



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y TRAUMATOLOGÍA BUCAL Y
MAXILOFACIAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO DURANTE LA
REPARACIÓN DE FRACTURA EN ENVEJECIMIENTO:
ESTUDIO PRECLÍNICO**

Felipe Ignacio Saavedra Vásquez

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Luis Córdova Jara

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Juan Cortés Araya

**Adscrito a Proyecto FONDECYT de Inicio 11190536 (LCJ)
Santiago - Chile
2022**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y TRAUMATOLOGÍA BUCAL Y
MAXILOFACIAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO DURANTE LA
REPARACIÓN DE FRACTURA EN ENVEJECIMIENTO:
ESTUDIO PRECLÍNICO**

Felipe Ignacio Saavedra Vásquez

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Luis Córdova Jara

TUTOR ASOCIADO

Prof. Dr. Juan Cortés Araya

**Adscrito a Proyecto FONDECYT de Inicio 11190536 (LCJ)
Santiago - Chile
2022**

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a los doctores Córdova y Cortés por la oportunidad que me dieron de trabajar junto a ellos en este gran proyecto y entregarme aprendizajes invaluable, sobre los que espero seguir construyendo mi carrera profesional.

Aprovecho esta instancia para dar gracias a los docentes que me acompañaron durante mi formación y que fueron capaces de enseñarme teoría, técnica y grandes valores.

También, agradecer a mis amigos por estar siempre ahí. Gracias a Frank por ser un hermano y una mano en quien confiar hasta en los momentos más amargos de la vida. A Martín y Héctor por ser mis hermanos desde hace más de 10 años. A Aníbal, Bastián, Carola, Lukas y Agustina por los grandes momentos y alegrías vividas. Gracias a Fernando, por su amistad y por ser una gran compañía en Chiloé. A Isidora, por ser una gran amiga y una excelente compañera de laboratorio. Gracias a Sebastián, por tener la valentía de ser mi primer paciente. A Diego y Yerin, por estar desde el comienzo de esta etapa que ya culmina.

Gracias a mis maestros de taekwondo, Anyelina, Maximiliano y Mario, por enseñarme el valor de la disciplina y del trabajo en equipo.

Por último, quisiera agradecer a mi familia por su apoyo incondicional durante mi formación profesional. Gracias a mi madre por estar en todas, siendo mi paciente o esperándome cada día con un plato de comida tras una jornada agotadora. A mi padre por estar aún cuando yo no he estado y a Maca por permitirme ser su hermano. Esto también es de ustedes.

Índice

1) RESUMEN	1
2) MARCO TEÓRICO	2
FRACTURAS Y ENVEJECIMIENTO	2
REPARACIÓN DE FRACTURAS	3
INFILTRADO INFLAMATORIO Y REPARACIÓN ÓSEA	4
MACRÓFAGOS: DEFINICIÓN, ORIGEN Y FUNCIONES	6
PLASTICIDAD Y ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS	6
ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS, POLARIZACIÓN Y FENOTIPOS	7
MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS CIRCULANTES	8
MACRÓFAGOS RESIDENTES EN TEJIDO.....	10
MACRÓFAGOS RESIDENTES DEL ESQUELETO.....	10
MACRÓFAGOS Y ENVEJECIMIENTO	12
3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
4) MATERIALES Y MÉTODO	16
MODELO ANIMAL: RATONES MACHO BALB/C DE 5 SEMANAS Y 24 SEMANAS.....	16
CÁLCULO DE TAMAÑO MUESTRAL.....	16
DEFECTO ÓSEO TIBIAL MONOCORTICAL.....	18
EUTANASIA Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	19
DESCALCIFICACIÓN DE MUESTRAS PARA PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	20
PROCESAMIENTO PARA ESTUDIO HISTOLÓGICO	21
SELECCIÓN DE LÁMINAS PARA MICROFOTOGRAFÍA Y ANÁLISIS	23
MICROFOTOGRAFÍA	23
DETERMINACIÓN Y RECORTE DE LA REGIÓN DE INTERÉS (ROI).....	23
ANÁLISIS CUALITATIVO DEL INFILTRADO INFLAMATORIO	24
CONTEO MANUAL CÉLULAS.....	24
MEDICIÓN DE NÚMERO DE CÉLULAS INFLAMATORIAS POR UNIDAD DE ÁREA	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
5) RESULTADOS	26
MORFOLOGÍA DEL INFILTRADO INFLAMATORIO Y HEMATOMA DEL SITIO FRACTURADO.....	26
CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS INFLAMATORIAS	28
6) DISCUSIÓN	29
7) CONCLUSIÓN	32
8) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9) ANEXOS	39
ANEXO 1. PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES CÓDIGO CICUA 21488 – ODO - UCH..	39
ANEXO 2. BATERÍA DE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA (ADAPTADO). LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA U. DE CHILE.....	58
ANEXO 3. OBTENCIÓN DE ROI EN ADOBE PHOTOSHOP 2022	60
ANEXO 4. PROTOCOLO IMAGEJ CELL COUNTER.....	62

1) Resumen

Introducción: La reparación de una fractura involucra la interacción de múltiples grupos celulares. Entre ellas, las células inflamatorias, en particular los macrófagos, han demostrado poseer un rol fundamental en la regulación de la reparación de fractura. Clínicamente, se ha descrito que la capacidad de reparación de fracturas durante la tercera edad disminuye significativamente. Tanto el fenotipo celular como los mecanismos celulares y moleculares involucrados en dicho proceso no han sido aun completamente dilucidados. En este estudio, queremos caracterizar el infiltrado de células inflamatorias presentes durante la reparación de fractura durante el envejecimiento. Además, de asociar dicho infiltrado con la respuesta reparativa ósea final en el sitio fracturado.

Materiales y método: En un modelo de ratón de fractura tibial estable (defecto óseo monocortical tibial) se comparó el infiltrado inflamatorio presente a los 2 días post cirugía en un grupo de individuos jóvenes e inmaduros esqueléticamente (5 semanas de edad) versus individuos adultos maduros esqueléticamente (24 semanas de edad). Las tibias fueron recolectadas, descalcificadas e incluidas en parafina para ser analizadas mediante histología convencional e histomorfometría. En sucesivos cortes histológicos, se comparó tanto la morfología del hematoma y el número de células inflamatorias presentes en el defecto en reparación.

Resultados: Cualitativamente se observaron diferencias en la densidad y organización del infiltrado inflamatorio, además de una disparidad sustancial en el tamaño del hematoma formado por cada grupo. De manera importante, el número de células inflamatorias identificadas en el sitio fracturado fue significativamente menor en individuos esqueléticamente maduros respecto a los jóvenes.

Conclusión: Tanto el infiltrado inflamatorio como el hematoma ubicado en el sitio de fractura disminuye en función de la maduración del esqueleto. Los resultados sugerirían mecanismos como una menor capacidad de reclutamiento de las células del sistema inmune, lo que causaría la inhibición de las vías de señalización que regulan y estimulan la reparación ósea. Se deben realizar nuevos estudios que identifiquen y describan el fenotipo y comportamiento de las células inflamatorias que participan en la reparación de fractura.

2) Marco Teórico

Fracturas y envejecimiento

Las fallas en la reparación de fracturas son frecuentes, prolongan el dolor en los pacientes y les impiden realizar sus actividades diarias con normalidad. La incertidumbre de cuándo va a sanar una fractura y la posibilidad de requerir nuevas intervenciones quirúrgicas, pueden afectar la salud mental de las personas (Hak et al. 2014). El impacto económico y social de este problema, repercute directamente en la calidad de vida de los pacientes y en el presupuesto de los sistemas de salud (Loi et al. 2016a), transformándose en un asunto relevante para la cirugía ortopédica y maxilofacial.

La edad es uno de los principales factores de riesgo para las patologías del sistema musculoesquelético (Ensrud 2013). La falla en la reparación de una fractura se define como la consolidación incompleta de la fractura, con ausencia de signos radiográficos de reparación por 3 meses consecutivos (Chen et al. 2018). La prevalencia de esta patología aumenta en personas mayores (Hak et al. 2014).

Las personas mayores presentan un estado de inflamación crónica sistémica, que disminuye la respuesta del sistema inmune innato y en consecuencia la capacidad regenerativa de los tejidos (Franceschi et al. 2018). La inmunidad innata es el primer sistema de defensa de un organismo ante la agresión de agentes externos al cuerpo humano (por ejemplo, una bacteria o un virus) o internos (por ejemplo, detritus celulares) (Kawamoto y Minato 2004).

Diversos estudios reportan que la capacidad osteogénica disminuye con el envejecimiento (Cottrell et al. 2016; Loi et al. 2016b; Chen et al. 2018). Es fundamental comprender cómo la edad modifica los mecanismos celulares y moleculares de la reparación ósea para el desarrollo de nuevas terapias que optimicen la capacidad regenerativa en personas mayores.

Reparación de fracturas

La reparación de fracturas es un fenómeno coordinado en que interactúan diversos factores. Dentro de estos últimos, encontramos: la estabilidad mecánica de la fractura, células osteogénicas, osteoconductividad, factores de crecimiento e inflamatorios, vasculatura y más novedosamente, las células inflamatorias (Loi et al. 2016a). El estudio del rol de las células inflamatorias en la reparación y remodelación ósea ha crecido significativamente durante la última década.

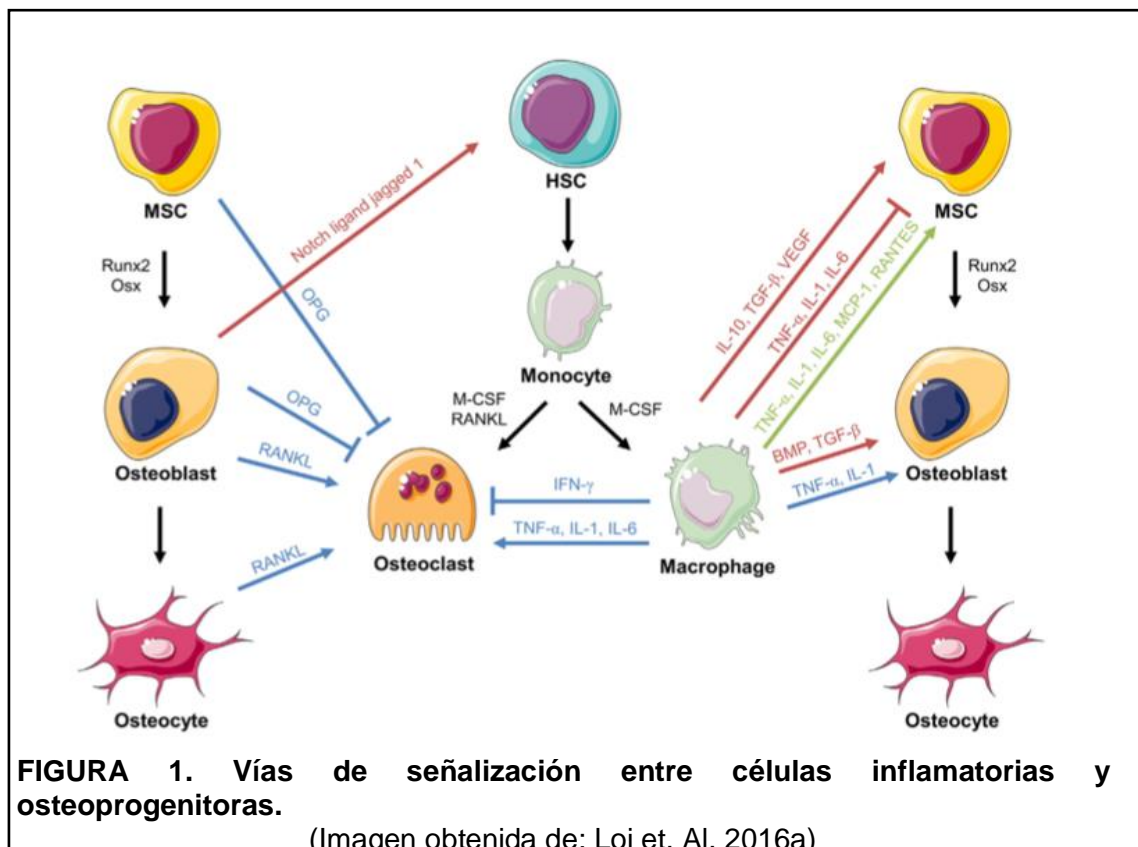
La estabilidad mecánica de una fractura va a condicionar la vía que seguirá el proceso reparativo. Cuando los extremos de fractura se encuentran estables o tienen un grado mínimo de movilidad, la reparación ósea será primaria, es decir, habrá aposición directa de tejido óseo que madurará progresivamente hasta recuperar la estructura laminillar, por lo que la vía de osificación será predominantemente intramembranosa. Por otra parte, si una fractura es inestable y existe movilidad de sus extremos, se formará un callo blando de tejido fibrocartilaginoso, que luego dará lugar a tejido óseo maduro, lo que se conoce como reparación secundaria, con predominancia de la vía de osificación endocondral (Loi et al. 2016a).

En las primeras etapas de la reparación secundaria habrá formación de un hematoma e inflamación aguda. Las primeras células inflamatorias en migrar al sitio de fractura son los neutrófilos. Estos últimos secretarán mediadores inflamatorios para reclutar monocitos/macrófagos circulantes. El conjunto de células y mediadores inflamatorios van a reclutar células madre mesenquimales, que se diferenciarán y proliferarán por la vía condrogénica. Los condrocitos van a secretar matriz cartilaginosa, uniendo los extremos y estabilizando la fractura. En la medida que aumenta el aporte sanguíneo habrá diferenciación y proliferación de osteoblastos, que secretarán hueso inmaduro, aumentando la estabilidad de la fractura. El cartílago entrará en un proceso de mineralización hasta que los osteoclastos reabsorban la matriz cartilaginosa y el tejido óseo inmaduro para reestablecer la estructura ósea laminillar (Cottrell et al. 2016; Loi et al. 2016a).

Infiltrado inflamatorio y reparación ósea

La inflamación es fundamental en las patologías que afectan al tejido óseo, entre las que encontramos la artritis, periodontitis, fracturas, etc. Se ha reportado que la reparación ósea se ve retrasada en personas inmunodeprimidas (Ono y Takayanagi 2017).

En un sitio de fractura, con la formación del hematoma se activa una cascada de migración de células inflamatorias, entre las que se encuentran neutrófilos, linfocitos y monocitos/macrófagos (Ono y Takayanagi 2017). Diversos estudios demostraron que existe una comunicación cruzada entre células del sistema inmune y células óseas durante la reparación ósea (Chang et al. 2008; Alexander et al. 2011; Raggatt et al. 2014; Loi et al. 2016b). Las células inflamatorias van a liberar citoquinas proinflamatorias y factores moleculares que serán determinantes en el proceso reparativo, estimulando la diferenciación y la actividad de los osteoblastos (Loi et al. 2016a) (**Figura 1**).



Los neutrófilos infiltran al sitio de fractura en las primeras 24 horas de la fractura (Loi et al. 2016a). Estas células van a secretar mediadores proinflamatorios que están implicados en el reclutamiento de monocitos/macrófagos provenientes de la circulación (Bigueti et al. 2018), que estarán presentes en diferentes etapas el proceso reparativo. Estudios de depleción de macrófagos en ratones revelan que la reparación ósea se retrasa por inhibición de la osificación endocondral e intramembranosa (Chang et al. 2008; Vi et al. 2015).

La interacción entre linfocitos y células óseas se ha descrito extensamente en la literatura. Estas células poseen un efecto proreparativo en modelos animales de fractura inestable, participando en etapas tempranas y tardías. Entre otras múltiples funciones, tanto linfocitos T y B están presentes en un sitio de fractura durante la etapa de osificación del callo, secretando OPG (osteoprotegerina) para inhibir la osteoclastogénesis, favoreciendo la aposición de matriz ósea (Könnecke et al. 2014).

Por otra parte, las células $T\gamma\delta$ son células no-antígeno-específicas y son capaces de reconocer componentes microbianos y subproductos del estrés celular, participando en la inmunidad innata. Estas células se caracterizan por estar próximas al hueso en homeostasis y proliferar luego de una fractura. Además, son la mayor fuente de interleuquina (IL)-17A en el proceso de reparación ósea, citoquina que está asociada a la proliferación de células mesenquimales y su diferenciación en osteoblastos (Ono y Takayanagi 2017).

Si bien, diversas células de la inmunidad innata participan en el proceso de reparación ósea, durante la última década los macrófagos se han convertido en uno de los principales objetos de estudio. Características como su plasticidad, capacidad de polarización y la secreción de múltiples factores moleculares y citoquinas, los convierten en uno de los actores principales del infiltrado celular inflamatorio y en potenciales blancos terapéuticos.

