



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

**LA MICROESTRUCTURA ÓSEA Y EL EFECTO DE LA PARÁLISIS DEL  
MÚSCULO MASETERO DE RATÓN POR TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EN EL  
CÓNDILO MANDIBULAR SON SEXUALMENTE DIMÓRFICOS.**

**Nicolás Mejías Becerra**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD**

**TUTOR ASOCIADO**

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

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1201385**  
**Santiago - Chile**  
**2023**





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

**LA MICROESTRUCTURA ÓSEA Y EL EFECTO DE LA PARÁLISIS DEL  
MÚSCULO MASETERO DE RATÓN POR TOXINA BOTULÍNICA TIPO A EN EL  
CÓNDILO MANDIBULAR SON SEXUALMENTE DIMÓRFICOS.**

**Nicolás Mejías Becerra**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Sonja Buvinic Radic, PhD**

**TUTOR ASOCIADO**

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

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1201385**  
**Santiago - Chile**  
**2023**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecerle a la Dra. Sonja y al Dr. Julián, quienes me abrieron las puertas a su equipo y cuyo apoyo, paciencia y disposición hicieron que este trabajo fuera una experiencia provechosa, elevando mi entendimiento y criterio ante la ciencia.

Le agradezco a mi familia, quienes han estado conmigo incondicionalmente durante todo mi proceso universitario. A mi madre, que desde pequeño me hizo creer que era capaz de lograrlo todo si me lo proponía. A mi hermano, con quien una corta conversación lograba levantar el peso en mis hombros. A mi abuela, quien me hace sentir el calor de mi hogar incluso a la distancia.

Por último, pero no menos importante, a todos los amigos que hice durante este capítulo de mi vida. Aquellos que vivieron conmigo las dificultades y sacrificios de esta carrera, aquellos que conocí en nuevos y desafiantes ambientes, aquellos que traigo conmigo desde años previos a este proceso. Amigos quienes saben que una buena compañía y una tarde libre son todo lo que se necesita a veces para darle leña al fuego que llevamos dentro. Amigos que me motivan a ser la mejor versión de mí mismo.

A todos ustedes, muchas gracias.

## ÍNDICE.

AGRADECIMIENTOS .....	
1. RESUMEN .....	
2. MARCO TEÓRICO:.....	1
2.1. Sistema musculoesquelético .....	1
2.1.1. Tejido muscular esquelético .....	1
2.1.2. Tejido óseo.....	2
2.1.2.1. Células óseas .....	2
2.1.2.2. Desarrollo, modelación y remodelación ósea .....	4
2.1.2.3. Biomecánica y calidad ósea .....	6
2.2. Dimorfismo sexual óseo del sistema musculoesquelético .....	8
2.3. Comunicación músculo-hueso .....	9
2.3.1. Atrofia muscular y afectación ósea.....	10
2.4. Trastornos temporomandibulares .....	11
2.4.1. Toxina Botulínica.....	12
2.4.2. Tratamiento con BoNTA en músculo masetero y su efecto en el cóndilo mandibular.....	14
3. HIPÓTESIS .....	15
4. OBJETIVO GENERAL.....	16
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16

6. METODOLOGÍA.....	16
6.1. Tipo de estudio .....	16
6.2. Diseño experimental y tamaño muestral.....	16
6.3. Intervención con BoNTA en músculo masetero.....	18
6.4. Escaneo de muestras por microtomografía computarizada.....	19
6.5. Análisis de microestructura ósea .....	19
6.6. Presentación de datos y análisis estadístico .....	20
7. RESULTADOS .....	22
7.1. Comparación de parámetros físicos generales y de sistema musculoesquelético masticatorio en ratones machos y hembras sin intervención. ....	22
7.2. Efecto de la inyección de BoNTA en la masa corporal y masa de músculo masetero de ratones machos y hembras. ....	24
7.3. Efecto de la parálisis muscular inducida por BoNTA en la microestructura del cóndilo mandibular de ratones machos y hembras.....	25
8. DISCUSIÓN .....	31
8.1. Caracterización por sexo de masa corporal, maseterina y parámetros de microestructura ósea condilar en ratones BALB/c sin intervenir. ....	31
8.2. Diferencias en microestructura ósea entre ratones BALB/c machos y hembras posterior al tratamiento unilateral con BoNTA en músculo masetero. .	35
8.3. Dimorfismo sexual de microestructura y remodelación ósea en modelos experimentales.....	37

