilofacial, específicamente en músculos masticatorios, para el tratamiento de desórdenes temporomandibulares (DTMs) y algunas alteraciones estéticas.

## **2.5. Sistema masticatorio y desórdenes temporomandibulares**

En los mamíferos, el aparato masticatorio es un complejo musculoesquelético especializado en funciones tales como la masticación, la defensa, la integración social, entre otras. Sus componentes principales tienen un origen embriológico común en el primer y segundo arcos faríngeos incluyendo componentes óseos (maxilar/mandíbula, dientes), la articulación temporomandibular (ATM), los músculos masticatorios, la lengua, los labios, las mejillas y las membranas mucosas (Pileicikiene y cols., 2007).

La mandíbula es un hueso único e irregular, que se articula mediante dos ATM a la base del cráneo (Santagati y Rijli, 2003). Como funciones características, la mandíbula brinda soporte y protección a los tejidos blandos craneofaciales (Yang y cols., 2015), articula con los dientes inferiores (Bagi y cols., 2011), permite la inserción de los músculos masticatorios (Chong y Evans, 1982; Baverstock y cols., 2013) y mantiene propiedades generales de los huesos como la reserva de minerales (calcio y fósforo) (Kwan, 2015) y como centro primario de hematopoyesis desde la médula ósea en su interior (Morrison y Scadden, 2014). El hueso, principal componente estructural de la mandíbula, es un tejido organizado jerárquicamente y compuesto por una estructura cortical con alto contenido mineral (70 %) y organización (láminas concéntricas), y un hueso trabecular con menor contenido mineral (62 %) y una disposición de láminas calcificadas más irregulares que forman

las trabéculas ( Burr y Akkus, 2014; Oftadeh y cols., 2015; Martin y cols., 2015) .Al igual que otros huesos, la mandíbula es altamente inervada y vascularizada, y presenta un recubrimiento externo (periostio) y un recubrimiento interno (endostio) en contacto directo con la médula ósea (Lai y cols., 2014). En la médula ósea se encuentran los precursores mesenquimales y hematopoyéticos de las principales células óseas, eritrocitos y células del sistema inmunológico (Bellido y cols., 2013; Morrison y Scadden, 2014). La mandíbula dispone de un proceso condilar que termina en la cabeza mandibular, con una superficie articular de fibrocartilago que recubre el hueso subyacente (hueso subcondral) ( Shibata y cols., 2013; Orset y cols., 2014; Liang y cols., 2016 ). Además, la cabeza mandibular es un centro de crecimiento osteocondral que conserva su actividad en individuos adultos, siendo capaz de adaptarse ante estímulos externos (Mizoguchi y cols., 2013). La ATM constituye una de las articulaciones más complejas y activas del organismo (Porto y cols., 2010) Debido a su alta actividad, la ATM está constantemente remodelándose y es susceptible a sufrir alteraciones que comprometen su normal funcionamiento. En este sentido, se estima que alrededor de un 60-70% de la población presenta o ha presentado signos de disfunción de la ATM (Kellesarian y cols., 2016). Los cambios funcionales y/o estructurales que afectan la ATM y los músculos masticatorios se clasifican como parafunciones (por ejemplo, bruxismo del sueño) o desórdenes temporomandibulares (por ejemplo, dolor miofascial, desplazamientos discales, entre otros) (León y cols., 2005; Díaz y Lucía, 2012). En Chile, la prevalencia de Desórdenes temporomandibulares es variable según el rango etario. En adultos se reporta un 49,6% de al menos un diagnóstico (Guerrero y cols., 2017). Un reporte de adultos mayores evidencia una prevalencia de 47% (Sandoval y cols., 2015). En tanto, en adolescentes alcanza un 26,88% (Aravena y cols., 2016).

Los músculos masticatorios (pteroideo lateral, pterigoideo medial, temporal y masetero), si bien comparten características generales con los de tronco y extremidades, tienen notables diferencias (Korfage y cols., 2005; Buvinic y cols., 2021). La primera diferencia radica en el origen embrionario; los músculos masticatorios derivan de la diferenciación del mesodermo paraxial a somitómeros y

luego arcos faríngeos, mientras que los de tronco y extremidades se originan cuando el mesodermo paraxial se diferencia a somitos y luego dermomiótomos (Lewis y cols., 2013). Otra particularidad es la expresión diferencial de isoformas de cadena pesada de la miosina (MyHC). Según esto, los músculos masticatorios no solo expresan las isoformas clásicas de MyHC tipo I y II, sino también MyHC de origen cardíaco (MyHC cardíaca  $\alpha$ ), e isoformas fetales (MyHC embrionaria y MyHC neonatal). También presentan abundantes fibras híbridas; esto es, fibras que expresan más de una isoforma de MyHC, lo que sólo se observa mínimamente en músculos de tronco y extremidades (Schiaffino y Reggiani, 2011). Esto explica por qué los músculos masticatorios responden a gran variedad de funciones motoras, y tienen óptimas propiedades en términos de fuerza, velocidad de contracción y resistencia a la fatiga (Langenbach y cols., 2003; Korfage y cols., 2005). Es por estas diferencias que músculos de extremidades y tronco no pueden ser homologados fisiológicamente con los músculos masticatorios.

Los músculos masetero, temporal y pterigoideo medial, son agonistas, y cumplen el rol de elevar la mandíbula durante la masticación, generando un movimiento coordinado que moviliza la ATM. El músculo masetero es el más prominente de los músculos masticatorios (Baverstock y cols., 2013; Norton y Netter, 2018); es multipenado y posee una arquitectura organizada en compartimentos compuestos de fibras inervadas por un alto número de motoneuronas; unidades motoras pequeñas y, por ende, más finamente reguladas (Cioffi y cols., 2012). Permite movimientos anteroposteriores, y tiene un rol activo en la generación de fuerza oclusiva durante el proceso de molienda del alimento (Langenbach y cols., 2003).

En roedores, el músculo masetero es el músculo masticatorio más prominente, y presenta un mayor desarrollo debido al predominio de movimientos anteroposteriores asociados a la conducta de roer en estos animales (Ram Ross, 2018). Esto hace que este músculo se vea particularmente afectado frente a cambios en la actividad masticatoria (Langenbach y cols., 2003; Vreeke y cols., 2011)

Debido a la íntima relación entre los componentes del sistema masticatorio, cualquier mínimo cambio en uno de ellos afecta la homeostasis del sistema completo. Por eso la actividad de los músculos masticatorios es relevante para mantener el sistema funcional. Es sabido que la actividad de estos músculos es uno de los factores epigenéticos más relevantes para el correcto desarrollo craneofacial. Alteraciones musculares incluso en la etapa adulta repercuten en la morfología del esqueleto craneofacial y en el correcto funcionamiento de la ATM ( Kiliaridis et al., 1995; Matic y cols., 2007). La disfunción de los músculos masticatorios promueve alteraciones morfológicas y funcionales de la ATM (Bender, 2012).

## **2.6. Toxina botulínica tipo A: Uso en odontología y antecedentes de efectos secundarios óseos.**

En la última década ha habido un aumento en el uso de BoNTA en humanos con fines terapéuticos para tratar problemas que afectan a los músculos masticatorios (hipertrofia del músculo masetero, dolor miofascial), dolor de cabeza y espalda, trastornos oftalmológicos causados por hiperactividad muscular y trastornos del movimiento ( Munchau, 2000; Miller y Clarkson, 2016; Balanta-Melo y cols ., 2019). Otros usos crecientes han sido con fines estéticos (Munchau, 2000). Sin embargo, el uso de BoNTA ha sido aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA, EE.UU.) sólo para un número limitado de condiciones: estrabismo, blefaroespasma, distonía cervical, hiperhidrosis axilar, espasticidad de miembro superior e inferior, migraña crónica, vejiga hiperreactiva e incontinencia urinaria(Allergan, 2021) A pesar de ello, en Chile, el Instituto de Salud Pública tiene aprobada el uso de la toxina para el tratamiento de bruxismo(Cortés-Monroy y Soza, 2014). Aún falta de evidencia preclínica respecto de la seguridad de las intervenciones no aprobadas (Pirazzini y cols., 2017).

Considerando las múltiples aplicaciones clínicas y estéticas de BoNTA “*off-label*” en el área odontológica y según lo evidenciado en extremidades y tronco, se hace necesario estudiar los cambios moleculares y estructurales tanto musculares como óseos que ocurren posterior a la inyección de BoNTA en músculo masetero.

Un modelo de estudio consiste en la inyección unilateral con BoNTA en músculo masetero. Dicho modelo promueve atrofia del músculo masetero intervenido, sin alterar el músculo contralateral inyectado con solución salina. La intervención no genera signos de estrés ni incomodidad en los ratones, ni alteraciones de alimentación o ganancia de peso (Balanta-Melo y cols., 2019). Por lo tanto, el músculo contralateral actúa como control intra-individuo. En roedores la parálisis del músculo masetero ocurre tan solo 24 horas después de la inyección de BoNTA (Yoshimi y cols., 2017). En estas condiciones, aumentan los niveles de ARNm de marcadores de atrofia (Atrogin-1, MuRF-1) y de regeneración muscular (miogenina) a los 7 días post-inyección en el lado tratado con BoNTA respecto del lado contralateral inyectado con solución salina (Balanta-Melo y cols., 2018). Además, disminuye significativamente el volumen y la masa del músculo masetero, así como el diámetro de sus fibras a los 14 días post-inyección (Balanta-Melo y cols., 2019).

El músculo esquelético activo es fundamental para la generación de fuerzas y la secreción de factores que regulan, por ejemplo, la homeostasis ósea (Balanta-Melo y Buvinic, 2018; Balanta-Melo y cols., 2019). En el modelo de inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero, se ha demostrado que aumenta la expresión de ARNm de RANKL tempranamente en el cóndilo mandibular asociado (2 días) (Balanta-Melo y cols., 2018), y se reporta una significativa disminución de la calidad ósea condilar a los 14 días post tratamiento (Balanta-Melo y cols., 2019). En otro estudio, el defecto óseo es evidente a las 4 semanas y se puede explicar por una disminución en la mineralización, deposición de matriz ósea y menor actividad TRAP en el cartílago condilar y hueso subcondral mandibular, denotando una menor tasa de remodelado óseo (Dutra y cols., 2018). Por microTC también se observa disminución de masa ósea a las 4 y 8 semanas post intervención (Dutra y Yadav, 2019).

Adicionalmente, se ha observado el fenómeno de retoños neuromusculares 2 semanas después de la intervención con BoNTA en el músculo masetero de primates no humanos (Capra y cols., 1991), y además se ha encontrado la

expresión de marcadores de apoptosis en el músculo masetero de roedores en esta misma temporalidad (Moon y cols., 2016).

La parálisis unilateral del músculo masetero inducida por BoNTA también resulta en pérdida del hueso subcondral del cóndilo mandibular del lado paralizado en conejos adultos (Rafferty y cols., 2012), ratas adultas (Kün-Darbois y cols., 2015) y ratones adultos jóvenes (Dutra y cols., 2016), además de afectar el crecimiento vertical mandibular en primates no humanos jóvenes, comparado con el lado no inyectado (Kim y cols., 2019). Además, un estudio piloto en mujeres adultas (Raphael y cols., 2014) y un reporte de caso (Aziz y cols., 2017) alertan sobre la pérdida ósea asociada a la inyección de BoNTA en músculo masetero. Un reciente reporte documenta disminución de la calidad ósea de la cortical condilar a los 12 meses post intervención con BoNTA medido con tomografía computada en mujeres adultas (Hong y Kang, 2020).

Considerando que:

- BoNTA se utiliza ampliamente en tratamientos odontológicos clínicos y estéticos, sin que su uso esté aprobado para intervenir el músculo masetero.
- En modelos preclínicos de inyección de BoNTA en músculo masetero aumenta la expresión de un marcador de osteoclastogénesis en la cabeza mandibular ipsilateral luego de tan sólo 2 días post intervención, pero sólo se ha evaluado y demostrado la pérdida significativa de la calidad ósea luego de 14 días.

La pregunta de investigación del presente trabajo es: ¿Se reduce la calidad ósea de la cabeza mandibular, caracterizada por parámetros de microestructura, en estadios tempranos (2-7 días) de la parálisis del músculo masetero inducida por BoNTA?

### **3. HIPÓTESIS.**

La parálisis del músculo masetero de ratón por inyección de Toxina Botulínica tipo A deteriora tempranamente la calidad ósea de la cabeza mandibular, desde los 2 días post intervención.

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL.**

Caracterizar el efecto de la parálisis unilateral de músculo masetero inducida por inyección de BoNTA en la calidad ósea de la cabeza mandibular en modelo murino, comparando dos temporalidades post intervención (2-7d).

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

En un modelo de inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero de ratones macho adultos, se plantea el siguiente objetivo específico:

1. Describir y comparar el efecto de la de inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero en parámetros microestructurales de la cabeza mandibular de ratón a los 2 y 7d post intervención.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS.**

Este es un estudio de análisis descriptivo y comparativo de datos digitales, provenientes de un estudio experimental en modelo animal a dos temporalidades.

### **4.1 Estrategia Experimental**

Con el fin de determinar la calidad ósea de la cabeza mandibular en ratones adultos, que fueron intervenidos de forma unilateral con BoNTA en el músculo masetero, se analizó la microestructura a los 2 y 7 días post-intervención.

#### **4.1.1 Describir y comparar el efecto de la de inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero en parámetros microestructurales de la cabeza mandibular de ratón a los 2 y 7d post intervención.**

Se analizaron muestras de mandíbulas de ratones macho adultos previamente escaneadas en equipo de microtomografía computarizada (Bruker Skyscan 1172, Centro de Microtomografía Computarizada, Indiana University School of Medicine, IN, EE.UU.), con un tamaño de vóxel de 8,43  $\mu\text{m}$ . Se compararon muestras de ratones sin intervenir (Grupo No Intervenido), con ratones con inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero derecho y solución salina en masetero izquierdo (grupo BoNTA, 2-7-14 días post intervención). A partir de reconstrucciones 3D se obtuvo una secuencia de imágenes en dos dimensiones del área de interés (cabeza mandibular, imágenes digitales), a la que se le caracterizó la microestructura ósea, cuantificando los siguientes parámetros: grosor trabecular ( $Tb.Th$ ; promedio del grosor de trabéculas,  $\mu\text{m}$ ), fracción de volumen óseo ( $BV/TV$ ; relación entre el volumen de hueso segmentado y el volumen total de la región de interés, razón) (Bouxsein et al., 2010). La cabeza mandibular adyacente al músculo masetero inyectado con BoNTA se comparó con la contralateral, adyacente al músculo masetero inyectado con solución salina. Los análisis fueron realizados con el programa ImageJ 1.53n (Schneider y cols., 2012) utilizando el plugin BoneJ 1.4.3 (Doube y cols., 2010).



## **4.2 Métodos.**

### **4.2.1 Muestras.**

Los análisis se realizaron utilizando los datos digitales de escaneo por microTC de mandíbulas de ratones adultos, previamente obtenidos en el laboratorio (Proyecto Fondecyt 1151353-1201385; Proyecto ENLACE-VID ENL29/19) y de las cuales fueron segmentadas para extraer sólo la cabeza mandibular. Por lo tanto, en este estudio no se realizaron intervenciones y no se tuvo contacto con animales de experimentación.