Macrófagos: definición, origen y funciones

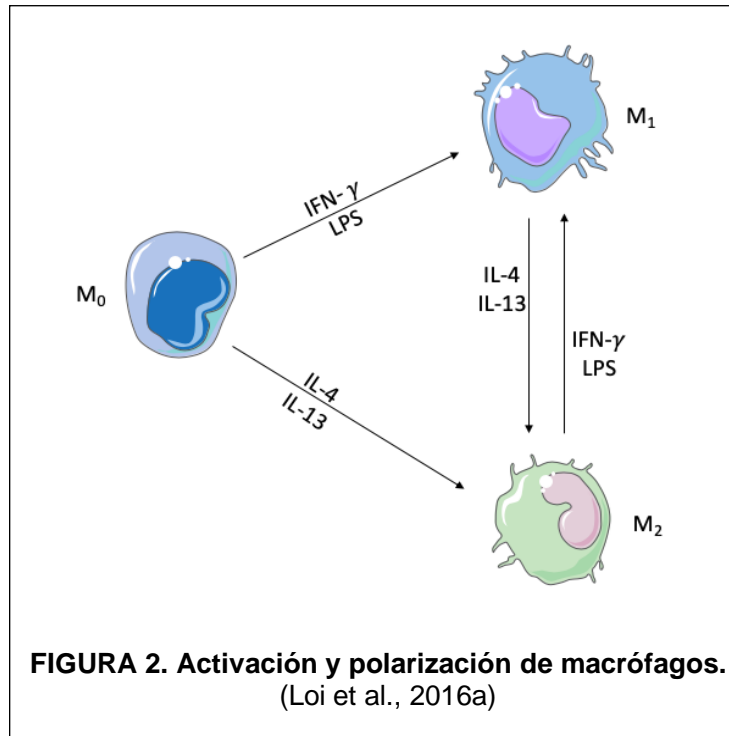
Los macrófagos son células del sistema inmune (Varol et al. 2015) con un rol fundamental en la inmunidad innata (Davies y Taylor 2015). Los macrófagos derivan de precursores que residen en diversos tejidos y de células precursoras mieloides, que a su vez provienen de células madre hematopoyéticas de la médula ósea (Kawamoto y Minato 2004; Geissmann et al. 2010). Sus funciones son eliminar restos de partículas/células muertas posterior al ataque de un agente patógeno externo o interno y producir un sinnúmero de enzimas proteolíticas, factores de crecimiento y citoquinas (Loi et al. 2016a; Ono y Takayanagi 2017; Bigueti et al. 2018). La superficie de los macrófagos posee complejos mayores de histocompatibilidad clase II (MHC II, por sus siglas en inglés), que les permiten actuar como células presentadoras de antígeno. Esto último, junto con la secreción de citoquinas y moléculas coestimuladoras les permitirán activar a los linfocitos T, quienes van a proteger al huésped de bacterias, patógenos y células malignas para mantener la homeostasis (Guerriero 2019).

Plasticidad y activación de macrófagos

Una de las principales características de los macrófagos es su plasticidad, es decir, son capaces de modificar su estado de activación y su fenotipo en respuesta a las condiciones del entorno, fenómeno llamado polarización (Murray et al. 2014). Los factores M-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos) y GM-CSF (Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos-Macrófagos), permiten que los monocitos sobrevivan y se transformen en macrófagos según los requerimientos (Sierra-Filardi et al. 2014). Según la exposición a estos factores, los macrófagos presentarán diferencias en su morfología, expresión de antígenos de superficie, capacidad fagocítica, sensibilidad al péroxido de hidrógeno, actividad enzimática, actividad supresora y susceptibilidad a algunos agentes patógenos (Akagawa et al. 2006).

Activación de macrófagos, polarización y fenotipos

Los macrófagos, al pasar a un estado activo y dependiendo de los factores inflamatorios a los que estén expuestos pueden adquirir dos fenotipos diferentes, conocidos como M₁ y M₂ (**Figura 2**).



Los macrófagos M₁, exhibirán un perfil proinflamatorio, caracterizado por la secreción de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias como Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α), IL-1 β e IL-6. Estos factores conducirán a la inflamación aguda consecutiva a una noxa, causando daño tisular y una mayor atracción e infiltración leucocitaria en el sitio del daño. Este fenotipo es promovido por la acción del interferón gamma (IFN- γ) y/o el lipopolisacárido bacteriano (LPS), y se conoce como activación clásica (Murray et al. 2014; Loi et al. 2016a; 2014 Forbes Preparing the ground for tissue regeneration from mechanism to therapy.pdf).

Por otra parte, los macrófagos M₂, tendrán un perfil antiinflamatorio y pro-regenerativo, su función será modular y resolver la inflamación con la producción de Oncostatina M (OSM), IL-1Ra, Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β),

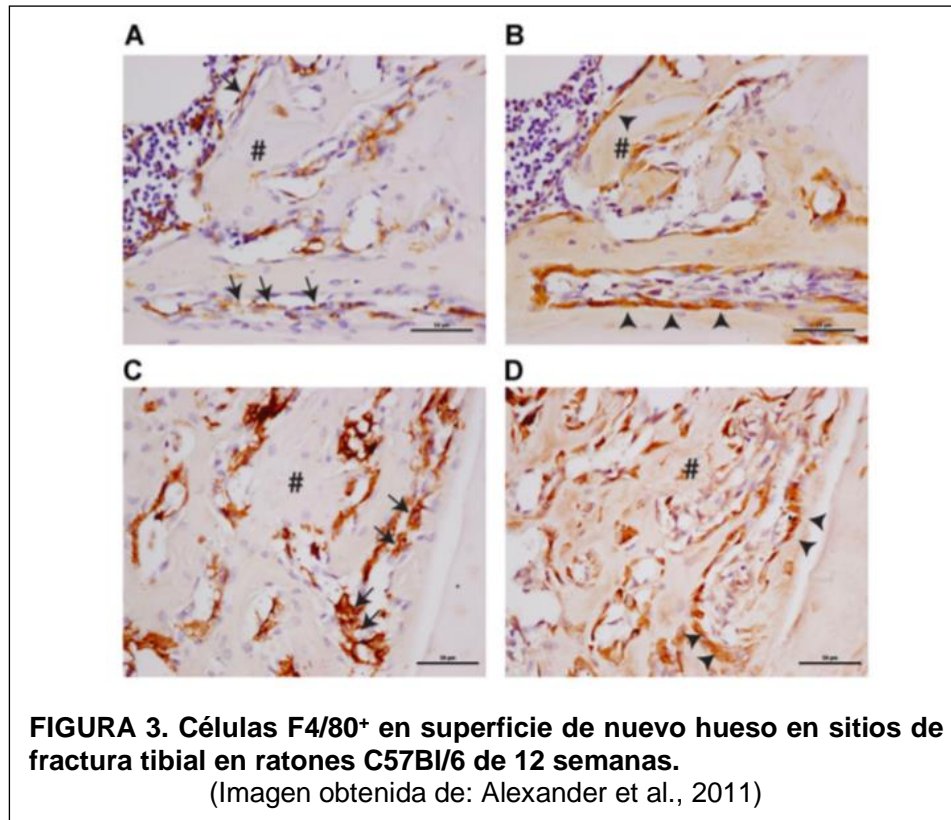
Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) y Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-1). Se les reconoce un rol fundamental en la formación de tejido de granulación y en la remodelación tisular. Este estado se expresa en condiciones de exposición a IL-4 y/o IL-13, y es conocido como activación alternativa (Forbes y Rosenthal 2014; Murray et al. 2014; Loi et al. 2016a).

In vivo, la polarización de los macrófagos no es absoluta: se expresa una mezcla de fenotipos, con la predominancia de alguno de ellos (De Maeyer y Chambers 2021). La inflamación aguda mediada por M₁ durante las primeras horas después de la noxa y la consecutiva repolarización hacia un fenotipo M₂, optimizan significativamente la capacidad osteogénica de las células osteoprogenitoras *in vitro* (Loi et al. 2016b). Es aún desconocido si en el fenómeno de polarización, los macrófagos ya presentes en el sitio inflamatorio transitan de un fenotipo a otro, o bien, nuevos macrófagos infiltran para inclinar la balanza hacia un fenotipo distinto (Schlundt et al. 2021). No obstante, *in vitro* se ha demostrado que, un mismo macrófago puede transitar de un fenotipo M₁ a M₂ y viceversa, (Spiller et al. 2015).

Macrófagos derivados de monocitos circulantes

Los macrófagos derivados de monocitos provienen de precursores mieloides y se encuentran en tránsito desde el torrente sanguíneo hacia sitios de inflamación aguda atraídos por mecanismos de quimiotaxis. En dichos sitios, los neutrófilos, secretan IL-6 y CCL-2 (Ligando de Quimioquina 2), aumentando esqueléticamente su concentración en el medio e induciendo la migración de monocitos desde la médula (Sierra-Filardi et al. 2014; Loi et al. 2016a). CCL-2 es una quimioquina inflamatoria de la familia MCP (Proteínas Quimiotácticas de Monocitos) expresada por diversos tipos celulares, que tiene múltiples funciones al interactuar con su receptor CCR-2: a) produce la extravasación de células inflamatorias (monocitos, linfocitos T y células Natural Killer (NK) a través del endotelio vascular, b) regula la producción de citoquinas proinflamatorias, c) activa a macrófagos definiendo un fenotipo M₁ o M₂ (Sierra-Filardi et al. 2014).

Los macrófagos pueden ser reconocidos en ratones mediante la detección de la glicoproteína transmembrana F4/80, que está es altamente expresada en macrófagos (Schaller et al. 2002; Alexander et al. 2011; Batoon et al. 2017). Además, la molécula F4/80 se caracteriza por tener una alta especificidad, permitiendo distinguir a los macrófagos de otras células del mismo linaje (como osteoclastos y precursores hematopoyéticos) (Alexander et al. 2011) (**Figura 3**).



El reclutamiento de monocitos, su diferenciación a macrófagos activos en el sitio de inflamación y sus cambios en la expresión fenotípica (Murray et al. 2014; Loi et al. 2016a) son hechos cruciales para la modulación inmune la reparación ósea (Bigueti et al. 2018).

Los macrófagos también van a secretar proteínas morfogenéticas (BMP)-2, BMP-4, y el factor de crecimiento transformante Beta-1 (TGF- β 1) que van a estimular la

diferenciación, proliferación y la actividad de células osteoprogenitoras (Blom et al. 2004).

Macrófagos residentes en tejido

Son los macrófagos que residen en el tejido participando en el desarrollo y homeostasis tisular. Dichos macrófagos tienen su origen en las primeras semanas de desarrollo embrionario. Un estudio en alvéolos pulmonares de embriones ratones *Csf2ra*^{-/-} reveló que provienen principalmente de precursores eritromieloides tardíos, que a partir del día 9.5 del desarrollo embrionario migran desde el saco vitelino hacia el hígado, diferenciándose en monocitos fetales, para luego colonizar los tejidos y convertirse en macrófagos residentes (Li et al. 2020).

Estos macrófagos son células muy heterogéneas, que se encuentran en casi todos los tejidos, donde van a responder a cambios en el microambiente tisular (células apoptóticas, detritus celulares, patógenos, etc.) y secretar moléculas reguladoras. Esto los hace fundamentales en la mantención de la homeostasis tisular (Pettit et al. 2008).

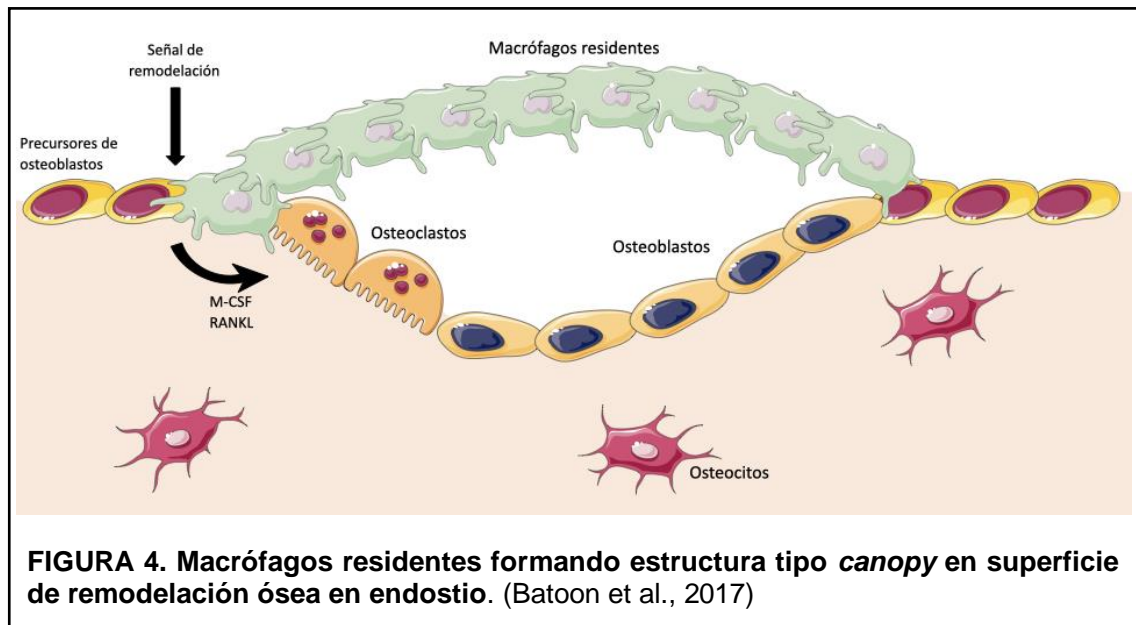
Macrófagos residentes del esqueleto

Los macrófagos residentes óseos u *Osteomacs* son encontrados en condiciones fisiológicas y cumplen funciones de desarrollo y mantención de la homeostasis ósea (Chang et al. 2008; Pettit et al. 2008; Alexander et al. 2011).

Los macrófagos residentes poseen un rol principal en la reparación ósea. Ante una fractura, liberarán diversas citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, tales como CCL-5, CCL-2 TNF α , IL-1, IL-6, que van a reclutar otras células inflamatorias, promover neovascularización y dirigir la migración y diferenciación de células mesenquimales, para promover la osteogénesis (Hoch et al. 2012; Freytes et al. 2013).

Un estudio *in vivo* en ratones demostró que la deficiencia de *CCL-5* disminuye la osteogénesis, especialmente en el endostio. Además, se pudo concluir que esta quimioquina sería clave en el reclutamiento de osteoclastos y en la diferenciación de macrófagos residentes en la cortical del endostio. Cabe destacar que este modelo es el primero en expresar de manera espontánea un fenotipo transitorio deficiente en macrófagos residentes (Wintges et al. 2013).

En el endostio, las zonas de formación de hueso se caracterizan por ser ricas en macrófagos residentes (Chang et al. 2008). En sitios de modelación/remodelación ósea *in vivo*, se organizan formando una especie de barrera tipo “*canopy*” sobre los osteoblastos maduros, aislando el sitio de remodelación y guiando la acción de osteoclastos, maduración de osteoblastos y formación de vasculatura (Batoon et al. 2017) (**Figura 4**). Se cree que esta organización espacial ocurre tanto para impedir la filtración de mediadores paracrinos y subproductos de la remodelación ósea, como para formar una barrera fagocítica que aísla el proceso y limita el impacto de factores y células próximas al sitio de remodelación (Batoon et al. 2017).



Un estudio en ratones permitió establecer que los macrófagos residentes periostales y endostales tienen similar perfil molecular, sin embargo, la complejidad

estructural del periostio produce que los macrófagos residentes posean una morfología y ordenamiento espacial diferente al endostio. Los macrófagos residentes del periostio han sido identificados en sitios de crecimiento óseo activo en diáfisis tibiales de ratones de 4 semanas, donde se organizan ramificados e intercalados con osteoblastos maduros. Del mismo modo, en periostio de metáfisis fueron observados en el *cambium*, en la cápsula y en la sección más externa del periostio (Alexander et al. 2017).

Macrófagos y envejecimiento

Los macrófagos son uno de los componentes centrales del estado inflamatorio crónico presente en el envejecimiento. Con la edad, estas células sufren una serie de cambios en su número, capacidad secretora, metabolismo, actividad fagocítica y actividad pro angiogénica (De Maeyer y Chambers 2021).

La evidencia actual afirma que la edad tiene un efecto sobre el número de macrófagos presentes en un organismo. Un estudio afirma que ratones en edad geriátrica, presentan un mayor número de macrófagos en bazo y médula ósea, respecto de ratones jóvenes (Jackaman et al. 2013) . En tanto, en pulmones de ratones, el número de macrófagos residentes disminuyó radicalmente al comparar entre jóvenes y envejecidos (Wong et al. 2017). Por otra parte, un estudio en humanos señala que no existen cambios en la cantidad de macrófagos CD68⁺ durante la vida adulta. Sin embargo, al comparar niños y adultos jóvenes con adultos maduros, los últimos tuvieron un conteo de macrófagos provenientes de la médula ósea significativamente menor (Ogawa et al. 2000).

De acuerdo con diversos estudios, la quimiotaxis y la secreción de citoquinas proinflamatorias están disminuidas en macrófagos envejecidos, mientras que se ha observado un aumento en los receptores que amplifican la respuesta inflamatoria (Hajishengallis 2010). Además, se describe que los macrófagos envejecidos tienen

un menor potencial para estimular la angiogénesis en tejidos dañados (De Maeyer y Chambers 2021).