8.4. Análisis de muestras mediante microtomografía computarizada.....	38
8.5. Limitaciones del modelo actual.....	40
9. CONCLUSIONES.....	40
10. REFERENCIAS.....	41

## 1. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** El sistema musculoesquelético presenta una alta coordinación entre sus tejidos componentes, por lo que la alteración de una de sus partes puede desencadenar efectos en todo este sistema. La parálisis muscular generada por el uso de Toxina Botulínica tipo A (BoNTA) es un ejemplo, cuyo resultado es la disminución de la calidad ósea asociada. Este sistema es también sexualmente dimórfico, es decir, presenta distintas características dependientes de las hormonas sexuales predominantes del sujeto, tales como microestructura y procesos de modelado y remodelado óseo. Existen distintos tratamientos que utilizan BoNTA en el territorio maxilofacial, uno de estos para el bruxismo, donde la toxina es inyectada en el músculo masetero para disminuir su función y nocicepción, cuyos usuarios son mayormente mujeres. Previamente se ha descrito que la atrofia maseterina mediada por el uso de BoNTA en el músculo masetero genera deterioro en el cóndilo mandibular, sin embargo, no existe un estudio que determine si este efecto es diferente dependiendo del sexo del sujeto.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Se obtuvieron imágenes de microtomografía computarizada (microCT) de mandíbulas de ratones machos y hembras tratados unilateralmente con BoNTA a los 2, 7 y 14 días post tratamiento (n= 57) y de ratones no intervenidos (n=12). Estas fueron analizadas a través del software DRAGONFLY, obteniendo valores de volumen óseo (BV), volumen de tejido (TV), fracción de volumen óseo (BV/TV), separación trabecular (Tb.Sp.) y grosor trabecular (Tb.Th.), con los que se realizó una caracterización de valores de microestructura ósea y posteriormente fueron comparados entre sexos.

**RESULTADOS:** La caracterización de microestructura ósea evidenció que ratones hembras poseen cóndilos mandibulares un 20% más grandes relativos a su tamaño corporal y con un 40% menos de separación trabecular ( $p < 0.005$ ). A nivel de magnitud de la respuesta al tratamiento, no se encontraron diferencias significativas entre ratones machos y hembras, sin embargo, las hembras presentaron diferencias significativas a los 2 días en fracción de volumen óseo y grosor trabecular entre su

lado tratado y no tratado, mientras que los machos lo hicieron en separación trabecular.

**CONCLUSIONES:** El uso de BoNTA en la parálisis del músculo masetero genera un deterioro del cóndilo mandibular evidenciable. La velocidad de este efecto en distintos parámetros de microestructura ósea es diferente en ratones machos y hembras, sin embargo, el nivel de respuesta es el mismo. Las características óseas de los cóndilos mandibulares son dimórficas, lo que nos lleva a pensar que el nivel de respuesta al tratamiento es mediado por la microestructura ósea inicial más que por el sexo del sujeto.

## **2. MARCO TEÓRICO:**

### **2.1. Sistema musculoesquelético**

El sistema musculoesquelético es un grupo de unidades coordinadas de manera anatómica y fisiológica, cuyos componentes son las articulaciones, cartílagos, ligamentos, músculos y huesos (Felsenthal y Zelzer, 2017).

#### **2.1.1. Tejido muscular esquelético**

Los músculos esqueléticos tienen como función principal la contracción, para permitir el movimiento y mantener la postura de los organismos. Además, participan en la regulación de la temperatura corporal, el almacenamiento de nutrientes y la regulación metabólica. El tejido muscular estriado esquelético es un tejido dinámico, que puede remodelarse en respuesta a diferentes estados metabólicos, condiciones fisiológicas como el ejercicio o diversas patologías (Frontera y Ochala, 2015). La unidad celular básica del músculo esquelético son las fibras musculares, células multinucleadas, terminalmente diferenciadas, que se pueden clasificar dependiendo de la expresión de isoformas de la cadena pesada de miosina (MyHC) en fibras tipo I (lentas) y tipo II (rápidas) (Schiaffino y Reggiani, 2011). Los distintos tipos de fibras varían en velocidad y fuerza de contracción (tipo II > tipo I), resistencia a la fatiga (tipo I > tipo II), número de mitocondrias (tipo I > tipo II), tipo de metabolismo (tipo I oxidativo/tipo II oxidativo/glucolítico) y diámetro de las fibras (tipo II > tipo I) (Pette y Staron, 2000).

