



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

**“EFECTO DE LA EDAD EN LA REPARACIÓN DE FRACTURA: ESTUDIO  
PRECLÍNICO.”**

**Isidora Paz Panez Toro**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Prof. Luis Córdova Jara**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Prof. Juan Cortés Araya**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt de Iniciación 11190536 (LCJ)  
Santiago - Chile  
2023.**





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

**“EFECTO DE LA EDAD EN LA REPARACIÓN DE FRACTURA: ESTUDIO  
PRECLÍNICO.”**

**Isidora Paz Panez Toro**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Prof. Luis Córdova Jara**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Prof. Juan Cortés Araya**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt de Iniciación 11190536 (LCJ)  
Santiago - Chile  
2023.**

Dedicado a todas las niñas que quieren hacer ciencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Doctor Luis Córdova y al Proyecto FONDECYT de Iniciación N°11190536 por la oportunidad de hacer ciencia.

Al Doctor Juan Cortés por enseñarme el arte de aprender.

Al Doctor Luis Solano por la docencia.

A la Tecnóloga Médica Lorena por el apoyo.

A la Doctora Viviana Toro por los conocimientos.

A la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Al Laboratorio Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Al Tesista y amigo Felipe Saavedra por el acompañamiento y la entrega.

A mis amigas y amigos por hacerme disfrutar del proceso.

Y a mi familia por apoyarme en todo lo que se me ocurre.

## **INDICE**

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>11</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>A. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>11</b>
<b>B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>11</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>8. CONCLUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>10. ANEXOS Y APÉNDICES</b>	<b>40</b>

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La población mundial envejece progresivamente, y con ello se observa un aumento de las fracturas en edad geriátrica. Así mismo, las fracturas en este rango etario presentan una alta tasa de retardo de consolidación, afectando la calidad de vida y representando un gran costo económico para los sistemas de salud. Los mecanismos celulares y moleculares involucrados a esta condición son aún poco conocidos. En este estudio se quiere conocer el impacto de la edad en la formación de nuevo hueso de un sitio fracturado.

**Materiales y métodos:** En el modelo ratón Balb/C de fractura tibial estable (defecto óseo monocortical tibial) se comparó la formación de nuevo hueso en el sitio intervenido luego de 7 días post intervención en un grupo de sujetos jóvenes, inmaduros esquelétalmente (5 semanas de edad) versus un grupo de sujetos adultos esquelétalmente maduros (24 semanas de edad). Posterior a la eutanasia, las tibias fueron recolectadas, fijadas, descalcificadas e incluidas en parafina para análisis histológico e histomorfometría. En cortes histológicos seriados, se analizó tanto la morfología como la superficie del hueso nuevo formado en el sitio fracturado.

**Resultados:** Constatamos en ambos grupos la formación de hueso nuevo en el sitio fracturado. En los sujetos inmaduros esquelétalmente, dicho nuevo hueso se forma masivamente tanto desde la superficie endóstica de la cortical anterior tibial (defecto) como del endostio de la cortical posterior tibial, obliterando el espacio medular del canal. Por el contrario, en los sujetos maduros esquelétalmente, el nuevo hueso se forma mayoritariamente a partir de la cortical anterior, sin obliterar el espacio medular y con organización celular diferente. Cuantitativamente, observamos que los sujetos maduros esquelétalmente forman una menor superficie de hueso nuevo que los esquelétalmente inmaduros ( $p < 0.0001$ ).

**Conclusiones:** Concluimos que la formación de hueso nuevo de un sitio fracturado disminuye en función de la maduración esquelética. Estos resultados sugieren que existiría un declinamiento en la capacidad formativa ósea en un sitio fracturado en

edades adultas, probablemente asociado a una disminución de vías y señales osteogénicas durante el envejecimiento.

## 2. INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista biológico, el envejecimiento según la Organización Mundial de la Salud es “el resultado de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, a un mayor riesgo de enfermedad y, en última instancia, a la muerte” siendo un proceso fisiológico e inevitable (1). La falla en la reparación ósea (retardo de consolidación de fracturas, pérdida aséptica de implantes ortopédicos, etc) es cada vez más frecuente durante el envejecimiento, generando retardos de consolidación de fracturas, discapacidad crónica, ausentismo laboral y afectando negativamente la calidad de vida de las personas (2,3).

El envejecimiento se mal asocia con personas de tercera edad, de hecho, se reporta que la disminución de la tasa de reparación de fracturas es a partir de los 30 años (4). Siendo así, un proceso que nos acompaña a lo largo de la vida. En Chile, se desconoce la epidemiología de las fracturas en adultos, sin embargo, se reporta que la incidencia de fractura de cadera en mujeres es 3 veces mayor que en hombres (3,5). Por otro lado, las fracturas mandibulares patológicas son más frecuentes en pacientes adultos mayores, en donde el incremento de la edad aumenta la morbimortalidad postquirúrgica (6).

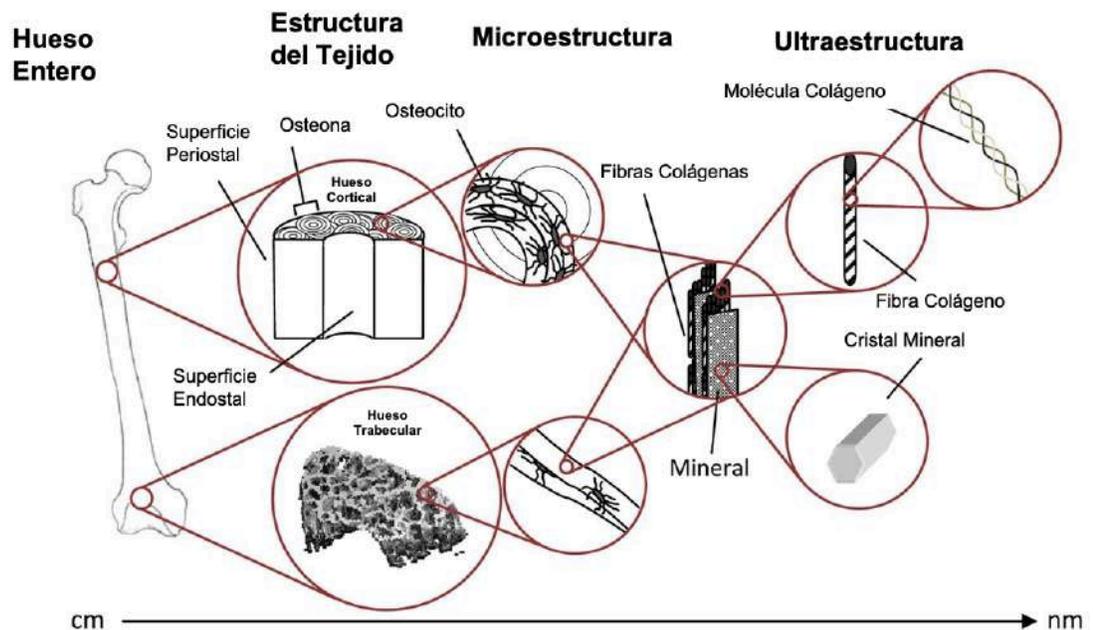
Desde un punto de vista mecanístico, la falla en la reparación ósea se asociaría a una disminuida capacidad de diferenciación de células osteoprogenitoras hacia osteoblastos maduros y funcionales (2,7). Por otro lado, el envejecimiento involucra un estado inflamatorio basal crónicamente elevado, el cual es mediado, entre otros, por células de la respuesta inmune derivadas de células madres hematopoyéticas (CMHs), el cual influiría negativamente en la reparación, retrasando la formación del callo fibroso óseo luego de una fractura (2). Sin embargo, evidencia reciente destaca el rol de vesículas extracelulares (EV) derivadas de células hematopoyéticas, siendo asociadas con el menor recuento de neutrófilos y/o macrófagos circulantes que participarían en la modulación de la regeneración tisular durante el envejecimiento (8). Incluso, un envejecimiento de las células madres esqueléticas (CME) induce un nicho inflamatorio hematopoyético

(7). Así, una adecuada y altamente regulada interacción entre células formadoras de hueso y células de la inmunidad residentes en la médula ósea (MO) contribuiría al logro de un adecuado proceso reparativo del tejido óseo durante toda la vida del organismo (2,7).

El sistema esquelético además de proveer movilidad, soporte y protección de órganos vitales, tiene una estrecha relación con el sistema hematopoyético debido a que los huesos albergan CMHs en sus cavidades medulares (2,9,10).

## Tejido óseo

El hueso, es un tejido altamente dinámico y en constante proceso de remodelación frente a estímulos mecánicos (2,10,11). Está compuesto por periostio, hueso cortical, endostio, médula, hueso trabecular, vasos y nervios (12). Independiente de la edad, el hueso está compuesto por tejido óseo cortical compacto y tejido óseo trabecular con estructura de tipo tejido o también llamado *woven bone* y estructura de tipo lamelar (Figura 1) (10).



**Figura 1. Niveles estructurales del hueso. Traducido de Boskey y Coleman 2010 (10).** El hueso está compuesto por hueso cortical y hueso trabecular. El hueso cortical se encuentra en la periferia del hueso y está formado por osteonas

orientadas longitudinalmente. Las osteonas se componen de hueso lamelar compacto con lagunas que contienen osteocitos. Este hueso lamelar está formado por cristal mineral y fibras de colágeno mayormente tipo 1. Por otro lado, el hueso trabecular se encuentra en la metáfisis y epífisis de los huesos largos que también se encuentra conformada por laminillas dispuestas de forma irregular y con una menor cantidad de osteonas (10).

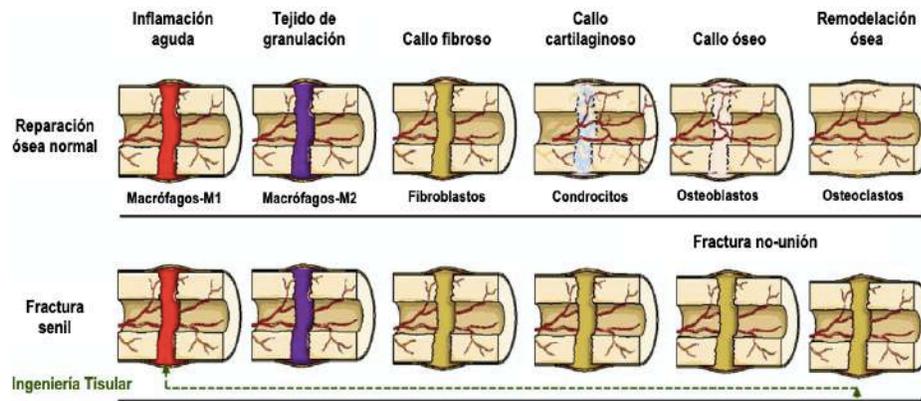
Para una homeostasis ósea debe existir un equilibrio entre la actividad osteoclástica y osteoblástica (2,3,13,14). Un desequilibrio en esa balanza puede resultar en osteoporosis, si se inclina hacia la osteoclastogénesis excesiva y en una osteoesclerosis si se inclina hacia una osteogénesis excesiva (13,15). Para mantener dicha homeostasis, son esenciales diferentes tipos celulares, presentes en distintos nichos en la médula ósea (12). Sin embargo, durante el envejecimiento, especialmente en mujeres, la actividad de los osteoclastos supera la actividad de los osteoblastos, lo que resulta en huesos más débiles (3,13).

La médula ósea se concentra en la cavidad central de los huesos largos del esqueleto, y está conformada por nichos o microambientes celulares. Uno de ellos es el nicho o microambiente hematopoyético, organizado por células hematopoyéticas, células adiposas y senos vasculares (16–18). Por otro lado, la médula ósea está delimitada periféricamente por el endostio, estructura ósea que tapiza la superficie de la cavidad medular y donde se ubica el nicho o microambiente óseo. El nicho óseo es un tejido multicelular que incluye células formadoras de hueso, llamadas osteoblastos, células que reabsorben hueso u osteoclastos, células vasculares endoteliales, células gliales, pericitos vasculares, adipocitos, fibroblastos y células estromales (16–18). Así, la homeostasis de la médula ósea es mediada, en parte, por la interacción entre los microambientes hematopoyético y óseo (19).

### **Reparación de fracturas: etapas y tipos**

La reparación de fracturas es un proceso ordenado y secuencial definido por factores sistémicos y locales (2). Las etapas de la reparación ósea se componen de

una respuesta inflamatoria aguda, el tejido de granulación, la formación de un callo fibroso que se mineraliza y da lugar a la remodelación ósea (Figura 3).



**Figura 3. Etapas de la reparación de fracturas óseas en distintas situaciones. Traducido de Loi *et al.* 2016 (2).** En la reparación ósea normal mediante la inflamación aguda, la formación de un callo fibroso y la mineralización de éste logra la remodelación ósea de la fractura. Sin embargo, en fracturas seniles se observa una persistencia del callo fibroso, generando una no unión de la fractura. Una oportunidad clínica es la ingeniería tisular en la inflamación aguda para obtener la remodelación ósea de la fractura.

La etapa de la respuesta inflamatoria aguda tiene una duración de 4 días en ratones (20), teniendo como objetivo la formación de un coágulo, que debido a la fractura de los vasos sanguíneos, del endostio y periostio resulta en la formación de un hematoma por la activación de la cascada de coagulación en el medio extravascular (2). Se crea un red de fibrina como primera matriz provisional ante la entrada las células inflamatorias atraídas por factores plaquetarios, del complemento, matriz extracelular dañada y macrófagos residentes del tejido local (2). Las primeras células que llegan al sitio de la fractura dentro de las 24 horas son los neutrófilos, secretando interleuquinas y proteínas quimiotácticas de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2) que activan la segunda ola de infiltrado celular de la inflamación reclutando macrófagos (2). Los macrófagos son células derivadas del linaje mieloide siendo los primeros participantes en la respuesta inmune innata y están presentes

en distintos órganos como macrófagos residentes (11,21). Actualmente, existen dos vías reconocidas como origen de los macrófagos: macrófagos derivados de los monocitos y los macrófagos residentes de tejidos (22–24). Los macrófagos residentes de tejido se originan durante la embriogénesis y se auto renuevan en la mayoría de los tejidos (22,23). Durante la inflamación, adquieren un subtipo (M1) pro-inflamatorio siendo clave para la iniciación de la cascada de reparación in vivo (12,21). La solución exitosa del estímulo inflamatorio está acompañado de citoquinas antiinflamatorias y reparativas que polarizan a los macrófagos, adquiriendo su fenotipo antiinflamatorio (M2) intentando reparar el tejido mediante la secreción de factores anabólicos (IL-10, TGF $\alpha$ , VEGF $\alpha$ , IGF1) (12,21,25,26).