La edad también posee un efecto sobre la capacidad de los macrófagos de reaccionar a los requerimientos ambientales inflamatorios. Los macrófagos de organismos envejecidos tienen una menor respuesta a LPS e IFN- γ , lo que disminuye su capacidad de adquirir un fenotipo proinflamatorio. Los macrófagos M₁ secretarán menores niveles de IL-6 y TNF α en organismos envejecidos. Por otra parte, los macrófagos envejecidos tienen una respuesta amplificada a IL-4 e IL-13, aumentando la expresión del fenotipo M₂. Los macrófagos antiinflamatorios tendrán un aumento en la secreción de IL-4 y TGF β (Jackaman et al. 2017).

Otro estudio propone que la actividad fagocítica de macrófagos recolectados de ratones envejecidos es menor a la de aquellos obtenidos de ratones jóvenes, lo que impide la eliminación de células apoptóticas y debrís celular, perpetuando un fenotipo proinflamatorio y retrasando la resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos (De Maeyer y Chambers 2021).

Actualmente, no existe evidencia sobre cambios en el número y en las características morfológicas del infiltrado inflamatorio en la reparación de fracturas. Se propone que conocer las características cualitativas y cuantitativas de las células inflamatorias que participan en la reparación de fractura en diferentes momentos de la vida, permitiría describir los cambios que inducen una menor capacidad osteogénica en la población envejecida.

La reparación de una fractura involucra la interacción de múltiples grupos celulares. Entre ellas, las células inflamatorias, en particular los macrófagos, han demostrado poseer un rol fundamental en la regulación de la reparación de fractura. Clínicamente, se ha descrito que la capacidad de reparación de fracturas durante la tercera edad disminuye significativamente. Tanto el fenotipo celular como los mecanismos celulares y moleculares involucrados en dicho proceso no han sido

aun completamente dilucidados. En este estudio, queremos caracterizar el infiltrado de células inflamatorias presentes durante la reparación de fractura durante el envejecimiento. Además, de asociar dicho infiltrado con la respuesta reparativa ósea final en el sitio fracturado.

3) Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

El proceso de envejecimiento produce cambios en el infiltrado inflamatorio presente en el sitio fracturado.

Objetivos

- **General:** Caracterizar el infiltrado de células inflamatorias presentes durante la reparación de fractura durante el envejecimiento.
- **Objetivos específicos**
 1. Comparar la morfología del hematoma e infiltrado inflamatorio del sitio fracturado en un modelo de ratón con fractura de tibia estable representativo de envejecimiento.
 2. Comparar el número de células inflamatorias presentes en el sitio fracturado en un modelo de ratón con fractura de tibia estable representativo de envejecimiento.

4) Materiales y método

Tipo de estudio: Experimental. Estudio experimental comparativo en modelo animal (preclínico).

Los procedimientos descritos a continuación fueron aprobados bajo el certificado **Nº 21488-ODO-UCH** por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (**Anexo 1**).

Modelo animal: ratones macho Balb/C de 5 semanas y 24 semanas

Los estudios preclínicos en modelo animal son fundamentales para analizar la biología de la reparación ósea. Particularmente, el modelo de ratón, se ha convertido en uno de los modelos de elección, teniendo en consideración: **1.** El costo de compra, mantención y alimentación de estos animales es relativamente bajo; **2.** El espacio para su almacenamiento es reducido, permitiendo incluir más individuos en cada grupo (Holstein et al. 2009); **3.** Se utilizan ratones machos con el fin de controlar el dimorfismo sexual de la homeostasis y reparación ósea (Almeida et al. 2017); **3.** Los tiempos de reparación ósea son menores, en comparación con animales más grandes; **4.** Presentan una tasa de cierre de la placa de crecimiento versus la esperanza de vida de alrededor del 30%, muy similar a la de los humanos (20%), si la comparamos con modelos de otras especies (5-10%) (Holstein et al. 2009); **5.** Se conoce que a las 5 semanas los ratones son jóvenes y se encuentran en etapa de maduración ósea. Asimismo, a las 24 semanas los ratones son adultos esqueléticamente maduros (Dutta y Sengupta 2016); **6.** Existe una amplia gama de anticuerpos disponibles que permiten estudiar los mecanismos moleculares y celulares de la reparación ósea en ratones (Holstein et al. 2009); **7.** El desarrollo de esta investigación fue posible gracias a los recursos del proyecto FONDECYT de Inicio Nº 11190536 y de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, por lo que el modelo de elección fue el de ratones macho Balb/C de 5 y 24 semanas.

Cálculo de tamaño muestral

El número de ratones por condición es de 5. Dicho número de animales ha sido

calculado mediante software G Power según fórmula estándar basada en el análisis de poder de estudio previo (Festing y Altman 2002), considerando:

$$\text{Tamaño muestral } (n) = 2DS^2 (1.96 + 0.842)^2 / \text{dif medias}^2$$

DS: Desviación estándar (DS) de 10%

1.96 y 0.842 corresponden a valor obtenido a error tipo 1 de 5% en tabla Z.

Dif. de medias: Basado en la diferencia del porcentaje de ratio BV/TV estudios de micro-CT previos similares: 80-60= 20

$$n = 1570.24/400 = 4$$

El efecto del tamaño de muestra necesario para definir diferencia de medias basado en estudios previos similares del tutor principal y otros (Córdova et al. 2015; Guihard et al. 2015) , según:

- a) La variabilidad intra-grupal estimada mediante desviación estándar basado en estudios previos similares del tutor principal y otros (Córdova et al. 2015; Guihard et al. 2015)
- b) Error tipo 1 definido al 5% (p=0.05)
- c) El poder del estudio es del 80%, es decir, la probabilidad que la intervención demuestre un efecto en grupo experimental.
- d) Pruebas estadísticas seleccionadas para evaluar diferencias entre dos grupos. En este estudio en el que evaluaremos de manera paramétrica variables cuantitativas continuas, utilizaremos el t-test para comparar entre dos grupos. Los cálculos serán ejecutados mediante software GraphPad Prism 9.0.1 (Software GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.).
- e) 10% pérdida de animales por muerte o error de acuerdo con fórmula:

$$\text{Tamaño muestral } (n^*) \text{ corregido} = \text{Tamaño muestral } (n) / (1 - [\% \text{ attrition}/100])$$

$$(n^*) = 4/0.9 = 4.4 \sim 5$$

Defecto óseo tibial monocortical

El modelo de fractura tibial es el más utilizado para el estudio de la reparación ósea. La anatomía de la tibia y la dificultad para estabilizarla al crear una fractura, son factores a considerar al elegir dicho modelo (Holstein et al. 2009). Por ello, para este estudio se estableció un modelo de defecto óseo monocortical (Chen et al. 2018) en la cara antero medial de la diáfisis proximal en la tibia izquierda de los individuos, estandarizando la zona intervenida y asegurando la estabilidad de la fractura. Además, cabe mencionar que el tutor a cargo de la investigación posee vasta experiencia en este modelo (Chen et al. 2018).

Aleatoriamente, se asignaron 5 animales al grupo esqueléticamente joven (5 semanas de edad) y 5 animales al grupo esqueléticamente maduro (24 semanas de edad) (Figura 5) (Dutta y Sengupta 2016).

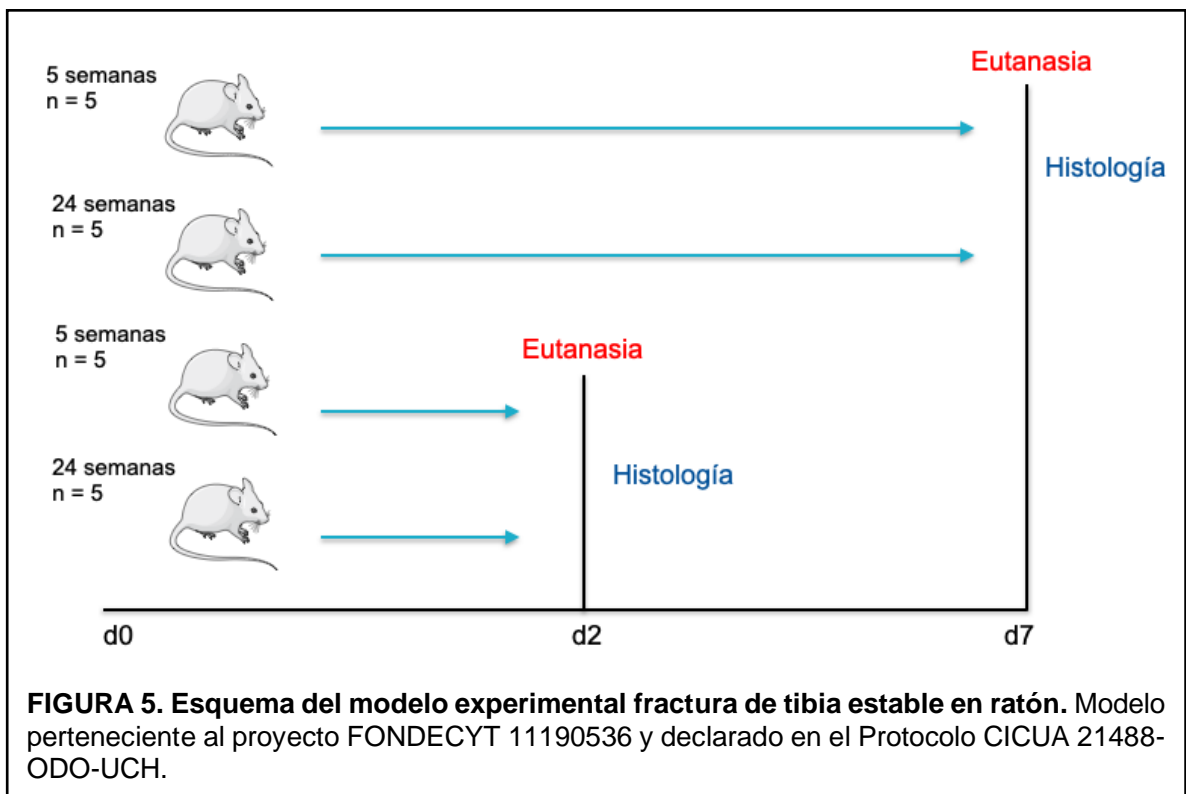


FIGURA 5. Esquema del modelo experimental fractura de tibia estable en ratón. Modelo perteneciente al proyecto FONDECYT 11190536 y declarado en el Protocolo CICUA 21488-ODO-UCH.

Inicialmente, los ratones fueron anestesiados vía inhalatoria con gas isoflurano al 5% hasta alcanzar un estado de inconciencia general. Alcanzado este punto, se disminuyó la concentración a 1,5% para mantener la anestesia. En un campo aséptico se preparó la piel para la incisión en cara antero medial de la tibia izquierda, donde se realizó un defecto óseo mediante osteotomía monocortical de 1mm de diámetro con motor quirúrgico dental NSK SurgicPro y fresa de carbide redonda de 1 mm Kerr (ISO N° 500-104-001-001-010) irrigada con solución salina, cuidando no dañar la cortical posterior de la tibia (**Figura 6**). La herida operatoria fue suturada con material reabsorbible catgut. Para la analgesia postoperatoria se administró Carprofeno 5 mg/kg cada 24 horas por 3 días vía subcutánea (**Anexo 1**).

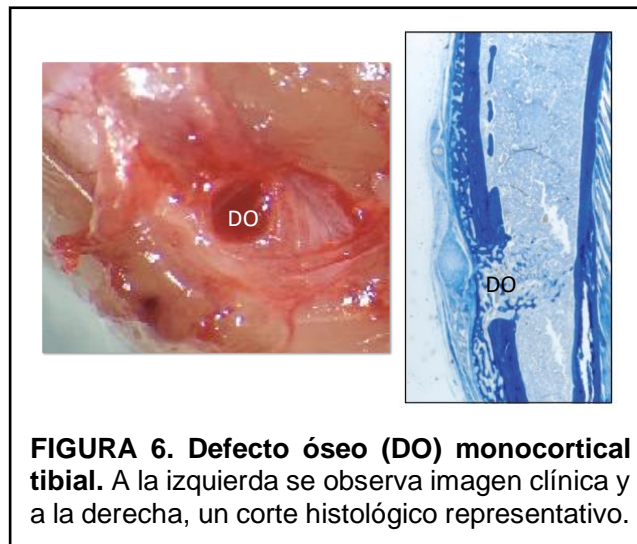


FIGURA 6. Defecto óseo (DO) monocortical tibial. A la izquierda se observa imagen clínica y a la derecha, un corte histológico representativo.

Eutanasia y recolección de muestras

Los individuos fueron eutanasiados al segundo día posterior a la creación del defecto con CO₂ vía inhalatoria. En un campo aséptico, se procedió a recolectar las muestras de tibia, removiendo cuidadosamente el pie, parte del fémur y la piel del animal (**Figura 7**). En total, se recolectaron 10 tibias izquierdas, con defecto óseo y 4 tibias derechas, sanas. Luego, se introdujeron individualmente en tubos rotulados con 15 ml de formalina al 10% por 24 horas para fijar los tejidos. Posteriormente, las muestras fueron lavadas en PBS e inmersas en 15 ml de EDTA al 5% pH=7 en

agitación por 29 días, renovando el EDTA cada 4 días, para su descalcificación. Una muestra de tibia derecha por grupo fue inmersa en 25 ml de PBS para ser utilizada como control interno de descalcificación (una vez realizado el control, fue sometida al mismo proceso de descalcificación que las demás muestras).

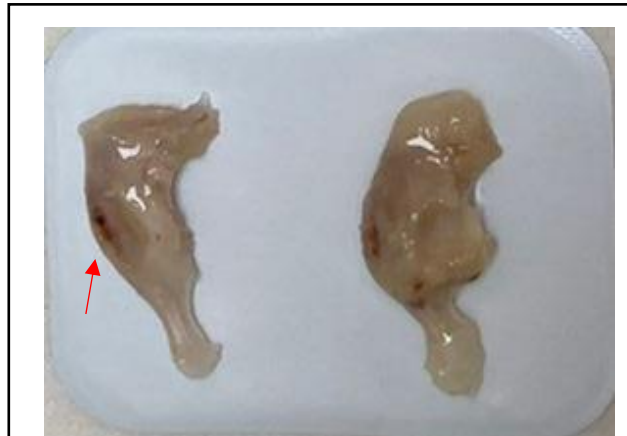


FIGURA 7. Aspecto macroscópico de muestras de tibia. A la izquierda se observa parte de fémur y tibia con defecto óseo (flecha). A la derecha muestra control.

Descalcificación de muestras para procesamiento histológico

Se comprobó la descalcificación de las muestras, con equipo de rayos dental Satelec Acteon X Mind y películas de radiografía periapical, empleando los siguientes parámetros: voltaje de 70kV, intensidad de 8mA y tiempo de exposición 0,16s. Se obtuvieron imágenes radiográficas compatibles con tejidos no mineralizados o con bajo contenido mineral en todas las muestras descalcificadas en EDTA al 5% por 29 días (**Figura 8**).



Procesamiento para estudio histológico

Al completar la descalcificación, las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación, para luego ser incluidas en bloques de parafina de forma individual. Posteriormente, se cortaron en láminas de 3 micrones, abarcando el defecto óseo en orientación sagital, utilizando el micrótopo Thermo Scientific Microm HM 325 del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (**Figura 9**). Las láminas fueron ubicadas en portaobjetos convencionales.

La técnica de elección para la tinción de las muestras fue la de hematoxilina-eosina, que se caracteriza por ser una técnica simple, ampliamente utilizada en histopatología, de costo relativamente bajo y que permite la tinción simultánea de múltiples portaobjetos (Bancroft y Layton 2013; Alturkistani et al. 2015).



FIGURA 9. Taco de parafina con muestra montado en micrótopo durante obtención de cortes histológicos.

Para el proceso de tinción, las láminas fueron desparafinadas en horno a 60 °C durante la noche y rehidratadas a través de concentraciones decrecientes de etanol, según el protocolo de Bateria de tinción Hematoxilina Eosina del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología Universidad de Chile (**Anexo 2**).

Finalmente, los portaobjetos fueron deshidratados a través de concentraciones crecientes de etanol, para luego proteger los tejidos con medio de montaje Flo-Texx y cubreobjetos (**Figura 10**).



FIGURA 10. Cortes histológicos obtenidos montados en portaobjetos y teñidos con técnica de

Selección de láminas para microfotografía y análisis

Las láminas teñidas fueron observadas con microscopio Axiolab ZEISS bajo objetivo de 4x. Se incluyeron todas las laminas cuya tinción resultó exitosa en términos de intensidad de color y aquellas en que la zona de interés de encontraba íntegra. Se excluyeron las láminas cuando:

- Existió desprendimiento total del tejido o de la zona de interés.
- La muestra sufrió fractura de la cortical posterior.
- La fractura monocortical no se encontraba en la zona proximal de la diáfisis tibial (ej: fractura monocortical en epífisis o metáfisis proximales).
- El eje mayor del corte histológico no estaba en el plano sagital de la fractura monocortical.