La composición de un músculo es heterogénea respecto a sus tipos de fibras, lo que permite que el músculo pueda ser utilizado para distintas tareas. Dicha composición puede ser modificada frente a demandas funcionales o metabólicas, siendo ésta la base de su plasticidad (Schiaffino y Reggiani, 2011).

### **2.1.2. Tejido óseo**

El tejido óseo es un tipo de tejido conectivo especializado, mineralizado, vital y dinámico. Sus principales funciones son la integridad mecánica, protección, locomoción, homeostasis mineral y hematopoyesis. Está formado por una fracción inorgánica, compuesta principalmente por cristales complejos de fosfato de calcio (hidroxiapatita), y una porción orgánica de proteínas (principalmente colágeno tipo I) y células (Morgan y Gerstenfeld, 2021).

Existen dos tipos de hueso en el esqueleto maduro: cortical y trabecular. Éstos, a pesar de ser macro y microscópicamente diferentes, son idénticos en su composición química. El hueso cortical compone el 80% del esqueleto, es compacto y denso, posee alta resistencia a las fuerzas y baja remodelación. Se encuentra principalmente rodeando al hueso trabecular, está altamente calcificado y su función es entregar fuerza mecánica y protección. Puede también participar en funciones metabólicas, principalmente en respuesta a deficiencias minerales prolongadas. El hueso trabecular representa un 20-25% del peso esquelético y está principalmente localizado al interior de los huesos largos, planos, vértebras y pelvis. Este tipo de hueso es menos denso, más elástico y tiene una tasa de remodelación más alta, junto con una mayor función metabólica. Su principal función es brindar resistencia a la deformación y cargas mecánicas y es el primero en responder ante las deficiencias minerales agudas (Buck y Dumanian, 2012).

#### **2.1.2.1. Células óseas**

En el tejido óseo existen 5 tipos de células, cuya función es crucial para la formación, reparación y remodelación ósea:

- Osteoblastos: derivados de las células madre mesenquimales, producen la matriz ósea formada por colágeno tipo I y múltiples proteínas no colágenas. Esta matriz, llamada osteoide, es una guía para la mineralización y

formación del hueso maduro. También ayudan en el proceso de resorción ósea, a través de la secreción de factores de diferenciación para formar osteoclastos y producir proteasas que degradan el osteoide, preparándolo para su remodelación. Tienen una vida media de 3 meses (Bellido y cols., 2019).

- Células de revestimiento óseo: los osteoblastos que terminan con su función de síntesis de matriz pueden transformarse en células de revestimiento óseo. De morfología plana y poca actividad biosintética, se encuentran en las superficies del tejido óseo. Su función no está del todo clara, pero tienen capacidad de volver a ser osteoblastos y se ha propuesto que participan en el intercambio de minerales y en la formación de compartimientos para la remodelación ósea (Bellido y cols., 2019).

- Osteocitos: de la línea mesenquimal, son células diferenciadas a partir de osteoblastos que escapan de la apoptosis, quedando encapsuladas en la matriz ósea. Su principal función es la mecanorecepción y la homeostasis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Tienen largas prolongaciones que le permiten comunicarse con células vecinas a través de señales mecánicas y químicas. Son más longevas (vida media de 25 años) y componen el 95% de las células óseas (Marotti. G. y cols., 1993; Bellido y cols., 2019).

- Osteoclastos: provenientes de la línea de células madre hematopoyéticas, son los encargados de la resorción ósea. Son células multinucleadas que secretan múltiples enzimas capaces de disolver la hidroxiapatita y las proteínas de la matriz ósea. Este proceso se logra en una zona sellada, llamada laguna de Howship, lo que permite la disolución del hueso de manera controlada y definida. Su vida media es de aproximadamente dos semanas, y está definida por factores asociados con la inflamación, los que regulan su formación, actividad y apoptosis (Bellido y cols., 2019; Morgan y Gerstenfeld, 2021).

- Osteomacrofagos: encontradas subsuperficialmente al endostio y periostio, cumplen con un rol regulador ante osteoblastos y osteoclastos. Son cruciales para la maduración final de las células osteoblásticas y sensibles a niveles elevados de calcio extracelular, produciendo factores osteoinductivos. Por otro lado, son sensibles a estímulos proinflamatorios (Lipopolisacáridos/LPS bacteriano) ante los cuales promueven la diferenciación osteoclástica. Se les considera células centinelas debido a su gran capacidad para detectar estímulos locales y regular la función osteoblástica necesaria (Chang y cols., 2008).