Durante el proceso inflamatorio, estos macrófagos, además de fagocitar desechos celulares en la inflamación secretan mediadores inflamatorios y quimiotácticos como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y CCL2 que reclutan fibroblastos, células madres mesenquimales y células osteoprogenitoras desde sus nichos (12,21,25). Debido a la disrupción en una fractura, el sitio se encuentra en hipoxia y ésta, sumada con la inestabilidad, dirigen a las células mesenquimales a una diferenciación por el linaje condrogénico. En cambio, lugares con mejor aporte vascular y más estabilidad mecánica la formación de hueso mediante una vía intramembranosa es dilucidada (20). Cuando se guía la diferenciación de células madre mesenquimales a lo largo de la vía condrogénica, estos producen cartílago que se extiende por el espacio de la fractura conectando los extremos con tejido fibroso y cartilagosos, formando lo que se llama callo blando. Este proporciona estabilidad y sirve como andamio para la osificación endocondral. A medida que avanza la mineralización se forma el callo óseo que posteriormente es eliminado progresivamente por osteoclastos (2).

El tipo de reparación dependerá del grado de desplazamiento de los fragmentos óseos y de la estabilidad mecánica del medio. Para una reparación óptima se requiere de una proximidad de los fragmentos y un grado de estabilidad mecánica con una cantidad de movimiento controlado (2).

La **reparación primaria** ocurre en fracturas con una mínima brecha interfragmentaria y movimiento, donde existe una aposición directa de nuevo hueso

mediada por los osteoblastos sin ninguna plantilla cartilaginosa (2). Se ve más frecuentemente en fracturas metafisarias en donde existe una estrecha relación con la médula ósea, por ende, una mayor presencia de células inflamatorias y osteoprogenitoras. Se caracteriza por el depósito de trabéculas óseas entre extremos de la fractura y la producción de nuevas trabéculas en la parte superior de las trabéculas preexistentes (2,27).

La **reparación secundaria** es aquella que ocurre cuando no existe una rigidez completa, lo que se traduce en grados de movimientos constantes y desplazamiento. Resultando en una osificación endocondral que implica inflamación, la formación de un callo y remodelación ósea. El objetivo es aumentar la estabilidad mecánica reemplazando progresivamente tejidos frágiles para llegar eventualmente al crecimiento vascular y mineralización. Se ve más frecuentemente en fracturas diafisarias (2,27).

Una falla en la reparación ósea resulta en una no-uni6n dolorosa o pseudoartrosis, en donde se observa la persistencia de hueso tipo tejido o *woven bone* y cartílago. Es por ello, que es importante la condici6n de la vasculatura local por la disponibilidad de poblaciones celulares necesarias que regulen y secreten mediadores inflamatorios, quimiot6cticos y factores de crecimiento (2).

### **Edad y reparaci6n 6sea**

El efecto de la edad en la reparaci6n 6sea ha sido estudiado desde distintas aristas. Se ha descrito que la edad trae consigo a c6lulas mesenquimales senescentes que muestran una capacidad reducida de diferenciarse en osteoblastos maduros funcionales (28). En las cuales, adem6s del desbalance entre prote6nas morfog6nicas de hueso BMPs y sus inhibidores, una prote6na reconocida como promotor de osteoblastog6nesis, disminuyen su capacidad de respuesta (2). Esto demuestra que el efecto de la edad en estos nichos no pasa desapercibido. De hecho, se sugiere que los linajes esquel6ticos envejecidos producen factores que inducen a la resorci6n 6sea (7).

Se ha descrito que las CMEs del microambiente de ratones envejecidos tiene un potencial de linaje limitado y desplazado por el estroma por una serie de genes

asociados a una disminución en la formación ósea, lo que corresponde a las observaciones de su diferenciación osteocondrogénica reducida y capacidad de formación de huesecillos *in vivo*. Más específicamente, el estroma derivado de CMEs envejecidas contribuye directamente a la desviación mieloide relacionada con la edad del sistema hematopoyético, con un aumento de factores inflamatorios (CSF-1, CCL11 y TGFb) (7). Incluso, a modo de terapia, se ha propuesto el transfusión de sangre de sujetos jóvenes en envejecidos para mejorar la reparación ósea, en los cuales, los resultados han sido controversiales, pero se sugiere que dicha diferencia podría radicar en un microambiente local que, en lugar de los factores transmitidos por la sangre, tiene un efecto más inmediato en los cambios relacionados con la edad en el esqueleto (7,8,28,29). En resumen, la edad podría afectar en la actividad osteocondrogénica de las CMEs, desarrollando un envejecimiento inflamatorio sistémico a través de la creación de un nicho pro-osteoclástico inflamatorio que mejoran la resorción ósea.

En los macrófagos durante la reparación ósea se ha descrito que al día 7 se encuentran entrelazados en el puente óseo en ratones de 12 semanas (30). Un tipo de macrófagos residentes de hueso llamados osteomacs, durante la reparación ósea, se asociaron específicamente con sitios de depósito de hueso intramembranoso, formando una estructura organizada con los osteoblastos. Los osteomacs mejoran osificación intramembranosa y es análoga a la función de "acoplamiento" propuesta de los osteoclastos durante la remodelación ósea, debido a que la osificación intramembranosa no implica la reabsorción de un cartílago antes de la formación ósea, por lo que es lógico que una célula mieloide madura no resortiva haya evolucionado como la fuente celular de factor(es) trófico(s) y/o anabólico(s) para ayudar al reclutamiento, maduración y/o función de los osteoblastos (30).

El efecto de la edad en los macrófagos ha sido estudiado en modelos de fractura inestable con formación de callo óseo, en la cual, ratones de 12 meses mostraron un aumento de macrófagos fenotipo M1 y una disminución de fenotipo M2 a los 7 días posterior a la inducción de un defecto óseo comparados a ratones de 3 meses de edad (31). Por otro lado, se conoce que la distribución espacial de

las arterias determinan las diferencias regionales en la oxigenación y la actividad metabólica en la reparación ósea, en el cual, el factor 1 a inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ) muestra mayor expresión en diáfisis e induce al transportador Glut1, mejorando así la osteogénesis (32). Se ha asociado el fenotipo M2 a la respuesta angiogénica en la reparación ósea, en la cual en ratones envejecidos muestra una clara disminución del factor HIF1 $\alpha$  y VEGFR $\alpha$  7 días después de la osteotomía (31). En resumen, la edad afectaría en la polarización macrofágica, retardando la reparación y angiogénesis.

Actualmente, el modelo de elección para el estudio de la reparación ósea en el envejecimiento es el modelo animal de fractura inestable y/o estabilizada con implantes, resultando en una osificación endocondral (33,34). Sin embargo, este modelo no permite conocer forma más básica de la formación ósea mediante una reparación primaria (33). Esto, limita la capacidad de aprovechar específicamente este proceso terapéuticamente. No existe evidencia sobre cambios en la cantidad y en las características morfológicas de la formación de nuevo hueso debido al envejecimiento en modelos de fractura estable.

Finalmente, considerando el aumento progresivo en las tasas de falla en la reparación de fracturas observadas en tercera edad, además de los múltiples estudios que reportan una disminuida capacidad de formación ósea exhibida por células osteoprogenitoras envejecidas, surge la pregunta ¿cómo es que las fracturas reparan durante este período de la vida? El propósito de este estudio es conocer cómo afecta la edad a la reparación de una fractura estable.

### 3. HIPÓTESIS

El proceso de envejecimiento disminuye la calidad y cantidad de nuevo hueso formado en la reparación de una fractura estable tibial en modelo murino.

### 4. OBJETIVOS

#### a. OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto de la edad en la reparación de una fractura estable tibial en modelo murino.

#### b. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En un modelo de fractura estable, mediante la inducción de un defecto óseo monocortical, en hueso tibial de ratones maduros e inmaduros esquelétalmente (7 días post fractura) se plantean los siguientes objetivos:

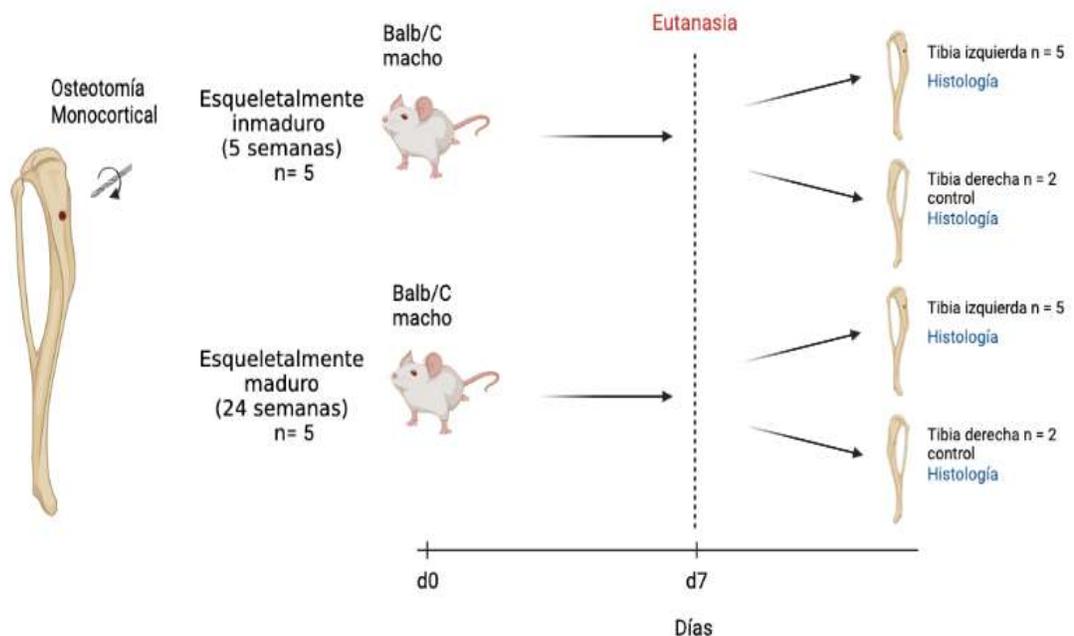
- **Objetivo Específico 1 (OE1):** Comparar la morfología del nuevo hueso formado en un sitio fracturado entre sujetos inmaduros y maduros esquelétalmente en un modelo de envejecimiento.
- **Objetivo Específico 2 (OE2):** Cuantificar la formación de nuevo hueso en un sitio fracturado entre sujetos inmaduros y maduros esquelétalmente en un modelo de envejecimiento

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### Estudio experimental comparativo en modelo animal.

#### a. Diseño experimental y cálculo de tamaño muestral:

Para este estudio se compararon defectos óseos monocorticales realizados en tibias de 10 ratones macho Balb/C asignados aleatoria y equitativamente en dos grupos: 5 ratones inmaduros esquelétalmente (5 semanas de edad) y 5 ratones maduros esquelétalmente (24 semanas de edad) que fueron obtenidos de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Figura 4).



Created in BioRender.com bio

**Figura 4. Diseño experimental en modelo animal de análisis comparativo.** 10 ratones macho Balb/C en total, 5 ratones inmaduros esquelétalmente (5 semanas de edad) y 5 ratones maduros esquelétalmente (24 semanas de edad). Siendo, la intervención en el día 0 mediante la inducción de un defecto óseo monocortical de tamaño no crítico (1mm diámetro) en la cara antero medial del hueso tibial y el término del estudio en el día 7. Diseño de autor creado con Biorender.com

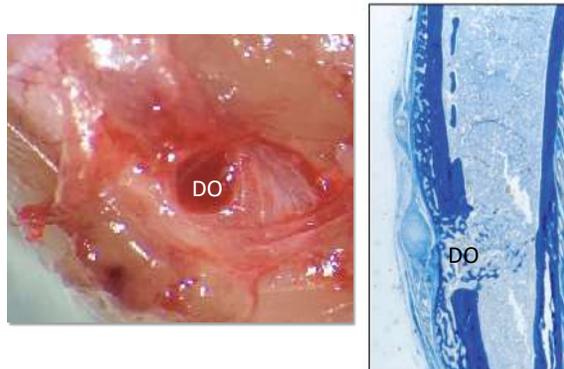
El desarrollo de esta investigación fue posible gracias a los recursos del proyecto FONDECYT de Inicio N° 11190536 y de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los procedimientos descritos a continuación y protocolos para el manejo animal fueron aprobados bajo el certificado N° 20347-ODO-UCH por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (Anexo 1)

El cálculo del tamaño muestral de 5 ratones por condición fue obtenido según el protocolo de manejo y cuidado de animales utilizando el software G Power® según fórmula estándar basada en el análisis de poder del estudio, siendo cada animal su propio control (35) (Anexo 2). Habiendo calculado 5 muestras por condición y considerando el número de muestras necesarias para realizar en análisis histológico, se consideraron 10 animales para el punto de término del estudio al día 7. La elección del término del estudio se basa en evidencia que asegura el proceso biológico en dicho día (2). De esta manera, se obtendrán 5 muestras de tibia izquierda por cada grupo y 2 tibias derechas sin intervención por grupo como control interno (Figura 4).