De acuerdo con estos criterios, la cantidad final de muestras por grupo fue de n=3, con 39 láminas en el grupo de 5 semanas y 29 láminas en el grupo de 24 semanas.

Microfotografía

Las imágenes fueron obtenidas con el objetivo 4x del microscopio Olympus BX-41, la cámara de microfotografía Leica MC120 HD (5 megapíxeles) y el software Leica LAS EZ para Windows, utilizando los siguientes parámetros: Brillo 60%, Gamma 0,8 y Saturación 146. Con el software Leica LAS EZ se creó una escala de 1mm para el posterior análisis de las imágenes obtenidas. Todas las imágenes fueron guardadas en formato TIFF.

Determinación y recorte de la Región de Interés (ROI)

En primer lugar, con el software ImageJ se midió la distancia en píxeles equivalente al milímetro establecido previamente como escala, obteniéndose un resultado de 302,1562 píxeles por milímetro. Luego, se midió la distancia en píxeles entre la cara interna de ambas corticales (diámetro medular) de todas las imágenes obtenidas, las que fueron registradas en una planilla de Microsoft Excel. Se calculó el promedio de estas distancias y se determinó el mínimo posible (550 x 527) para que el área seleccionada permitiera observar el defecto óseo en todas las imágenes, sin abarcar ni sobrepasar las corticales.

Luego de establecer la ROI, se recortaron las imágenes con el software Adobe Photoshop 2021 v22.5.1 para MacOS, siguiendo la secuencia descrita en el **Anexo 3**.

Análisis cualitativo del infiltrado inflamatorio

Se analizaron los recortes obtenidos, considerando los siguientes aspectos:

1. Ubicación del infiltrado inflamatorio: En qué regiones anatómicas se encontró predominantemente.
2. Organización de las células del infiltrado inflamatorio: Formando cúmulos, retículas, etc.
3. Características del hematoma: Área que ocupa y su relación con las células inflamatorias.

Conteo manual de células

Obtenido el recorte de la ROI, se midió el número de células del infiltrado inflamatorio en ImageJ, siguiendo los pasos detallados en el **Anexo 4**, considerando los núcleos eosinófilos de células presentes en la zona del defecto óseo, compatibles con células de la respuesta inmune innata como macrófagos (monocitos), neutrófilos y linfocitos T.

Medición de número de células inflamatorias por unidad de área

En ImageJ se estableció una escala global de 302,1562 píxeles por milímetro (*Analyze > Set Scale*). Luego, se seleccionó el área total (*Edit > Selection > Select All*) y se analizó la imagen para obtener el área total en mm² (*Analyze > Measure*). Se obtuvo un área total de 3,175 mm² en todas las imágenes, comprobándose así que la ROI fue obtenida correctamente en cada una de ellas.

Posteriormente, para cada imagen, el número de células obtenidas en el conteo previo se dividió por el área total, obteniéndose la cantidad de células por área con la siguiente fórmula:

$$\boxed{Células/mm^2 = \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{3,175}}$$

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se informaron como “promedio \pm error estándar (EE)”. Luego de la evaluación de valores atípicos con *Outlier Calculator* de Graphpad, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos. Al comprobarse la distribución normal de los resultados, se aplicó el test de t de Student (no pareado) y sin corrección para comparar el delta de dos grupos etarios independientes. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en GraphPad Prism 9.0.1 (Software GraphPad, La Jolla, CA, EE. UU.), donde el valor estadístico de los resultados está determinado por $p < 0,05$ en el test t.

5) Resultados

Morfología del infiltrado inflamatorio y hematoma del sitio fracturado.

Existieron diferencias sustanciales en las características del infiltrado inflamatorio entre los individuos de 5 y 24 semanas (**Figura 11**). En los sujetos de 5 semanas, el infiltrado se observó principalmente concentrado en zonas adyacentes a hueso y médula ósea, rodeando el hematoma. En tanto, en individuos de 24 semanas, el infiltrado se observa disperso por toda la región de interés, con algunas pocas células organizándose en forma reticular en la zona más central y hacia la cortical anterior (parte superior de las imágenes histológicas). Algunas células ahusadas rodean el hematoma en sujetos de ambas edades, sin embargo, en individuos de 24 semanas se observa ocupando una mayor área (**Figura 11C y 11D**).

Otro punto que considerar es el tamaño del hematoma. En individuos de 5 semanas se observó un hematoma de gran tamaño, que ocupa un porcentaje importante de la región de interés; con gran cantidad y densidad de células hemáticas que se organizan en uno o más núcleos y con una pequeña cantidad de células inflamatorias en su interior. Por otra parte, los sujetos de 24 semanas presentaron un hematoma muy menor en cuanto a tamaño, generalmente con las células hemáticas concentradas en un solo núcleo y con un escaso contenido de células inflamatorias (**Figura 11A y 11B**).

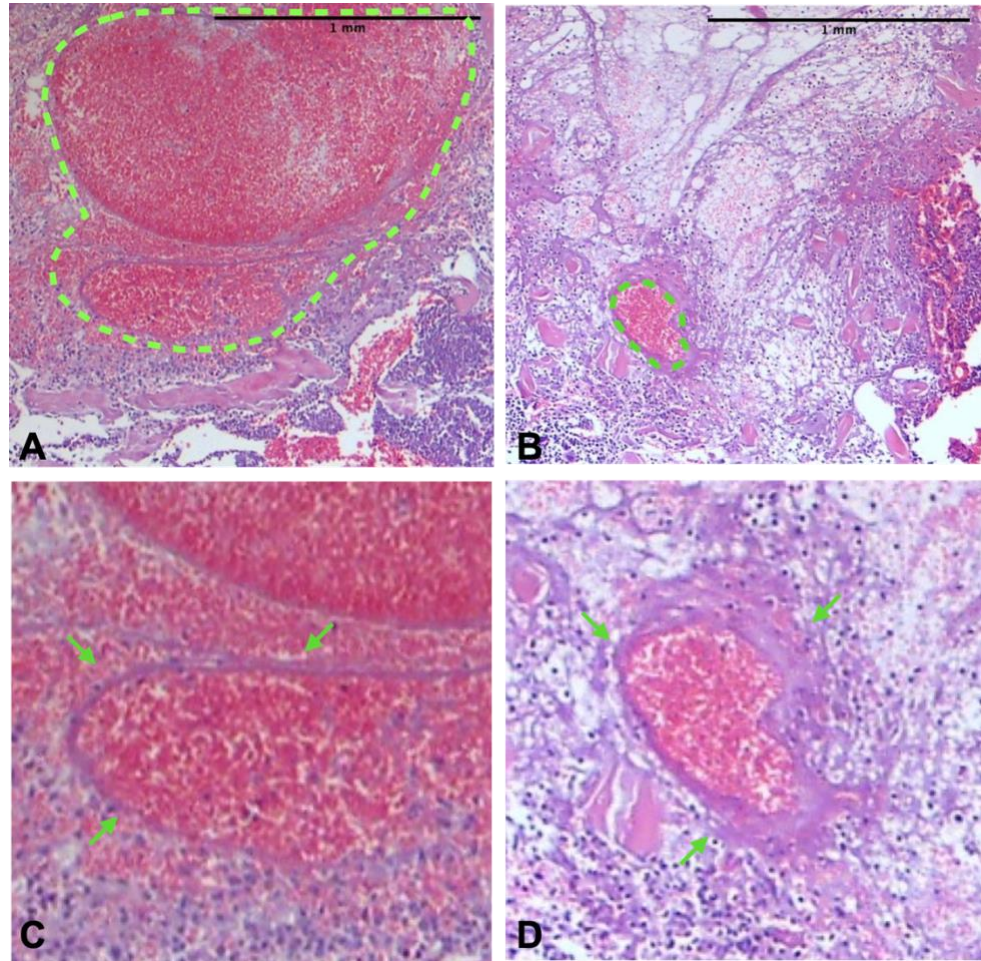
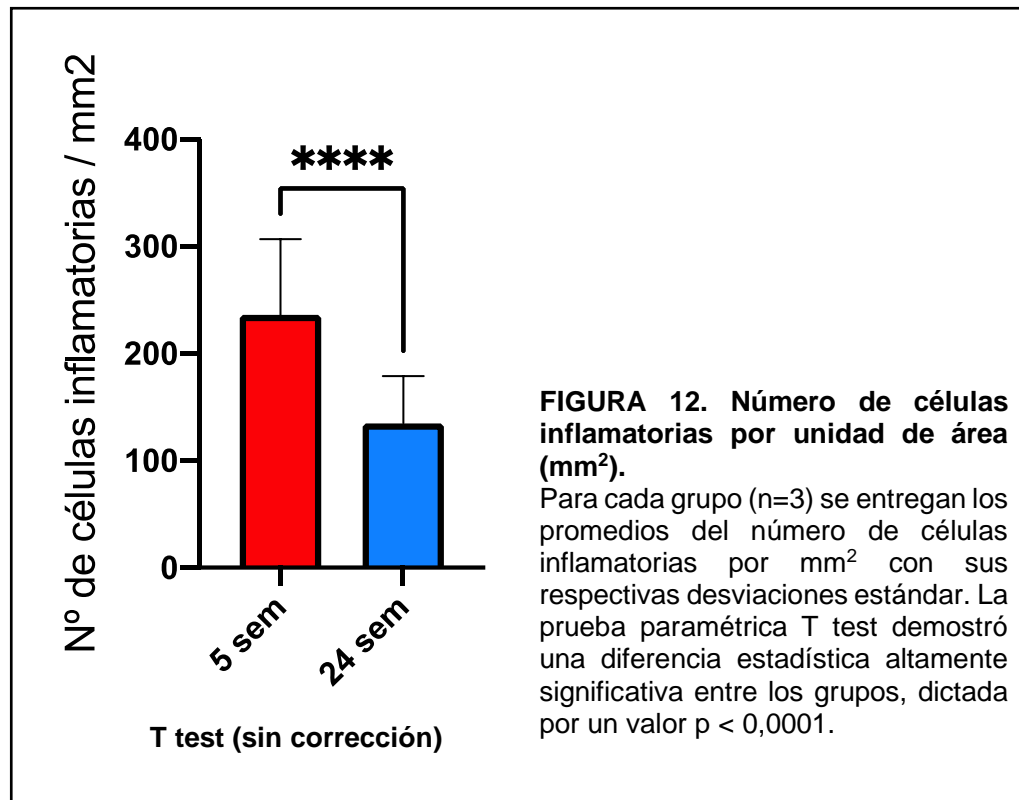


FIGURA 11. Morfología del infiltrado inflamatorio a los 2 días post creación del defecto óseo monocortical en individuos de 5 semanas (A, C) y 24 semanas (B, D). La línea verde punteada delimita el hematoma en láminas histológicas de dos individuos de diferente edad (A, B). Se observa una disminución significativa del tamaño del hematoma con la edad. En C y D las flechas señalan células ahusadas que delimitan el hematoma.

Cuantificación de las células inflamatorias

Los individuos de 5 semanas presentaron un promedio de $236,0 \pm 11,36$ células por mm^2 , mientras que los sujetos de 24 semanas presentaron un promedio de $134,7 \pm 44,02$ células por mm^2 a los dos días de realizado el defecto óseo. Esta diferencia presentó un valor estadístico altamente significativo con $p < 0,0001$ (**Figura 12**).



6) Discusión

En este estudio preclínico de ratones con fractura estable de tibia en contexto de envejecimiento, quisimos poner en evidencia el infiltrado inflamatorio presente en un sitio fracturado en dos periodos alejados de la vida: jóvenes inmaduros esqueléticamente y adultos maduros esqueléticamente.

Los resultados obtenidos demuestran una importante reducción del infiltrado inflamatorio en sujetos esqueléticamente maduros. La capacidad de reclutar células de la inmunidad innata, entre ellos los macrófagos, hacia un sitio de reparación ósea disminuiría con la edad, debido a la disminución de los mecanismos de quimiotaxis que las células inmunes experimentan con la edad (Solana et al. 2012).

Las células inmunes presentes durante las primeras horas posteriores a una fractura regulan la función y migración de otras células inmunes, como otros macrófagos y linfocitos T, por lo que, las vías de señalización que regulan las primeras etapas de la reparación ósea podrían verse atenuadas en los organismos esqueléticamente maduros, produciendo un volumen de infiltrado inflamatorio mucho menor, respecto de individuos que aún se encuentran en maduración esquelética (Gibon et al. 2016). Como consecuencia de un menor infiltrado inflamatorio en las etapas tempranas de la reparación ósea, los mecanismos de regulación inmune también podrían verse afectados en las etapas más tardías, disminuyendo la respuesta del sistema inmune adaptativo y retardando la regeneración de la estructura ósea laminillar.

Un estudio no publicado en que se utilizó el mismo modelo experimental de defecto óseo tibial demostró que la edad disminuye la capacidad de formar nuevo hueso a los siete días, al presentar diferencias significativas en la superficie de nuevo hueso formado entre individuos esqueléticamente jóvenes y maduros (Panez et al. 2022). Así, una disminución del número de células inmunes que infiltran el sitio de fractura a los dos días estaría asociada a una menor capacidad para formar nuevo hueso a los siete días post creación del defecto.

Se ha descrito que los macrófagos poseen una menor capacidad secretora de quimioquinas y una menor expresión del fenotipo M₁ en organismos envejecidos, factores que son clave en las primeras horas posteriores a una noxa. A lo anterior, se suma un menor reclutamiento de células inflamatorias, entre ellas, macrófagos, lo que podría generar una menor estimulación de células madre mesenquimales, menor diferenciación de osteoblastos y/o menor activación directa de osteoblastos, impidiendo la aposición de matriz ósea y comprometiendo la regeneración del tejido (Loi et al. 2016a). La menor activación y diferenciación de osteoblastos también podría inhibir las vías de regulación positiva que estimulan a las células madre hematopoyéticas para diferenciarse en monocitos/macrófagos, generando un ciclo que inhibe la respuesta inmune en la reparación ósea desde el origen (Loi et al. 2016a). Para futuros estudios, sería relevante medir los factores y citoquinas proinflamatorias presentes en el sitio reparativo, por ejemplo, a través de una técnica q-PCR.

Desde el punto de vista morfológico, es plausible pensar que los individuos de 5 semanas sufrieron una mayor hemorragia durante la cirugía, lo que se tradujo en la formación de un hematoma más grande. Esta mayor hemorragia se podría deber a un mayor número de vasos sanguíneos presentes en la medula ósea lo que aceleraría la migración de células inflamatorias y sus precursores hacia el sitio de fractura.

Dentro de las limitaciones de este estudio, mencionamos que el modelo de envejecimiento utilizado en este estudio involucró animales adultos con esqueleto maduro y no en edad geriátrica (12-18 meses). Sin embargo, la diferencia etaria con el grupo de jóvenes fue suficiente para poner en evidencia significativas diferencias celulares y morfológicas entre ellos. En futuras investigaciones sería interesante comparar la respuesta inflamatoria y reparativa del tejido óseo en sujetos de más diversas edades y establecer el patrón con el que esta capacidad va decreciendo.

Otra limitación fue la imposibilidad de reconocer específicamente el fenotipo de células presentes en el infiltrado inflamatorio debido a razones técnico-operativas. El procedimiento de la selección de células del infiltrado inflamatorio fue arbitrario, reconociendo las diferencias entre la anatomía del hueso en homeostasis y en fractura monocortical. Para futuros estudios lo óptimo será realizar un marcaje específico con técnica inmunohistoquímica, para reconocer particularmente el comportamiento y los cambios que la edad produce en cada tipo de célula presente en el infiltrado inflamatorio. En esta misma línea, sugerimos realizar un inmunomarcaje de macrófagos con anticuerpo para F4/80 que permitiría cuantificar de mejor manera y proponer potenciales mecanismos de regulación de la reparación de fractura.

Aún con sus limitaciones, este estudio permitió establecer un modelo piloto para próximas investigaciones del laboratorio del tutor principal, abriendo las puertas para un futuro estudio de xenoinjerto *in vivo*.

7) Conclusión

Concluimos que tanto el infiltrado inflamatorio como el hematoma ubicado en el sitio de fractura disminuyen en función de la maduración del esqueleto.

Para comprender mejor el efecto de la edad sobre el infiltrado inflamatorio, se necesitan nuevos estudios que realicen el marcaje específico de las células que lo componen. Se abren las puertas a nuevas investigaciones que permitan trasladar conocimientos *in vivo* al modelo que desarrollamos en este proyecto.

8) Referencias bibliográficas

Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology*. enero de 2006;11(s1):S32-6.

Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, Kohler T, Müller R, Wu AC, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res*. julio de 2011;26(7):1517-32.

Alexander KA, Raggatt L, Millard S, Batoon L, Chiu-Ku Wu A, Chang M, et al. Resting and injury-induced inflamed periosteum contain multiple macrophage subsets that are located at sites of bone growth and regeneration. *Immunol Cell Biol*. enero de 2017;95(1):7-16.

Almeida M, Laurent MR, Dubois V, Claessens F, O'Brien CA, Bouillon R, et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*. enero de 2017;97(1):135-87.

Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *GJHS*. 25 de junio de 2015;8(3):72.