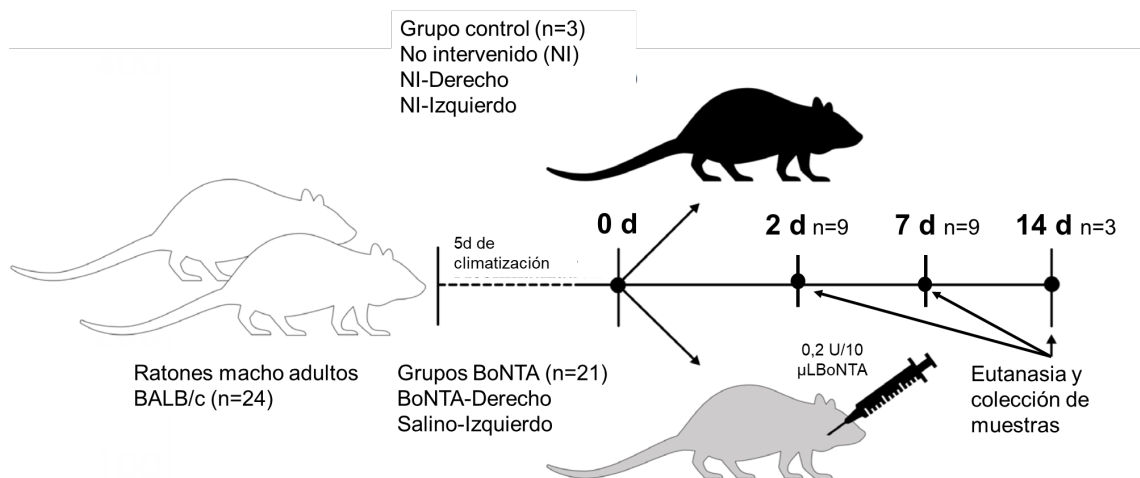
### **4.2.2 Diseño experimental de inyección unilateral con BoNTA en músculo masetero.**

Si bien la intervención con BoNTA en el músculo masetero no forma parte de este trabajo, es preciso detallar la estrategia que se ejecutó y de la cual derivan los grupos experimentales y controles de este estudio.

Veinticuatro ratones BALB/c machos adultos (9 semanas; 22-26 g) fueron divididos aleatoriamente en un grupo No Intervenido (n = 3) o grupos BoNTA 2d (n=9), BoNTA 7d (n=9) y BoNTA 14d (n = 3). El grupo No Intervenido no se sometió a ningún procedimiento y se generó su eutanasia a los 14 días; se utilizó como control para determinar el estado basal de los parámetros óseos evaluados (NI-derecho y NI-izquierdo). El grupo BoNTA 14d se utilizó como control positivo para la disminución de los parámetros de microestructura ósea, de acuerdo a lo descrito previamente por nuestro grupo (Balanta-Melo y cols., 2019). Tras 5 días de aclimatación en condiciones estándar para todos los grupos, se define el día 0, donde los ratones del grupo BoNTA fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de ketamina 80 mg/kg y xilacina 8 mg/kg. Luego, cada animal recibió una única inyección de BoNTA (0,2 U/10 µL; Onabotulinumtoxin A; BOTOX®, Allergan Chile, Santiago, Chile; Lote # C4306C2) en el músculo masetero derecho. La dosis se basó en un estudio anterior (Balanta-Melo y cols., 2018), en que se escaló la dosis informada para procedimientos clínicos en humanos a la masa de músculo

masetero de ratón (3 U/g, Van Ejden y cols., 1997; Miller y Clarkson, 2016). Como control intraindividuo se utilizó la inyección de 10  $\mu$ L de solución salina (0,9% p/v de NaCl) en el músculo masetero izquierdo (**Figura 6**).

Los animales se alojaron en condiciones controladas. ( $20 \pm 2$  °C, humedad relativa 42% -48% y 12 horas ciclo luz / oscuridad), con agua y comida *ad libitum* (LabDiet® JL Rata y ratón / Auto 6F 5K67; Lab Diet, St Louis, MO, EE. UU.). Se realizó a diario la evaluación general del bienestar animal, con registro de la masa corporal día por medio. Después de 2, 7 o 14 días post inyección, los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestésico intraperitoneal. Las mandíbulas fueron almacenadas en formalina al 10% (tamponado neutro, Sigma - Aldrich®, St Louis, MO, EE. UU.) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la toma de imagen por microTC (Balanta-Melo y cols., 2019).



**Figura 6 Representación del modelo de estudio y grupos experimentales.**  
*Adaptación de información suplementaria de Balanta-Melo y cols., 2019.*

#### 4.2.3 Captura de imágenes por MicroTC.

Las mandíbulas se escanearon en el sistema Bruker Skyscan 1172 con los siguientes parámetros: tamaño de vóxel isotrópico de 8,43  $\mu\text{m}$ , voltaje 50 kV, corriente 500  $\mu\text{A}$ , filtro de aluminio de 0,5 mm, tiempo de integración 926 ms y 35 min de duración del escaneo por muestra. Las muestras se mantuvieron en formalina al 10% durante el escaneo para evitar la desecación. Se obtuvieron reconstrucciones 3D de las mandíbulas completas que fueron visualizadas y segmentadas en DRAGONFLY 2021.1.0.977 (Object Research Systems, Canadá) (Piche y cols., 2018). Con ello se obtuvo una secuencia de imágenes 2D en escala de grises de cada cabeza mandibular de interés. Las imágenes representan recortes digitales longitudinales del cóndilo, separados entre sí por 8,43  $\mu\text{m}$ .

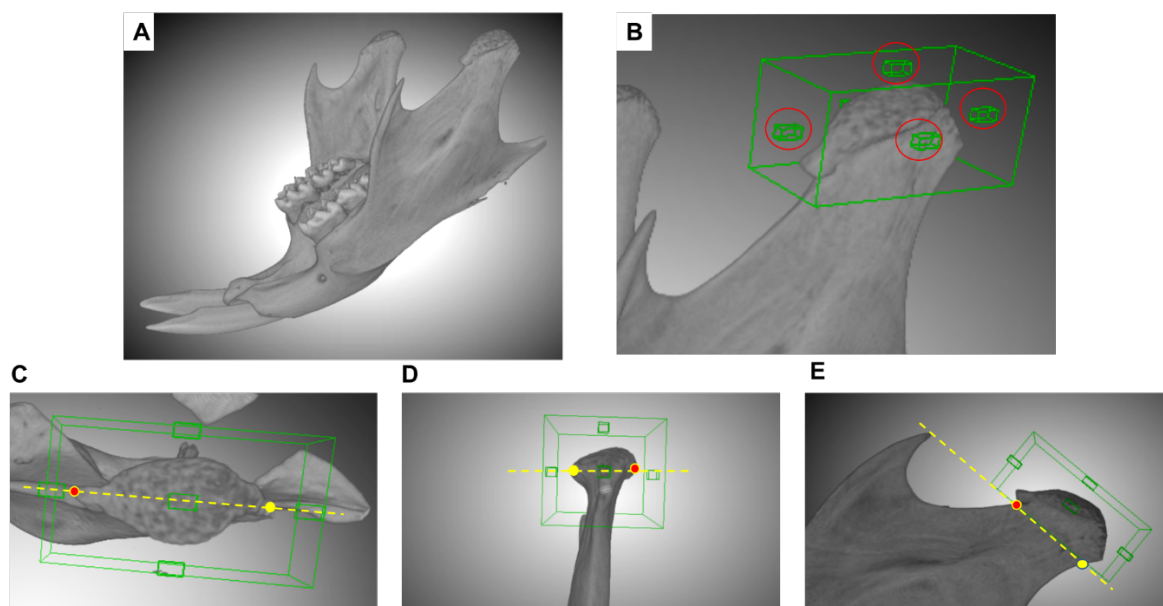
#### 4.2.4 Análisis de microestructura.

Para la caracterización de la microestructura existen varios métodos, uno de ellos es la MicroTC (Donnelly, 2011). Su uso en roedores está ampliamente descrito y los parámetros trabeculares más comunes a evaluar son los antes mencionados: BV/TV y Tb.Th. (Bouxsein y cols., 2010). BV/TV es un parámetro que caracteriza la pérdida de tejido óseo dentro de un volumen total de interés y Tb.Th un parámetro que cuantifica la arquitectura trabecular. Con ambos parámetros se puede estimar con precisión la calidad del tejido trabecular al caracterizar la cantidad de tejido y su arquitectura; esto es esencial para la calidad ósea del hueso completo (Oftadeh y cols., 2015).

Previo al análisis de la microestructura fue necesario generar las imágenes 2D a través de la segmentación de la zona de interés en las reconstrucciones 3D de las mandíbulas completas (**Figura 7A**). Por cada mandíbula se segmentó la cabeza mandibular izquierda y derecha utilizando el programa DRAGONFLY 2021.1.0.977 (Object Research Systems, Canadá) (Piche y cols., 2018), reproduciendo la misma selección por cada muestra. Primero se posicionó la caja de segmentación en la cabeza mandibular, ajustándola al tamaño aproximado de dicha estructura (**Figura 7B**). Luego se posicionó desde una vista superior dejando un eje imaginario que va desde el punto más anterior al más posterior de la cabeza mandibular, pasando por

las subcajas anterior, media y posterior (**Figura 7C**). Luego se posicionó la caja desde una vista posterior, procurando dejar un eje imaginario pasando desde el polo medial al polo lateral, pasando por las subcajas medial y lateral, respectivamente (**Figura 7D**). Finalmente, desde una vista lateral, se delimitó la cabeza mandibular con un eje imaginario que va desde el punto más anterioinferior de la cabeza mandibular al punto más posteroinferior, eje que se proyecta hacia anterior aproximadamente hacia la punta del proceso coroides mandibular (**Figura 7E**).

Una vez obtenido el *set* de imágenes 2D por cada cabeza mandibular, se realizó el análisis de microestructura ósea utilizando el procesamiento de imágenes a través de ImageJ 1.53n (Schneider y cols., 2012), a través del plugin BoneJ en su versión 1.4.3. (Doube y cols., 2010). Tanto la segmentación como el análisis microestructural fue realizado sin conocer el grupo experimental al que pertenecía cada muestra (análisis ciego).



**Figura 7** Imagen de referencia que muestra la zona de segmentación de la cabeza mandibular en el programa DragonFly 2021.1.0.977.

**A)** Imagen de la reconstrucción 3D. **B)** Imagen de la reconstrucción 3D con la caja (en verde) de segmentación del cóndilo izquierdo de la imagen que selecciona la zona de interés; los círculos rojos seleccionan las subcajas para el cambio de angulación de la segmentación. **C)** Imagen superior de la cabeza mandibular con la caja y el eje imaginario (línea discontinua amarilla) desde el punto más anterior (punto rojo) al más posterior (punto amarillo). **D)** Imagen desde posterior de la cabeza mandibular con la caja y el eje imaginario (línea discontinua amarilla) desde el polo medial (punto rojo) al lateral (punto amarillo). **E)** Imagen lateral de la cabeza mandibular con la caja y el eje imaginario (línea discontinua amarilla) desde el punto más anteroinferior (punto rojo) al punto más posteroinferior (punto amarillo).

El protocolo de análisis microestructural fue realizado en Windows. Dentro del trabajo de campo de la tesis, fue ajustado a la resolución del MicroTC utilizado (8,43  $\mu\text{m}$ ) y validado como un protocolo que arroja resultados consistentes y reproducibles, al compararlo con el protocolo utilizado a resolución mayor (5,11 $\mu\text{m}$ ) previamente utilizado en nuestro grupo (Balanta-Melo y cols., 2019). El presente protocolo se detalla a continuación:

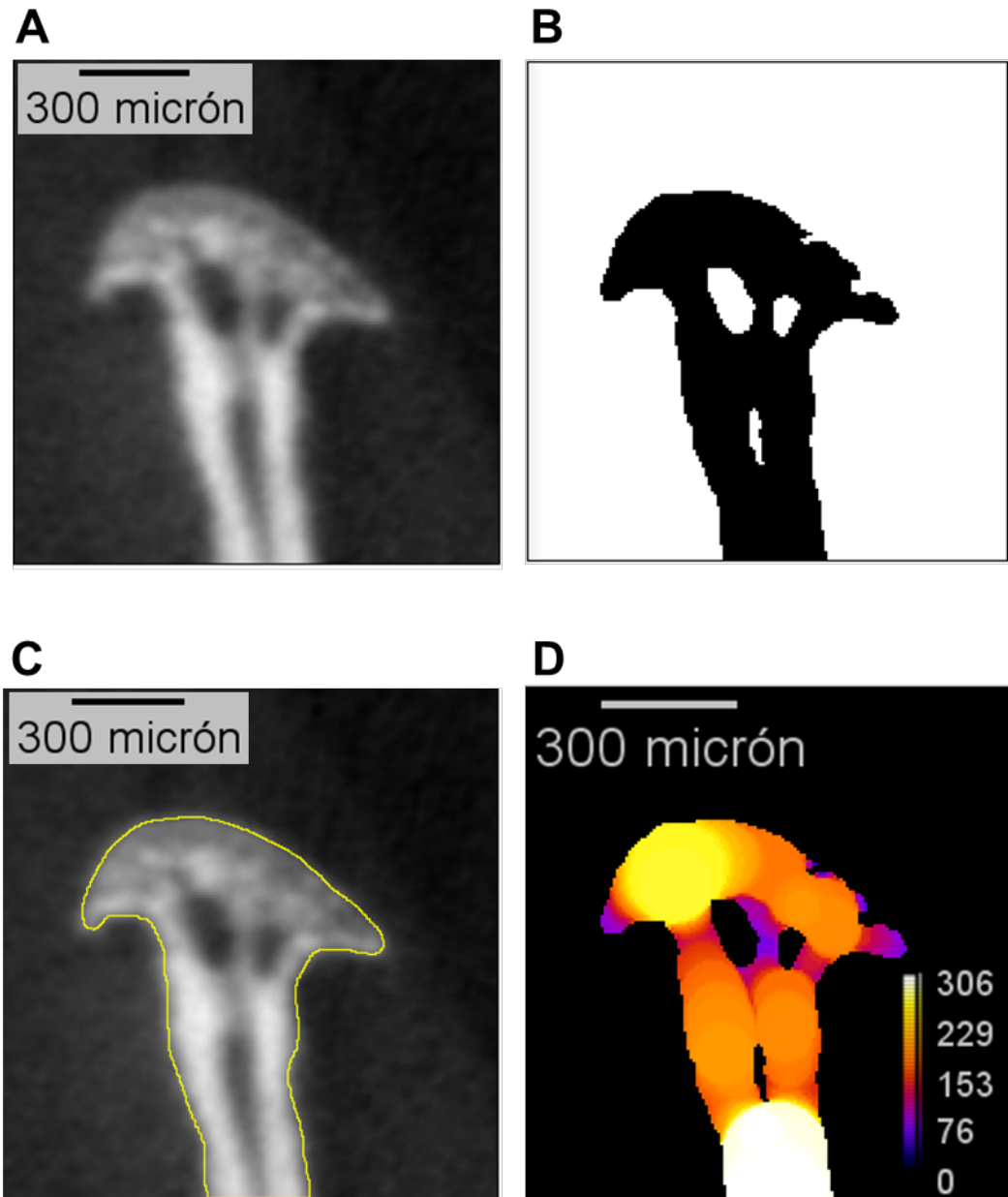
- 1) En ImajeJ 1.53n se abre la secuencia de imágenes de interés en la sección *Import, Image Sequence*.
- 2) Es necesario seleccionar la conversión a escala de grises de 8 bit (*Convert to 8-bit Grayscale* o seleccionar la opción “*Image*”; luego en “*type*” estará la opción *8-bit*) y ordenar nombres numéricamente (*Sort names numerically*). Además, hay que confirmar que la imagen inicial (*Starting image*) sea 1, incrementos 1 (*Increment*) y la escala de imágenes al 100% (*Scale Images*).
- 3) Ajuste de escala: En la sección “*Analyze*”, se ajusta la distancia en pixeles a 1 (*Distance in pixels*); la distancia conocida en este análisis fue 8,43 (Known distance); la relación del aspecto de pixeles en 1 (*Pixel aspect ratio*); y la unidad de medida micrón (*Unit of length*). Se recomienda guardar la secuencia de imagen en formato tiff. El ajuste de escala es necesario cada vez que se abra nuevamente una secuencia.
- 4) Procesamiento de imágenes para la obtención de BV/TV y Tb.Th .
  - a. Transformación de imágenes en escala de grises a imágenes binarias: Una vez que se obtiene la imagen en escala de grises en 8 bit (**Figura 8A**), se utiliza BoneJ 1.4.3 en la opción *plugins*, donde se selecciona la opción *Optimise Threshold*; arroja una ventana en la cual hay que seleccionar *Apply Threshold* y *Threshold only*. Mediante la determinación del umbral de valor blanco/negro (*threshold*) de la imagen original en escala de grises, el programa interpreta las zonas claras (hiperdenso) como hueso; en este caso, al no existir otras estructuras mineralizadas, se puede determinar con seguridad que el blanco de la imagen corresponde a tejido óseo, mientras que las zonas más oscuras (hipodenso) es vacío. En este caso el programa arroja

un umbral blanco/negro (*threshold*) automático. El programa automáticamente genera la secuencia de imágenes binarias necesarias para el análisis microestructural, obteniendo una imagen en blanco y negro, donde negro es tejido óseo y blanco es vacío (**Figura 8B**). Esta interpretación de la imagen es generada por el plugin BoneJ 1.4.3 y optimiza el análisis al eliminar el ruido de la secuencia original de escala de grises. Se recomienda guardar esta secuencia en formato *tiff*.