#### **b. Defecto óseo monocortical tibial.**

Brevemente, el modelo consistió en la inducción de un defecto óseo monocortical de tamaño no crítico (1 milímetro de diámetro) en la cara antero medial de la diáfisis tibial. Para ello, los ratones fueron anestesiados vía inhalatoria con gas Isoflurano al 5% (36–38) alcanzando el estado de inconsciencia general a los 30 segundos, para luego modificar la concentración a 1,5% manteniendo el estado de anestesia general en un tiempo quirúrgico estimado de 10 minutos. Posteriormente, se rasuró la zona operatoria y en condiciones asépticas, se realizó una incisión cutánea longitudinal sobre la diáfisis medial izquierda exponiendo así la cara antero medial de la diáfisis tibial. Se realizó un defecto óseo tibial mediante una osteotomía monocortical de un 1 mm de diámetro con fresa carbide redonda Kerr® (ISO N° 500-104-001-001-010) irrigada con solución salina y un motor quirúrgico dental NSK

SurgicPro® que llegó a la cavidad medular. Se tuvo cuidado de no lesionar la cortical posterior ni el lado lateral de la tibia (Figura 5).



**Figura 5. Defecto óseo (DO) monocortical tibial.** A la izquierda se observa imagen clínica y a la derecha un corte histológico representativo.

Se logró el cierre primario sin tensión mediante suturas de material reabsorbible catgut. Para la analgesia post operatoria se administró Carprofeno (Rimadyl®) (38) 5mg/kg cada 24 horas durante 3 días vía subcutánea en dorso cervical (Anexo 2). El control diario de peso y comportamiento de los ratones fue realizado por personal de la Plataforma Experimental de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

### c. Obtención de muestras

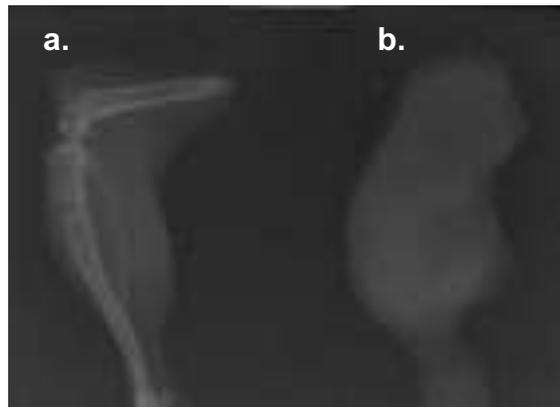
Al séptimo día post cirugía, cada animal recibió CO<sub>2</sub> mediante vía inhalatoria como método de eutanasia (39). En un campo aséptico se recolectaron 10 patas izquierdas intervenidas. La pata, parte del fémur y la piel de cada animal fueron removidas cuidadosamente (Figura 6). Inmediata e individualmente las tibias fueron incluidas en tubos rotulados con 15mL de formalina al 10% durante 24 horas para la fijación de los tejidos.

**Figura 6. Aspecto macroscópico de muestra tibial limpia.** La flecha roja indica la presencia de un hematoma en la ubicación del defecto óseo.



#### d. Descalcificación ósea

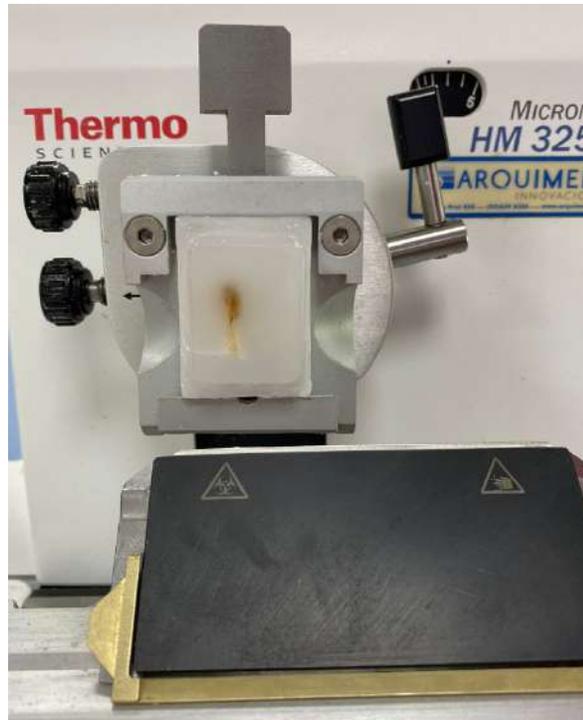
Posterior a las 24 horas, las muestras fueron lavadas con PBS e inmersas en 15 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 5% pH=7 durante 29 días, renovando el medio cada 4 días. El control de la descalcificación ósea se realizó mediante la toma de radiografías. Utilizando el equipo de rayos dental Satelec Acteon X Mind®, películas de radiografía periapical y empleando parámetros estandarizados para todas las tomas radiográficas, se obtuvieron imágenes radiográficas compatibles con tejidos no mineralizados o con bajo contenido mineral en todas las muestras descalcificadas según el protocolo descrito (Figura 7).



**Figura 7. Control radiográfico de descalcificación ósea en EDTA 5% durante 29 días.** Mediante el equipo de rayos Satelec Acteon X Mind® y empleando parámetros estandarizados para todas las tomas radiográficas: 70kV voltaje, 8mA de intensidad y 0,16 segundos como tiempo de exposición, se compara la presencia de tejido calcificado. En donde, existe una clara diferencia radiográfica entre ambas muestras. **(a)** Siendo una muestra tibial derecha de control sin descalcificación ósea y **(b)** una muestra tibial izquierda con defecto óseo descalcificada.

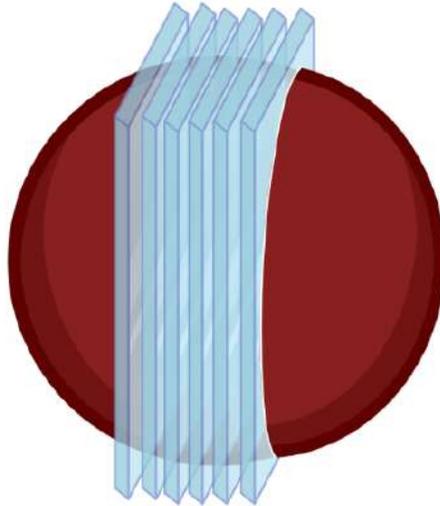
### e. Procesamiento histológico (inclusión/montaje/corte)

Al completar el proceso de descalcificación, las muestras fueron preparadas para estudio histológico incluidas en bloques de parafina individuales, orientando sagitalmente el defecto óseo tibial. Posteriormente, mediante un micrótopo de rotación Thermo Scientific Microm HM 325® se realizaron cortes de 3 $\mu$ m de espesor abarcando el defecto óseo en toda su extensión (Figura 8).



**Figura 8. Muestra incluida en taco de parafina montada en micrótopo de rotación durante obtención de cortes histológicos.**

Los cortes fueron ubicados en portaobjetos para histología convencional. De la totalidad de los cortes por sujeto se seleccionaron desde 6 cortes consecutivos en la zona de mayor diámetro del defecto óseo. Asegurando así, la ubicación central del defecto (Figura 9).



**Figura 9. Selección de cortes histológicos en la ubicación de mayor diámetro.**

Se realizaron cortes de 3µm de espesor mediante un micrótopo de rotación a través de toda la extensión del defecto óseo en sentido sagital. Se seleccionaron mínimo 6 muestras consecutivas en el diámetro mayor del defecto óseo de cada tibia. Imagen representativa creada en Biorender.com.

Posteriormente, los cortes de 3 µm de espesor fueron teñidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina, caracterizada por ser una técnica simple, ampliamente utilizada en histopatología, de costo relativamente bajo y que permite la tinción simultánea de múltiples portaobjetos (40). Para realizar la técnica, los cortes fueron previamente secados en una estufa a 37° C durante la noche y desparafinados con xilol, para luego ser teñidos según el protocolo de Batería de tinción Hematoxilina Eosina del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología Universidad de Chile. Para finalizar con la protección y el montaje de los cortes mediante medio de montaje y cubreobjetos (Anexo 3) (Figura 10).



## Figura 10. Obtención de cortes histológicos montados y teñidos con técnica de Hematoxilina-Eosina

### f. Selección de muestras histológicas a analizar.

De las 10 tibias totales intervenidas, 2 de cada grupo fueron excluidas del procesamiento de imágenes, debido al error humano en la técnica quirúrgica y/o en la obtención de la muestra. Los criterios de exclusión fueron: la ubicación del defecto en la placa de crecimiento, muestras disgregadas por el proceso de tinción, región de interés alterada y tinciones deficientes. Por otro lado, los criterios de inclusión fueron: ubicación del defecto bajo la placa de crecimiento, cavidad medular y región de interés íntegra y correcta tinción. La cantidad de cortes de cada muestra se encuentra detallada a continuación (Tabla 1).

**Tabla 1. Descripción de las muestras por grupo**

	<b>Individuos</b>	<b>N.º de muestras por individuo</b>	<b>Muestras totales por grupo</b>
<b>5 semanas</b>	1	14	37
	2	11	
	3	12	
<b>24 semanas</b>	1	6	23
	2	9	
	3	8	

### g. Microfotografía y análisis

Los portaobjetos teñidos fueron observados mediante el microscopio Axiolab ZEISS® bajo un objetivo de 4x. Asimismo, las imágenes fueron obtenidas utilizando 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

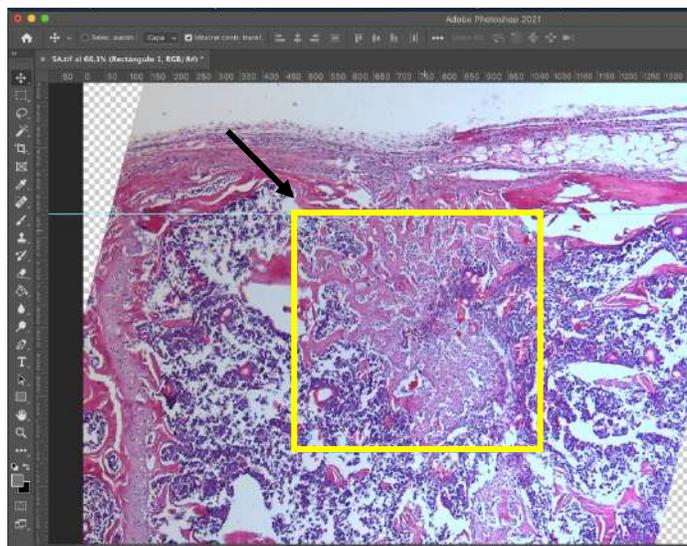
el software Leica LAS EZ® se creó una escala de 1mm para el posterior análisis de las imágenes obtenidas. Todas las imágenes fueron guardadas en formato TIFF.

#### **h. Determinación y recorte de la Región de Interés (ROI)**

Para establecer la comparabilidad de las muestras se realizó la medición de las distancias promedios entre cortical anterior y posterior, resultando en un promedio de diámetro medular similar en ambos grupos (esqueletalmente inmaduros  $\bar{X}$ : 630,53 píxeles esqueletalmente maduros  $\bar{X}$ : 603,30 píxeles) Se estableció como región de interés (ROI) un rectángulo de 550 x 527 píxeles<sup>2</sup> con el objetivo que el área seleccionada permitiera observar el defecto óseo en todas las imágenes.

Una vez obtenidas las imágenes, se debe determinar la región de interés (ROI) utilizando el software Adobe Photoshop® 2021 v22.5.1 para MacOS®. Para ello, se midió el diámetro medular en píxeles de todas las imágenes obtenidas. Luego de establecer la ROI, se recortaron las imágenes, siguiendo la siguiente secuencia (Anexo 4):

1. Se rotó la imagen, de modo que la cortical anterior tibial se ubicara paralela al eje x y en la parte superior de la imagen.
2. Se creó un rectángulo de 550 x 527 píxeles<sup>2</sup> ubicado sobre el centro del defecto óseo, inmediatamente posterior a la cortical anterior.
3. A partir del rectángulo, se creó una mesa de trabajo. Se guardó el archivo en formato TIFF (Figura 11).



**Figura 11. Creación de ROI en Adobe Photoshop® 2021 v22.5.1 para MacOS®.** Rectángulo 550 x 527 píxeles<sup>2</sup> ubicado en el centro del defecto óseo y posterior a la cortical anterior.

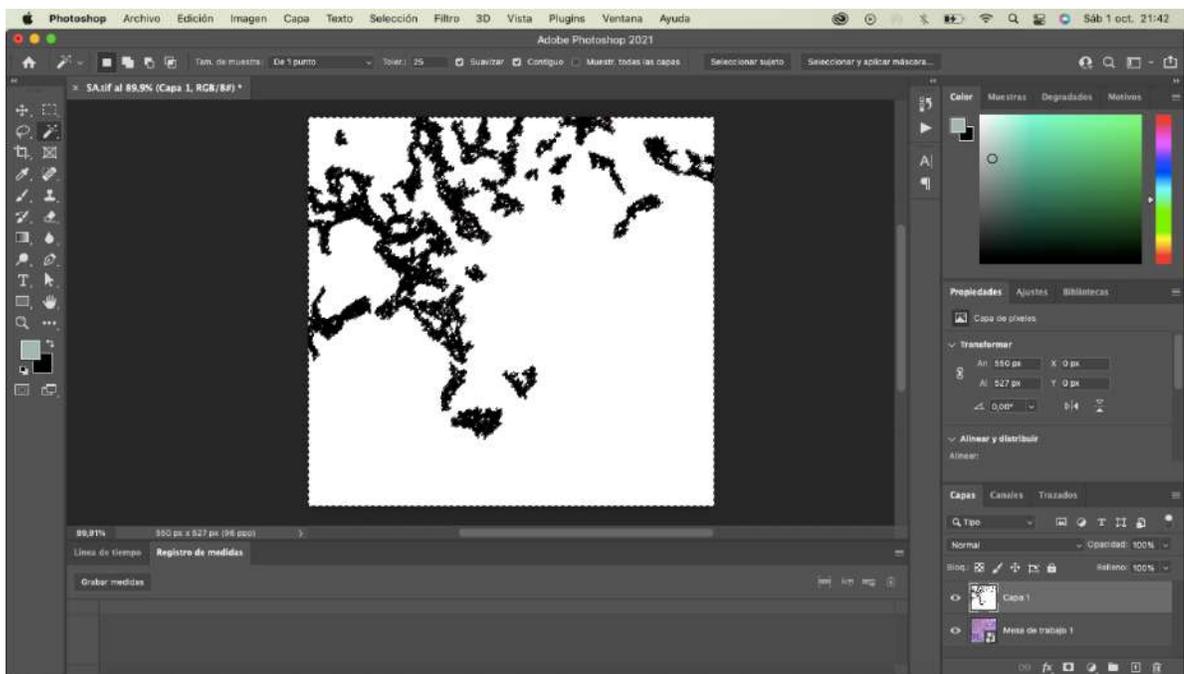
**i. Análisis cualitativo de la formación de nuevo hueso.**

Se analizaron los recortes de la ROI obtenidos, considerando los siguientes aspectos: Ubicación, extensión y distribución de la respuesta osteoformadora.