Bancroft JD, Layton C. The hematoxylin and eosin. En: *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* [Internet]. Elsevier; 2013 [citado 28 de septiembre de 2022]. p. 173-86. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978070204226300010X>

Batoon L, Millard SM, Raggatt LJ, Pettit AR. Osteomacs and Bone Regeneration. *Curr Osteoporos Rep*. agosto de 2017;15(4):385-95.

Bigueti CC, Vieira AE, Cavalla F, Fonseca AC, Colavite PM, Silva RM, et al. CCR2 Contributes to F4/80+ Cells Migration Along Intramembranous Bone Healing in Maxilla, but Its Deficiency Does Not Critically Affect the Healing Outcome. *Front Immunol*. 10 de agosto de 2018;9:1804.

Blom AB, van Lent PLEM, Holthuysen AEM, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, et al. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during

experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. agosto de 2004;12(8):627-35.

Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal Tissue Macrophages Are Intercalated throughout Human and Mouse Bone Lining Tissues and Regulate Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *J Immunol*. 15 de julio de 2008;181(2):1232-44.

Chen T, Li J, Córdova LA, Liu B, Mouraret S, Sun Q, et al. A WNT protein therapeutic improves the bone-forming capacity of autografts from aged animals. *Sci Rep*. diciembre de 2018;8(1):119.

Córdova LA, Trichet V, Escriou V, Rosset P, Amiaud J, Battaglia S, et al. Inhibition of osteolysis and increase of bone formation after local administration of siRNA-targeting RANK in a polyethylene particle-induced osteolysis model. *Acta Biomaterialia*. febrero de 2015;13:150-8.

Cottrell JA, Turner JC, Arinzeh TL, O'Connor JP. The Biology of Bone and Ligament Healing. *Foot and Ankle Clinics*. diciembre de 2016;21(4):739-61.

Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*. abril de 2015;144(4):541-8.

De Maeyer RPH, Chambers ES. The impact of ageing on monocytes and macrophages. *Immunology Letters*. febrero de 2021;230:1-10.

Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*. mayo de 2016;152:244-8.

Ensrud KE. Epidemiology of Fracture Risk With Advancing Age. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 1 de octubre de 2013;68(10):1236-42.

Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR Journal*. 1 de enero de 2002;43(4):244-58.

Forbes SJ, Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from

mechanism to therapy. *Nat Med.* agosto de 2014;20(8):857-69.

Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol.* octubre de 2018;14(10):576-90.

Freytes DO, Kang JW, Marcos-Campos I, Vunjak-Novakovic G. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* enero de 2013;114(1):220-9.

Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science.* 5 de febrero de 2010;327(5966):656-61.

Gibon E, Lu L, Goodman SB. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. *Stem Cell Res Ther.* diciembre de 2016;7(1):44.

Guerrero JL. Macrophages. En: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 31 de marzo de 2021]. p. 73-93. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644818300698>

Guihard P, Boutet MA, Brounais-Le Royer B, Gamblin AL, Amiaud J, Renaud A, et al. Oncostatin M, an Inflammatory Cytokine Produced by Macrophages, Supports Intramembranous Bone Healing in a Mouse Model of Tibia Injury. *The American Journal of Pathology.* marzo de 2015;185(3):765-75.

Hajishengallis G. Too old to fight? Aging and its toll on innate immunity. *Molecular Oral Microbiology.* febrero de 2010;25(1):25-37.

Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, et al. Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury.* junio de 2014;45:S3-7.

Hoch AI, Binder BY, Genetos DC, Leach JK. Differentiation-Dependent Secretion of Proangiogenic Factors by Mesenchymal Stem Cells. Beltrami AP, editor. *PLoS ONE.* 20 de abril de 2012;7(4):e35579.

Holstein JH, Garcia P, Histing T, Kristen A, Scheuer C, Menger MD, et al. *Advances*

in the Establishment of Defined Mouse Models for the Study of Fracture Healing and Bone Regeneration. *Journal of Orthopaedic Trauma*. mayo de 2009;23(Supplement 5):S31-8.

Jackaman C, Radley-Crabb HG, Soffe Z, Shavlakadze T, Grounds MD, Nelson DJ. Targeting macrophages rescues age-related immune deficiencies in C57 BL /6J geriatric mice. *Aging Cell*. junio de 2013;12(3):345-57.

Jackaman C, Tomay F, Duong L, Abdol Razak NB, Pixley FJ, Metharom P, et al. Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils. *Ageing Research Reviews*. julio de 2017;36:105-16.

Kawamoto H, Minato N. Myeloid cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. agosto de 2004;36(8):1374-9.

Könnecke I, Serra A, El Khassawna T, Schlundt C, Schell H, Hauser A, et al. T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion. *Bone*. julio de 2014;64:155-65.

Li F, Okreglicka KM, Pohlmeier LM, Schneider C, Kopf M. Fetal monocytes possess increased metabolic capacity and replace primitive macrophages in tissue macrophage development. *EMBO J [Internet]*. 3 de febrero de 2020 [citado 1 de junio de 2020];39(3). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/emboj.2019103205>

Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. mayo de 2016a;86:119-30.

Loi F, Córdova LA, Zhang R, Pajarinen J, Lin T hua, Goodman SB, et al. The effects of immunomodulation by macrophage subsets on osteogenesis in vitro. *Stem Cell Res Ther*. diciembre de 2016b;7(1):15.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. julio de 2014;41(1):14-20.

Ogawa T, Kitagawa M, Hirokawa K. Age-related changes of human bone marrow: a histometric estimation of proliferative cells, apoptotic cells, T cells, B cells and

macrophages. *Mechanisms of Ageing and Development*. agosto de 2000;117(1-3):57-68.

Ono T, Takayanagi H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. agosto de 2017;15(4):367-75.

Panez, I, Córdova LA, Cortés J. Efecto de la Edad en la Reparación de Fractura: Estudio Preclínico. (Tesis de pregrado, sin publicar) . Facultad de Odontología. Universidad de Chile, diciembre de 2022.

Pettit AR, Chang MK, Hume DA, Raggatt LJ. Osteal macrophages: A new twist on coupling during bone dynamics. *Bone*. diciembre de 2008;43(6):976-82.

Raggatt LJ, Wullschleger ME, Alexander KA, Wu ACK, Millard SM, Kaur S, et al. Fracture Healing via Periosteal Callus Formation Requires Macrophages for Both Initiation and Progression of Early Endochondral Ossification. *The American Journal of Pathology*. diciembre de 2014;184(12):3192-204.

Schaller E, Macfarlane AJ, Rupec RA, Gordon S, McKnight AJ, Pfeffer K. Inactivation of the F4/80 Glycoprotein in the Mouse Germ Line. *MCB*. 15 de noviembre de 2002;22(22):8035-43.

Schlundt C, Fischer H, Bucher CH, Rendenbach C, Duda GN, Schmidt-Bleek K. The multifaceted roles of macrophages in bone regeneration: A story of polarization, activation and time. *Acta Biomaterialia*. octubre de 2021;133:46-57.

Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto Á, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, et al. CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. *Jl*. 15 de abril de 2014;192(8):3858-67.

Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Seminars in Immunology*. octubre de 2012;24(5):331-41.

Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, Anfang RR, Ng J, Nakazawa KR, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials*. enero

de 2015;37:194-207.

Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annu Rev Immunol.* 21 de marzo de 2015;33(1):643-75.

Vi L, Baht GS, Whetstone H, Ng A, Wei Q, Poon R, et al. Macrophages Promote Osteoblastic Differentiation In Vivo: Implications in Fracture Repair and Bone Homeostasis: MACROPHAGES PROMOTE OSTEOBLASTIC DIFFERENTIATION. *J Bone Miner Res.* junio de 2015;30(6):1090-102.

Wintges K, Beil FT, Albers J, Jeschke A, Schweizer M, Claass B, et al. Impaired bone formation and increased osteoclastogenesis in mice lacking chemokine (C-C motif) ligand 5 (Ccl5): BONE REMODELING IN *CCL5* -DEFICIENT MICE. *J Bone Miner Res.* octubre de 2013;28(10):2070-80.

Wong CK, Smith CA, Sakamoto K, Kaminski N, Koff JL, Goldstein DR. Aging Impairs Alveolar Macrophage Phagocytosis and Increases Influenza-Induced Mortality in Mice. *Jl.* 1 de agosto de 2017;199(3):1060-8.

9) Anexos

Anexo 1. Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales Código CICUA 21488 – ODO - UCH



UNIVERSIDAD DE CHILE
COMITÉ INSTITUCIONAL de CUIDADO y USO de ANIMALES (CICUA)

PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES

(Debe ser presentado en español)

Uso interno

Investigador: Luis Córdova Jara
Código Comité Facultad: FOUCH 210616
Código CICUA: **21488 – ODO – UCH**
Fecha de recepción: 16/06/2021
Fecha certificación: 19/08/2021



A. ANTECEDENTES ADMINISTRATIVOS

A.1. Título del proyecto presentado:

Immunomodulating bone healing for the aging via macrophages - osteoprogenitor cells interaction: Estudio Piloto

Fecha de inicio y término del proyecto (indique mes y año): **Junio 2021 - Enero 2022**

Fecha de inicio y término de uso de los animales (indique mes y año): **Septiembre 2021 – Noviembre 2021**

A.2. Tipo de proyecto y actividad (marque con una cruz, si es Tesis indique de que Programa)

INVESTIGACIÓN: DOCENCIA: TESIS: OTRO:

Fuente Financiamiento y vigencia (Nombre y n°): **FONDECYT Inicio 11190536**

A.3. Nombre del Investigador Responsable y nombramiento institucional (cargo): Prof. Dr. Luis Córdova Jara, Profesor Asistente, Departamento de Cirugía Bucal y Maxilofacial, Facultad de Odontología

Nombre Patrocinado, si existiese (Investigador externo, Postdoctorante, Tesista): Isidora Panes Toro, Felipe Saavedra Vásquez., tesis de pregrado, Facultad de Odontología.

A.4. Teléfono(s) de contacto: +569 - 32025113

Fax:


e-mail: lcordova@uchile.cl

A.5. Mencione el Laboratorio y Departamento de la Facultad en la que se desarrollará el trabajo con animales (si el trabajo lo realizará en más de un Laboratorio o Unidad debe especificarlo): Laboratorio Dr. Luis Cordova, Depto. de Cirugía Bucal y Maxilofacial, FOUCH

A.6. Contacto en caso de una emergencia con los animales en horario no laboral (al menos 2 personas).

Nombre: Prof. Dr. Luis Córdova Jara +569 – 32025113, Felipe Saavedra +56 9 8293 8145 o Srta. Isidora Panez +56 9 9342 4022

A.7. Listado de personas autorizadas para el manejo de los animales. Indique su capacitación (técnico, bioterista, tesista, postdoctorante, investigador, académico, etc.) y la función directa que realizará en el manejo de los animales (ej. Aseo, inoculación de animales, cirugías, etc) y vínculo con el Laboratorio. Incorpore las filas que sean necesarias. NO OLVIDE que debe comunicar oportunamente si se produce un cambio en el listado presentado a continuación (agregue cuantas filas sean necesarias).

NOMBRE	CAPACITACIÓN	FUNCIÓN en el Proyecto	FILIACIÓN Institucional	VÍNCULO con la Unidad
Luis Córdova Jara	<p>Capacitación en manejo de animales: (Diploma Escuela Veterinaria – Univ. Nantes-ONIRIS https://www.oniris-nantes.fr/) (Animal Care and Use Program – Stanford University).</p> <p>Experiencia en diseño y planificación experimental y cuidado de/con modelos animales.</p> <p>Experiencia en modelos de defectos óseos murinos.</p>	<p>Anestesia general Manipulación quirúrgica Analgesia post-operatoria Cuidado y observación post-operatoria Eutanasia.</p>	<p>Profesor Asistente Universidad de Chile</p>	<p>Investigador Principal IP</p> 
Isidora Panez (tesista de Pregrado)		<p>Observadora en los procedimientos que realizará Dr. Luis Córdova.</p>	<p>Estudiante de 6to año de Odontología</p>	<p>Tesista</p>
Felipe Saavedra (tesista de Pregrado)		<p>Observador en los procedimientos que realizará Dr. Luis Córdova.</p>	<p>Estudiante de 6to año de Odontología</p>	<p>Tesista</p>

Actualizado Octubre 2017

B. ANTECEDENTES DE LOS ANIMALES A UTILIZAR**B.1. Especie(s), raza, cepa, y línea transgénica (si aplica) utilizada(s):**

Ratón (Mus musculus) - Cepa BALB/c (<https://www.jax.org/strain/000651>)

B.2. Edad/Estado de desarrollo

Adultos jóvenes y adultos maduros (5 y 24 semanas, respectivamente)

B.3. Peso:

Adultos jóvenes 21,8 – 27 g y adultos esquelétalmente maduros 30-40g

B.4. Sexo: Machos.**B.5. Indique el origen de los animales (lugar de procedencia):**

Plataforma Experimental, ICOD, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Calle Olivos 943, Independencia, Santiago de Chile

B.6. Indique el lugar donde se realizarán los procedimientos y la superficie disponible para que los animales vivos permanezcan (ya sea en el bioterio o fuera de él):

Plataforma Experimental, ICOD, Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Calle Olivos 943, Independencia, Santiago de Chile

B.7. Señale el número total de animales a utilizar en el proyecto (Señale además si se compartirán animales con otro proyecto. El desglose por objetivos se debe incluir en la sección C.4):

20 totales.

B.8. Señale el método(s) de identificación de los animales

Hasta cinco (5) ratones serán agrupados en una (1) jaula especificando: cepa, fecha de nacimiento, fecha de destete, identificación del grupo al cual pertenecen dentro del experimento. Para la identificación de cada individuo se realizará una marcación en la piel de la cola con marcador indeleble.

B.9. Describa detalladamente las condiciones de traslado de los animales y la(s) persona(s) responsable(s) del traslado.

No aplica.

B.10. Si procede, remita el certificado de SAG o institución que autoriza el uso (en caso de animales silvestres).

No aplica.



C. PROPÓSITOS DE LA INVESTIGACIÓN

C.1. Señale el o los propósito(s) principal(es) del Proyecto en un párrafo no superior a 12 líneas. Éstos deben ser explicados de manera que sean comprensibles para el ciudadano común. Además, la relevancia del proyecto debe quedar claramente señalada para cualquier evaluador éticista.

El propósito principal del estudio es definir el efecto de la edad sobre la reparación ósea, describiendo la contribución tanto del infiltrado de células inflamatorias (macrófagos) como de células de la médula ósea (precursores vasculares y precursores de hueso) a dicho proceso. Para cumplir con los objetivos específicos, utilizaremos un modelo animal de defecto óseo tibial de tamaño no crítico realizado quirúrgicamente en ratones de 5 y 24 semanas de edad. Mediante histología e inmunohistoquímica se identificarán a las distintas células participantes en la reparación ósea. Finalmente, se establecerá la relación de estas células con la capacidad de formación de nuevo hueso, tanto en individuos jóvenes como maduros.

Este proyecto permitirá determinar el efecto de la edad sobre el número de células inflamatorias y células de la médula ósea durante la reparación ósea, proponiendo así potenciales blancos terapéuticos que favorezcan la reparación ósea.

C.2. Justifique el uso de ANIMALES, en vez de usar modelos alternativos. Por modelos alternativos se entienden aquellos que reemplacen la utilización de animales vertebrados. Indique los motivos por los cuales no se plantea aplicar un método alternativo al procedimiento propuesto.

Para establecer el efecto del envejecimiento sobre las células que regulan la reparación ósea, no existe un mejor modelo biológico que el uso de un animal vertebrado, en este caso, un mamífero. Existe un amplio consenso del rol de factores sistémicos como temperatura corporal, perfusión vascular, hormonas, vitaminas y carga mecánica sobre el remodelado/regeneración ósea. Asimismo, el uso de animales de experimentación permite emular las interacciones o crosstalk molecular del nicho óseo con otros nichos (vascular, hematopoyético, etc.).

C.3. Explique las características que justifiquen el uso de esta(s) ESPECIE(S). Indique la especie y raza (o cepa) que se propone utilizar y los motivos de esta selección.

Modelo mínimo indispensable para responder la pregunta de investigación del estudio que es: ¿cuál es el efecto del envejecimiento sobre las células que regulan la reparación ósea?

Modelo validado por la comunidad científica que estudia biología ósea: El modelo de ratón ha sido universalmente aceptado como un modelo útil para el estudio de la biología ósea (1). Específicamente en reparación ósea, se han publicado múltiples protocolos de defectos óseos asociados a fracturas y pérdidas de tejido.

Modelo ratón es el modelo de elección en estudios tipo prueba de concepto: Aún cuando el modelo de ratón es distinto al de los humanos, en comparación con otros modelos (primates no humanos, ovejas, cerdos, perros), por lo general, en el estudio de la eficacia de materiales tipo andamios y de drogas u otro tipo de moléculas en la reparación, se comienza con el modelo de ratón por su facilidad en el manejo, crianza y posterior procesamiento de muestras (al ser éste, un modelo animal pequeño), sumado al hecho de que económicamente es más accesible.