- b. Dibujo de región de interés (*Region Of Interest, ROI*): Para generar un análisis preciso, manualmente (utilizando mouse o tableta digital de dibujo) se dibuja en el programa la región a analizar. Es decir, se delimita la cabeza mandibular en la secuencia completa de imágenes, cada una por separado (aproximadamente 250 imágenes por cabeza mandibular). Para ello se selecciona *ROI Manager* en *tools* de la sección *Analyse* y se delimita la cabeza mandibular utilizando la opción *Freehand Selections* de ImageJ 1.53n. Una vez dibujado, se guarda cliqueando *add[t]* en la ventana que previamente aparece al abrir *ROI Manager*. Para pasar a la siguiente imagen se debe clicar fuera de la región de interés de la imagen con el fin de eliminar el dibujo previo y repetir el procedimiento con la imagen siguiente hasta completar la secuencia. Para efecto de esta tesis se utilizó la imagen en escala de grises 8-bit para la determinación de ROI más precisa y reproducible debido a la resolución de la imagen, a diferencia del protocolo inicial donde se realizaba en imagen binaria, dicha modificación fue sujeta a validación para establecer la capacidad de dar resultados reproducibles y consistentes (**Figura 8C**).
- c. Una vez terminada la delimitación de la región de interés de la secuencia completa, para la obtención de BV/TV se abre la imagen binaria y se selecciona el *plugin* BoneJ 1.4.3, *Fraction* y luego *Area/Volume Fraction*; se obtiene una tabla con los siguientes parámetros: Volumen óseo, el volumen total de la muestra y el BV/TV.

- d. Para la obtención del Tb.Th, nuevamente se utiliza el *plugin* BoneJ 1.4.3 y su opción *Thickness*, seleccionando el cálculo de Tb.Th. Se genera una tabla con el resultado del análisis de dichos parámetros. El cálculo del Tb.Th es automatizado por el programa y el algoritmo de cálculo es a través de la medición del diámetro de circunferencias que se circunscriben dentro del tejido; el programa arroja círculos de colores de acuerdo con el grosor trabecular, siendo los colores más claros (amarillo/naranja), diámetros mayores, y los colores más oscuros (rojos/morado/azul) denotan diámetros menores (**Figura 8D**).
- e. Una vez obtenido todos los resultados, se exportan en una planilla Microsoft® Excel® (versión 2110).





**Figura 8** Imágenes representativas de una cabeza mandibular en cada uno de los pasos para el análisis de microestructura ósea en ImageJ 1.53n con BoneJ1.4.3 (A) imagen en escala grises. (B) Imagen binaria. (C) Selección de ROI. (D) Análisis *Thickness*: Imagen 2D del mapa de color con barra de calibración de la escala colorimétrica del algoritmo de cálculo de BoneJ 1.4.3.

### 4.3 Análisis estadístico

En base a lo reportado y validado previamente por nuestro grupo, donde se determinó que el tamaño muestral necesario para evaluar la diferencia en los parámetros óseos 3D (variables continuas) obtenidos mediante MicroTC, entre el lado experimental (BoNTA) y el lado control (Salino), es de mínimo 8 individuos (Balanta-Melo y cols, 2019), en la presente tesis se usaron 9 individuos de interés para cada grupo (2 y 7d).

Los datos se reportaron de acuerdo con el tamaño de la muestra y la normalidad de su distribución como promedio y error estándar del promedio (+/- SEM). La distribución normal de los datos se determinó mediante test de Shapiro-Wilk. La diferencia entre lado BoNTA (derecho) y el lado Salino (izquierdo) del mismo individuo se determinó mediante Prueba t pareada de una cola. La diferencia entre lado BoNTA o Salino y sus homólogos de distintos individuos se determinó mediante la Prueba t-test no pareada de una cola. La comparación múltiple entre el grupo No Intervenido y el lado Salino de individuos intervenidos a distintos tiempos, se realizó mediante la prueba Krustal-Wallis. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 9.0d (Software GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.).  $p < 0,05$  se definió como diferencia estadística.

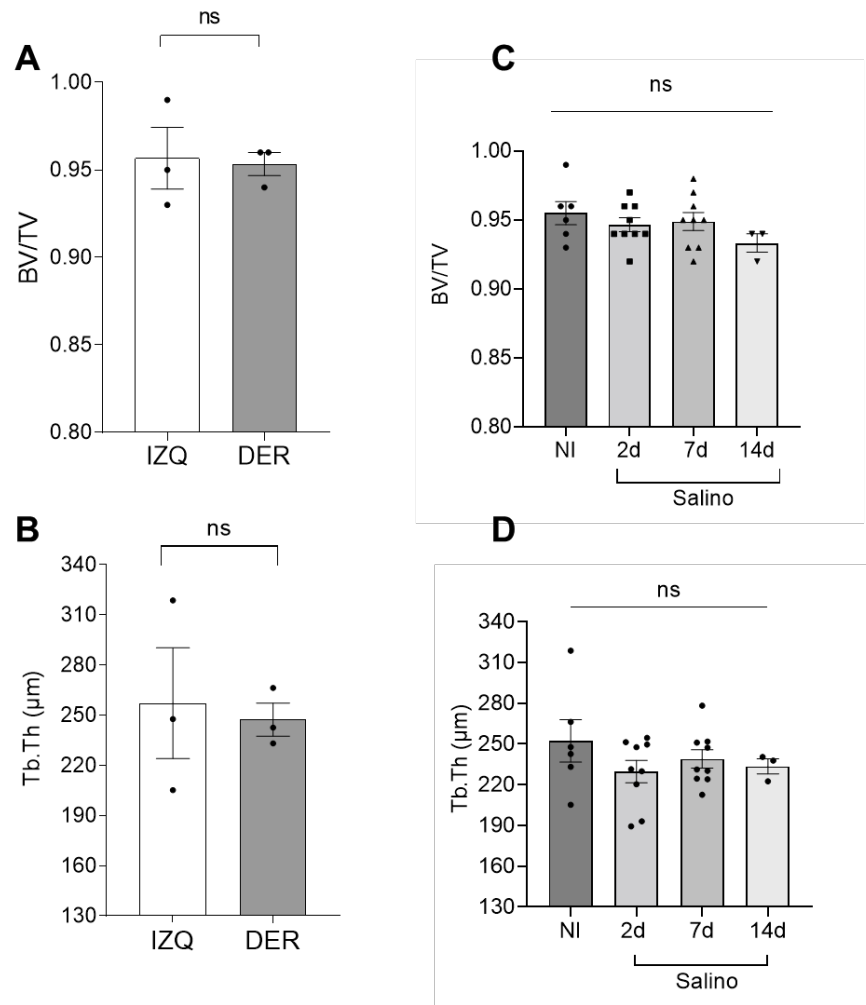
## 5. RESULTADOS.

### 5.1 Establecimiento de los controles negativos y positivos del protocolo.

Con el fin de determinar la simetría de los dos cóndilos en las mandíbulas de los animales, se realizaron controles sin intervención. Paralelamente, se utilizó la inyección unilateral de BoNTA y análisis luego de 14 días como control positivo del daño óseo asociado, como ya se ha descrito por nuestro grupo (Balanta-Melo y cols., 2019).

En las mismas condiciones de alojamiento controlado que todos los individuos, no se observaron cambios en los parámetros BV/TV ni Tb.Th entre el lado derecho e izquierdo en los individuos controles no intervenidos, (**Figura 9A-B**). No hubo diferencias significativas del BV/TV entre grupo no intervenido y el lado izquierdo (Salino) de animales intervenidos con BoNTA a los 2 y 7 días (**Figura 9C**). Tampoco hubo diferencia significativa en el Tb.Th entre el grupo no intervenido y el lado Salino de animales intervenidos con BoNTA a los 2 y 7 días (control intraindividuo) (**Figura 9D**).

A los 14 días post intervención, la cabeza mandibular del lado inyectado con BoNTA exhibe una disminución significativa de la magnitud de los parámetros microestructurales óseos evaluados respecto al lado Salino (**Figura 10**). Por lo tanto, el grupo BoNTA 14d se establece como control positivo y el grupo Sin Intervención como control negativo.

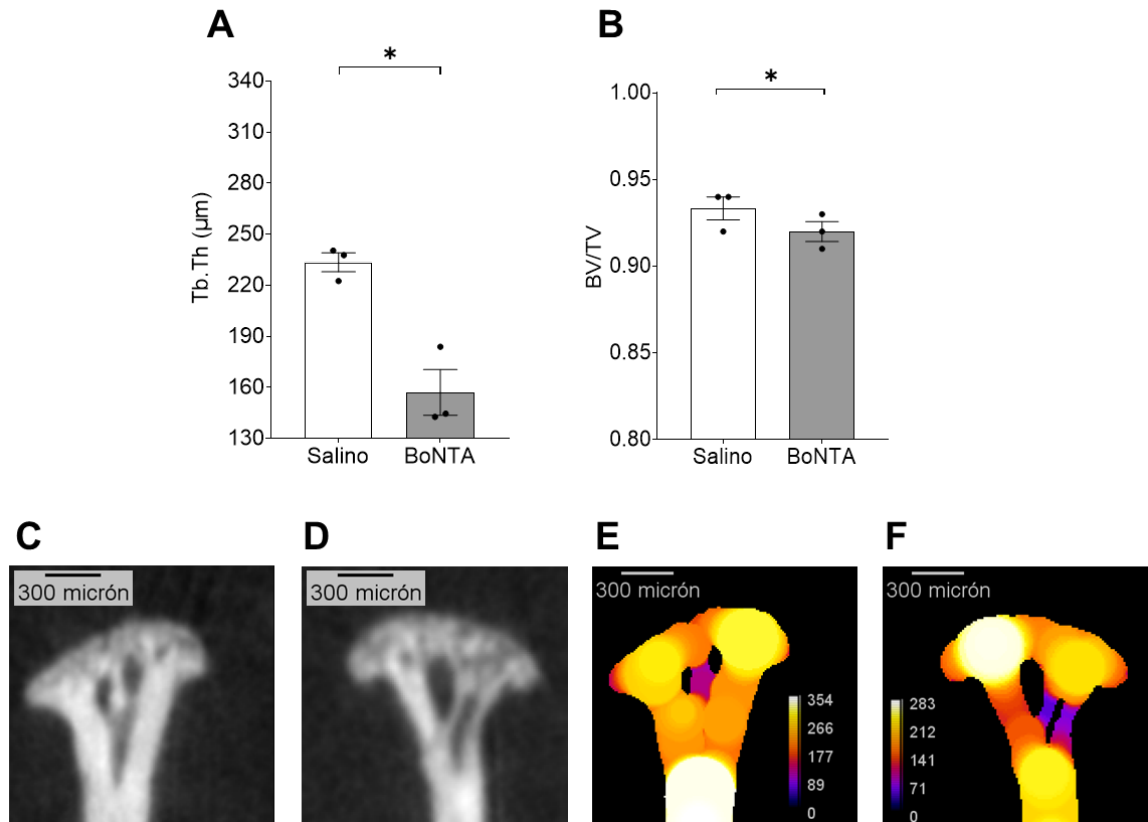


**Figura 9** La microestructura de la cabeza mandibular adyacente al músculo masetero inyectado con solución salina (2-7-14d, control intra-individuo) es equivalente a la de animales no intervenidos: lado derecho (DER) e izquierdo (IZQ).

**A-B:** Animales sin intervenir no presentan cambios en los parámetros de microestructura ósea BV/TV (A) ni Tb.Th. (B) en las cabezas mandibulares derecha e izquierda. n=3, promedio ± SEM, test de t pareado, una cola, ns: no significativo.

**C-D:** En los grupos BoNTA 2-7-14d, el cóndilo adyacente al músculo masetero inyectado con solución salina es equivalente al de los animales no intervenidos cuando se comparan los parámetros de BV/TV (C) y Tb.Th. (D). n=6-9, promedio ± SEM, prueba Kruskal-Wallis, una cola, ns: no significativo.

BV/TV, Fracción de Volumen óseo; Tb.Th, Grosor Trabecular. NI: No Intervenido.



**Figura 10** La inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero reduce el Tb.Th y BV/TV de la cabeza mandibular ipsilateral a los 14 días post intervención.

A los 14 días luego de la inyección de BoNTA en el músculo masetero se reduce significativamente el Tb.Th **(A)** y BV/TV **(B)** en la cabeza mandibular ipsilateral (BoNTA) comparado con su contralateral inyectado con solución salina (Salino). **(C-D)**: Imágenes representativas en 2D en escala de grises de cabezas mandibulares de un individuo BoNTA 14d, lado Salino **(C)** y lado BoNTA **(D)**. **(E-F)**: Imágenes representativas del mapa de color de análisis *Thickness* con barra de calibración de la escala colorimétrica del algoritmo de cálculo de BoneJ 1.4.3, en la zona central de cabezas mandibulares de un individuo BoNTA 14d, lado Salino **(E)** y lado BoNTA **(F)**. n = 3; promedio +/- SEM; \*: p < 0.05; *Test de t* *pareado* de una