#### **2.1.2.2. Desarrollo, modelación y remodelación ósea**

El desarrollo óseo comienza durante el primer trimestre de gestación y continúa de manera postnatal. Es mediado por factores genéticos y se logra a través de dos procesos, diferenciados por el ambiente donde ocurren y las células que producen la matriz a mineralizar:

- Osificación Intramembranosa/ Mesenquimal: proceso esencial durante el desarrollo fetal de los huesos planos del cráneo, mandíbula, maxilar y clavículas, así como en la recuperación de fracturas compuestas. El proceso comienza con una concentración de células mesenquimales que inician su diferenciación en puntos llamados centros de osificación. Éstas se transforman en osteoblastos, los cuales producen la matriz que será mineralizada y vascularizada, quedando atrapados y terminando como osteocitos. Este proceso avanza formando las trabéculas, mientras que los espacios vasculares se reducen. El mesénquima que rodea al hueso en formación se condensa y se forma como periostio fibrovascular en sus bordes y superficies externas e internas, donde la formación del hueso continúa hacia la superficie de las trabéculas. Este crecimiento genera una interconexión inicial llamada tejido óseo, el cual al alcanzar mayor organización pasa a llamarse tejido laminar. El engrosamiento del hueso ocurre por función de las células madre derivadas del periostio más profundo (Kini y Nandeesh, 2012).

- Osificación Intracartilaginosa/ Endocondral: este proceso ocurre para el resto de los huesos del cuerpo (largos, cortos e irregulares), siendo esencial en el crecimiento postnatal de éstos y en la reparación de fracturas. El primer proceso comienza durante el desarrollo fetal, en los centros de osificación primaria encontrados en la zona media (diáfisis) del cartílago que se volverá hueso, con la migración hacia los extremos de células osteoprogenitoras y hematopoyéticas. Una osificación secundaria ocurre después del nacimiento, formando las epífisis de los huesos en sus extremos. Ambas epífisis son separadas de la diáfisis por una zona de cartílago en crecimiento, que será totalmente reemplazada por hueso. Este hueso adquiere grosor por función de los osteoblastos bajo el periostio y se degrada internamente por actividad de los osteoclastos dando espacio a la medula, de manera constante hasta la madurez. El crecimiento del hueso termina con la fusión entre epífisis y diáfisis (Kini y Nandeesh, 2012).

Una vez formado el hueso, éste puede ser modificado a través de dos procesos:

- Modelado óseo: definido como la modificación de hueso no laminillar a laminillar a través de formación ósea mediada por osteoblastos o resorción mediada por osteoclastos. Su función primaria es el aumento de masa ósea y la mantención y alteración de la forma de los huesos. Si bien la formación y resorción son localmente independientes, no lo son globalmente, ya que ambos procesos ocurren de manera simultánea en el esqueleto y se deben coordinar para modificar la forma del hueso. La modelación ocurre en hueso preexistente, por lo que se diferencia de la formación ósea y está sujeta a estresores locales que señalan la necesidad de formación o resorción. La formación del hueso secundario tiene como resultado osteonas secundarias, también llamadas “sistemas haversianos”. Éstos son de mayor tamaño, ordenados en láminas óseas de manera longitudinal y cilíndrica, concéntricas a un canal haversiano por el que pasa una terminación neurovascular. Este proceso es más prominente durante la infancia, asociado al

crecimiento longitudinal de los huesos y, a excepción de ciertas patologías, disminuye en la adultez (Allen y Burr, 2019).

- Remodelado óseo: a diferencia del modelado, este proceso es un equilibrio generado por la resorción y formación de hueso laminillar mediada por células. Es un proceso continuo durante la vida, en el cual se resorbe hueso laminillar antiguo y se sintetiza una nueva matriz ósea laminillar. Esta matriz será mineralizada para formar el hueso nuevo, eliminando así el daño acumulado. Ocurre de manera periosteal, endocortical, trabecular e intracortical y se provoca de manera estocástica o dirigida por señales como la acumulación de micro daños en el hueso. Otras señales físicas, como la atrofia muscular, son captadas por los mecanorreceptores en los osteocitos generando un remodelado que tiende a la reducción de la formación ósea (osteopenia) (Allen y Burr, 2019).