Actualizado Octubre 2017

Elección de cepa/sexo: Ratón (*Mus musculus*) macho - Cepa BALB/c (<https://www.jax.org/strain/000651>). Se utilizará esta cepa, ya que, el laboratorio dispone de un número de individuos que son suficientes para esta investigación, siendo la opción más costo-efectiva para la persecución de los objetivos. Existen factores genéticos dimórficos que producen diferencias tanto en la arquitectura del hueso como en la diferenciación de células óseas. Se eligen ratones machos para obviar la variable del potencial efecto hormonal (estrógenos) en la reparación ósea (7), lo que nos permite responder a la pregunta de investigación planteada. Además, considerando que es un estudio piloto, no queremos aumentar el número de animales de experimentación.

Modelo costo-efectivo: Se justifica el uso de animales pequeños (ratón) debido a su versatilidad de manipulación quirúrgica, disponibilidad de recursos de investigación, costo-efectividad y herramientas de diagnóstico molecular.

Experiencia previa del investigador principal en el uso del modelo ratón. Desde el año 2010, el IP ha ganado experiencia en experimentación animales pequeños (rata y ratón) creando modelos animales para el estudio de la biología ósea en calota craneal, tibia, maxilar, tejido subcutáneo y cápsula renal.

Bibliografía

- (1) Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat.* 2015; 3(3):95-104.
- (2) Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim.* 2011; 45(1):14-24.
- (3) Padovan L, Segat L, Pontillo A, Antcheva N, Tossi A, Crovella S. Histatins in non-human primates: gene variations and functional effects. *Protein Pept Lett.* 2010; 17: 909-18.
- (4) van Dijk Irene, A.F. Beker, W. Jellema, K. Nazmi, G. Wu, D. Wismeijer y col. Histatin-1 enhances cell adhesion to titanium in an implant integration model. *J Den Res.* 2017; 96:430-436.
- (5) Castro M, Torres P, Solano L, Córdova LA, Torres VA. Histatin-1 counteracts the cytotoxic and antimigratory effects of zoledronic acid in endothelial and osteoblast-like cells. *J Periodontol.* 2019; 90(7):766-74.
- (6) Hiro-aki Kodama, Yuji Amagai, Hiroko Sudo, Shiro Kasai, Shigehisa Yamamoto. Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Japanese Journal of Oral Biology.* (1981); 23 (4): 899 – 901.
- (7) Zanotti S, Kalajzic I, Aguila HL, Canalis E. Sex and genetic factors determine osteoblastic differentiation potential of murine bone marrow stromal cells. *PLoS One.* 2014 Jan 28;9(1):e86757
- (8) Glatt V, Canalis E, Stadmeier L, Bouxsein ML. Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. *J Bone Miner Res.* 2007 Aug;22(8):1197-207
- (9) Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J et al. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone.* 2009 Dec;45(6):1065-72
- (10) Su P, Tian Y, Yang C, Ma X, Wang X, Pei J, et al. Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy. *Int J Mol Sci.* 9 de agosto de 2018; 19(8).



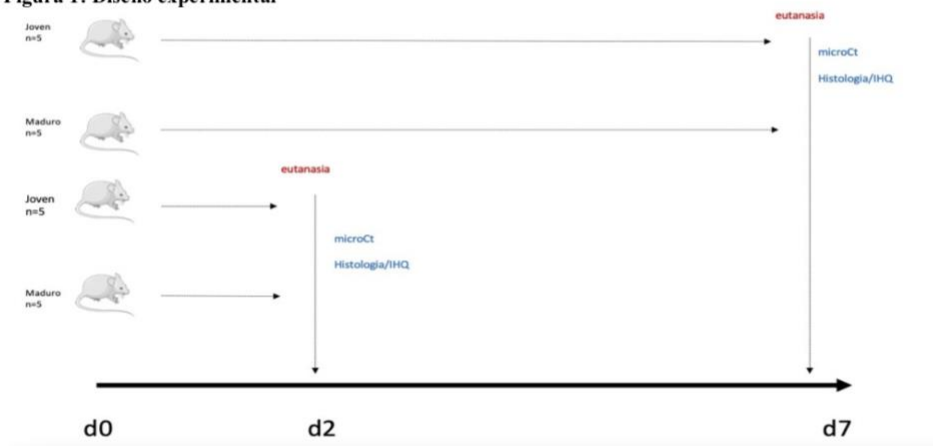
Actualizado Octubre 2017

C.4. Justifique estadística y/o bibliográficamente el número de animales a utilizar por cada uno de los objetivos del estudio. Recuerde que de acuerdo a las normas internacionales de bioética animal, se debe utilizar el mínimo de animales necesario para obtener resultados válidos. Aplicar el principio de las 3 Rs: Reemplazar animales por otro sistema (ej. in vitro); Reducir número de animales; Refinar los procedimientos realizados.

R: El número de ratones por condición es de 5

Dicho número de animales ha sido calculado mediante software G Power según fórmula estándar basada en el análisis de poder del estudio (PMID 12391400), considerando: Habiendo: a) calculado el tamaño muestral = 5 muestras por condición, b) considerado el número de muestras necesarias para realizar dos tipos de análisis (uCT e inmunohistoquímica), y c) cumplir con el principio de “tres Rs”; se consideraron 10 animales para ser eutanasiados tanto para el día 2 como para el día 7 post cirugía. Así, obtendremos 5 muestras de pierna derecha por grupo, las que serán fijadas, luego analizadas por uCT/SEM y luego incluidas en parafina para ser estudiadas mediante histología. (Ver figura 1).

Figura 1: Diseño experimental



Especificaciones del cálculo de tamaño muestral:

$$\text{Tamaño muestral } (n) = 2DS^2 (1.96 + 0.842)^2 / \text{Dif. medias}^2$$

DS: Desviación estándar (DS) de 10%

1.96 y 0.842 corresponden a valor obtenido a error tipo 1 de 5% en tabla Z.

Dif. de medias: Basado en la diferencia del porcentaje de ratio BV/TV estudios de micro-CT previos similares: 80-60= 20

$$n = 1570.24/400 = 4$$



Actualizado Octubre 2017

- a) El efecto del tamaño de muestra necesario para definir diferencia de medias basado en estudios previos similares del investigador principal y otros (PMID: 25462844 y 25559270)
- b) La variabilidad intra-grupal estimada mediante desviación estándar basado en estudios previos similares del investigador principal y otros (PMID: 25462844 y 25559270)
- c) Error tipo 1 definido al 5% ($p=0.05$)
- d) El poder del estudio de 80%, es decir la probabilidad que la intervención demuestre un efecto en grupo experimental.
- e) Bidireccionalidad del efecto esperado, es decir, se espera que la intervención pueda ejercer un efecto pro-osteogénico o un efecto anti-osteogénico
- f) Pruebas estadísticas seleccionadas para evaluar diferencias entre dos grupos. En este estudio en que evaluaremos de manera paramétrica variables cuantitativas continuas, utilizaremos el t-test para comparación entre dos grupos o ANOVA para comparar múltiples grupos. Los cálculos serán ejecutados mediante software Prism7 (Graphpad Inc., San Diego, CA, EE. UU.).
- g) 10% pérdida de animales por muerte o error de acuerdo con fórmula:
Tamaño muestral (n^*) corregido = Tamaño muestral (n) / (1 - [% attrition/100])

$$(n^*) = 4/0.9 = 4.4 \sim 5$$

(1) Liu C, Carrera R, Flamini V. Effects of mechanical loading on cortical defect repair using a novel mechanobiological model of bone healing. Bone. 2018; 108:145-155.

(2) Michael F. W. Festing. Design and statistical methods in studies using animal models of development. ILAR J. 2006; 47(1):5-14.

(3) Jaykaran Charan, N. D. Kantharia. How to calculate sample size in animal studies?. J Pharmacol Pharmacother. 2013; 4(4): 303-306.



D. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EXPERIMENTO

D.1. Enumere la secuencia de TODOS los procedimientos a seguir con los animales. Explícite el curso temporal en los procedimientos crónicos. El detalle de procedimientos no quirúrgicos (manipulación y administración de sustancias) debe incluirse en la Sección E. El detalle de los procedimientos quirúrgicos debe incluirse en la Sección F.

1. Recepción, distribución de los animales en jaulas y observación durante el tiempo de adaptación (4 días) de animales en plataforma experimental.
2. Identificación y asignación aleatoria a un grupo de estudio.
3. Inducción anestésica y anestesia general inhalatoria (Isoflurano).
4. Creación quirúrgica de defecto óseo monocortical.
5. Analgesia postoperatoria.
6. Control clínico postoperatorio diario.
7. Eutanasia según puntos de tiempo establecidos en diseño del estudio.
8. Disección de segmento corporal de interés y desecho de cadáveres según normas establecidas.

D.2. Describa el o los criterios de interrupción del trabajo con los animales durante el experimento. Incluya en su descripción el procedimiento esperado de finalización y las circunstancias en que el experimento será interrumpido para evitar sufrimientos innecesarios al animal. Si su protocolo incluye experimentos crónicos con inducción de patologías, indique explícitamente en qué momento se eutanasiarán los animales y el grado de compromiso de bienestar general, que se espera en esas condiciones, en base a los protocolos de supervisión modificados de Morton y Griffiths (Veterinary Record, 116: 431-36, 1985) según corresponda, establecidos en los Anexos II y III. Puede modificarlo según las condiciones del estudio y las características de su modelo animal.

Descripción situación esperada:

Se espera que los individuos, posterior al efecto anestésico, puedan incorporarse con facilidad, vale decir, puedan caminar relativamente bien el primer día, lo cual mejorará sustancialmente desde el segundo día. En relación a la alimentación y aspecto corporal, no deberían experimentar alteración alguna.

Descripción situación de interrupción de trabajo

Si durante el experimento se observan signos de sepsis en el animal, tales como: Pérdida de peso (mayor al 10%) – Disminución en el flujo respiratorio, en conjunción con una calidad disminuida (Jadeo) – Secreciones purulentas del sitio quirúrgico – Disminución en la actividad del ratón, que se puede presentar con temblores a nivel de las extremidades – Secreciones oculares – Pelo hirsuto (1); aquel individuo será descartado del experimento y sometido a eutanasia según las normas establecidas en la sección H, tanto para mitigar el sufrimiento como para no invalidar los resultados que se desprendan del experimento, ya que el fenómeno de sepsis altera el proceso de reparación ósea (2). Además, si durante el experimento se observan signos de sufrimiento intenso tales como: Motilidad alterada (o nula marcha) – Automutilación – Inapetencia – Pérdida de peso; aquel individuo será sometido a eutanasia según las normas establecidas en la sección H.

Bibliografía

- (1) Bradly Shrum. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes*. 2014; 7: 233.
- (2) Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8(3): 33-43

Actualizado Octubre 2017



E. PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS (MANIPULACIÓN DEL ANIMAL Y ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS)

E.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) no quirúrgico(s) a realizar. Incluya en su descripción: administración de sustancias, vía, sitio de inoculación, forma de administración, volumen y frecuencia de administración, métodos de sujeción o inmovilización del animal, uso de radiación (dosis y frecuencia), otros procedimientos: estudios de supervivencia, biopsias, entre otros.

Se realizarán los siguientes procedimientos no-quirúrgicos:

- a) Se administrará una dosis de analgésico preoperatoriamente (Carprofeno 5 mg/kg por vía subcutánea)
- b) **Anestesia general inhalatoria mediante Isoflurano**, a una concentración inicial al 5% hasta alcanzar estado de inconsciencia general (aproximado de 15 - 30 segundos). Una vez llegado a este punto, se modificará la concentración a 1,5 % para mantenimiento del estado de anestesia general (estimado en 20 minutos duración de cirugía).
- c) Analgesia post-operatoria: Una vez cerrada la herida quirúrgica, se administrará Carprofeno 5 mg/kg, cada 24 horas por 3 días, vía subcutánea a nivel de dorso cervical (1).

Bibliografía

- (1) Rat and Mouse anaesthesia and analgesia. Formulary and general drug information. 2016. UBC Animal care guidelines.
- (2) Szczesny G, Veihelmann A, Massberg S, Nolte D, Messmer K. Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the haemodynamic effects. *Lab Anim.* 2004; 38(1):64-9.

E.2. Indique el nombre y experiencia de la(s) personas que efectuará(n) los procedimientos no quirúrgicos.

Dr. Luis Córdova

Capacitación en manejo de animales (Diplomado de la Escuela de Experimentación Animal Nivel I, Laboratorio de Fisiopatología Animal y Farmacología Funcional, Escuela Nacional Veterinaria, Agroalimentaria y de Alimentación (ONIRIS), Nantes, Francia, 22 de noviembre 2011 y Animal Care and Use Program – Stanford University, Estados Unidos.)

Experiencia en defecto óseos en modelos murinos (*Sci Rep.* 2018 Jan 8;8(1):119 - *J Craniomaxillofac Surg.* 2016 Sep;44(9):1387-94)

Tesistas de título: Isidora Panes T., Felipe Saavedra V.

E.3. Indique las condiciones en que se mantendrán los animales en los periodos de tiempo entre las distintas intervenciones.

Los ratones serán mantenidos según las condiciones de la plataforma experimental, con ciclo de luz día-noche. Se les hará una visita diaria hasta la finalización del experimento, con especial énfasis en los primeros 3 días posoperatorios con el objetivo de supervisar situaciones de interrupción del procedimiento (Sección D2).

Actualizado Octubre 2017



F. PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

F.1. Identifique y describa el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) a realizar. Incluya métodos de asepsia que utilizará.

Defecto óseo tibial:

Bajo anestesia general inhalatoria y técnica aséptica, se rasurará la cara anteromedial de la pierna derecha e izquierda del ratón. Luego, se aplicará un antiséptico local mediante gasa estéril embebida en povidona yodada. El resto del animal será cubierto con campo quirúrgico estéril, de manera de exponer solamente el área de trabajo, mientras que todo el material y campo quirúrgico estarán estériles. Se accederá quirúrgicamente a través de la piel de la cara anteromedial de la pierna mediante bisturí #15 complementado por tijera Iris 9 cm. exponiendo la cara anteromedial tibial. Mediante la misma hoja de bisturí #15 se seccionará el periostio el cual será levantado mediante un periostotomo tipo Molt. Luego, se realizará el defecto óseo monocortical por medio de fresado (2000 rpm, motor NSK Mio) realizado con fresa de carburo-tungsteno de 1.0 mm de diámetro (SS White) refrigerada mediante irrigación continua con suero fisiológico estéril (cloruro de sodio 0,9 %). Los defectos óseos serán rellenados con/sin constructo celular-matriz tridimensional según el diseño del estudio. Finalmente, se cerrará discontinuamente la piel con monofilamento 5-0.

F.2. Indique nombre y experiencia de la(s) persona(s) que efectuará(n) procedimientos quirúrgicos.

Luis Córdova Jara

Capacitación en manejo de animales (Diplomado de la Escuela de Experimentación Animal, Laboratorio de Fisiopatología Animal y Farmacología Funcional, Escuela Nacional Veterinaria, Agroalimentaria y de Alimentación (ONIRIS), Nantes, Francia, 22 de noviembre 2011 y Animal Care and Use Program – Stanford University

Experiencia en defecto óseos en modelos murinos (Sci Rep. 2018 Jan 8;8(1):119 - J Craniomaxillofac Surg. 2016 Sep;44(9):1387-94).

Tesistas de pregrado

Observación de procedimiento quirúrgico.

Referencias que sustentan experiencia del operador

(1) Chen T, Li J, Córdova LA, Liu B, Mouraret S, Sun Q, Salmon B, Helms J. A WNT protein therapeutic improves the bone-forming capacity of autografts from aged animals. Sci Rep. 2018. 8(1):119.

(2) Córdova LA, Guilbaud F, Amiaud J, Battaglia S, Charrier C, Lezot F, Piot B, Redini F, Heymann D. Severe compromise of preosteoblasts in a surgical mouse model of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. J Craniomaxillofac Surg. 2016. 44(9):1387-94.



Actualizado Octubre 2017

F.3. Condiciones e infraestructura del lugar donde se efectuarán los procedimientos quirúrgicos.

Los procedimientos quirúrgicos serán realizados en las dependencias de plataforma experimental de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Para tal propósito contamos con un espacio de 327 mt2, acondicionado con:

- a) Mesa que será acondicionada para realización de cirugía (por medio de campos quirúrgicos estériles)
- b) Lámpara
- c) Motor de baja velocidad marca NSK, Modelo Mio
- d) Gelpack, para mantención temperatura corporal postoperatoria
- e) Vaporizador, para uso de Isoflurano

F.4. Si el o los procedimiento(s) quirúrgico(s) incluyen supervivencia del animal, señale el cuidado postoperatorio requerido e identifique a la persona responsable.

Analgesia postoperatoria: Carprofeno 5 mg/kg cada 24 horas por 3 días, subcutánea. A lo anterior, se sumará la valoración diaria de los individuos según la sección D2.
Responsable: Dr. Luis Cordova.

F.5. Si corresponde justifique si un mismo animal será sometido a procedimientos quirúrgicos más de una vez e indique el procedimiento previo.