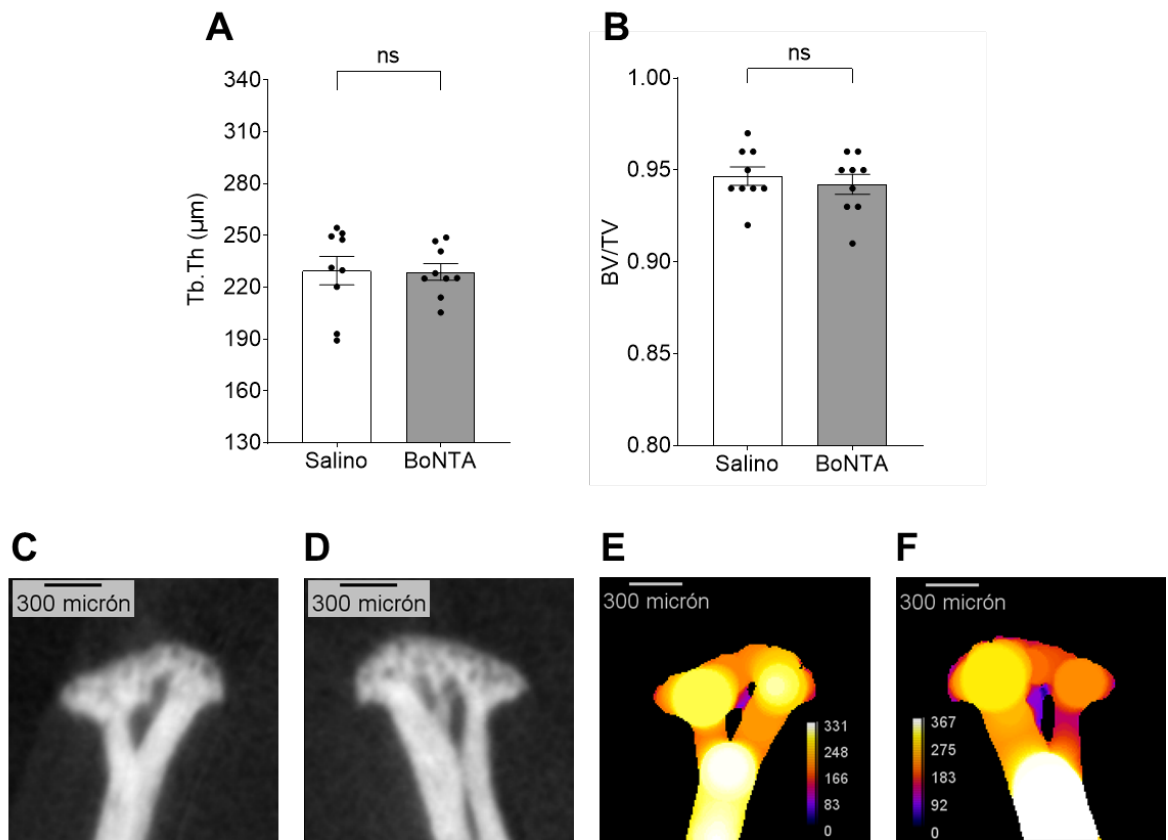
cola. *Abreviaciones: BoNTA, toxina botulínica tipo A; BV/TV, Fracción de Volumen óseo; Tb.Th, Grosor Trabecular.*

## **5.2 La parálisis de músculo masetero inducida por BoNTA promueve pérdida ósea temprana en la cabeza mandibular, desde los 7 días post intervención.**

Con el fin de evaluar si disminuye la calidad ósea de la cabeza mandibular, caracterizada a través de su microestructura, luego de la parálisis de músculo masetero inducida por BoNTA a estadios tempranos, se compararon los parámetros BV/TV y Tb.Th a distintos tiempos post intervención. Se observó que luego de 2 días post inyección con BoNTA en el músculo masetero derecho de ratón, no hubo cambios estadísticamente significativos en la cabeza mandibular del lado BoNTA respecto al lado contralateral intervenido con solución salina (**figura 11A-B**). Las **figuras 11C-D-E-F** muestran imágenes representativas de las capturas 2D de MicroTC en escala de grises (**Figura 11C-D**) de cóndilos provenientes de una misma mandíbula en la zona central de la cada cabeza mandibular de individuos BoNTA 2d, en que no se aprecian cambios cualitativos entre el lado BoNTA y el lado salino, lo cual también se grafica en las imágenes del análisis *Thickness* (**Figura 11E-F**).

A los 7 días post inyección unilateral con BoNTA en el músculo masetero derecho, disminuyeron significativamente los parámetros de BV/TV y Tb.Th. en la cabeza mandibular ipsilateral, en un 3,71 +/- 0,49% y un 19 +/- 1,72%, respectivamente. (**Figura 12A-B**). La disminución del volumen óseo y el grosor de las trabéculas se aprecia claramente en las imágenes representativas de la captura 2D del microTC en escala de grises (**Figura 12C-D**). La disminución del grosor de las trabéculas se aprecia en las imágenes representativas de la captura 2D del análisis *Thickness*; mapa de color con barra de calibración de la escala colorimétrica del algoritmo de cálculo de BoneJ 1.4.3 (**Figura 12E-F**). Las imágenes corresponden a la misma mandíbula en la zona central de cada cabeza mandibular.

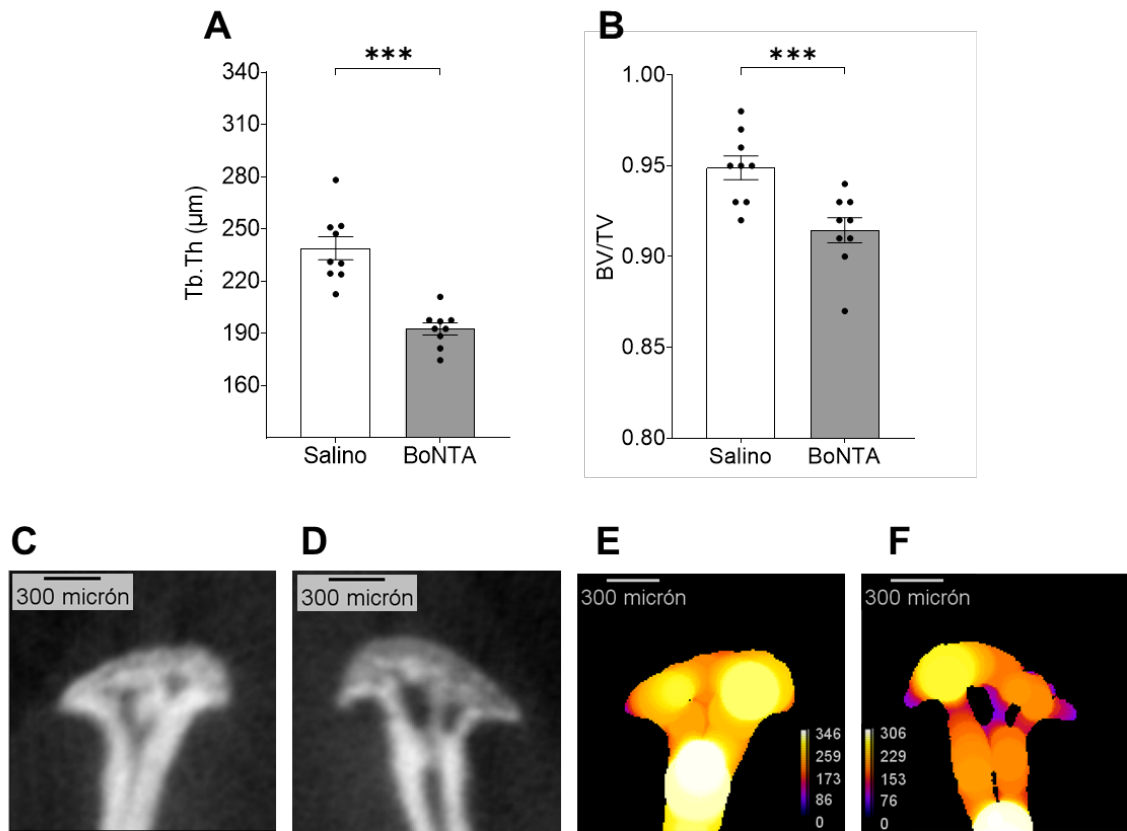
Para evaluar si existe un efecto progresivo en la disminución de la calidad de la microestructura ósea de la cabeza mandibular luego de la parálisis de músculo masetero inducida por BoNTA, se compararon estos parámetros a los distintos tiempos post intervención, como se muestra en la **Figura 13**. El parámetro Tb.Th en las cabezas mandibulares ipsilaterales a la inyección de BoNTA disminuye significativamente entre las 2 y 7 días (**Figura 13A**) y entre los 7 y 14 días (**Figura 13B**) post intervención. Por otro lado, BV/TV disminuyó significativamente entre los 2 y 7 días post intervención (**Figura 13C**) y luego se mantuvo estable hasta los 14 días (**Figura 13D**).



**Figura 11 La microestructura ósea de la cabeza mandibular no está alterada a los 2 días post inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero.**

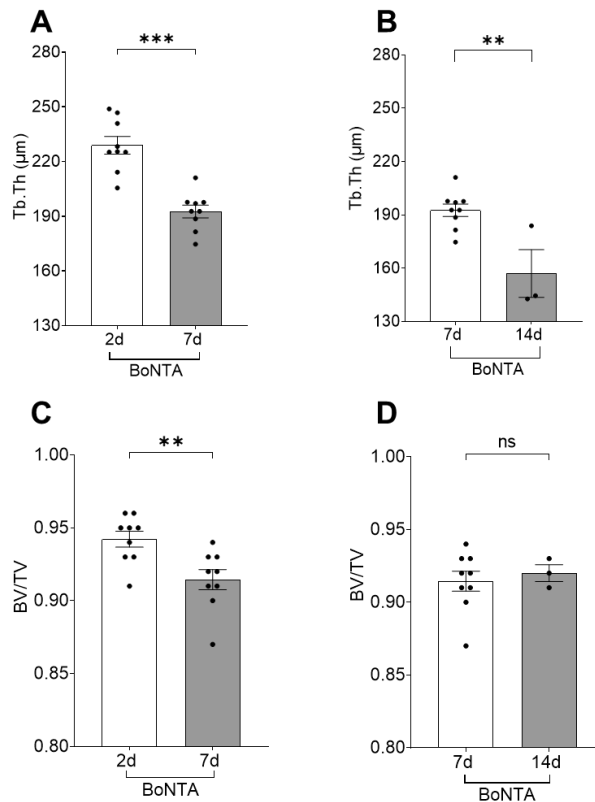
A dos días post intervención no hubo cambios significativos de BV/TV **(A)** ni Tb.Th **(B)** entre la cabeza mandibular del lado inyectado con BoNTA y el contralateral inyectado con solución salina en músculo masetero. **(C-D)**: Imágenes representativas en 2D en escala de grises de cabezas mandibulares de un individuo BoNTA 2d, lado Salino (C) y lado BoNTA (D). **(E-F)**: Imágenes representativas del mapa de color de análisis *Thiknes* con barra de calibración de la escala colorimétrica del algoritmo de cálculo de BoneJ 1.4.3, en la zona central de cabezas mandibulares de un individuo BoNTA 2d, lado salino (E) y lado BoNTA (F). n = 9; promedio +/- SEM; ns: no significativo; *Test de t pareado* de una cola. *Abreviaciones: BoNTA, toxina botulínica tipo A; BV/TV, Fracción de Volumen óseo; Tb.Th, Grosor Trabecular.*





**Figura 12** La microestructura ósea de la cabeza mandibular disminuye a los 7 días post inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero.

Siete días post intervención se reduce significativamente BV/TV (**A**) y Tb.Th (**B**) en la cabeza mandibular ipsilateral (BoNTA) comparado con su contralateral inyectado con solución salina en músculo masetero. (**C-D**): Imágenes representativas en 2D en escala de grises de cabezas mandibulares de un individuo BoNTA 7d, lado salino (**C**) y lado BoNTA (**D**). (**E-F**): Imágenes representativas del mapa de color de análisis *Thickness* con barra de calibración de la escala colorimétrica del algoritmo de cálculo de BoneJ 1.4.3, en la zona central de cabezas mandibulares de un individuo BoNTA 7d, lado salino (**E**) y lado BoNTA (**F**). n = 9; promedio +/- SEM; \*\*\*: p < 0.001; *Test de t pareado* de una cola. *Abreviaciones: BoNTA, toxina botulínica tipo A; BV/TV, Fracción de Volumen óseo; Tb.Th, Grosor Trabecular.*



**Figura 13 La inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero reduce la microestructura ósea de la cabeza mandibular ipsilateral de forma progresiva desde los 7 días.**

Se comparan los valores de Tb.Th y BV/TV de cóndilos adyacentes a músculos maseteros inyectado con BoNTA (ipsilaterales), a distintos tiempos post-intervención **(A)** El Tb.Th del lado intervenido con BoNTA es significativamente menor a los 7 días respecto su homólogo a los 2 días (n=9). **(B)** BV/TV del lado intervenido con BoNTA es significativamente menor a los 7 días respecto su homólogo a los 2 días (n=9). **(C)** El Tb.Th del lado intervenido con BoNTA es significativamente menor a los 14 días respecto su homólogo a los 7 días, n = 3 – 9. **(D)** No hay cambio significativo del BV/TV entre los 7 y 14 días n = 3 – 9.

\*\**: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001; Test de t no pareado de una cola. Se reporta promedio +/- SEM. Abreviaciones: BoNTA, toxina botulínica tipo A; BV/TV, Fracción de Volumen óseo; Tb.Th, Grosor Trabecular.*

## **6. DISCUSIÓN.**

### **6.1 Validación del modelo y calibración del método de análisis**

En el presente trabajo se analizó si a tiempos cortos post inyección de BoNTA (2-7d) en músculo masetero de ratón disminuye la calidad ósea de la cabeza mandibular asociada, tal como se ha descrito por nuestro grupo a 14 días (Balanta-Melo y cols., 2019). Con esta tesis se demuestra por primera vez que la intervención unilateral con BoNTA en músculo masetero reduce la calidad ósea de la cabeza mandibular asociada a los 7 d post intervención, caracterizada por una disminución de dos parámetros de microestructura ósea medidos por microTC: BV/TV y Tb.Th.

En esta tesis se ajustó y validó un nuevo protocolo de análisis de microestructura ósea mediante la cuantificación de dos parámetros óseos (BV/TV y Tb.Th) con el uso de imágenes 2D de escaner por microTC, con tamaño de voxel de 8,43  $\mu\text{m}$ . El grupo BoNTA 14 días, exhibió una disminución significativa de BV/TV y Tb.Th, siendo consistente con reportes previos, donde se observó disminución significativa de los parámetros mencionados a los 14 días con una resolución de 5,11  $\mu\text{m}$  de tamaño de voxel (Balanta-Melo y cols., 2019). A esta temporalidad, el fenotipo de atrofia muscular ya está establecido y la pérdida de tejido óseo es significativa. Por tanto, se pudo establecer que la resolución 8,43  $\mu\text{m}$  y el análisis en BoneJ 1.4.3 con el protocolo desarrollado en el presente trabajo, genera un resultado consistente con reportes previos. Esto cobra relevancia debido a que hay disponibles varios equipos de escaneo para microTC y programas para el análisis de imágenes y, por tanto, distintos protocolos de análisis microestructural. Éstos reportan variabilidad en el resultado de la cuantificación de los parámetros de microestructura ósea; BV/TV es el parámetro que menos varía entre los distintitos métodos de análisis/equipo, mientras que Tb.Th tiende a mayor variabilidad entre los métodos (Steiner y cols., 2020). Aun así, BoneJ 1.4.3, utilizando el protocolo descrito en la presente tesis, resulta un método apropiado para el análisis microestructural, con resultados reproducibles y comparables. Cabe señalar que la comparativa mencionada de los resultados de análisis y toma de imágenes, a diferencia del presente estudio, está realizada en huesos humanos con un tamaño de voxel de 18  $\mu\text{m}$  (Steiner y cols., 2020).

## **6.2 Efectos óseos de BoNTA en músculos de extremidades**

En estudios previos se ha establecido que la fracción de volumen óseo y la arquitectura del hueso trabecular, pueden explicar más del 90% de la resistencia a la fractura del hueso (Borah y cols., 2002; Oftadeh, Entezari y cols., 2015; Oftadeh, Perez-Viloria, y cols., 2015; Samelson y cols., 2019). Estos resultados representan evidencia inédita que constatan disminución del tejido óseo en un estadio temprano de la parálisis inducida por BoNTA en el sistema masticatorio. Este efecto ha sido reportado en un modelo similar, donde se observó una disminución de BV/TV en la tibia a los 3 días post intervención con BoNTA (Botox, Allergan; 2 U/100 g, 20  $\mu$ l volumen final) en los músculos gastrocnemio, sóleo y plantaris de ratones hembras C57 de 16 semanas de edad. En el mismo reporte se constató una disminución significativa de Tb.Th. a los 5 días post intervención (Poliachik y cols., 2010). Cabe señalar que la resolución de la microTC utilizada fue 10.5  $\mu$ m de tamaño de voxel, que es menor a la usada en el presente estudio; sin embargo es suficiente para el análisis de microestructura ósea en ratones (Donnelly, 2011). Por otro lado, fueron analizadas ratones hembras C57BL/6 adultas de 16 semanas de edad a diferencia de esta tesis donde se usaron ratones machos adultos de 8 semanas, lo que podría tener factores confundentes relacionados al sexo (Kim y cols., 2017). Podría existir variabilidad entre hembras y machos, siendo las primeras más susceptibles a cambios óseos, con mayor tendencia a la pérdida de tejido que los machos ( Genant y Lotz, 1994; Nguyen y cols., 2001; Naganathan y Sambrook, 2003; Nieves y cols., 2005; Cawthon, 2011; Lang, 2011; Roberts y cols., 2011; Cianferotti y Brandi, 2014; Alswat, 2017; Konermann, 2019; Hong y Kang, 2020).