**j. Análisis cuantitativo de la formación de nuevo hueso.**

**Creación de máscara ósea.**

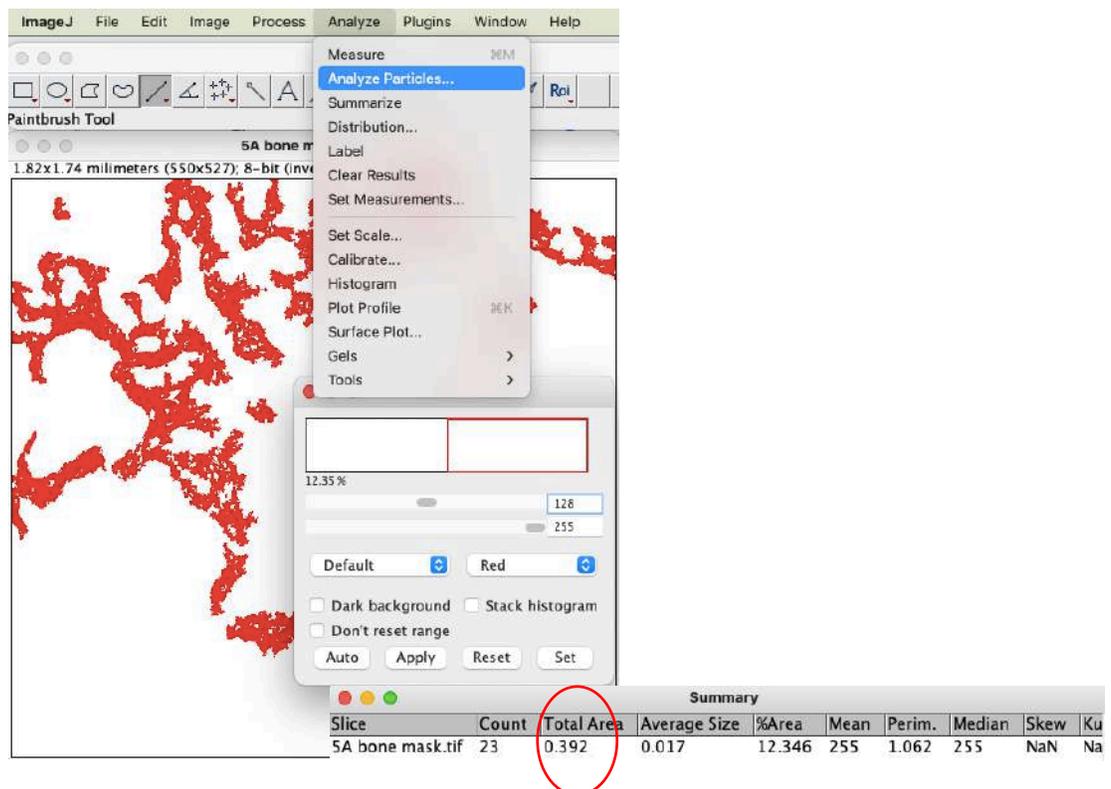
Con la región de interés previamente obtenida, se creó la máscara ósea para cuantificar la formación de nuevo hueso. Mediante el software Adobe Photoshop® 2021 v22.5.1 para MacOS® y utilizando la herramienta “*Varita mágica*” con tolerancia de color 25, se seleccionó el nuevo hueso formado. Se excluyó de la selección con la herramienta *Lazo* cualquier selección que no fuese nuevo hueso formado. La selección se rellenó de color negro y al invertir la selección se rellenó el fondo de color blanco obteniendo la máscara ósea (Anexo. 5) (Figura 12).



**Figura 12. Creación de máscara ósea de ROI para el análisis cuantitativo de la formación de nuevo hueso en Adobe Photoshop® 2021 v22.5.1 para MacOS®.**

**Cuantificación de la superficie ósea del nuevo hueso formado.**

La máscara ósea realizada fue analizada mediante el software ImageJ® para MacOS®. Transformando las imágenes a 8 bits se estableció una escala global de 302,1562 pixeles por milímetro según la escala del microscopio. Se analizó el área total de la ROI en mm<sup>2</sup> y se estableció un umbral de 128 (Egan 2012) para seleccionar la formación de nuevo hueso dentro de esta. Obteniendo como resultado la superficie de la formación de nuevo hueso en mm<sup>2</sup> (Anexo 6) (Figura 13). Todos los datos obtenidos fueron incluidos en Microsoft Excel®, estableciendo la razón del área de la formación de nuevo hueso/área total en mm<sup>2</sup> para su análisis estadístico.



**Figura 13. Medición del nuevo hueso formado por unidad de área en Image J®.** Área roja representa la superficie ósea del nuevo hueso formado en la ROI medida en mm<sup>2</sup>

#### **4.11. Presentación de datos y análisis estadístico.**

Los resultados de  $n=3$  experimentos por grupo se informaron en mediana y rangos. Posterior a la evaluación de outliers o valores atípicos mediante Outlier Calculator® de Graphpad®. Debido al tamaño muestral de  $n=3$  se optó por realizar prueba no paramétrica de U de Mann Whitney para muestras independientes sin corrección (Mishra 2019).

Todos los análisis estadísticos se realizarán en GraphPad Prism 9.0d® (Software GraphPad®, La Jolla, CA, EE. UU.), donde  $p < 0,05$  definirá una diferencia estadística.

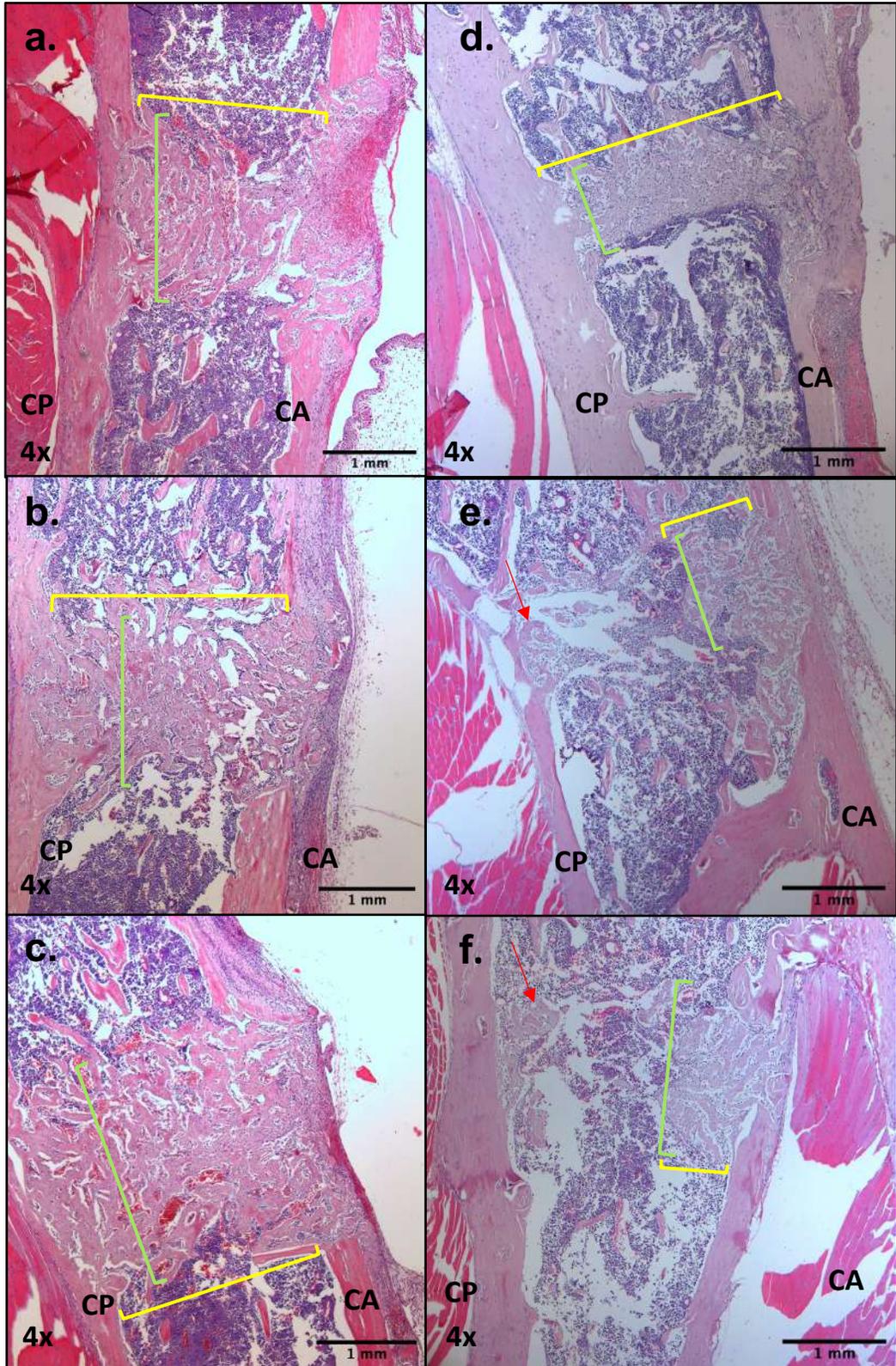
## 6. RESULTADOS

**Los ratones jóvenes inmaduros esquelétalmente exhibieron una respuesta formativa ósea masiva respecto de los adultos maduros esquelétalmente.**

Se constató que en ambos grupos hubo formación de nuevo hueso como respuesta a la formación de un defecto óseo monocortical. Sin embargo, en los 3 ratones inmaduros esquelétalmente (5 semanas de edad) se observó una respuesta osteoformadora masiva, proveniente tanto de los bordes del defecto y cortical anterior tibial como de la de la cortical posterior, permitiendo la formación de un puente óseo. Entendiéndose como puente óseo, a la formación de nuevo hueso que abarca la distancia entre corticales ocupando el diámetro medular. Este puente óseo se extendió de manera uniforme y transversal desde el defecto óseo abarcando los extremos de la cortical anterior hasta la cortical posterior y manteniendo un grosor similar entre los ratones del mismo grupo (Figura 14). Por otro lado, en 2 ratones maduros esquelétalmente (24 semanas de edad) se observó un intento en la formación de este puente óseo, mediante la reacción mínima de la cortical posterior y una reacción localizada de la cortical anterior, abarcando desde la extensión del defecto óseo hacia el espacio medular. Sorprendentemente, uno de los ratones maduros esquelétalmente logró la formación de un puente óseo, sin embargo, con un menor grosor en comparación con los ratones jóvenes inmaduros esquelétalmente (Figura 14).

**Inmaduros  
esqueletalmente**

**Maduros  
esqueletalmente**

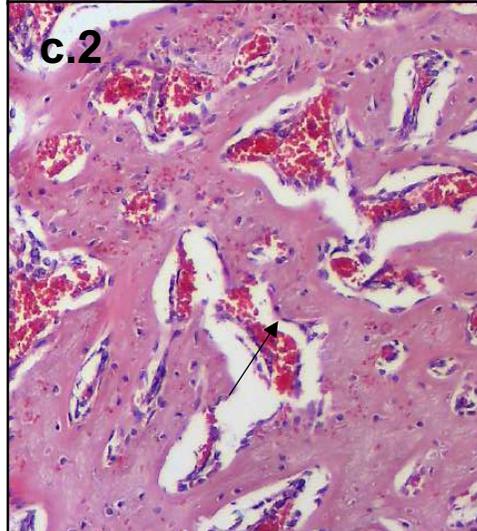
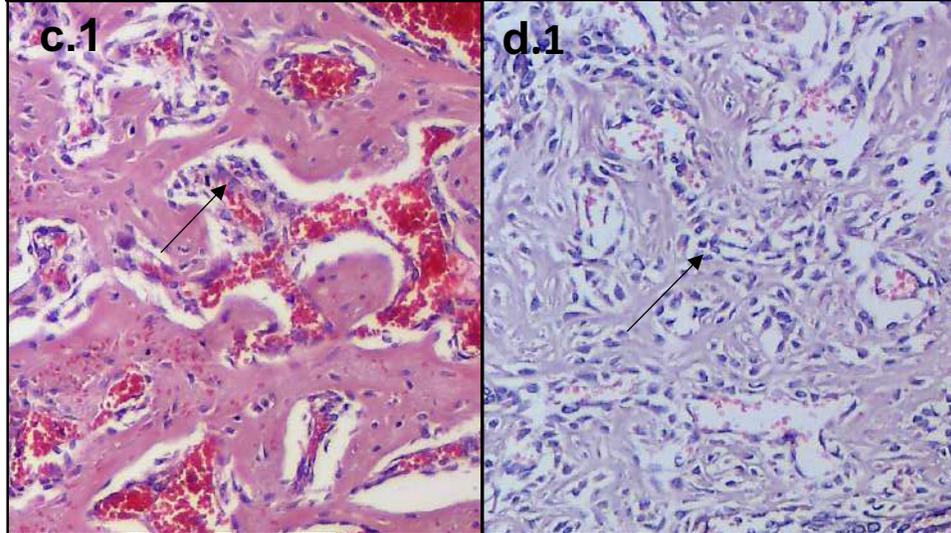
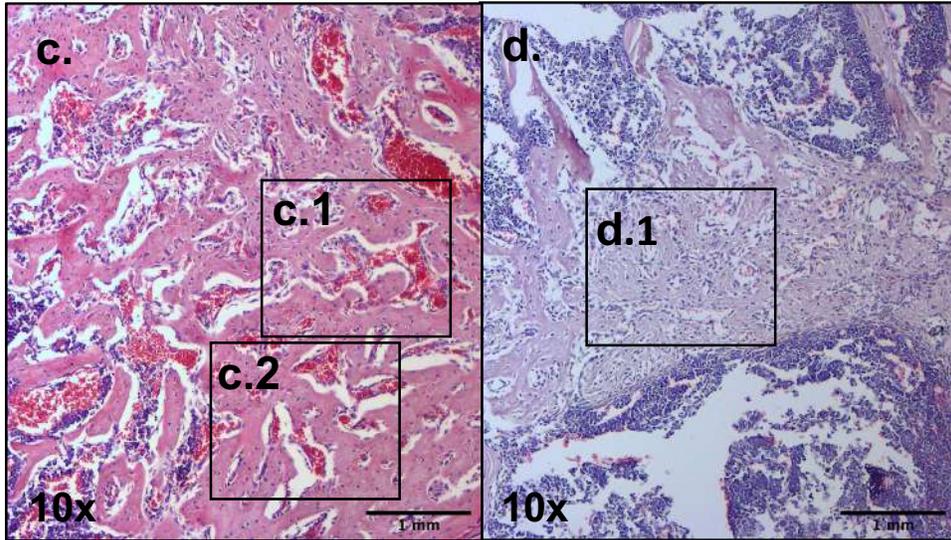