No aplica.



G. DOLOR Y AFLICCIÓN

Es imperativo observar el principio fundamental de **evitar todo dolor y sufrimiento innecesario en cada animal que participa en un estudio científico**. Toda manipulación que provoque dolor o aflicción del o de los animal(es), **debe justificarse** en forma sólida y detallada.

G.1. Indique en la siguiente Tabla, el nivel de dolor según el grado de estrés o discomfort producido en los animales a manipular cada año. Los diferentes niveles de dolor o aflicción en el manejo de animales se explican en el Anexo IV. * Es obligatorio completar esta Tabla.

Nivel de Dolor	Indique Número de Animales por Año				
	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
A. Mínimo dolor y estrés	0				
B. Dolor asistido por medidas apropiadas (analgésico u otro)	20				
C. Dolor no asistido por medidas apropiadas	0				

G.2. Anestesia, Analgesia y Tranquilizantes. Para los animales indicados en la Tabla anterior (G1), categorías B, especifique los anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes que serán utilizados. Indique el o los nombre(s) de(los) agente(s) usado(s), la dosis, ruta, frecuencia y duración de administración, así como la(s) persona(s) encargada(s) del tratamiento y supervisar su efecto.

Carprofeno 5 mg/kg cada 24 horas por 3 días, administración en tejido subcutáneo de dorso cervical

Personas a cargo:

Luis Córdova: Administración y supervisión efecto
Asistente de Investigación y tesista(s) entrenados.

G.3. Si hay animales indicados en la categoría C de la Tabla G.1., se debe justificar por qué está contraindicado el uso de anestésicos, analgésicos, sedantes o tranquilizantes durante, o después de los procedimientos que causan dolor o aflicción (incluya referencias).

No aplica



H. DISPOSICIÓN FINAL DE LOS ANIMALES

H.1. Eutanasia. Describa detalladamente el método de eutanasia. Si se usa un agente químico, especifique, dosis y ruta de administración. Si su método es físico o mecánico, describa y justifique el método a utilizar. Indique la(s) persona(s) encargada(s) de esta función (Se sugiere revisar *The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, American Veterinary Medical Association, USA*).

La eutanasia de los animales se efectuará mediante inhalación de isofluorano (5% durante 1 minuto) y posterior dislocación cervical. La utilización de ambos métodos asegura completamente el procedimiento, en conjunto de que evita sufrimiento y el uso de químicos que pueden interferir en órganos y tejidos.

Personas a cargo:

Luis Córdova: Ejecución de procedimiento
Asistente de Investigación y tesista(s) entrenados

Bibliografía

(1) The AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, American Veterinary Medical Association, USA.

H.2. Eliminación de desechos. Describa brevemente el proceso de eliminación de los cadáveres de acuerdo con las normas de Bioseguridad de su Unidad. Si la eliminación es diferente a lo establecido, debe explicar el procedimiento en detalle y justificarlo.

Los cadáveres de los animales serán eliminados en base a las normas de la Plataforma Experimental, ICOD, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

H.3. Mantención de especímenes muertos. Describa la finalidad y las normas establecidas en cada caso (conservación en museos, docencia, otros).

No aplica

H.4. Supervivencia. Describa y justifique la disposición y destino de los animales en caso de experimentos o actividades docentes en que los animales no son eutanasiados al término del procedimiento.

No aplica



I. SUSTANCIAS ADMINISTRADAS A LOS ANIMALES QUE REQUIERAN CERTIFICACIÓN ESPECIAL

I.1. El uso de fármacos o sustancias peligrosas en la investigación con animales requiere de una aprobación separada. Es su responsabilidad contar con la(s) autorización(es) correspondiente(s). Si es relevante, adjunte las autorizaciones a este documento.

Nota: Si en su proyecto considera la utilización de agentes psicotrópicos, debe llevar un control y registro del uso de éstos. Además, todo excedente deberá ser comunicado a Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de su unidad para su resguardo o eliminación.

Señale a continuación en las siguientes Tablas aquellas sustancias que utilizará.

SUSTANCIAS QUE NO REQUIEREN APROBACIÓN	Lista de sustancias
Agentes Biológicos	
Fármacos	Suero Fisiológico Estéril (Cloruro de Sodio 0,9%) Isoflurano Oxígeno medicinal Carprofeno (Artriofin ®) 44 mg/mL – Ampolla 50 mL Povidona Yodada (Povisept ®) Solución tópica 10%
Otros	Sutura Nylon 4-0 (Ethicon)

SUSTANCIAS DAÑINAS PARA LOS ANIMALES O HUMANOS QUE REQUIEREN APROBACIÓN	Lista de sustancias y documentación, si corresponde
Radionúclidos	No aplica
Agentes Biológicos	No aplica
Drogas o químicos peligrosos	No aplica
ADN Recombinante	No aplica
Fármacos	No aplica
Otros	No aplica



Actualizado Octubre 2017

J. CERTIFICACIONES DEL ACADÉMICO Y/O INVESTIGADOR RESPONSABLE DE LOS PROCEDIMIENTOS DESCRITOS EN ESTE PROTOCOLO

- J.1. Certifico** que, a mi juicio, la investigación propuesta no constituye una duplicación innecesaria de investigaciones previas.
- J.2. Certifico** que todas las personas bajo mi supervisión y responsabilidad que participan en los procedimientos con los animales, trabajarán de acuerdo con las normas y reglas éticas vigentes nacionales e internacionales.
- J.3. Certifico** que he revisado la literatura científica y base de datos pertinentes sin encontrar procedimientos válidos alternativos, o no estoy en condiciones de desarrollarlos.
- J.4. Confirmo** que he completado la Tabla en el ítem G.1
- J.5. Certifico** que los antecedentes presentados en este Protocolo **incluyen la totalidad** de los procedimientos con animales propuestos en el Proyecto.
- J.6.** Me comprometo a solicitar y obtener la aprobación del CICUA de la Universidad de Chile antes de iniciar **CUALQUIER** cambio al Protocolo aprobado, **sea de procedimientos** como de **personal**.
- J.7. Certifico** que el personal que estará a cargo del manejo y o manipulación de los animales cuenta con experiencia, certificación o algún tipo de calificación que evite exponer a los animales a situaciones que ponen en riesgo su bienestar.
- J.8. Declaro** estar en conocimiento que se realizará **SEGUIMIENTO** por parte del CICUA para confirmar el cumplimiento de este Protocolo.
- J.9. Certifico** que las personas involucradas en este protocolo han leído y aprobado la versión definitiva de este documento.

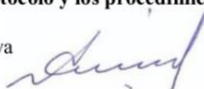
J.10. Investigador Patrocinado del protocolo (si lo hubiese):

Firma: No aplica

J.11. Académico Responsable del Protocolo y los procedimientos planteados:

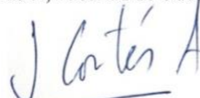
Dr Luis Cordova

Firma:



J.12. VºBº Director de la Unidad Académica: Prof. Juan Cortés Araya, Director del Departamento de Cirugía Traumatología Bucal y Maxilofacial, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Firma:



(Importante: las firmas en los puntos J.10, J.11 y J.12 deben ir sólo en el protocolo final aprobado, no son necesarias ni en la primera presentación digital, ni en las enmiendas posteriores a la certificación si las hubiere)

Fecha envío del protocolo: 23 Junio 2021



Actualizado Octubre 2017

Check List

Señor Académico: Con el fin de evitar rechazo por parte del CICUA de su Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio por razones formales, por favor verifique que:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1 Cuenta con las respectivas firmas del Investigador, Director de la unidad y Académico responsable de los procedimientos (éste último si corresponde según el punto M) | <input type="checkbox"/> |
| 2 Respondió el B5 y B6 (indicar bioterio y lugar de los procedimientos con los animales) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 3 Ha especificado el cálculo del número total de animales a utilizar (punto B.7) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 4 Se ajustó a las indicaciones del punto C1 (descripción breve y comprensible para el ciudadano común de los propósitos de la investigación). | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 5 Ha justificado y especificado el cálculo del número de animales a utilizar por objetivo (punto C.4) | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 6 Indicó “no aplica” en todos los items en que no corresponde responder | <input checked="" type="checkbox"/> |



Actualizado Octubre 2017

ANEXO I - GLOSARIO

Afflicción: dolor o molestia.

Analgésico: fármaco utilizado para reducir la percepción central de los estímulos dolorosos.

Anestésico: fármaco que bloquean la sensibilidad táctil y dolorosa de un individuo generando un estado de inconsciencia en el animal. Puede utilizarse de manera parcial sobre el cuerpo (local) o general. Se caracteriza por generar analgesia, amnesia, e inmovilidad. Se utiliza en procedimientos quirúrgicos, en procedimientos poco invasivos pero muy dolorosos, y también para la exploración física o toma de muestras.

Angustia: emoción negativa, se caracteriza por ser una emoción compleja, puede ocurrir sin presencia del estímulo.

Criterio de punto final: Punto determinado de manera científica, donde el dolor o distrés del animal es terminado, minimizado o reducido a través de acciones a través de la eutanasia, tratamiento o terminando el procedimiento.

Criterio de interrupción: Punto en el cual se decide poner término de manera anticipada a la investigación, ya sea porque el análisis preliminar de resultados lo permite o porque hay problemas metodológicos que así lo requieren.

Disconfort: situación no confortable, que causa incomodidad en el animal.

Distrés: se refiere al contenido emocional de experiencias nocivas que provocan una respuesta de estrés fisiológico en los animales. La experiencia nociva puede ser predominantemente emocional, física, o una combinación de ambos. Generalmente ocurre cuando la respuesta de estrés es muy aguda o cuando se hace crónica, sobrepasando la capacidad de adaptación del individuo.

Dolor: experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño. Para cuantificarlo se utilizan signos indirectos de dolor, como por ejemplo expresión facial, cambios posturales y conductuales. Siempre que exista el riesgo de que se produzca dolor se debe usar un analgésico. Si no existe evidencia científica de que el procedimiento cause dolor, se asume que si es doloroso para el humano lo es para el animal.

Estrés: Se refiere al amplio rango de respuestas fisiológicas y conductuales aun cierto estímulo, desde las pequeñas desviaciones de los ajustes homeostáticos diarios que se dan bajo circunstancias benignas, hasta los cambios fisiológicos máximos de los sistemas del individuo.

Eutanasia: Del griego eu (bueno) y thanatos (muerte). Describe el término de la vida de un individuo de una forma que minimice o elimine el dolor y distrés. Es deber del Médico Veterinario llevar a cabo la eutanasia a través de criterios acordes a los intereses del animal y/o debido a principios de bienestar animal. Deben utilizarse técnicas que induzcan la muerte de una forma rápida, sin dolor ni distrés (AVMA, 2013).

Modelos alternativos: aquellos que reemplazan la utilización de animales vertebrados.

Principio de las 3 Rs: principio formulado en la década de los 60 por los biólogos ingleses, Russel y Burch, en su libro "The Principle of Humane Experimental Technique". Hacen referencia a Reemplazar, Reducir y Refinar.

Reemplazo: Preferir el uso de modelos no-animales sobre modelos animales cuando sea posible y permitan alcanzar los objetivos científicos (modelos virtuales, métodos in vitro). Otra alternativa e utilizar animales que estén más abajo en la escala filogenética (reemplazo relativo) que tienen menor capacidad de experimentar sufrimiento (ej. Reemplazar modelo vertebrado por invertebrado).

Reducción: Utilizar métodos que permitan obtener niveles de información comparables reduciendo al máximo la cantidad de animales utilizados, u obtener mayor información desde el mismo número. Estos métodos incluyen diseños experimentales apropiados, determinación de tamaño muestral, y análisis estadístico apropiado.

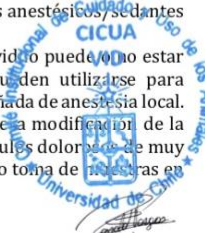
Refinamiento: Utilizar métodos que alivien o minimicen el potencial dolor, sufrimiento o distrés, aumentando el bienestar animal desde su nacimiento hasta su muerte, por ejemplo a través del enriquecimiento ambiental.

Procedimientos no quirúrgicos: procedimientos que incluyen manipulación (métodos de sujeción o inmovilización) y administración de sustancias (vías, uso de radiación) de manera no instrumental para el diagnóstico, tratamiento o rehabilitación que no involucran incisión de los tejidos.

Procedimientos quirúrgicos: manejos o intervenciones en animales que involucren incisión de tejidos u órganos. Todo procedimiento quirúrgico debe realizarse bajo estrictas medidas de asepsia y protocolos anestésicos y sedantes y/o analgésicos apropiados para la intervención.

Sedantes: fármaco que produce una depresión central acompañada por somnolencia, el individuo puede o no estar consciente de lo que ocurre a su alrededor, pero si responde a estímulos dolorosos. Pueden utilizarse para procedimientos poco o no invasivos, que requieren de cooperación del animal. Puede ir acompañada de anestesia local.

Tranquilizante: fármaco que posee un efecto calmante, sin alteración de la consciencia. Genera modificación de la conducta, por lo que el individuo estará relajado, pero consciente; puede no responder a estímulos dolorosos de muy baja intensidad. Ayudan a reducir el estrés del animal, puede utilizarse para exploración física o toma de muestras en animales nerviosos.



Actualizado Octubre 2017

ANEXO II (adaptado)

Protocolo de supervisión para Roedores modificado del protocolo propuesto por Morton y Griffiths (1985)
(Veterinary Record, 116: 431-36, 1985).

Protocolo de supervisión para roedores de laboratorio		
Variable	Rangos	Puntuación
Pérdida de peso (de 0 a3)	● Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente).	0
	● Pérdida de peso inferior al 10%.	1
	● Pérdida de peso entre el 10% y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de heces.	2
	● Pérdida de peso superior al 20%, el animal con consume agua ni alimento.	3
Aspecto (de 0 a3)	● Normal.	0
	● Pelo en mal estado.	1
	● Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales.	2
	● Postura anormal.	3
Comportamiento espontáneo (de 0 a3)	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Inactividad	2
	● Automutilación, vocalización anormales, animales muy inquieto o inmóviles.	3
Puntuación Total		

Nota: cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro todas las 3 pasan a 4. Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:

Puntuación:

Desde 0-4

normal

Desde 5-9

supervisar cuidadosamente considerar el uso de analgésicos

Desde 10-14

sufrimiento intenso: administrar analgésicos (¿eutanasia?)

Desde 15-20

eutanasia



Actualizado Octubre 2017

ANEXO III

Niveles de Dolor o Aflicción

- A. Mínimo dolor y estrés:** Mínima molestia de los animales durante procedimientos NO QUIRÚRGICOS. Ejemplos: sujeción para observación o exámenes físicos, toma de muestras de sangre, inoculación de sustancias en pequeñas cantidades por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal u oral, pero no intratorácica o intracardíaca (Categoría B), estudios agudos sin supervivencia en los cuales los animales son completamente anestesiados y no recobran la conciencia, períodos cortos de privación de agua y comida (equivalentes a los que podrían ocurrir en condiciones naturales) o modificaciones ambientales leves, métodos de eutanasia con rápida pérdida de conciencia (sobredosis de anestésicos, decapitación luego de sedación o anestesia).
- B. Dolor asistido por medidas apropiadas:** Mínima dolor o aflicción debido al uso de medicamentos apropiados para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Es el caso de la mayoría de los procedimientos QUIRÚRGICOS asociados a protocolos anestésicos y analgésicos apropiados. Ejemplos: canulación o cateterización de vasos sanguíneos o cavidades corporales bajo anestesia; cirugías menores bajo anestesia general o local tales como biopsias, laparoscopia; cirugías mayores bajo anestesia general con recuperación subsiguiente; sujeción o inmovilización por tiempos cortos pero que por observación evidencian leve discomfort o stress del animal; tiempo prolongado (varias horas) de inmovilización; inducción de conductas estresantes; inducción de anomalías anatómicas, fisiológicas o enfermedades que ocasionan dolor o stress pero que esta aliviado por medidas apropiadas. Procedimientos en esta categoría no deberían causar cambios significativos en la apariencia general del animal ni en parámetros tales como frecuencia cardiaca, respiratoria, excreción urinaria y fecal, o comportamiento social.
- C. Dolor no asistido por medidas apropiadas:** Dolor o aflicción sin el uso de medicamentos para disminuir o eliminar las molestias de los animales. Si existen animales en esta categoría, el investigador debe tener una clara y sólida justificación. Ejemplos: exposición a noxas o agentes cuyos efectos son desconocidos; exposición a drogas o químicos en niveles que pueden causar la muerte, dolor severo o gran stress; estudios de comportamiento en los cuales el nivel de stress producido se desconoce; uso de relajantes musculares o drogas que producen parálisis sin usar previa anestesia; quemaduras o traumas dolorosos en animales conscientes; y todo otro procedimiento que pueda ocasionar stress severo u ocasione dolor intenso que no pueda ser aliviado por analgésicos (por ejemplo ensayos de toxicidad o infecciones experimentales en los cuales el final del experimento es la muerte del animal). Exposición a drogas o químicos en niveles incompatibles con los sistemas fisiológicos y que induzcan un malestar crónico sin medidas paliativas. Los estudios asociados a esta categoría no debiesen ser muy prolongados o de severo daño clínico para disminuir al máximo el tiempo de exposición al dolor y aflicción. El malestar puede detectarse por marcada anomalía en los patrones de comportamiento, ausencia de "acalamiento", deshidratación, "vocalización" anormal, anorexia prolongada; letargia; trastornos al caminar y moverse, o signos clínicos severos de infección local o sistémica.