El efecto de la reducción de tejido óseo en extremidades inferiores posterior a la parálisis muscular, se ha explicado por una sobrerregulación de la osteoclastogénesis. En un estudio de inyección con BoNTA (2 U/100 g, 10 $\mu$ l volumen total; Allergan) en músculos de extremidad inferior de ratones hembras C57Bl6/J de 16 semanas de edad, se reportó un aumento progresivo de RANKL en la tibia a los 3 días, que no es significativo sino hasta los 7 días luego de la inyección. Luego de 5 días se observó un aumento del 122% del número de osteoclastos respecto al control contralateral salino. Luego de 7 días se observó una disminución

significativa de BV/TV (-51.4%) y Tb.Th (-21.2%) en la tibia del lado inyectado con BoNTA respecto al control salino (Aliprantis et al., 2012).

### **6.3 Comparación del efecto de BoNTA con otros modelos de desuso muscular en extremidades**

La inyección de BoNTA en músculos es uno de varios modelos existentes para estudiar los efectos del desuso muscular sobre el tejido óseo en animales (Brent y cols., 2021). Otro de ellos es la suspensión por cola para generar desuso de extremidades inferiores. En este modelo se ha reportado una disminución significativa de BV/TV (-27%) y Tb.Th (-20%) en el hueso trabecular de tibia y femur de ratones machos C57BL/6J de 16 semanas de edad, a los 14 días de suspensión de cola respecto a individuos controles no suspendidos. En dicha temporalidad reportaron una disminución de las propiedades mecánicas del femur: 13% menos de momento de flexión final, 10% menos tensión y 12% menos rigidez a la flexión (Lloyd y cols., 2014). Esto denota que el porcentaje de reducción de BV/TV y Tb.Th observados en dicho estudio, tiene un efecto biológico en extremidades inferiores. Respecto a este último punto, podemos exponer una limitación de la presente tesis: los hallazgos de reducción de los parámetros analizados, si bien son estadísticamente significativos, no permiten extrapolar a una posible consecuencia biológica de esta reducción. Para el modelo de desuso muscular por suspensión de cola se describe es capaz de reducir la fuerza muscular entre 1 a 3 días luego de la descarga mecánica (Hanson y cols., 2013), mientras que el uso de BoNTA es capaz de generar la parálisis de los músculos de extremidad inferior a las 24 h (Poliachik y cols., 2010), siendo una ventaja comparativa al generar efecto más rápido, además de permitir la generación de un control intraindividuo, lo que no ocurre con la suspensión de cola. Si bien este último método está validado para su uso en estudios de desuso muscular, no es posible de aplicar en el sistema masticatorio para tales efectos; otro modelo propuesto que se puede aplicar en el territorio maxilofacial es la denervación quirúrgica (Brent y cols., 2021). Ésta genera una parálisis total del músculo de interés con la posibilidad de generar un control intraindividuo, pero precisa de expertiz quirúrgica y puede generar disfunción vascular con una consecuente alteración de la circulación sanguínea (Kjell y Olson,

2016). Otra posibilidad de modelo, es la generación de desuso muscular a través de dieta blanda, pero involucra mayor tiempo de experimentación y se reporta mayoritariamente en estudios del desarrollo mandibular (Tanaka y cols., 2007; Enomoto y cols., 2010; N. Hichijo y cols., 2014; Natsuko Hichijo y cols., 2015).

De acuerdo a lo anterior, existe una consistencia de los resultados presentados en este trabajo con otros modelos de desuso muscular en extremidades. Sin embargo, dicha evidencia no es completamente homologable al sistema masticatorio, por las diferencias fisiológicas y estructurales que presentan.

#### **6.4 Antecedentes de efectos óseos posterior a la parálisis de músculos masticatorios inducida por BoNTA en modelo animal.**

En el sistema masticatorio de ratones hembras C57BL/6J (6 semanas) luego de 4 semanas de inyección unilateral de BoNTA (0,3 U / 30  $\mu$ l), se ha observado un 10% de reducción de la fracción de volumen óseo en el lado inyectado versus el control, medido a través de MicroTC (voxel de 6  $\mu$ m). Interesantemente, en este reporte observaron que la disminución de la masa ósea se previene parcialmente cuando se ejecuta carga mecánica estática sobre la ATM por 4 semanas (Dutra y cols., 2018). Esto sugiere que el hueso responde a fuerzas externas, que podrían ser generadas por el músculo; al generarse la parálisis el estímulo desaparece, con la consecuente pérdida de tejido óseo. Por otro lado, a nivel histológico se demostró una disminución significativa del 75% de fosfatasa alcalina, un marcador de formación ósea (van Straalen y cols., 1991), en el lado BoNTA respecto a los controles (Dutra y cols., 2018).

Un estudio en ratas adultas, también reportan una disminución significativa de microestructura ósea con el uso de microTC de alta resolución (tamaño de vóxel de 2,94  $\mu$ m), usando una única de inyección de BoNTA (2U / 0,4 ml; Botox®, Allergan): 1U en músculo masetero y 1U en músculo temporal. A las 4 semanas post intervención se reportó una disminución significativa de BV/TV en el lado inyectado versus los controles intra individuo (inyección salina) y grupos controles propiamente tal también intervenidos pero con inyección de solución salina (Kün-Darbois y cols., 2017). Cabe señalar que la dosis usada es más alta que la usada

en ratones; esto se debe a la diferencia de peso y por tanto, del tamaño del animal y de los músculos de interés. Mientras un ratón masa alrededor de 20 g (Dutra y cols, 2018), una rata puede bordear los 500 g (Kün-Darbois y cols., 2017).

En ratones jóvenes en desarrollo machos y hembras (5 semanas, transgénico Col10a1) se reportó una disminución significativa de BV/TV (21.44%) y Tb.Th (17.4%) respecto a los controles, luego de 4 semanas post inyección de BoNTA en el músculo masetero derecho (0,3U / 30  $\mu$ l), medido con MicroTC con un tamaño de voxel de 6  $\mu$ m. Cabe destacar que la disminución de los parámetros microestructurales puede estar influenciada por la edad de los animales, puesto que al ser individuos en desarrollo, son más sensibles a los cambios en la proliferación celular asociados a la remodelación ósea (Dutra y cols., 2016). El mismo grupo en 2019, reportó en ratones hembra C57BL/6 (6 semanas, equivalente a pubertad) una reducción del 10% de la fracción de volumen óseo a las 4 semanas, que es mantenida a las 8 semanas, denotando que tal efecto no es transitorio (Dutra y Yadav, 2019).

Un punto importante en cuanto a la variabilidad de los resultados obtenidos en los diferentes estudios en modelo murino podría explicarse en diferencias en la selección de la región de Interés (ROI). Kün-Darbois y cols en 2015 especifican un ROI que no comprende el volumen total del cóndilo mandibular; excluyen el contorno cortical, seleccionando sólo lo correspondiente a tejido óseo esponjoso (Kün-Darbois y cols., 2015). En otro estudio previamente mencionado, seleccionan tanto hueso cortical como trabecular estrictamente de la cabeza mandibular, sin abarcar parte del cóndilo mandibular que es captado por la imagen 2D (Dutra y Yadav, 2019). En esta tesis se utilizó la selección del contorno del cóndilo mandibular, abarcando hueso cortical y trabecular de la cabeza mandibular y la primera porción del cóndilo mandibular, esto aumenta el volumen total a analizar.

Los hallazgos de esta tesis cobran relevancia al evidenciar tempranamente la progresión del fenómeno de pérdida ósea posterior a la parálisis muscular, que se acentúa a medida que transcurre el tiempo desde la intervención. En ratas Sprague Dawley hembras (4 semanas) se observó mediante microTC (tamaño de voxel =

9 $\mu$ m) que 10 semanas después de una inyección única bilateral con BoNTA (Botox, Allergan, Irvine, Calif) en músculo masetero hay una disminución del 10.44% de BV/TV y un 12,8% de Tb.Th en la cabeza mandibular (Wang y cols., 2020). Estos resultados dan cuenta de la importancia de la musculatura funcional en la mantención del tejido óseo. En el mismo estudio realizaron inyecciones múltiples espaciadas cada 2 semanas, probablemente para eliminar el fenómeno de “sprouting” (mencionado en el marco teórico). Por tanto, generaron un modelo donde el músculo se denervó químicamente durante 6 semanas, observando que en esta última condición la disminución de BV/TV y Tb.Th es más severa (Wang y cols., 2020) 27.71% y 23.38% respectivamente. Por tanto, inyecciones múltiples y seriadas podrían tener mayor efecto osteopénico que una dosis única.

Sólo existe un estudio donde se reportan cambios microestructurales a un tiempo menor a los previamente mencionados, y es a 14 días post intervención con inyección unilateral con BoNTA, utilizando la misma dosis y cepa de ratón que en esta tesis. En dicho reporte se utilizó un microTC de mayor resolución (tamaño de vóxel 5,11  $\mu$ m) y se evidenció una disminución de BV/TV (16%) y Tb.Th (26%) de forma significativa entre el lado inyectado versus el control salino y grupo control sin intervención (Balanta-Melo y cols., 2019). El porcentaje de reducción de ambos parámetros difieren con la presente tesis. Por ejemplo el BV/TV en el grupo BoNTA 14d se reduce en un 1,21%, en comparación a al 16% reportado previamente, a pesar de ello Tb.Th se reduce de manera consistente y similar en ambos estudios, siendo un 19 +/-1,72 % en la presente y un 26% de disminución reportado con anterioridad. Esto puede deberse al tamaño de la muestra. Dado que el grupo BoNTA 14d en el presente trabajo se realizó sólo para estandarizar y validar la técnica de cuantificación de microestructura ósea, se utilizó un n=3, en comparación al n=8 del reporte previo (Balanta-Melo y cols., 2019). A pesar de la gran diferencia en el porcentaje de disminución, en el presente estudio la reducción fue significativa. Teniendo en cuenta que previamente se estableció que a los 14 días hay diferencias significativas entre los grupos experimentales y control, la significancia encontrada en esta tesis a dicha temporalidad es suficiente para establecer estos resultados como un control positivo. Por otra parte, el control negativo (ratones sin intervención



eutanasiados a los 14 días) no exhibieron cambios en la microestructura de las cabezas mandibulares derecha e izquierda, dando cuenta que los ratones de este modelo generan función masticatoria de forma simétrica.

En el presente estudio se evidenció la disminución de tejido óseo a los 7 días luego de la inyección, resultado que es concordante si pensamos en las bases celulares de la remodelación ósea. Es sabido que para exista una disminución de la masa ósea, debe existir un proceso de remodelación del tejido óseo. Esto implica la diferenciación y activación osteoclástica (Boyle y cols., 2003; Robling y cols., 2006; Clarke, 2008; Charles y Aliprantis, 2014; Katsimbri, 2017;), que ocurre tras la expresión de RANKL por parte de osteoblasto y osteocitos (Boyce y Xing, 2008). Teniendo en cuenta de que existe una sobreexpresión de ARNm de RANKL a los 2 días en la cabeza mandibular en el lado del musculo masetero paralizado con BoNTA (Balanta-Melo y cols., 2018), es probable que ya en dicha temporalidad exista activación de osteoclastos quiescentes (Florencio-Silva y cols., 2015). En el presente reporte pudimos evidenciar que no existe un efecto en el tejido a los 2 días como respuesta aguda al aumento de RANKL; sin embargo, este resultado también podría deberse a que el aumento de RANKL reportado, es medido a través de ARNm y no a nivel de expresión de la proteína funcional. Por otro lado, desde los 2 días comenzarían a diferenciarse nuevos osteoclastos y sobreactivarse los quiescentes, proceso que toma alrededor de 7 días (Marks y Seifert, 1985; McDonald y cols., 2021), donde sí se pudo evidenciar disminución del tejido óseo. Esto da cuenta que posterior a la parálisis muscular con dosis única en músculo masetero ocurre progresivamente un deterioro del tejido óseo, que ya es significativo desde los 7 días. No se pudo encontrar diferencias significativas de BV/TV entre los lados intervenidos de 7 y 14 días, a diferencia de Tb.Th que sí tuvo una disminución progresiva. Nuevamente esto puede deberse al bajo n utilizado a los 14 días, que arroja un cambio en la magnitud de BV/TV entre lado BoNTA y salino que, si bien es significativo intraindividuo, es probable que no sea suficiente para que la comparación interindividuo sea significativa. Es esperable que con un n mayor el BV/TV a los 14 días se acerque al 16% de disminución que fue reportado previamente en nuestro grupo (Balanta-Melo y cols., 2019), lo que podría lograr la

significancia, teniendo en cuenta que en esta tesis se reporta una disminución de 3,71 +/- 0,49% del BV/TV a los 7 días con un n=9.

Los efectos observados en ratones y ratas son consistentes con los observados en modelo de conejo, donde se utilizó inyección de BoNTA (Botox®, Allergan, 10U / 0,25 ml) en músculo masetero y se midió Tb.Th (entre otros) a las 4 y 12 semanas mediante microTC. Se observó una disminución significativa de Tb.Th a las 4 semanas y recuperación a parámetros similares a los basales a las 12 semanas (Rafferty y cols., 2012).

Existen distintos modelos para el estudio del desuso muscular, siendo los estudios en modelo murino los más utilizados (Brent y cols., 2021). Estos son animales representativos de estudio del desarrollo y fisiología de la articulación temporomandibular en los mamíferos a nivel preclínico, siendo de interés desde el punto de vista de la masticación y su influencia en los problemas oromandibulares desde lo experimental (Okayasu y cols., 2003; Suzuki y Iwata, 2016; Liang y cols., 2016). Los roedores presentan cambios de forma y tamaño de la mandíbula durante su desarrollo como resultado de la erupción dental y el estímulo biomecánico de los músculos masticatorios, lo que constituye un proceso importante en el entendimiento del desarrollo craneomandibular humano (Swiderski y Zelditch, 2013).

### **6.5 Dosis de BoNTA y su equivalencia en diferentes estudios.**

Una dificultad a la hora de comparar los resultados de nuestro estudio con la literatura, es que los distintos estudios de parálisis con BoNTA utilizan distintas dosis, y distintas marcas comerciales de toxina, que no tienen equivalencia en su dosificación. En cuanto a la dosis de BoNTA utilizada, en ratones machos adultos, una dosis de 0,1U de BoNTA (Botox Vista; Allergan) es suficiente para reducir significativamente la actividad electromiográfica del músculo masetero, 24 h post intervención (Yoshimi y cols., 2017). Dado que 1U equivale a la LD50 en un ratón suizo de 20 g (1 ng / Kg) (Montecucco y Molgó, 2005), la dosis implementada en este estudio, 0,2U (0,2 ng/kg), resulta segura para la salud general de los animales,

suficiente para generar la atrofia del músculo masetero y consistente con estudios publicados durante el desarrollo del modelo pre-clínico (Dutra et al., 2016; Yoshimi y cols., 2017; Dutra et al., 2018). Teniendo en cuenta que las diferentes marcas comerciales de BoNTA no son intercambiables en términos de dosis (Doube y cols., 2010), es relevante establecer que la neurotoxina utilizada en el desarrollo de esta tesis corresponde Onabotulinumtoxin A (Botox®, Allergan Chile), la cual es producida por el mismo laboratorio y bajo el mismo estandar de equivalencia de dosis implementado para los productos utilizados previamente en ratones adultos para inducir parálisis y atrofia del músculo masetero en un rango entre 0,1U y 0,3U (Dutra et al., 2016; Yoshimi y cols., 2017; Dutra y cols., 2018), además de ser consistente con la neurotoxina utilizada en estudios con ratas adultas ( Tsai y cols., 2010; Kün-Darbois et al., 2015; Kün-Darbois y cols., 2017; Shi y cols., 2018) y conejos adultos (Rafferty y cols., 2012; Matthys y cols., 2015). Adicionalmente, en humanos algunos de los reportes sobre el uso de BoNTA en el músculo masetero se enmarcan entre 5U y 70U por músculo (Langenbach y cols., 2003; Miller y Clarkson, 2016; De la Torre Canales y cols., 2018; Ondo y cols., 2018; ). Con base en la masa promedio del músculo masetero humano (Van Eijden y cols., 1997), una dosis alta de BoNTA (70U) equivaldría aproximadamente a 3,3 U/g de músculo masetero, lo cual se corresponde con la dosis utilizada en este estudio (0,2U en 10 µl) normalizada por la masa del masetero de ratón para un promedio de 3 U/g. La utilización de la misma neurotoxina, por lo tanto, permite evaluar y contrastar la dosis usada en relacion con sus efectos entre diferentes especies y diseños experimentales.