**Figura 14. Comparación morfológica de la formación de nuevo hueso a los 7 días post la inducción de un defecto óseo en ratones inmaduros y maduros esquelétalmente (de 5 y 24 semanas de edad respectivamente), mediante histología convencional con la técnica de hematoxilina-eosina (HE).** Se observó en los ratones inmaduros esquelétalmente (**a, b y c**) la formación de un puente óseo ante la respuesta de la cortical posterior y anterior a los 7 días posterior a la inducción de un defecto óseo. La línea amarilla muestra la extensión de la formación de nuevo hueso, siendo similar en los 3 sujetos. Los ratones maduros esquelétalmente (**d, e y f**) mostraron una respuesta disminuida. (**e y f**) La línea amarilla muestra la extensión de la formación ósea ante la respuesta de la cortical anterior limitada inmediatamente bajo el defecto en la cavidad medular. Las flechas rojas indican la respuesta de la cortical posterior en la formación de nuevo hueso, siendo esta menor. (**d**) Sólo un ratón maduro esquelétalmente pudo generar un puente óseo ante la inducción del defecto. Sin embargo, el grosor es menor en comparación a los ratones inmaduros esquelétalmente.

Al observar con mayor aumento la disposición celular en la formación de nuevo hueso en el ROI (Figura 15), los ratones inmaduros esquelétalmente mostraron una formación de nuevo hueso con la presencia de distintas organizaciones celulares. Se observaron grupos celulares agrupados sin organización entre el nuevo hueso formado y células ahusadas organizadas en una sola capa en la superficie del nuevo hueso formado (Figura 15). Por el contrario, los ratones maduros esquelétalmente mostraron una alta celularidad y dispersa sin orden en capas cercanas a la superficie de la matriz ósea. Al mismo aumento, los ratones maduros esquelétalmente presentaron menor formación de nuevo hueso (Figura 15). Cabe destacar, la diferencia de saturación de las tinciones, en la cual los ratones maduros esquelétalmente presentó una menor coloración.

**Inmaduros  
esqueletalmente**

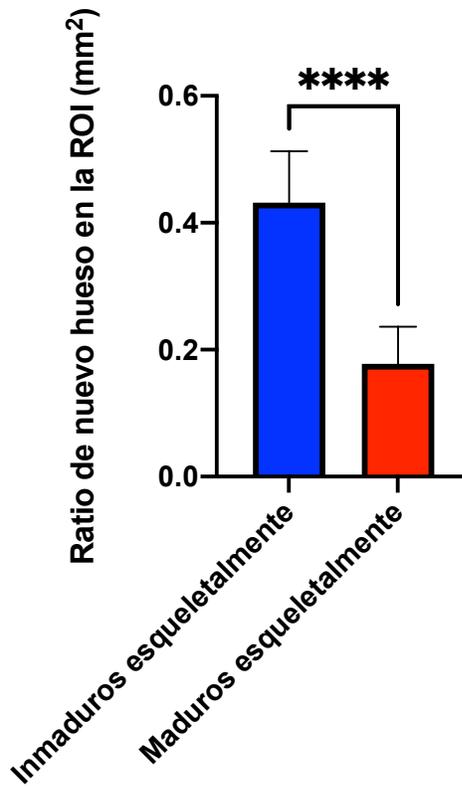
**Maduros  
esqueletalmente**



**Figura 15. Visión aumentada del ROI correspondiente al nuevo hueso en ratones inmaduros y maduros esquelétalmente (de 5 y 24 semanas de edad respectivamente) posterior a 7 días post inducción en un modelo de defecto óseo de tamaño no crítico estable. (c)** En los ratones inmaduros esquelétalmente se observó la formación de nuevo hueso tipo “tejido”. **(c.1)** A una mayor ampliación, se observaron grupos celulares desorganizados en los alrededores del nuevo hueso formado y **(c.2)** la presencia de células organizadas en una capa en la superficie del nuevo hueso. **(d)** Los ratones maduros esquelétalmente mostraron una formación desorganizada de nuevo hueso. **(d.1)** A una mayor ampliación, se observó una alta celularidad también desorganizada entre la formación de nuevo hueso. Destacablemente, al mismo aumento los ratones maduros esquelétalmente presentaron menor formación de nuevo hueso.

**Los ratones jóvenes inmaduros esquelétalmente formaron una superficie significativamente mayor de hueso nuevo respecto de los adultos maduros esquelétalmente**

Una vez realizado procesamiento de las imágenes detallado anteriormente, correspondientes a defectos óseos tibiales de tamaño no crítico a los 7 días post intervención. Se realizó el análisis estadístico del ratio de la formación de nuevo hueso expresado en  $\text{mm}^2$ . Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.0001$ ) en el área de la formación de nuevo hueso entre los grupos (Figura 16), donde la superficie de la formación de nuevo hueso en los ratones inmaduros esquelétalmente fue mayor (mediana  $0,4346 \text{ mm}^2$  y rango  $1552 \text{ mm}$ ) en comparación con los ratones maduros esquelétalmente (mediana  $0,1613 \text{ mm}$  rango  $278 \text{ mm}$ ) a los 7 días post intervención.



**Figura 16. Ratio de nuevo hueso en el ROI en ratones de 5 y 24 semanas.** Se observa una disminución de la superficie de hueso nuevo en los sujetos de 24 semanas de edad respecto de los de 5 semanas de edad. \*\*\*\*:  $p < 0.0001$  Prueba de U de Mann-Whitney no pareado.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos demostrado que el envejecimiento afecta en la reparación ósea de una fractura estable a través de la comparación de la respuesta ósea en un esqueleto inmaduro versus uno maduro. Así, observamos que la madurez esquelética, disminuye la calidad y cantidad del nuevo hueso en ratones de 24 semanas de edad. Este hecho ha sido demostrado también en modelos de fractura inestable, donde la reparación ósea exhibe una vía endocondral más frágil y con alta actividad resortiva mediada por osteoclastos tanto en ratones de 6 meses y 18 meses (7,29,33,41).

En suma, este estudio estableció un modelo de defecto óseo monocortical de tamaño no crítico en la cara anteromedial de la tibia, donde ocurre osificación intramembranosa, asegurando la estabilidad de la fractura (30,34,42–44). Existe poca evidencia sobre los cambios en la reparación ósea inducidos por la edad en un modelo de osificación intramembranosa representativo de una fractura estable de osificación intramembranosa (30). Así, este estudio contribuye al mayor conocimiento del efecto de la edad en la reparación ósea, excluyendo la inestabilidad fracturaría.

Histológicamente se observó la formación de nuevo hueso a los 7 días posteriores a la inducción del defecto al igual que otros estudios (30,34). Si bien, las fracturas diafisarias osifican de manera endocondral mediante la presencia de un callo óseo (2,27), la inducción de un defecto óseo monocortical estable en la diáfisis tibial mostró una osificación intramembranosa con la aposición de hueso nuevo o *woven bone* desde el endostio hacia el espacio medular (20,27,30,43). Interesantemente, el puente óseo no se formó en los ratones maduros esquelétalmente, localizándose en el endostio. Esta observación se podría relacionar con una disminución de células osteoprogenitoras, transcritores de células mesenquimales y pérdida de masa ósea en el envejecimiento (4). Además, se podría asociar a una pronunciada reducción de vasos endostales CD31<sup>+</sup> donde las células osteoprogenitoras se encuentran fuertemente asociadas, siendo mucho más abundantes en ratones de 4 semanas según Kusumbe y cols. (32).

Similarmente a otros investigadores, la morfología de la formación de nuevo hueso en nuestro modelo, mostró a células osteoblásticas mesenquimales de forma redonda ubicadas alrededor de la formación de nuevo hueso *woven bone* dispuesto al azar en una masa celular donde no existía hueso previamente (34,43). Por otro lado, se observó aparentemente osteoblastos de superficie (OSs) alineándose en una capa, en la superficie del hueso nuevo para sintetizar fibras paralelas de hueso lamelar en los sujetos inmaduros esquelétalmente.

Otro factor a destacar es que la cicatrización ósea primaria no está asociada con una presencia importante de células inflamatorias, debido a su estabilidad. No así, una fractura de reparación secundaria en donde la constante inestabilidad mantiene un estado inflamatorio crónico. Es por esto, que este tipo de reparación estable intramembranosa podría verse más afectada en sujetos envejecidos donde el infiltrado inflamatorio es aún más escaso y la funcionalidad de las células osteoprogenitoras es menor (20,45).

Otro aspecto a mencionar es la diferencia en la saturación de tinciones, siendo menor en los ratones maduros esquelétalmente, posiblemente al presentar menor cantidad de colágeno siendo un tejido óseo con menor contenido mineral. Viéndose en los ratones inmaduros esquelétalmente de manera intensa.

Nuestros hallazgos proponen que el proceso de envejecimiento, específicamente el periodo post madurez esquelético y sexual, sin incluir la senescencia; sería moduladora de la respuesta ósea reparativa. Existe evidencia que demuestra que los sujetos adultos maduros esquelétalmente reparan un 62,8% menos respecto a sujetos jóvenes inmaduros esquelétalmente (7,29,33,41).

En nuestro estudio, los animales de 24 semanas de edad ya tuvieron su madurez sexual y corresponden a ejemplares adultos maduros esquelétalmente según el criterio de envejecimiento de la cepa BALB/c obtenidos de Jackson Laboratory (46–48). Este grupo, ha sido reportado con una significativa disminución en la reparación ósea de fractura sin ser un grupo senescente (41). Es importante destacar que la maduración esquelética marcaría un punto de inflexión en la capacidad del hueso para reparar. Nuestros resultados fueron similares a otros

investigadores que usan este modelo, demostrando su eficacia en estudios celulares (42). Es mandatorio continuar esta línea de investigación determinando a través de anticuerpos marcadores para distintas células, como CD146, f4/80 para determinar el rol de nichos hematopoyéticos y no hematopoyéticos en la reparación ósea. Así, abriendo camino para nuevas estrategias terapéuticas.

### **Modelo**

Según lo mencionado anteriormente, nuestros resultados fueron similares a los que utilizan este modelo experimental de reparación de fractura estable en ratón (42). Dicho modelo es una buena alternativa para el estudio de la edad en la reparación ósea, debido a que la cirugía es bien tolerada por los ratones y es costo-efectivo. Toma importancia el desarrollo de nuevos modelos en el área maxilofacial, donde se debe buscar su aplicabilidad en humanos siendo ético a su vez.

### **Limitaciones**

Una limitación del presente trabajo es que es un morfológico básico que, si bien, identifica los elementos tisulares y celulares, no demuestra el fenotipo inmune de las células del sitio fracturado. También, el solo uso de sujetos macho limita su aplicabilidad a hombres y no demuestra el universo real de la población.

Además, se encuentra la dificultad de mantener el total del tamaño muestral debido a que, al ser modelo *in vivo* es difícil manejar todas las variables: técnica quirúrgica, obtención de la muestra, procesamiento de las muestras y la dificultad que significa obtener muestras de tejido óseo descalcificado. Sin embargo, debido al efecto de los resultados, un número de experimentos de  $n=3$  sería suficiente para evaluar parámetros morfológicos e histomorfometría en hueso en donde no fue aplicada ninguna terapia. Independiente de lo anterior, es importante contar personas expertas en el equipo, con una curva de aprendizaje, para no afectar en el número final de muestras.

Por otro lado, no nos fue posible establecer alguna diferencia entre los tamaños, pesos, diámetros corticales y medulares tibiales en los dos grupos, debido a que al ser una estructura tridimensional es complejo establecer proporciones

estandarizadas para el área de interés según la edad, largo, etc. Si bien, se han reportado aumentos en el grosor cortical en ratones entre 6 semanas a 6 meses de edad (4,49) se hizo lo mejor posible en estandarizar un promedio.

### **Futuras proyecciones**

Se utilizaron ratones machos con el fin de estandarizar el modelo de estudio, debido a la evidencia reciente que demuestra un declive del volumen óseo en hembras a los 6 meses de edad (50). Lo anterior es causa del dimorfismo sexual en la osteoblastogénesis (51,52). Ya estandarizando el modelo de un defecto óseo monocortical para el estudio de la edad en la reparación ósea en ratones machos de 5 y 24 semanas de edad, es indispensable incluir hembras en próximos estudios debido a que son el grupo con más prevalencia de fracturas (5,53). Por otro lado, sería interesante incluir más días de estudio posterior a la inducción del defecto para determinar la rapidez de la formación ósea en distintas edades, además de evaluar el impacto de 1mm de defecto óseo y determinar si existe diferencia según la edad. Todo lo anterior puesto en una balanza de costos y beneficios utilizando modelos animales.