Actualizado Octubre 2017



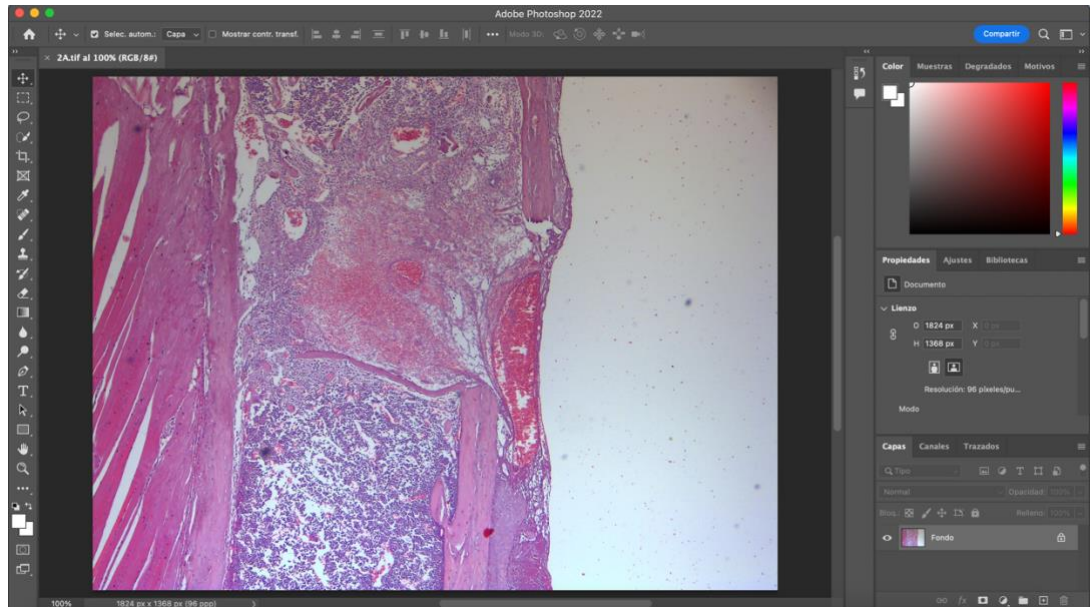
Anexo 2. Batería de Tinción Hematoxilina-Eosina (Adaptado). Laboratorio de Anatomía Patológica Facultad de Odontología U. de Chile

<i>Solución</i>	<i>Tiempo</i>
Xilol I	10 min
Xilol II	10 min
OH 100° I	10 min
OH 100° II	10 min
OH 95°	10 min
OH 70°	10 min
Agua corriente	5 min
Hematoxilina de Harris	10 min
Agua corriente	2 min
Azular en bórax	15 dippings
Agua corriente	3 min
Eosina acuosa 1%	10 min
Agua corriente	Hasta que el agua se vea transparente
OH 70°	15 dippings
OH 95°	15 dippings
OH 100° II	15 dippings
OH 100° I	15 dippings
Xilol II	15 dippings

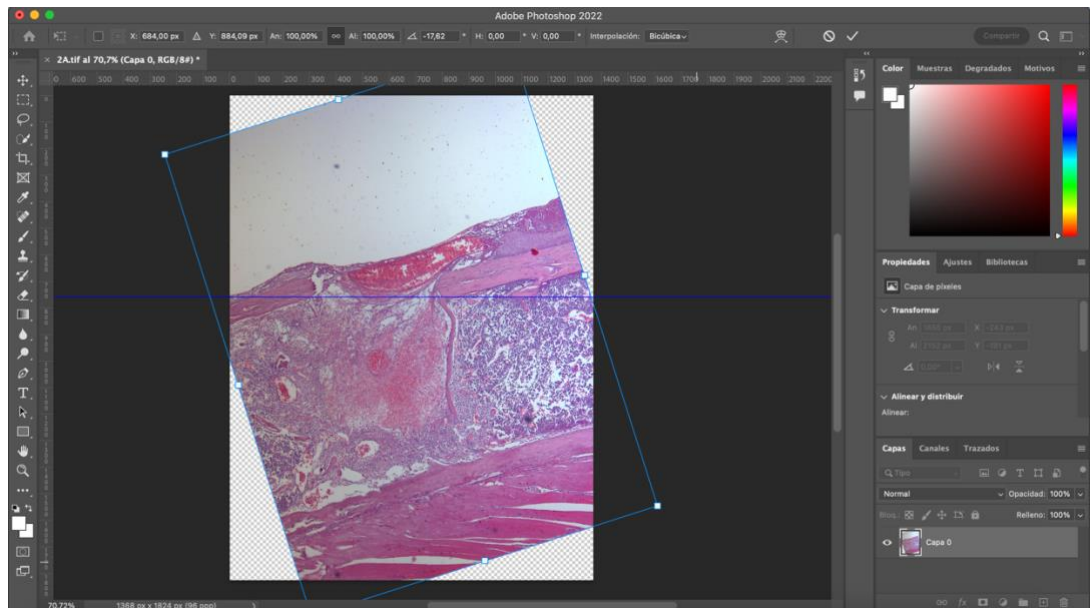
Xilol I	15 dippings
----------------	-------------

Anexo 3. Obtención de ROI en Adobe Photoshop 2022

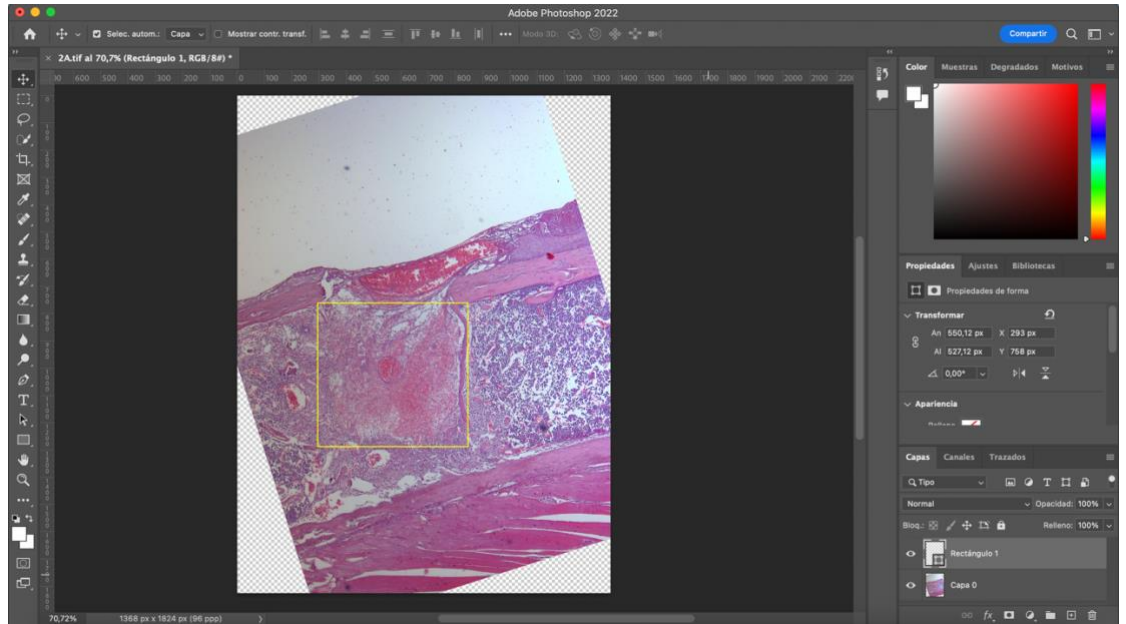
1. Abrir archivo de imagen TIFF en Adobe PS 2022.



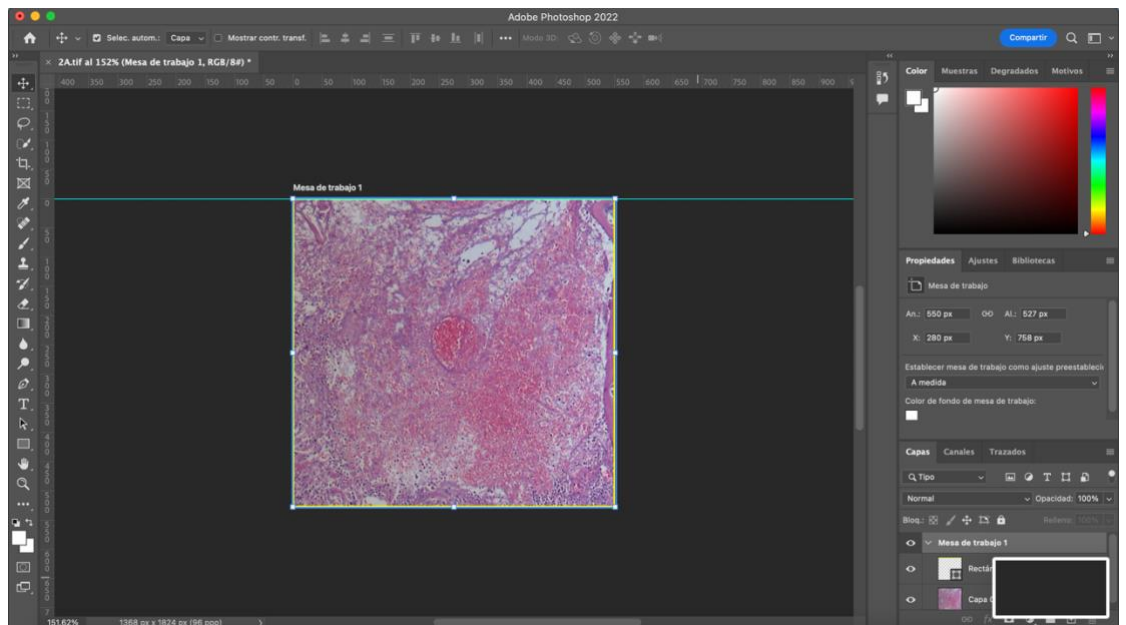
2. Se rotó la imagen hasta que la cortical anterior de la tibia estuviera paralela al eje x y en la parte superior de la imagen.



3. Se creó un rectángulo de 550 x 527 píxeles y se posicionó sobre el centro del defecto óseo, inmediatamente posterior a la cortical anterior.

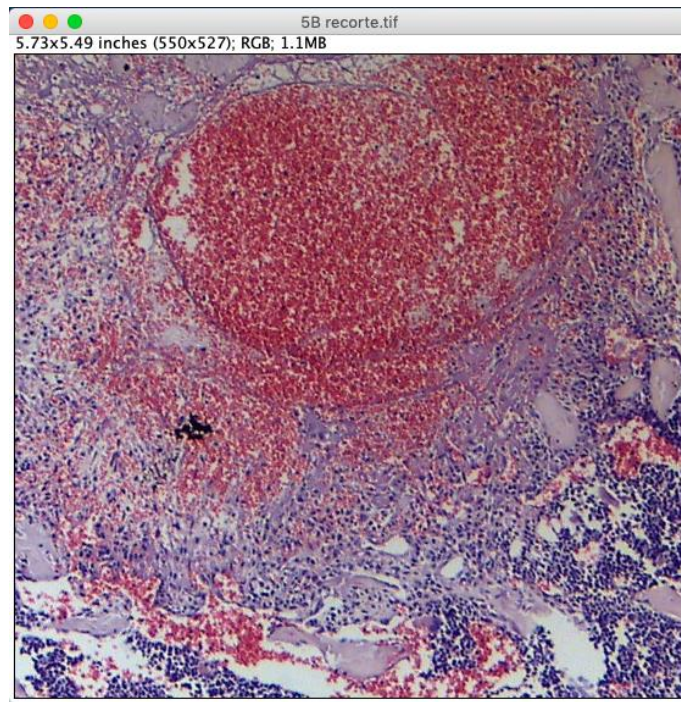


4. A partir del rectángulo, se creó una *mesa de trabajo*. Se guardó el archivo en formato TIFF.

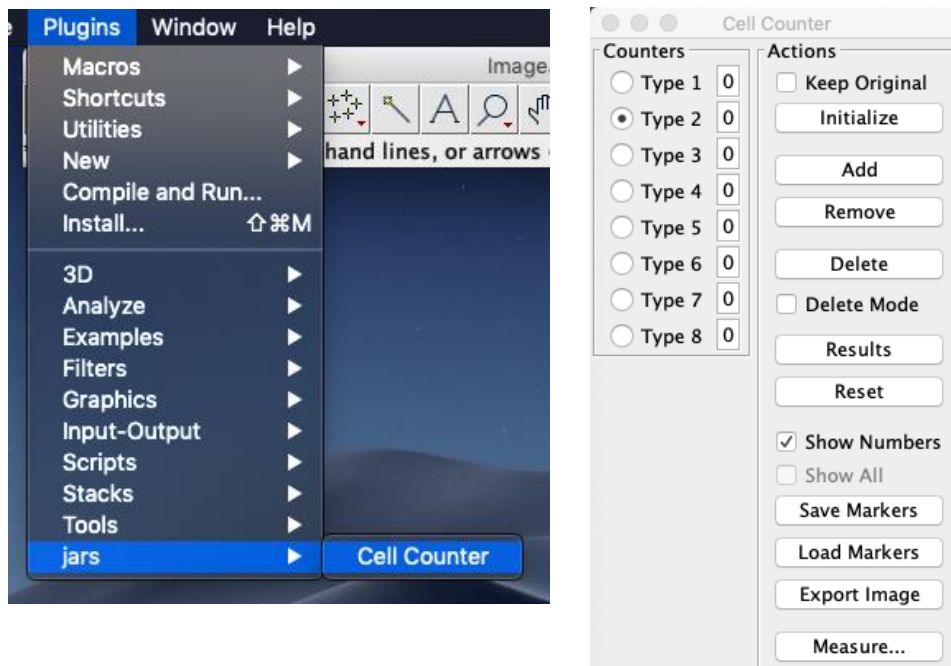


Anexo 4. Protocolo ImageJ Cell Counter.

1. En ImageJ, abrir la imagen seleccionada.

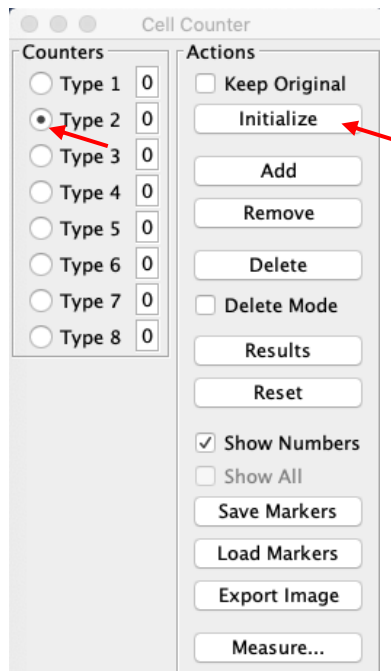


2. Ejecutar *plugin Cell Counter*.

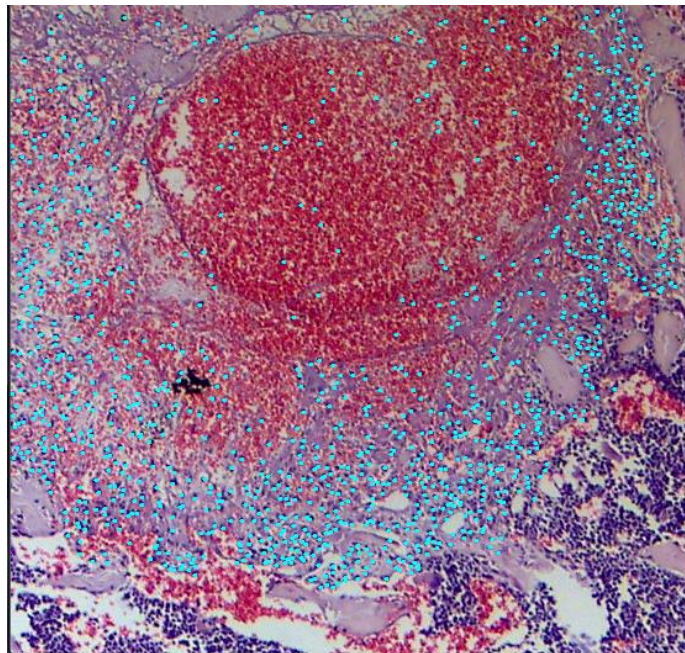


3. Iniciar el conteo y seleccionar un tipo de célula (color con que se irán

marcando en la imagen).



4. Contar manualmente las células, haciendo click sobre los núcleos eosinófilos en cada imagen, excluyendo células óseas y de la médula ósea.



5. Obtener los resultados y registrar en planilla de Microsoft Excel.