#### **6.6 Antecedentes de efectos óseos posterior a la parálisis de músculos masticatorios inducida por BoNTA en humanos.**

Existen obvias diferencias en la temporalidad de la remodelación ósea entre roedores y humanos; los primeros exhiben un metabolismo comparativamente más rápido que los humanos (Jilka, 2013). Se estima que la remodelación ósea en ratones se completa alrededor de los 14 días (Weinstein y cols., 1998), mientras que en humanos toma un total aproximado de 6-9 meses (Han y cols., 1997).

En base a lo anterior podemos esperar que la disminución de tejido óseo posterior a la parálisis muscular del masetero se observe a mayor tiempo en humanos. Existen reportes en humanos que evidencian cambios en la forma de la mandíbula. Uno de ellos evidencia que posterior a la inyección bilateral de BoNTA (Neuronox; Medytox Inc.) en hombres y mujeres adultos en músculo masetero (100 IU / 2 mL), hay una disminución significativa del volumen del ángulo mandibular, medido con Tomografía Computarizada ConeBeam (CBTC), comparando el estado previo a la intervención versus 6 meses post intervención (Lee y cols., 2017). Cabe destacar que la toxina empleada en tal estudio (Neuronox; Medytox Inc., Seoul, Korea) no es la utilizada en los reportes en modelo animal y la dosis usada no es suficiente para generar una suficiente disminución de la fuerza del masetero. Un estudio piloto en 2014, evidenció mediante CBTC en mujeres adultas (45 años en promedio de edad), una disminución visual y subjetiva (análisis ciego por parte de 2 radiólogos maxilofaciales) de la densidad ósea en el cóndilo mandibular de pacientes que fueron expuestas al tratamiento con BoNTA para dolor miofascial, respecto a pacientes que no recibieron intervención con la toxina, visualizado de 6 a 10 semanas post inyección (Raphael y cols., 2014). En otro reporte prospectivo se evidenció adelgazamiento de la cortical y cambios en la textura superficial del cóndilo mandibular, medido por CBTC a los 12 meses luego de la intervención con BoNTA (Botox, Allergan, bilateral, 30-100U en masetero, 20U en temporal), respecto al estado inicial de los pacientes (Kahn y cols., 2020). En otro reporte retrospectivo, con un total de 77 mujeres (39 jóvenes y 38 postmenopáusicas), se constató que luego de 12 meses post intervención con BoNTA de manera bilateral en músculo masetero (20 unidades) y temporal (25 unidades) en 2 dosis espaciadas cada 6 meses, hubo una disminución del grosor cortical del cabeza mandibular medido por Tomografía Computarizada (30 $\mu$ m de tamaño de vóxel), al ser comparado con el estado inicial previa a la intervención (Hong y Kang, 2020). Estos resultados se contraponen con otro reporte donde no se encontraron diferencias significativas entre el estado basal y luego de 1 año post intervención, midiendo mediante CBTC la densidad ósea y el volumen de la cabeza mandibular; estos resultados se pueden deber al tamaño de muestra menor (n=35 mujeres adultas)

que los reportes anteriores. Por otro lado, la dosis de BoNTA utilizada no fue estándar para todos los participantes, ni tampoco las veces de exposición a la toxina fue la misma entre individuos (Raphael y cols., 2020), sobretodo la última variable podría arrojar diferentes resultados (Dressler y Saberi, 2005). Dichas discrepancias en estudios clínicos dan cuenta que los efectos deletéreos de la inyección con BoNTA en el tejido óseo mandibular es un tema de interés actual y de emergente estudio.

Este trabajo genera bases para que posteriormente se estudie el mecanismo molecular y celular que subyace a la coordinación musculo/hueso que se expresa en un fenotipo de atrofia muscular y disminución de masa ósea posterior a la parálisis muscular. En el tejido óseo estudiado en el presente trabajo de tesis se evidenció el curso temporal del fenómeno descrito desde un tiempo temprano. Además de ser un engranaje relevante dentro de una investigación mayor, aporta en sí mismo al conocimiento de los efectos óseos agudos de la intervención muscular con BoNTA a nivel del cóndilo mandibular.

## **7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES**

### **7.1 Conclusiones**

La parálisis unilateral del músculo masetero inducida por BoNTA, reduce temprana y progresivamente la calidad ósea de la cabeza mandibular del lado inyectado, caracterizada por la disminución de parámetros microestructurales (BV/TV y Tb.Th), desde los 7 días post intervención.

Estos resultados evidencian un posible efecto secundario de la utilización de BoNTA en músculo masetero que conlleva a un proceso de osteopenia de la cabeza mandibular cuyo mecanismo molecular y celular no está completamente descrito. Esto es relevante para la investigación clínica odontológica a tener en cuenta para futuros estudios de potencial daño, además como antecedente a informar a los pacientes intervenidos con esta toxina.

### **7.2 Proyecciones**

Respecto a la calidad ósea a nivel microestructural y su repercusión biológica ¿La disminución de la calidad ósea caracterizada a través de la microestructura ósea tendrá efectos biológicos y clínicos para los pacientes tratados con BoNTA en músculos masticatorios? Pensado en el diagnóstico de patologías osteopénicas ¿La caracterización de la microestructura ósea mediante tomografía computarizada podrá ser un método diagnóstico de osteopenia a nivel clínico?

En cuanto al uso de BoNTA en pacientes con patología osteopénica de base ¿Se producirá un deterioro aumentado del tejido óseo de la cabeza mandibular en pacientes tratados con BoNTA en músculo masticatorios que presentan una patología osteopénica concomitante?

En cuanto a intervenciones dermatológicas ¿existen consecuencias osteopénicas maxilofaciales con las inyecciones múltiples de BoNTA con fines estéticos?

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliprantis, A. O., Stolina, M., Kostenuik, P. J., Poliachik, S. L., Warner, S. E., Bain, S. D., & Gross, T. S. (2012). Transient muscle paralysis degrades bone via rapid osteoclastogenesis . *The FASEB Journal*, 26(3), 1110–1118. <https://doi.org/10.1096/fj.11-196642>
- Allergan. (2019). *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*. [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
- Allergan. (2021). *Submitted By Allergan on 2/1/21 Highlights of Prescribing Information*. [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
- Alswat, K. A. (2017). Gender Disparities in Osteoporosis. *Journal of Clinical Medicine Research*, 9(5), 382–387. <https://doi.org/10.14740/jocmr2970w>
- Andersen, T. L., Sondergaard, T. E., Skorzynska, K. E., Dagnaes-Hansen, F., Plesner, T. L., Hauge, E. M., Plesner, T., & Delaisse, J. M. (2009). A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *American Journal of Pathology*, 174(1), 239–247. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080627>
- Aravena, P. C., Arias, R., Aravena-Torres, R., & Seguel-Galdames, F. (2016). Prevalencia de trastornos temporomandibulares en adolescentes del Sur de Chile, año 2015. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 9(3), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.09.005>
- Ausk, B. J., Huber, P., Poliachik, S. L., Bain, S. D., Srinivasan, S., & Gross, T. S. (2012). Cortical bone resorption following muscle paralysis is spatially heterogeneous. *Bone*, 50(1), 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.08.028>
- Aziz, J., Awal, D., & Ayliffe, P. (2017). Resorption of the mandibular condyle after injections of botulinum toxin A. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 55(9), 987–988. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2017.09.010>
- Bagi, C. M., Berryman, E., & Moalli, M. R. (2011). *Skeletal anatomy of lab animals*. 61(1), 76–85.
- Balanta-Melo, J., & Buvinic, S. (2018). Mandibular bone loss: A hidden side effect of botulinum toxin type A injection in masticatory muscles. *Journal of Oral*

- Research*, 7(2), 44–46. <https://doi.org/10.17126/joralres.2018.014>
- Balanta-Melo, J., Toro-Ibacache, V., Kupczik, K., & Buvinic, S. (2019). Mandibular bone loss after masticatory muscles intervention with botulinum toxin: An approach from basic research to clinical findings. *Toxins*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/toxins11020084>
- Balanta-Melo, J., Toro-Ibacache, V., Torres-Quintana, M. A., Kupczik, K., Vega, C., Morales, C., Hernández-Moya, N., Arias-Calderón, M., Beato, C., & Buvinic, S. (2018). Early molecular response and microanatomical changes in the masseter muscle and mandibular head after botulinum toxin intervention in adult mice. *Annals of Anatomy*, 216, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.11.009>
- Balanta-Melo, J., Torres-Quintana, M. A., Bemann, M., Vega, C., González, C., Kupczik, K., Toro-Ibacache, V., & Buvinic, S. (2019). Masseter muscle atrophy impairs bone quality of the mandibular condyle but not the alveolar process early after induction. *Journal of Oral Rehabilitation*, 46(3), 233–241. <https://doi.org/10.1111/joor.12747>
- Baverstock, H., Jeffery, N. S., & Cobb, S. N. (2013). The morphology of the mouse masticatory musculature. *Journal of Anatomy*, 223(1), 46–60. <https://doi.org/10.1111/joa.12059>
- Bellido, T., Plotkin, L. I., & Bruzzaniti, A. (2013). Bone Cells. *Basic and Applied Bone Biology*, 14, 27–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00002-2>
- Bender, S. D. (2012). Temporomandibular disorders, facial pain, and headaches. *Headache*, 52(SUPPL. 1), 22–25. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2012.02134.x>
- Bettis, T., Kim, B. J., & Hamrick, M. W. (2018). Impact of muscle atrophy on bone metabolism and bone strength: implications for muscle-bone crosstalk with aging and disuse. *Osteoporosis International*, 29(8), 1713–1720. <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4570-1>
- Blaauw, B., Schiaffino, S., & Reggiani, C. (2013). Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Comprehensive Physiology*, 3(4), 1645–1687. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130009>
- Blair, H. C., Larrouture, Q. C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Tuan, R. S.,



- Robinson, L. J., Schlesinger, P. H., & Nelson, D. J. (2017). Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 23(3), 268–280. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0454>
- Borah, B., Dufresne, T. E., Chmielewski, P. A., Gross, G. J., Prenger, M. C., & Phipps, R. J. (2002). Risedronate preserves trabecular architecture and increases bone strength in vertebra of ovariectomized minipigs as measured by three-dimensional microcomputed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(7), 1139–1147. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.7.1139>
- Boruah, S., Subit, D. L., Paskoff, G. R., Shender, B. S., Crandall, J. R., & Salzar, R. S. (2017). Influence of bone microstructure on the mechanical properties of skull cortical bone – A combined experimental and computational approach. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 65, 688–704. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.09.041>
- Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., & Müller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(7), 1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
- Bouxsein, M. L., & Karasik, D. (2006). Bone geometry and skeletal fragility. *Current Osteoporosis Reports*, 4(2), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s11914-006-0002-9>
- Boyce, B. F., & Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473(2), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.018>
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). *and Activation*. 423(May), 337–342.
- Brent, M. B., Brüel, A., & Thomsen, J. S. (2021). A Systematic Review of Animal Models of Disuse-Induced Bone Loss. *Calcified Tissue International*, 108(5), 561–575. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00799-9>
- Brotto, M., & Bonewald, L. (2015). Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*, 80, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.010>
- Brotto, M., & Johnson, M. L. (2014). Endocrine crosstalk between muscle and bone. *Current Osteoporosis Reports*, 12(2), 135–141. <https://doi.org/10.1007/s11914->

014-0209-0

- Burr, D., & Akkus, O. (2014). *Chapter 1 - Bone Morphology and Organization. Basic and Applied Bone Biology* (Academic P).
- Buvinic, S., Kupczik, K., Va, W., Beato, C., & Toro-ibacache, V. (2021). Muscle-Bone Crosstalk in the Masticatory System: From Biomechanical to Molecular Interactions. *Frontiers in Endocrinology*, *11*(March), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.606947>
- Cabahug-Zuckerman, P., Frikha-Benayed, D., Majeska, R. J., Tuthill, A., Yakar, S., Judex, S., & Schaffler, M. B. (2016). Osteocyte Apoptosis Caused by Hindlimb Unloading is Required to Trigger Osteocyte RANKL Production and Subsequent Resorption of Cortical and Trabecular Bone in Mice Femurs. *Journal of Bone and Mineral Research*, *31*(7), 1356–1365. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2807>
- Caeiro, J. R., González, P., & Guede, D. (2013). Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, *5*(2), 99–108. <https://doi.org/10.4321/s1889-836x2013000200007>
- Caeiro Rey, J. R., Dapía Robleda, S., Vaquero Cervino, E., Roca Ruiz, L., & Blanco Ramos, M. A. (2005). Bone strength determinants. *Revista Espanola de Enfermedades Metabolicas Oseas*, *14*(4), 67–74. [https://doi.org/10.1016/s1132-8460\(05\)72686-6](https://doi.org/10.1016/s1132-8460(05)72686-6)
- Capra, N. F., Bernanke, J. M., & Porter, J. D. (1991). Ultrastructural changes in the masseter muscle of *Macaca fascicularis* resulting from intramuscular injections of botulinum toxin type A. *Archives of Oral Biology*, *36*(11), 827–836. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(91\)90032-P](https://doi.org/10.1016/0003-9969(91)90032-P)
- Casas, M., Buvinic, S., & Jaimovich, E. (2014). ATP signaling in skeletal muscle: From fiber plasticity to regulation of metabolism. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *42*(3), 110–116. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000017>
- Cawthon, P. M. (2011). Gender differences in osteoporosis and fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *469*(7), 1900–1905. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-1780-7>
- Cecilia Cortés-Monroy, H., & Soledad Soza, B. (2014). Usos prácticos de la toxina