## 8. CONCLUSIÓN

Concluimos que la formación de hueso nuevo de un sitio fracturado en un modelo murino disminuye en función de la maduración esquelética. Estos resultados sugieren que existiría un declinamiento en la capacidad formativa ósea en un sitio fracturado, probablemente asociado a una disminución de vías y señales osteogénicas durante el envejecimiento. El modelo de defecto óseo monocortical fue capaz de reproducir una reparación ósea en primera intención manteniendo su estabilidad. Este estudio sienta las bases para el estudio de la fisiopatología de la reparación de las complicaciones de reparación de fracturas (por ejemplo, no uniones). Además, permitiría proponer medidas preventivas para evitar fracturas en tercera edad.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Envejecimiento y salud [Internet]. 01-10-22. 2022 [cited 2023 Jan 9]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
2. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016;86:119–30.
3. Dinamarca-Montecinos JL, Améstica-Lazcano G, Rubio-Herrera R, Carrasco-Buvinic A, Vásquez A. Características epidemiológicas y clínicas de las fracturas de cadera en adultos mayores en un hospital público chileno. *Rev Med Chil*. 2015 Dec 1;143(12):1552–9.
4. Portal-Núñez S, Lozano D, de la Fuente M, Esbrit P. Fisiopatología del envejecimiento óseo. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2012;47(3):125–31.
5. Barahona M, Martínez Á, Brañes J, Rodríguez D, Barrientos C. Incidencia, factores de riesgo y letalidad de la fractura de cadera en Chile: estudio transversal sobre registros nacionales de 2017. *Medwave*. 2020;20(5):e7939.
6. Minigutti MO, Ramos EA, Caruso D, Muiño JM, Antonelli LB, Diamante M. Pathological fractures of the mandible in elderly patients: A series of 15 cases. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*. 2019;41(4):183–8.
7. Ambrosi TH, Marecic O, McArdle A, Sinha R, Gulati GS, Tong X, et al. Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature* [Internet]. 2021;597. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03795-7>
8. Zhang X, Baht GS, Huang R, Chen YH, Molitoris KH, Miller SE, et al. Rejuvenation of neutrophils and their extracellular vesicles is associated with enhanced aged fracture healing. *Aging Cell*. 2022;21(7):1–15.
9. Zhao Y, Xie L. Unique bone marrow blood vessels couple angiogenesis and osteogenesis in bone homeostasis and diseases. *Ann N Y Acad Sci*.

- 2020;1474(1):5–14.
10. Boskey AL, Coleman R. Critical reviews in oral biology & medicine: Aging and bone. *J Dent Res*. 2010;89(12):1333–48.
  11. Deng R, Li C, Wang X, Chang L, Ni S, Zhang W, et al. Periosteal CD68+F4/80+ Macrophages Are Mechanosensitive for Cortical Bone Formation by Secretion and Activation of TGF- $\beta$ 1. *Adv Sci*. 2022;9(3):1–16.
  12. 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 Biomater*. 2021;133(xxxx):46–57.
  13. Salhotra A, Shah HN, Levi B, Longaker MT. Mechanisms of bone development and repair HHS Public Access. Vol. 21, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020. 696–711 p.
  14. Ambrosi TH, Longaker MT, Chan CKF. A Revised Perspective of Skeletal Stem Cell Biology. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7(September).
  15. Seike M, Omatsu Y, Watanabe H, Kondoh G, Nagasawa T. Stem cell niche-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity. *Genes Dev*. 2018;32(5–6):359–72.
  16. Baccin C, Al-Sabah J, Velten L, Helbling PM, Grünschläger F, Hernández-Malmierca P, et al. Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat Cell Biol*. 2020;22(1):38–48.
  17. Chan CKF, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, et al. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* [Internet]. 2009;457(7228):490–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07547>
  18. Travlos GS. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):548–65.

19. Chan CKF, Lindau P, Jiang W, Chen JY, Zhang LF, Chen CC, et al. Clonal precursor of bone, cartilage, and hematopoietic niche stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(31):12643–8.
20. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(3):133–43.
21. Loi F, Córdova LA, Zhang R, Pajarinen J, Lin TH, Goodman SB, et al. The effects of immunomodulation by macrophage subsets on osteogenesis in vitro. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2016;7(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0276-5>
22. Yona S, Gordon S. From the reticuloendothelial to mononuclear phagocyte system - The unaccounted years. *Front Immunol*. 2015;6(JUL):1–7.
23. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* [Internet]. 2018;49(4):595–613. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>
24. Blériot C, Chakarov S, Ginhoux F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity*. 2020;52(6):957–70.
25. Córdova LA, Loi F, Lin T-H, Gibon E, Pajarinen J, Nabeshima A, et al. CCL2, CCL5 and IGF-1 Participate in The Immunomodulation of Osteogenesis during M1/M2 Transition In Vitro HHS Public Access. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(11):3069–76.
26. Konttinen YT, Pajarinen J, Takakubo Y, Gallo J, Nich C, Takagi M, et al. Macrophage polarization and activation in response to implant debris: Influence by “particle disease” and “ion disease.” *J Long Term Eff Med Implants*. 2014;24(4):267–82.
27. Aspenberg P, Sandberg O. Distal radial fractures heal by direct woven bone formation. *Acta Orthop*. 2013;84(3):297–300.
28. Gibon E, Lu L, Goodman SB. Aging, inflammation, stem cells, and bone

- healing. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2016;7(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0300-9>
29. Baht GS, Silkstone D, Vi L, Nadesan P, Amani Y, Whetstone H, et al. Exposure to a youthful circulation rejuvenates bone repair through modulation of  $\beta$ -catenin. *Nat Commun*. 2015;6(May):1–10.
  30. 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*. 2011;26(7):1517–32.
  31. Löffler J, Sass FA, Filter S, Rose A, Ellinghaus A, Duda GN, et al. Compromised Bone Healing in Aged Rats Is Associated With Impaired M2 Macrophage Function. *Front Immunol*. 2019;10(October):1–11.
  32. Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*. 2014;507(7492):323–8.
  33. 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. *J Orthop Trauma*. 2009;23(SUPPL. 5):31–8.
  34. Campbell TM, Wong WT, Mackie EJ. Establishment of a model of cortical bone repair in mice. *Calcif Tissue Int*. 2003;73(1):49–55.
  35. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J*. 2002;43(4):244–57.
  36. Greenfield EA. Administering anesthesia to mice, rats, and hamsters. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(6):457–9.
  37. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, et al. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J*. 2012;53(1):1–14.

38. Pritchett-Corning KR, Mulder GB, Luo Y, White WJ. Principles of rodent surgery for the new surgeon. *J Vis Exp*. 2010;(47):3–7.
39. AVMA Panel on Euthanasia. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. 2013th ed. American Veterinary Medical Association; 2013.
40. Bancroft JD. The Theory and Practice of Histological Techniques. 7th ed. Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD, editors. Vol. 24, Pathology. Elsevier Limited.; 2013. 126–138 p.
41. Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, et al. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res* [Internet]. 2005 [cited 2022 Sep 20];23:1300–7. Available from: [www.elsevier.com/locate/orthres](http://www.elsevier.com/locate/orthres)
42. 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*. 2018;8(1):1–11.
43. Shapiro F, Wu JY. Woven bone overview: Structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation throughout vertebrate groups. *Eur Cells Mater*. 2019;38:137–67.
44. Hernández-Flores C, Delgado A, Domínguez-Hernández VM. Evaluación biomecánica de un modelo de defecto óseo en tibia de rata. *Rev Mex Ing Biomed*. 2011;32(1):12–9.
45. Saavedra F, Córdova LA, Cortés J. Caracterización del infiltrado inflamatorio durante la reparación de fractura en envejecimiento: estudio experimental en modelo murino. Universidad de Chile; 2022.
46. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* [Internet]. 2016;152:244–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>
47. Hagan C. When are mice considered old? [Internet]. Blog Post. 2017 [cited 2020 Dec 21]. Available from: <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old#>

48. Flurkey K, Curren J, Harrison D. Mouse models in aging research. *Fac Res* 2000 - 2009 [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2020 Dec 21];3:637–72. Available from: [https://mouseion.jax.org/stfb2000\\_2009/1685](https://mouseion.jax.org/stfb2000_2009/1685)
49. Halloran BP, Ferguson VL, Simske SJ, Burghardt A, Venton LL, Majumdar S. Changes in Bone Structure and Mass With Advancing Age in the Male C57BL/6J Mouse. *J Bone Miner Res*. 2002;17(6).
50. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, et al. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone* [Internet]. 2009;45(6):1065–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2009.08.005>
51. Piemontese M, Almeida M, Robling AG, Kim HN, Xiong J, Thostenson JD, et al. Old age causes de novo intracortical bone remodeling and porosity in mice. *JCI Insight*. 2017;2(17).
52. 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;9(1):1–13.
53. Dinamarca JL, Améstica G, Rubio R, Carrasco A, Vásquez A. Características epidemiológicas y clínicas de las fracturas de cadera en adultos mayores en un hospital público chileno. *Rev Med Chil*. 2015;143(12):1552–9.

## 10. ANEXOS Y APÉNDICES

### Anexo 1. Certificado del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA).



Santiago, 19 de agosto de 2021

Certificado N°: 21488 – ODO – UCH

#### CERTIFICADO

El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile, certifica que en el Protocolo **FOUCH 210616** del Proyecto de Investigación titulado **“Immunomodulating bone healing for the aging via macrophages - osteoprogenitor cells interaction: Estudio Piloto”**, de los investigadores **Isidora Panes Toro** y **Felipe Saavedra Vásquez**, tesis de pregrado, carrera de Odontología y del académico patrocinador **Dr. Luis Córdova Jara**, Profesor Asistente, Departamento de Cirugía Bucal y Maxilofacial, todos pertenecientes a la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, no se plantean acciones en sus procedimientos que contravengan las normas bioéticas de manejo y cuidado de animales. Así mismo, la metodología experimental planteada satisface lo estipulado en el Programa Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile.

Los investigadores se han comprometido a la ejecución de este proyecto dentro de las especificaciones señaladas en el protocolo revisado y autorizado por el CICUA, a mantener los procedimientos experimentales planteados y a no realizar ninguna modificación sin previa aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación para el uso de **20 ratones**, especie *Mus musculus*, cepa BALB/c provenientes del **Bioterio Plataforma Experimental, ICOD, Facultad de Odontología, Universidad de Chile**, desde **septiembre de 2021 a noviembre del 2021**, tiempo estimado de ejecución del estudio, el cual será financiado por **Proyecto FONDECYT Iniciación N° 11190536**.

*El CICUA de la Universidad de Chile, forma parte de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, y está constituido por 53 miembros: 5 médicos veterinarios, 39 académicos (12 de ellos médicos veterinarios), y 9 miembros no asociados a la academia o investigación, y que cuentan con experiencia en bioética relacionada a mantención y uso de animales. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “Protocolo de Manejo y Cuidado de Animales” después de un estudio acucioso y de la acogida de los investigadores de las observaciones exigidas por el Comité.*

Ronald Vargas Casanova  
Director  
CICUA – VID  
Universidad de Chile



Dr. Emilio Herrera Videla  
Presidente  
CICUA - VID  
Universidad de Chile

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUA)  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VID) – Universidad de Chile  
<http://www.uchile.cl/portal/investigacion/152120/comite-institucional-de-cuidado-y-uso-de-animales-cicua>  
email: [coordinador.cicua@uchile.cl](mailto:coordinador.cicua@uchile.cl)

## Anexo 2. Protocolo de manejo y cuidado de animales.



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., tesistas de pregrado, Facultad de Odontología.

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

**Fax:**

**e-mail:** [lcordova@uchile.cl](mailto: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 Córdova, 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 <a href="https://www.oniris-nantes.fr/">https://www.oniris-nantes.fr/</a>) (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>

**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.



**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).

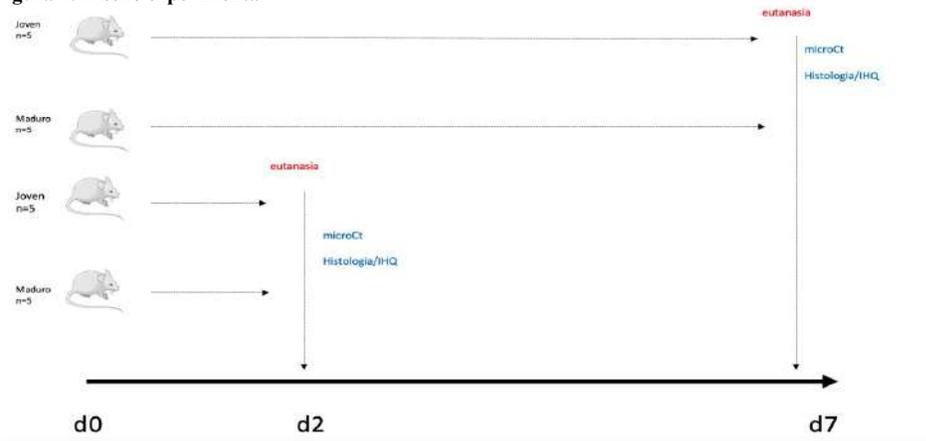


**C.4. Justifique estadística y/o bibliográficamente el número de animales a utilizar por cada uno de los objetivos del estudio. Recuerde que de acuerdo a las normas internacionales de bioética animal, se debe utilizar el mínimo de animales necesario para obtener resultados válidos. Aplicar el principio 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: 333.
- (2) Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8(3): 333-43



## 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).



## 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 rellenos 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.



**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 mt<sup>2</sup>, 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 isoflurano (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



## 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.

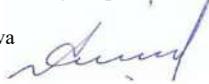
**J.10. Investigador Patrocinado del protocolo (si lo hubiese):**

Firma: No aplica

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

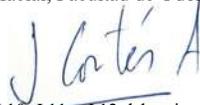
Dr Luis Cordova

Firma:



**J.12. VºBº Director de la Unidad Académica:** Prof. Juan Cortés Araya, Director del Departamento de Cirugía y 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



### 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 type="checkbox"/> |
| 3 Ha especificado el cálculo del número total de animales a utilizar (punto B.7)  | <input 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 type="checkbox"/> |
| 5 Ha justificado y especificado el cálculo del número de animales a utilizar por objetivo (punto C.4)   | <input type="checkbox"/> |
| 6 Indicó <b>“no aplica”</b> en todos los items en que no corresponde responder  | <input type="checkbox"/> |

Actualizado Octubre 2017



## ANEXO I - GLOSARIO

**Aflicción:** 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.

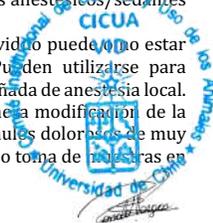
**Refinamiento:** Utilizar métodos que alivien o minimicen el potencial dolor, sufrimiento o distrés, aumentando el bienestar animal desde su nacimiento hasta su muerte, por ejemplo a través del enriquecimiento ambiental.

**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 involucren 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, 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.



## 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
<b>Pérdida de peso (de 0 a3)</b>	● 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
<b>Aspecto (de 0 a3)</b>	● Normal.	0
	● Pelo en mal estado.	1
	● Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales.	2
	● Postura anormal.	3
<b>Comportamiento espontáneo (de 0 a3)</b>	● Normal.	0
	● Pequeños cambios.	1
	● Inactividad	2
	● Automutilación, vocalización anormales, animales muy inquieto o inmóviles.	3
<b>Puntuación Total</b>		

**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

Desde 5-9

Desde 10-14

Desde 15-20

normal

supervisar cuidadosamente considerar el uso de analgésicos

sufrimiento intenso: administrar analgésicos (¿eutanasia?)

eutanasia



## 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 intracardiaca (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 anormalidad en los patrones de comportamiento, ausencia de "acicalamiento", deshidratación, "vocalización" anormal, anorexia prolongada; letargia; trastornos al caminar y moverse, o signos clínicos severos de infección local o sistémica.



### **Anexo 3. Batería de tinción Hematoxilina-Eosina del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.**

#### **Batería de tinción Hematoxilina Eosina:**

##### **Desparafinar**

- Xilol I 10 min
- Xilol II 10 min

##### **Rehidratación**

- OH 100° I 10 min
- OH 100° II 10 min
- OH 95° 10 min
- OH 70° 10 min
- Agua corriente 5 min

##### **Tinción**

- Hematoxilina de Harris 10 min
- Agua corriente 5 min
- Azular en Bórax 15 sumergidas
- Agua corriente 5 min
- Eosina acuosa 1% 10 min
- Agua corriente hasta que salga traslúcida

##### **Deshidratar**

- OH 70° 15 sumergidas
- OH 95° 15 sumergidas
- OH 100° I 15 sumergidas
- OH 100° II 15 sumergidas
- Xilol I 15 sumergidas
- Xilol II 15 sumergidas

**Montaje**

- Montar con Flo-texx

**Soluciones:****Hematoxilina:**

- Lista para usar. Filtrar antes de usar

**Bórax saturado:**

- 1 cucharada colmada de Sodio de Borato 10-Hiidrato en 250 mL de agua corriente.

**Eosina acuosa 1%:**

- 1gr de eosina y 100mL de agua destilada
- Mezclar y filtrar

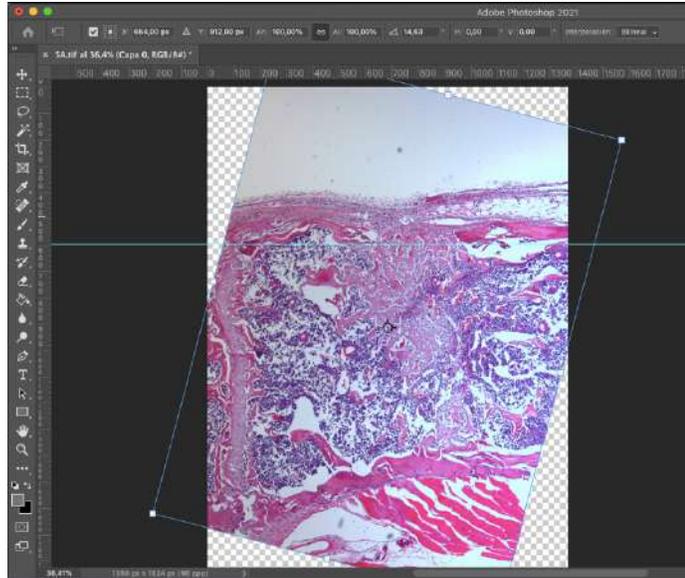
\*En caso de que la tinción sea débil, agregar 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 250 mL de solución. El pH de la solución debe quedar aproximadamente en 4.6

\*\*Eosina acuosa 1% con AGG: teñir por 3 min.

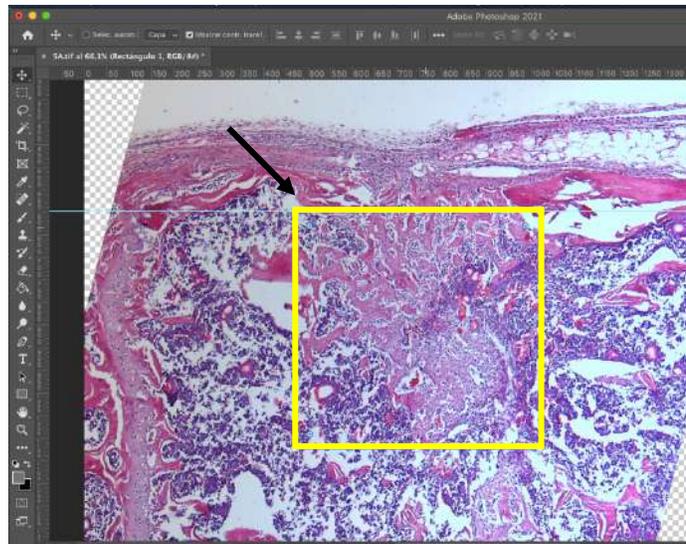
\*\*\*Eosina acuosa 1% sin AAG: teñir por 8 a 15 min

#### Anexo 4. Creación de ROI en Adobe Photoshop® 2021 v22.5.1 para MacOS®

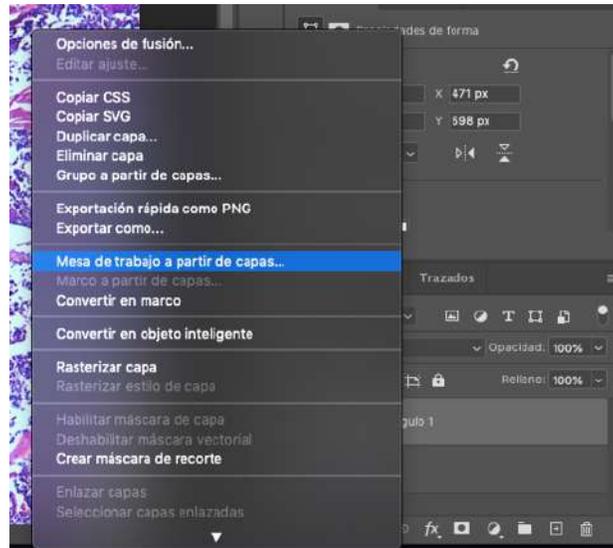
1. Rotación de la imagen, de modo que la cortical anterior tibial se ubique paralela al eje x y en la parte superior de la imagen.



2. Se crea un rectángulo de 550 x 527 píxeles ubicado sobre el centro del defecto óseo, inmediatamente posterior a la cortical anterior.

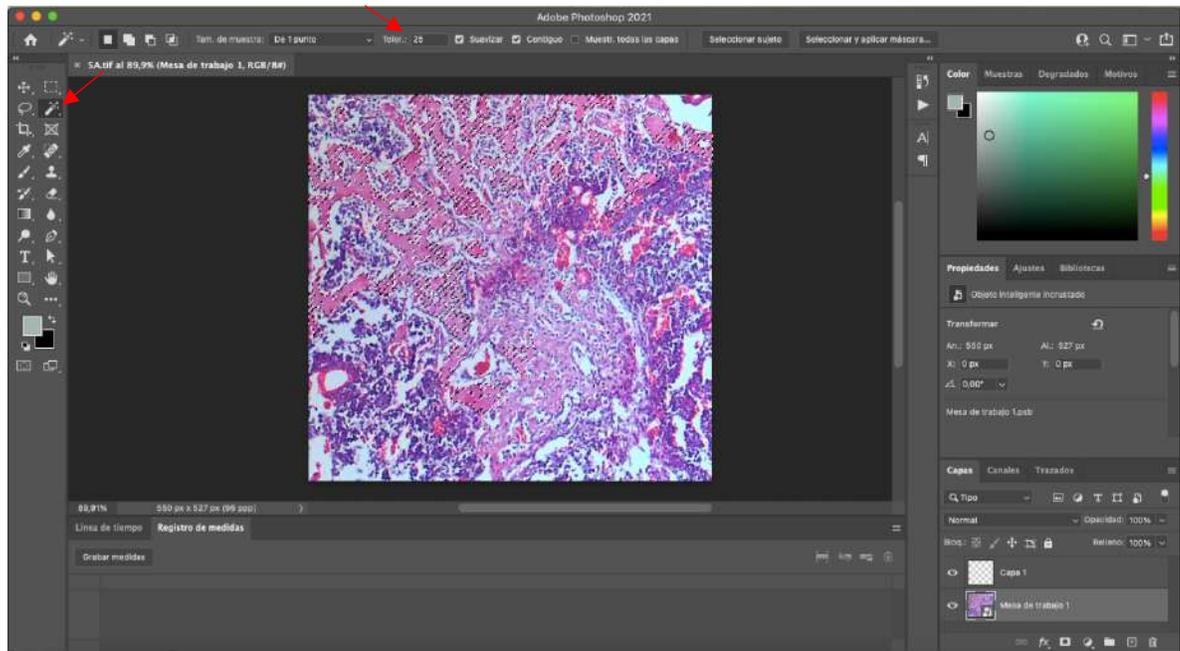


3. A partir del rectángulo, se creó una mesa de trabajo. Se guardó el archivo en formato TIFF.

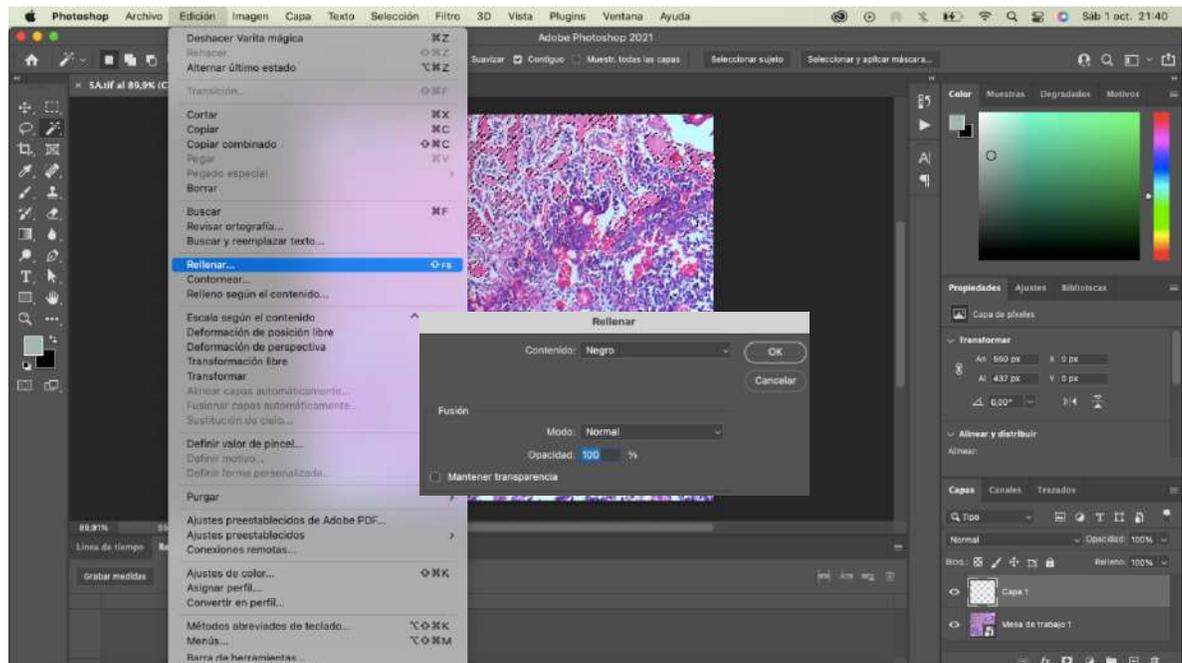


## Anexo 5. Creación de máscara ósea para el análisis cuantitativo de la formación de nuevo hueso en Adobe Photoshop® 2021 v22.5.1 para MacOS®.