- botulínica en adultos en medicina física y rehabilitación. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(2), 225–236. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70033-1](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70033-1)
- Cediel, J., Cárdenas, M., García, A., Chuaire, L., Payán, C., Villegas, V., & Sánchez, C. (2009). *Manual de histología: Tejidos fundamentales*. [https://books.google.cl/books?hl=en&lr=&id=ca2kuO4iwM0C&oi=fnd&pg=PA15&dq=info:GdKsh\\_C3YGYJ:scholar.google.com&ots=oq15lm77--&sig=IC335ti-zSXq5CDQv8lzZLvpuTM&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cl/books?hl=en&lr=&id=ca2kuO4iwM0C&oi=fnd&pg=PA15&dq=info:GdKsh_C3YGYJ:scholar.google.com&ots=oq15lm77--&sig=IC335ti-zSXq5CDQv8lzZLvpuTM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Charles, J. F., & Aliprantis, A. O. (2014). Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med*, 20(8), 449–459. <https://doi.org/10.1002/nme.2110>
- Chong, D. A., & Evans, C. A. (1982). Histologic study of the attachment of muscles to the rat mandible. *Archives of Oral Biology*, 27(7), 519–527. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(82\)90065-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(82)90065-6)
- Cianferotti, L., & Brandi, M. L. (2014). Muscle-bone interactions: Basic and clinical aspects. *Endocrine*, 45(2), 165–177. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-0026-8>
- Cioffi, I., Gallo, L. M., Palla, S., Erni, S., & Farella, M. (2012). Macroscopic analysis of human masseter compartments assessed by magnetic resonance imaging. *Cells Tissues Organs*, 195(5), 465–472. <https://doi.org/10.1159/000329503>
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3 Suppl 3, 131–139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Cobos A, Segade A, F. I. (2001). Muscle fibre types in the suprahyoid muscles of the rat. *Journal of Anatomy*, 198(3), 283–294. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2001.19830283.x>
- Colaiani, G., Mongelli, T., Colucci, S., Cinti, S., & Grano, M. (2016). Crosstalk Between Muscle and Bone Via the Muscle-Myokine Irisin. *Current Osteoporosis Reports*, 14(4), 132–137. <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0313-4>
- Crockett, J. C., Rogers, M. J., Coxon, F. P., Hocking, L. J., & Helfrich, M. H. (2011). Bone remodelling at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(7), 991–998. <https://doi.org/10.1242/jcs.063032>
- De la Torre Canales, G., Pinzón, N. A., Lora, V. M., Peroni, L., Sanchez-Ayala, A.,

- Gomes, A. F., Manfredini, D., Neto, F. H., & Rizzati-Barbosa, C. (2018). Establishing a protocol for botulinum toxin type A applications in chronic masticatory muscle pain, based on its efficacy and safety: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Toxicon*, *156*(2018), S20–S21. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.055>
- De Paiva, A., Meunier, F. A., Molgó, J., Aoki, K. R., & Dolly, J. O. (1999). Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: Biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(6), 3200–3205. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3200>
- Díaz Walter , Lucía Carmen, M. C. (2012). Prevalencia y necesidad de tratamiento de trastornos temporomandibulares en una población Chilena. *Archivo Médico de Camagüey*, *16*(5), 602–609.
- Donnelly, E. (2011). Methods for assessing bone quality: A review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *469*(8), 2128–2138. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1702-0>
- Doube, M., Klosowski, M. M., Arganda-Carreras, I., Cordelières, F. P., Dougherty, R. P., Jackson, J. S., Schmid, B., Hutchinson, J. R., & Shefelbine, S. J. (2010). BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone*, *47*(6), 1076–1079. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.08.023>
- Dressler, D., & Saberi, F. A. (2005). Botulinum toxin: Mechanisms of action. *European Neurology*, *53*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1159/000083259>
- Dutra, E. H., O'Brien, M. H., Lima, A., Kalajzic, Z., Tadinada, A., Nanda, R., & Yadav, S. (2016). Cellular and matrix response of the mandibular condylar cartilage to botulinum toxin. *PLoS ONE*, *11*(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164599>
- Dutra, E. H., O'Brien, M. H., Logan, C., Tadinada, A., Nanda, R., & Yadav, S. (2018). Loading of the Condylar Cartilage Can Rescue the Effects of Botox on TMJ. *Calcified Tissue International*, *103*(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0385-x>
- Dutra, E. H., & Yadav, S. (2019). The effects on the mandibular condyle of Botox

- injection into the masseter are not transient. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 156(2), 193–202.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2018.08.023>
- Enomoto, A., Watahiki, J., Yamaguchi, T., Irie, T., Tachikawa, T., & Maki, K. (2010). Effects of mastication on mandibular growth evaluated by microcomputed tomography. *European Journal of Orthodontics*, 32(1), 66–70.  
<https://doi.org/10.1093/ejo/cjp060>
- Everts, V., Delaissié, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., & Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(1), 77–90. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.1.77>
- Felsenthal, N., & Zelzer, E. (2017). Mechanical regulation of musculoskeletal system development. *Development (Cambridge)*, 144(23), 4271–4283.  
<https://doi.org/10.1242/dev.151266>
- Fitzgerald RH, K. H. y M. A. (2004). *Ortopedia: Tomo 1 (Vol1.)*.  
<https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4201/Ortopedia.html>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 421746.  
[https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(05\)80182-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(05)80182-6)
- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H. J. A., & Duarte, J. A. (2014). Bone quality: The determinants of bone strength and fragility. *Sports Medicine*, 44(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0100-7>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics*, 45(2), 183–195.  
<https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Genant, K., & Lotz, C. (s/f). *In Bone Density, and Fracture*.
- Guerrero, L., Coronado, L., Maulén, M., Meeder, W., Henríquez, C., & Lovera, M. (2017). Prevalencia de trastornos temporomandibulares en la población adulta beneficiaria de atención primaria en salud del servicio de Salud Valparaíso, San Antonio. *Avances en Odontoestomatología*, 33(3), 113–120.

- Guo, B., Zhang, Z. K., Liang, C., Li, J., Liu, J., Lu, A., Zhang, B. T., & Zhang, G. (2017). Molecular Communication from Skeletal Muscle to Bone: A Review for Muscle-Derived Myokines Regulating Bone Metabolism. *Calcified Tissue International*, *100*(2), 184–192. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0209-4>
- Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z., & Zou, W. (2018). Paracrine and endocrine actions of bone - The functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Research*, *6*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0019-6>
- Han, Z. H., Palnitkar, S., Sudhaker Rao, D., Nelson, D., & Parfitt, A. M. (1997). Effects of ethnicity and age or menopause on the remodeling and turnover of iliac bone: Implications for mechanisms of bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research*, *12*(4), 498–508. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.4.498>
- Hanson, A. M., Harrison, B. C., Young, M. H., Stodieck, L. S., & Ferguson, V. L. (2013). Longitudinal characterization of functional, morphologic, and biochemical adaptations in mouse skeletal muscle with hindlimb suspension. *Muscle and Nerve*, *48*(3), 393–402. <https://doi.org/10.1002/mus.23753>
- Hichijo, N., Kawai, N., Mori, H., Sano, R., Ohnuki, Y., Okumura, S., Langenbach, G. E. J., & Tanaka, E. (2014). Effects of the masticatory demand on the rat mandibular development. *Journal of Oral Rehabilitation*, *41*(8), 581–587. <https://doi.org/10.1111/joor.12171>
- Hichijo, Natsuko, Tanaka, E., Kawai, N., Van Ruijven, L. J., & Langenbach, G. E. J. (2015). Effects of decreased occlusal loading during growth on the mandibular bone characteristics. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129290>
- Hirschfeld, H. P., Kinsella, R., & Duque, G. (2017). Osteosarcopenia: where bone, muscle, and fat collide. *Osteoporosis International*, *28*(10), 2781–2790. <https://doi.org/10.1007/s00198-017-4151-8>
- Hong, S. W., & Kang, J. H. (2020). Decreased mandibular cortical bone quality after botulinum toxin injections in masticatory muscles in female adults. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60554-w>
- Huang, W., Foster, J. A., & Rogachefsky, A. S. (2000). Pharmacology of botulinum

- toxin. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(2 1), 249–259.  
<https://doi.org/10.1067/mjd.2000.105567>
- Huo, S. H., Sun, C., Liu, G. R., & Ao, R. H. (2021). Bone remodeling analysis for a swine skull at continuous scale based on the smoothed finite element method. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 118(August 2020).  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104444>
- Ibrahim, A., Bulstrode, N. W., Whitaker, I. S., Eastwood, D. M., Dunaway, D., & Ferretti, P. (2017). Nanotechnology for Stimulating Osteoprogenitor Differentiation. *The Open Orthopaedics Journal*, 10(1), 849–861.  
<https://doi.org/10.2174/1874325001610010849>
- Jilka, R. L. (2013). The relevance of mouse models for investigating age-related bone loss in humans. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 68(10), 1209–1217.  
<https://doi.org/10.1093/gerona/glt046>
- Kahn, A., Kün-Darbois, J. D., Bertin, H., Corre, P., & Chappard, D. (2020). Mandibular bone effects of botulinum toxin injections in masticatory muscles in adult. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 129(2), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.03.007>
- Karsenty, G., & Mera, P. (2018). Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle. *Bone*, 115, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.04.006>
- Katsimbri, P. (2017). The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 26(6), 1–5. <https://doi.org/10.1111/ecc.12740>
- Kellesarian, S. V., Al-Kheraif, A. A., Vohra, F., Ghanem, A., Malmstrom, H., Romanos, G. E., & Javed, F. (2016). Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review. *Cytokine*, 77, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.11.005>
- Kim, D. G., Haghighi, A., Kwon, H. J., Coogan, J. S., Nicolella, D. P., Johnson, T. B., Kim, H. D., Kim, N., & Agnew, A. M. (2017). Sex dependent mechanical properties of the human mandibular condyle. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 71(December 2016), 184–191.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.03.012>

- Kim, H. J., Tak, H. J., Moon, J. W., Kang, S. H., Kim, S. T., He, J., Piao, Z., & Lee, S. H. (2019). Mandibular vertical growth deficiency after botulinum-induced hypotrophy of masticatory closing muscles in juvenile nonhuman primates. *Frontiers in Physiology*, 10(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00496>
- Kini, U., & Nandeesh, B. (2012). *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*.
- Kjell, J., & Olson, L. (2016). Rat models of spinal cord injury: From pathology to potential therapies. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(10), 1125–1137. <https://doi.org/10.1242/dmm.025833>
- Konermann, S. (2019). 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiology & behavior*, 173(3)(1), 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.015.Effects>
- Korfage, J. A. M., Koolstra, J. H., Langenbach, G. E. J., & Van Eijden, T. M. G. J. (2005). Fiber-type composition of the human jaw muscles - (Part 1) Origin and functional significance of fiber-type diversity. *Journal of Dental Research*, 84(9), 774–783. <https://doi.org/10.1177/154405910508400901>
- Krasnoff, J., & Painter, P. (1999). The physiological consequences of bed rest and inactivity. *Advances in Renal Replacement Therapy*, 6(2), 124–132. [https://doi.org/10.1016/S1073-4449\(99\)70030-0](https://doi.org/10.1016/S1073-4449(99)70030-0)
- Kün-Darbois, J. D., Libouban, H., & Chappard, D. (2015). Botulinum toxin in masticatory muscles of the adult rat induces bone loss at the condyle and alveolar regions of the mandible associated with a bone proliferation at a muscle enthesis. *Bone*, 77, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.03.023>
- Kün-Darbois, J. D., Manero, F., Rony, L., & Chappard, D. (2017). Contrast enhancement with uranyl acetate allows quantitative analysis of the articular cartilage by microCT: Application to mandibular condyles in the BTX rat model of disuse. *Micron*, 97, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.03.008>
- Kwan, P. (2015). Osteoporosis: From osteoscience to neuroscience and beyond. *Mechanisms of Ageing and Development*, 145, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.02.001>
- Lai, X., Price, C., Lu, X. L., & Wang, L. (2014). Imaging and quantifying solute



- transport across periosteum: Implications for muscle-bone crosstalk. *Bone*, 66, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.002>
- Lang, T. F. (2011). The Bone-Muscle Relationship in Men and Women. *Journal of Osteoporosis*, 2011, 1–4. <https://doi.org/10.4061/2011/702735>
- Langenbach, G., Van De Pavert, S., Savalle, W., Korfage, H., & Van Eijden, T. (2003). Influence of food consistency on the rabbit masseter muscle fibres. *European Journal of Oral Sciences*, 111(1), 81–84. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2003.00008.x>
- Larsson, L., & Moss, R. L. (1993). Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *The Journal of Physiology*, 472(1), 595–614. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019964>
- Lee, H. J., Kim, S. J., Lee, K. J., Yu, H. S., & Baik, H. S. (2017). Repeated injections of botulinum toxin into the masseter muscle induce bony changes in human adults: A longitudinal study. *Korean Journal of Orthodontics*, 47(4), 222–228. <https://doi.org/10.4041/kjod.2017.47.4.222>
- León, I. G., Lima, K. F., González, G., & Núñez, M. O. (2005). Algunas consideraciones sobre los trastornos temporomandibulares. *Revista Cubana de Estomatología*, 42(3), 28–35.
- Lewis, M., Hunt, N., & Shah, R. (2013). Masticatory muscle structure and function. En *Craniofacial Muscles: A New Framework for Understanding the Effector Side of Craniofacial Muscle Control* (pp. 91–109). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4466-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4466-4_6)
- Liang, W., Li, X., Gao, B., Gan, H., Lin, X., Liao, L., & Li, C. (2016). Observing the development of the temporomandibular joint in embryonic and post-natal mice using various staining methods. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(2), 481–489. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2937>
- Lloyd, S. A., Lang, C. H., Zhang, Y., Paul, E. M., Laufenberg, L. J., Lewis, G. S., & Donahue, H. J. (2014). Interdependence of muscle atrophy and bone loss induced by mechanical unloading. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(5), 1118–1130. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2113>

- Marks, S. C., & Seifert, M. F. (1985). The lifespan of osteoclasts: Experimental studies using the giant granule cytoplasmic marker characteristic of beige mice. *Bone*, 6(6), 451–455. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(85\)90223-6](https://doi.org/10.1016/8756-3282(85)90223-6)
- Martin, R., Burr, D., Sharkey, N., & Fyhrie, D. (2015). *Skeletal Tissue Mechanics*. NY: Springer New York.
- Matic, D. B., Yazdani, A., Wells, R. G., Lee, T. Y., & Gan, B. S. (2007). The Effects of Masseter Muscle Paralysis on Facial Bone Growth. *Journal of Surgical Research*, 139(2), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.09.003>
- Matthys, T., Ho Dang, H. A., Rafferty, K. L., & Herring, S. W. (2015). Bone and cartilage changes in rabbit mandibular condyles after 1 injection of botulinum toxin. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 148(6), 999–1009. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2015.05.034>
- McCarthy, E. F. (2011). Perspective: Skeletal complications of space flight. *Skeletal Radiology*, 40(6), 661–663. <https://doi.org/10.1007/s00256-011-1100-z>
- McDonald, M. M., Kim, A. S., Mulholland, B. S., & Rauner, M. (2021). New Insights Into Osteoclast Biology. *JBMR Plus*, 5(9), 1–10. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10539>
- Miller, J., & Clarkson, E. (2016). Botulinum Toxin Type A. Review and Its Role in the Dental Office. *Dental Clinics of North America*, 60(2), 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.11.007>
- Mizoguchi, I., Toriya, N., & Nakao, Y. (2013). Growth of the mandible and biological characteristics of the mandibular condylar cartilage. *Japanese Dental Science Review*, 49(4), 139–150. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2013.07.004>
- Montecucco, C., & Molgó, J. (2005). Botulinal neurotoxins: Revival of an old killer. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(3 SPEC. ISS.), 274–279. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.12.006>
- Moon, Y. M., Kim, M. K., Kim, S. G., & Kim, T. W. (2016). Apoptotic action of botulinum toxin on masseter muscle in rats: early and late changes in the expression of molecular markers. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2680-9>
- Morgan, E. F., & Gerstenfeld, L. C. (2021). The bone organ system: form and