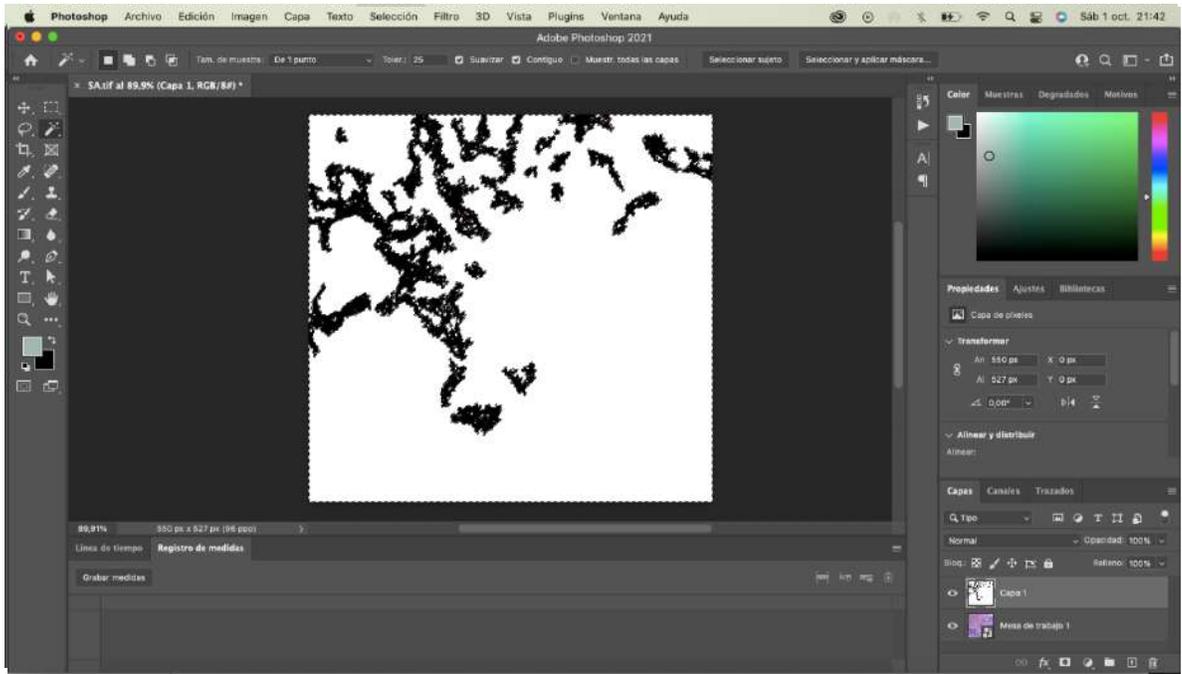
1. Herramienta *Varita Mágica*. Selección del nuevo hueso utilizando una tolerancia de color 25.



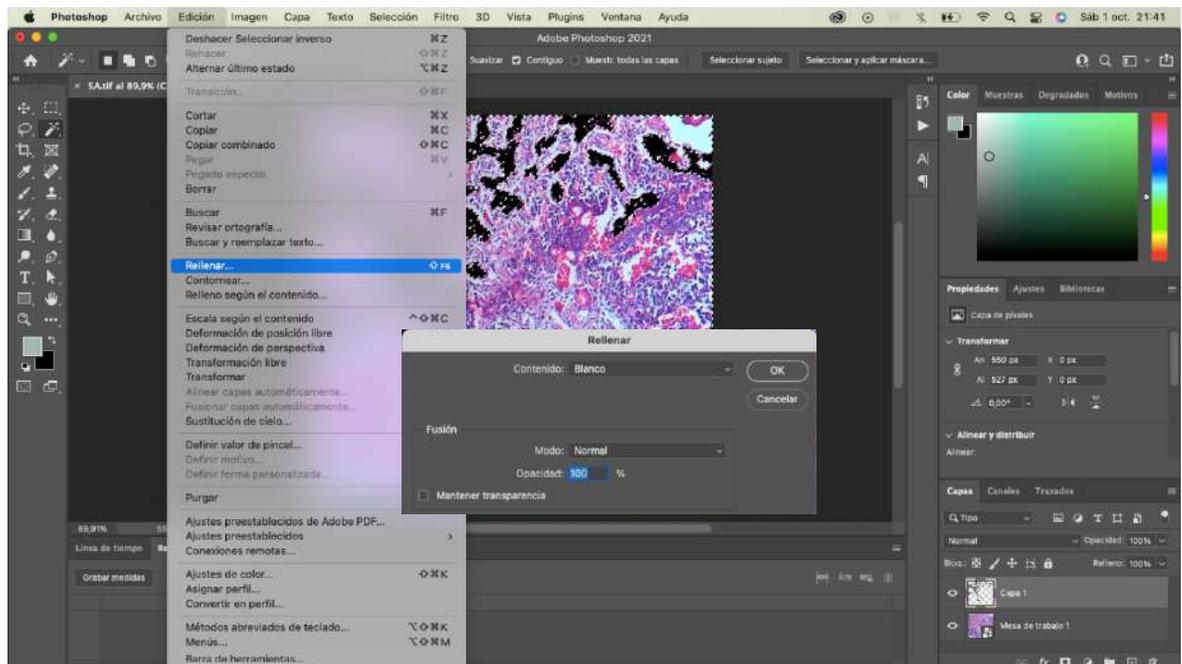
2. *Edición > Rellenar*. Una vez lista la selección y ubicados en la *Capa 1*.



3. *Selección > Invertir*. Se invierte la selección previa.



4. Se repite el paso 2 cambiando el contenido de color blanco.

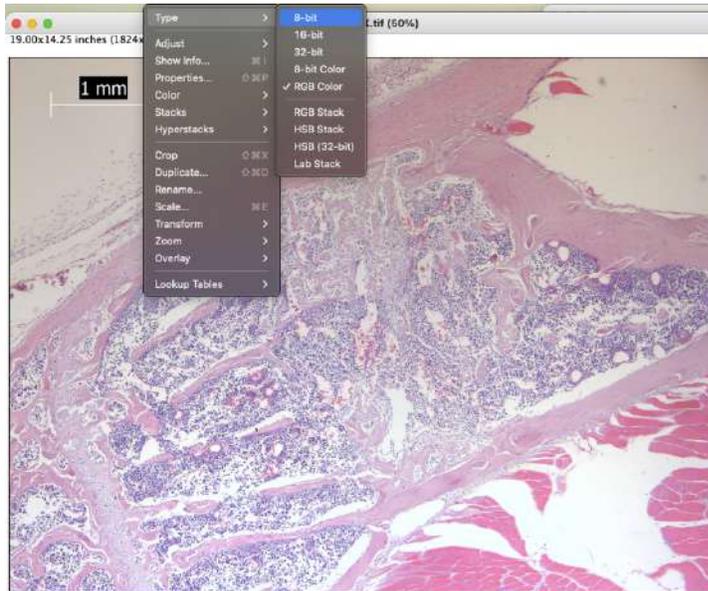


5. Se guarda la máscara ósea en formato TIFF

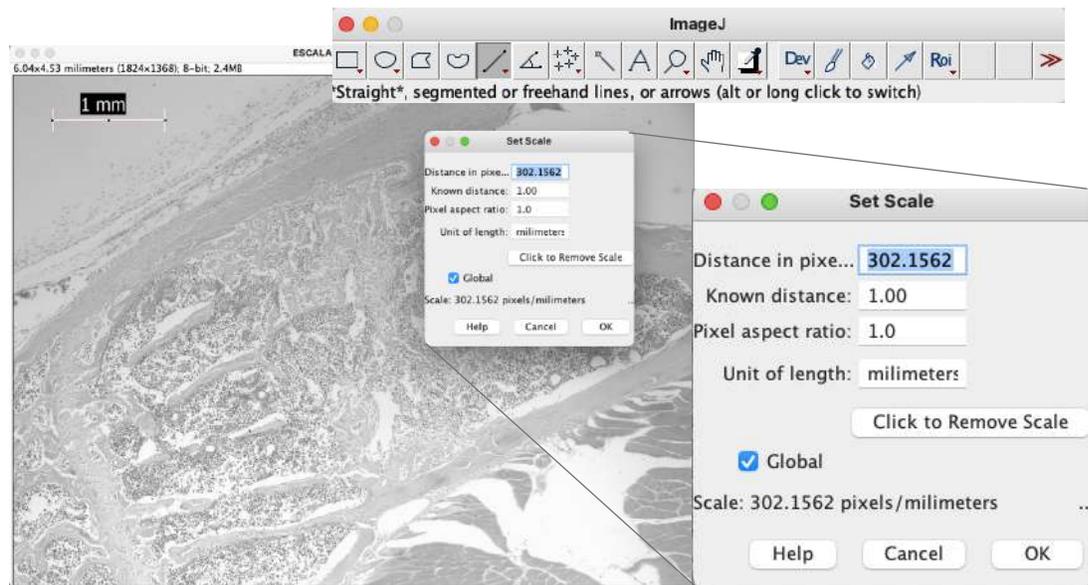


## Anexo 6. Calibración de magnitud en Image J® para MacOS®

1. Abrir imagen con barra de escala.
2. *Image > Type > 8-bit*. Las imágenes se transforman a 8-bit. La imagen cambiará a blanco y negro.



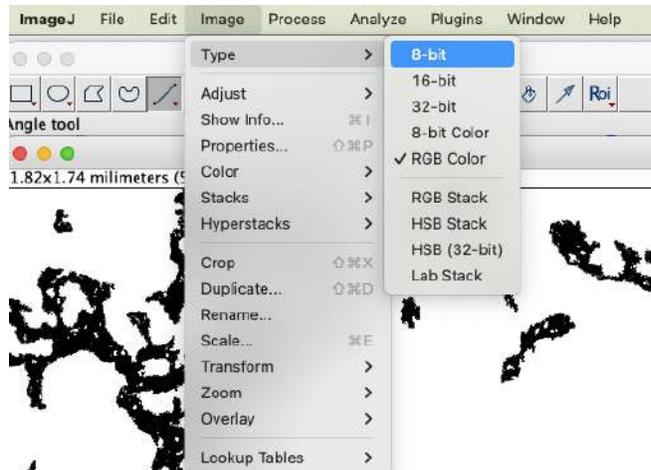
3. Herramienta *Straight*. Se dibuja una línea midiendo la longitud de la barra de escala. Seleccionar *Analyze > Set Scale*.



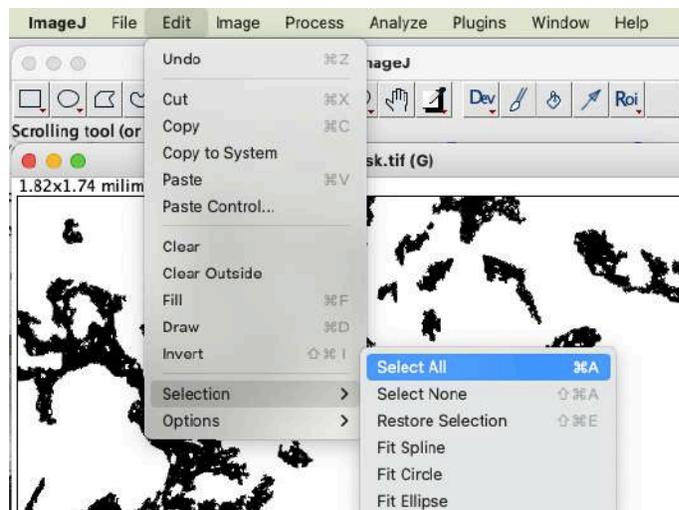
4. La longitud medida (302,1562) en la barra de escala es determinada como "Distance in pixels". La longitud de la barra de escala (1mm) es determinada como "Known distance". Finalmente se debe ingresar la unidad de medida en que el microscopio insertó la barra de escala (milímetros).

## Anexo X. Medición del nuevo hueso formado por unidad de área en Image J®

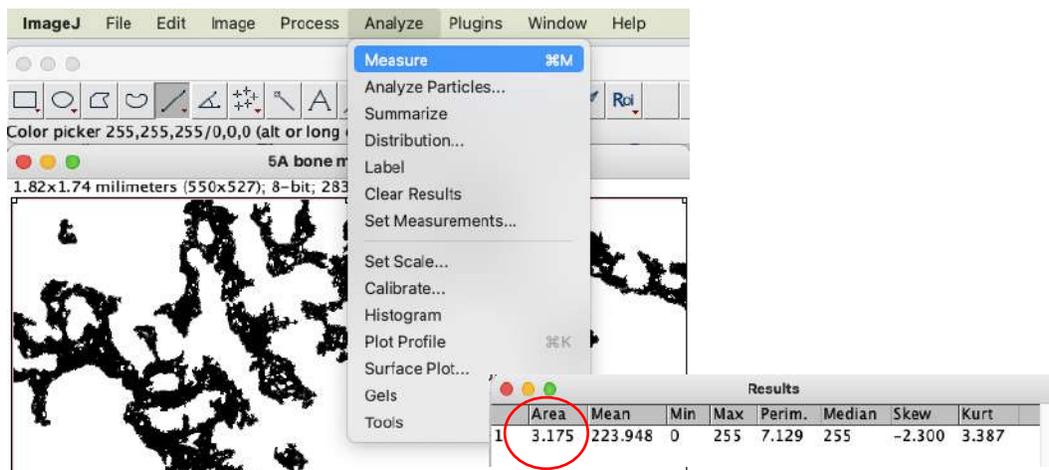
1. *Image > Type > 8-bit*. Se abre una máscara ósea con las calibraciones de la barra de escala hecho previamente. Las imágenes se transforman a 8 bit.



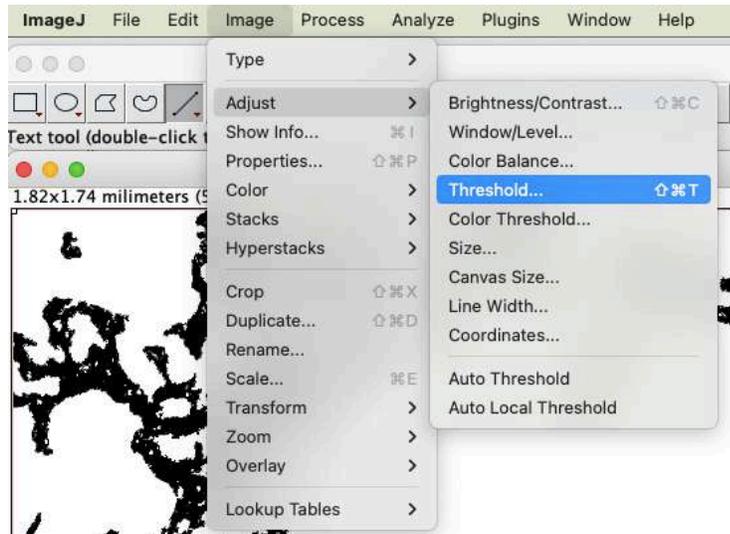
2. *Edit > Selection > Select All*. Se selecciona el área total.



3. *Analyze > Measure*. Se analiza la selección del área total para obtener el área en la imagen para obtener el área total en  $\text{mm}^2$ .



4. *Image > Adjust > Threshold*. Se establece el umbral de 128.



5. *Analyze > Analyze Particles*. Se analizan las áreas en mm<sup>2</sup> de nuevo hueso formado seleccionado por el umbral de 128.