- function. En *Marcus and Feldman's Osteoporosis*. INC.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813073-5.00002-2>
- Morrison, S. J., & Scadden, D. T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, *505*(7483), 327–334. <https://doi.org/10.1038/nature12984>
- Munchau, A. (2000). Regular review: Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ*, *320*(7228), 161–165. <https://doi.org/10.1136/bmj.320.7228.161>
- Naganathan, V., & Sambrook, P. (2003). Gender differences in volumetric bone density: A study of opposite-sex twins. *Osteoporosis International*, *14*(7), 564–569. <https://doi.org/10.1007/s00198-003-1422-3>
- Nguyen, T. V., Maynard, L. M., Towne, B., Roche, A. F., Wisemandle, W., Li, J., Guo, S. S., Chumlea, W. C., & Siervogel, R. M. (2001). Sex differences in bone mass acquisition during growth: the Fels Longitudinal Study. *Journal of clinical densitometry: the official journal of the International Society for Clinical Densitometry*, *4*(2), 147–157. <https://doi.org/10.1385/jcd:4:2:147>
- Nieves, J. W., Formica, C., Ruffing, J., Zion, M., Garrett, P., Lindsay, R., & Cosman, F. (2005). Males have larger skeletal size and bone mass than females, despite comparable body size. *Journal of Bone and Mineral Research*, *20*(3), 529–535. <https://doi.org/10.1359/JBMR.041005>
- Niroshani Surangika Soysa, Neil Alles1, Kazuhiro Aoki, & Keiichi Ohya. (2012). Osteoclast formation and differentiation: An overview. *Journal of medical and dental sciences*, *59*, 65–74. [http://lib.tmd.ac.jp/jmd/5903/01\\_Soysa.pdf](http://lib.tmd.ac.jp/jmd/5903/01_Soysa.pdf)
- Norton, N. S., & Netter, F. H. (2018). *Netter, Anatomía de cabeza y cuello para odontólogos / Neil S. Norton ; ilustraciones de Frank H. Netter ; ilustradores colaboradores, Carlos A.G. Machado ... [et al. ; traducción, Elsevier España]*. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat00574a&AN=cbzar a.b2000801&site=eds-live>
- Oftadeh, R., Entezari, V., Spörri, G., Villa-Camacho, J. C., Krigbaum, H., Strawich, E., Graham, L., Rey, C., Chiu, H., Müller, R., Hashemi, H. N., Vaziri, A., & Nazarian, A. (2015). Hierarchical analysis and multi-scale modelling of rat cortical and trabecular bone. *Journal of the Royal Society Interface*, *12*(106), 5–7. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0070>

- Oftadeh, R., Perez-Viloria, M., Villa-Camacho, J. C., Vaziri, A., & Nazarian, A. (2015). Biomechanics and Mechanobiology of Trabecular Bone: A Review. *Journal of Biomechanical Engineering*, 137(1). <https://doi.org/10.1115/1.4029176>
- Okayasu, I., Yamada, Y., Mohno, S., & Yoshida, N. (2003). New animal model for studying mastication in oral motor disorders. *Dent Res*, 82(4), 318-21.
- Ondo, W. G., Simmons, J. H., Shahid, M. H., Hashem, V., Hunter, C., & Jankovic, J. (2018). Onabotulinum toxin-A injections for sleep bruxism. *Neurology*, 90(7), e559–e564. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004951>
- Orset, E., Chaffanjon, P., & Bettega, G. (2014). Temporomandibular joint model: Anatomic and radiologic comparison between rat and human. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 36(2), 163–166. <https://doi.org/10.1007/s00276-013-1159-4>
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Reviews*, 88(4), 1379–1406. <https://doi.org/10.1152/physrev.90100.2007>
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
- Picard, B., Gagaoua, M., & Gagaoua, M. (2020). Muscle Fiber Properties in Cattle and Their Relationships with Meat Qualities: An Overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(22), 6021–6039. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02086>
- Piche, N., Cote, F., Yen, E., & Marsh, M. (2018). Dragonfly as a Flexible Platform for Interpreting and Processing Hyperspectral and other High-dimensional Images. *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1), 560–561. <https://doi.org/10.1017/s143192761800329x>
- Pileickiene, G., Varpiotas, E., Surna, R., & Surna, A. (2007). A three-dimensional model of the human masticatory system, including the mandible, the dentition and the temporomandibular joints. *Stomatologija / issued by public institution*

“Odontologijos studija” ... [et al.], 9(1), 27–32.

- Pingel, J., Nielsen, M. S., Lauridsen, T., Rix, K., Bech, M., Alkjaer, T., Andersen, I. T., Nielsen, J. B., & Feidenhansl, R. (2017). Injection of high dose botulinum-toxin A leads to impaired skeletal muscle function and damage of the fibrillar and non-fibrillar structures. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14997-3>
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., & Montecucco, C. (2017). Botulinum neurotoxins: Biology, pharmacology, and toxicology. *Pharmacological Reviews*, 69(2), 200–235. <https://doi.org/10.1124/pr.116.012658>
- Plotkin, L. I., & Bellido, T. (2016). Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nature Reviews Endocrinology*, 12(10), 593–605. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.71>
- Poliachik, S. L., Bain, S. D., Threet, D. W., Huber, P., & Gross, T. S. (2010). Transient muscle paralysis disrupts bone homeostasis by rapid degradation of bone morphology. *Bone*, 46(1), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.10.025>
- Popp, K. L., Turkington, V., Hughes, J. M., Xu, C., Unnikrishnan, G., Reifman, J., & Bouxsein, M. L. (2019). Skeletal loading score is associated with bone microarchitecture in young adults. *Bone*, 127(February), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.06.001>
- Porto, G. G., Vasconcelos, B. C. D. E., Andrade, E. S. D. S., & Silva, V. A. (2010). Comparison between human and rat TMJ: Anatomic and histopathologic features. *Acta Cirurgica Brasileira*, 25(3), 290–293. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502010000300012>
- Qaisar, R., Bhaskaran, S., & Van Remmen, H. (2016). Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025>
- Qin, W., Bauman, W. A., & Cardozo, C. (2010). Bone and muscle loss after spinal cord injury: Organ interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1211, 66–84. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05806.x>

- Rafferty, K. L., Liu, Z. J., Ye, W., Navarrete, A. L., Nguyen, T. T., Salamati, A., & Herring, S. W. (2012). Botulinum toxin in masticatory muscles: Short- and long-term effects on muscle, bone, and craniofacial function in adult rabbits. *Bone*, *50*(3), 651–662. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.11.015>
- Ram, Y., & Ross, C. F. (2018). Evaluating the triplet hypothesis during rhythmic mastication in primates. *Journal of Experimental Biology*, *221*(2). <https://doi.org/10.1242/jeb.165985>
- Raphael, K. G., Tadinada, A., Bradshaw, J. M., Janal, M. N., Sirois, D. A., Chan, K. C., & Lurie, A. G. (2014). Osteopenic consequences of botulinum toxin injections in the masticatory muscles: A pilot study. *Journal of Oral Rehabilitation*, *41*(8), 555–563. <https://doi.org/10.1111/joor.12180>
- Raphael, Karen G., Janal, M. N., Tadinada, A., Santiago, V., Sirois, D. A., & Lurie, A. G. (2020). Effect of multiple injections of botulinum toxin into painful masticatory muscles on bone density in the temporomandibular complex. *Journal of Oral Rehabilitation*, *47*(11), 1319–1329. <https://doi.org/10.1111/joor.13087>
- Roberts, M., Yuan, J., Graham, J., Jacobs, R., & Devlin, H. (2011). Changes in mandibular cortical width measurements with age in men and women. *Osteoporosis International*, *22*(6), 1915–1925. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1410-3>
- Robling, A. G., & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology*, *82*, 485–506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>
- Robling, A. G., Castillo, A. B., & Turner, C. H. (2006). Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *8*(1), 455–498. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721>
- Roschger, P., Blouin, S., Paschalis, E., Gamsjaeger, S., Klaushofer, K., & Misof, B. (2017). *Principles of Bone and Joint Research*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58955-8>
- Rossetto, O., Pirazzini, M., & Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: Genetic, structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*,

- 12(8), 535–549. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3295>
- Samelson, E. J., Broe, K. E., Xu, H., Yang, L., Boyd, S., Biver, E., Szulc, P., Adachi, J., Amin, S., Atkinson, E., Berger, C., Burt, L., Chapurlat, R., Chevalley, T., Ferrari, S., Goltzman, D., Hanley, D. A., Hannan, M. T., Khosla, S., ... Bouxsein, M. L. (2019). Cortical and trabecular bone microarchitecture as an independent predictor of incident fracture risk in older women and men in the Bone Microarchitecture International Consortium (BoMIC): a prospective study. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 7(1), 34–43. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(18\)30308-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(18)30308-5)
- Sandoval, I., Ibarra, N., Flores, G., Marinkovic, K., Díaz, W., & Romo, F. (2015). Prevalencia de Trastornos Temporomandibulares según los CDI/TTM, en un Grupo de Adultos Mayores de Santiago, Chile Prevalence of Temporomandibular Disorders According to RDC/TMD in Older People of Santiago, Chile. *Int. J. Odontostomat*, 9(1), 73–78.
- Santagati, F., & Rijli, F. M. (2003). Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(10), 806–818. <https://doi.org/10.1038/nrn1221>
- Schiaffino, S., & Reggiani, C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 77(2), 493–501. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.2.493>
- Schiaffino, Stefano, & Reggiani, C. (2011). Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Sciote, J. J., & Kentish, J. C. (1996). Unloaded shortening velocities of rabbit masseter muscle fibres expressing skeletal or  $\alpha$ -cardiac myosin heavy chains. *Journal of Physiology*, 492(3), 659–667. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1996.sp021335>
- Shi, Z., Lv, J., Xiaoyu, L., Zheng, L. W., & Yang, X. W. (2018). Condylar Degradation

- from Decreased Occlusal Loading following Masticatory Muscle Atrophy. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6947612>
- Shibata, S., Sato, R., Murakami, G., Fukuoka, H., & Rodriguez-Vázquez, J. F. (2013). Origin of mandibular condylar cartilage in mice, rats, and humans: Periosteum or separate blastema? *Journal of Oral Biosciences*, 55(4), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.job.2013.08.001>
- Shields, R. K., & Dudley-Javoroski, S. (2006). Musculoskeletal plasticity after acute spinal cord injury: Effects of long-term neuromuscular electrical stimulation training. *Journal of Neurophysiology*, 95(4), 2380–2390. <https://doi.org/10.1152/jn.01181.2005>
- Sims, N. A., & Gooi, J. H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19(5), 444–451. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.016>
- Steiner, L., Synek, A., & Pahr, D. H. (2020). Comparison of different microCT-based morphology assessment tools using human trabecular bone. *Bone Reports*, 12, 100261. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2020.100261>
- Suzuki, A., & Iwata, J. (2016). Mouse genetic models for temporomandibular joint development and disorders. *Oral Diseases*, 22(1), 33–38. <https://doi.org/10.1111/odi.12353>
- Swiderski, D. L., & Zelditch, M. L. (2013). The complex ontogenetic trajectory of mandibular shape in a laboratory mouse. *Journal of Anatomy*, 223(6), 568–580. <https://doi.org/10.1111/joa.12118>
- Takahashi, K., Matsuda, Y., & Naruse, K. (2016). Mechanosensitive ion channels. *AIMS Biophysics*, 3(1), 63–74. <https://doi.org/10.3934/biophy.2016.1.63>
- Tanaka, E., Sano, R., Kawai, N., Langenbach, G. E. J., Brugman, P., Tanne, K., & Van Eijden, T. M. G. J. (2007). Effect of food consistency on the degree of mineralization in the rat mandible. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(9), 1617–1621. <https://doi.org/10.1007/s10439-007-9330-x>
- Torrubia, B., Martín Fernández, M., Rubert, M., Gómez-Chinchón, M., Recio Visedo, P., & Piedra, C. de la. (2020). Efectos del tratamiento con bazedoxifeno sobre



- la calidad ósea en ratas ovariectomizadas. *Rev. osteoporos. metab. miner. (Internet)*, 12(1), 20–27.
- Tsai, C. Y., Lei, Y. Y., Yang, L. Y., & Chiu, W. C. (2015). Changes of masseter muscle activity following injection of botulinum toxin type A in adult rats. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 18(4), 202–211. <https://doi.org/10.1111/ocr.12095>
- Tsai, Chi Yang, Huang, R. Y., Lee, C. M., Hsiao, W. T., & Yang, L. Y. (2010). Morphologic and Bony Structural Changes in the Mandible After a Unilateral Injection of Botulinum Neurotoxin in Adult Rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 68(5), 1081–1087. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2009.12.009>
- Udagawa, N., Koide, M., Nakamura, M., Nakamichi, Y., Yamashita, T., Uehara, S., Kobayashi, Y., Furuya, Y., Yasuda, H., Fukuda, C., & Tsuda, E. (2021). Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 39(1), 19–26. <https://doi.org/10.1007/s00774-020-01162-6>
- Van Eijden, T. M. G. J., Korfage, J. A. M., & Brugman, P. (1997). Architecture of the human jaw-closing and jaw-opening muscles. *Anatomical Record*, 248(3), 464–474. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199707\)248:3<464::AID-AR20>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199707)248:3<464::AID-AR20>3.0.CO;2-M)
- Van Eijden, T. M. G. J., Van Ruijven, L. J., & Giesen, E. B. W. (2004). Bone tissue stiffness in the mandibular condyle is dependent on the direction and density of the cancellous structure. *Calcified Tissue International*, 75(6), 502–508. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-0295-6>
- Van Eijden, T., Korfage, J., & Brugman, P. (1997). Architecture of the Human Jaw-Closing and Jaw-Opening Muscles. *THE ANATOMICAL RECORD*, 474(July 1996), 464–474.
- van Straalen, J. P., Sanders, E., Prummel, M. F., & Sanders, G. T. B. (1991). Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clinica Chimica Acta*, 201(1–2), 27–33. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90021-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90021-4)
- Vegger, J. B., Brüel, A., Dahlgaard, A. F., & Thomsen, J. S. (2016). Alterations in gene expression precede sarcopenia and osteopenia in botulinum toxin

- immobilized mice. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, 16(4), 355–368.
- Voegeli, A. (2004). *Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor*. Springer.
- Vreeke, M., Langenbach, G. E. J., Korfage, J. A. M., Zentner, A., & Grünheid, T. (2011). The masticatory system under varying functional load. Part 1: Structural adaptation of rabbit jaw muscles to reduced masticatory load. *European Journal of Orthodontics*, 33(4), 359–364. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjq083>
- Wang, Z., Sa, G., Wei, Z., Dai, X., Wan, Q., & Yang, X. (2020). Obvious morphologic changes in the mandible and condylar cartilage after triple botulinum toxin injections into the bilateral masseter. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 158(4), e43–e52. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2020.01.017>
- Warner, S. E., Sanford, D. A., Becker, B. A., Bain, S. D., Srinivasan, S., & Gross, T. S. (2006). Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone*, 38(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.08.009>
- Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Michael Parfitt, A., & Manolagas, S. C. (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *Journal of Clinical Investigation*, 102(2), 274–282. <https://doi.org/10.1172/JCI2799>
- Worton, L. E., Gardiner, E. M., Kwon, R. Y., Downey, L. M., Ausk, B. J., Bain, S. D., & Gross, T. S. (2018). Botulinum toxin A-induced muscle paralysis stimulates Hdac4 and differential miRNA expression. *PLoS ONE*, 13(11), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207354>
- Yang, H. M., Won, S. Y., Kim, H. J., & Hu, K. S. (2015). Neurovascular structures of the mandibular angle and condyle: a comprehensive anatomical review. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 37(9), 1109–1118. <https://doi.org/10.1007/s00276-015-1482-z>
- Yoshimi, T., Koga, Y., Nakamura, A., Fujishita, A., Kohara, H., & Al., M. E. et. (2017). Mechanism of motor coordination of masseter and temporalis muscles for

increased masticatory efficiency in mice. *J Oral Rehabil.*, 44(5), 363–374.  
<https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>

Yoshimi, T., Koga, Y., Nakamura, A., Fujishita, A., Kohara, H., Moriuchi, E., Yoshimi, K., Tsai, C. Y., & Yoshida, N. (2017). Mechanism of motor coordination of masseter and temporalis muscles for increased masticatory efficiency in mice. *Journal of Oral Rehabilitation*, 44(5), 363–374.  
<https://doi.org/10.1111/joor.12491>