### **2.1.2.3. Biomecánica y calidad ósea**

Si bien el hueso es una estructura sólida, su capacidad de elasticidad y adaptación son clave ante las necesidades a las que es sometido constantemente. Sus propiedades biomecánicas dependen no sólo de la cantidad de mineral en su matriz, sino que también de la calidad de su formación, con lo que nos referimos a los niveles de estructuras que lo componen (Caeiro y cols., 2013). Estas estructuras pueden dividirse en múltiples categorías (Figura 1), pero para este estudio nos concentramos en dos:

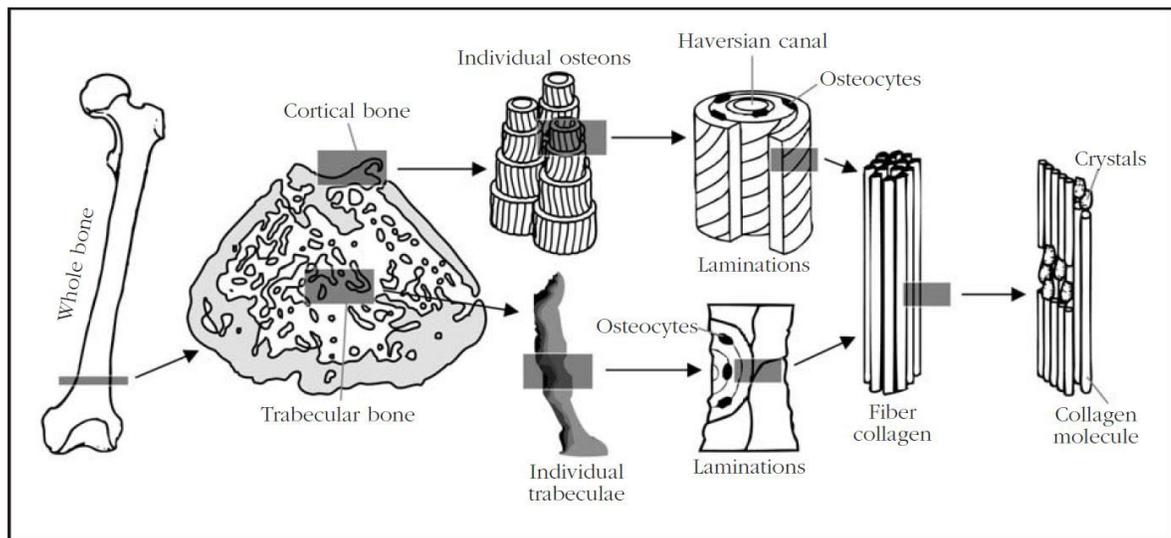
Microestructura: corresponde a la arquitectura espacial de los componentes que forman el hueso. Esto establece la estructura de hueso cortical y trabecular, que poseen diferencias a nivel de respuesta ante las fuerzas a las que son sometidos.

- Hueso cortical: más compacto y aplanado, compuesto por sistemas haversianos distribuidos de manera cúbica o cilíndrica. Debido a esta organización

son más resistentes ante las fuerzas de tracción longitudinales y a las compresivas y menos ante la torsión y las fuerzas perpendiculares. Su resistencia ante fractura está asociada principalmente a su grosor y al nivel de masa ósea de la zona estudiada (Caeiro y cols., 2013).

- **Hueso trabecular:** grandes trabéculas presentan una organización de sistemas haversianos entrecruzados y tiene mayor resistencia ante la compresión que cualquier otra fuerza. Múltiples factores alteran su resistencia ante la fractura: densidad mineral ósea (BMD), grosor trabecular (Tb.Th.), separación trabecular (Tb.Sp.), número de trabéculas (Tb.N.) y relación (BV/TV) entre el volumen óseo (BV) y el volumen de tejido (TV) (Caeiro y cols., 2013).

**Macroestructura:** está dada por las características macroscópicas del hueso, que consideran forma, tamaño y geometría. Su comportamiento depende de su forma y la distribución de los tejidos óseos que lo componen (Caeiro y cols., 2013).



**Figura 1. Esquema de niveles de organización estructural del tejido óseo.** Desde macroestructura (izquierda) hasta composición del hueso (Derecha). Imagen obtenida de Caeiro y cols., 2013.

El concepto de “calidad ósea” es complejo, pues contempla múltiples factores predictivos ante el riesgo de fractura y cómo éstos, al ser modificados, alteran esta predicción. Entre las posibles variables que se deben tener en consideración para determinar la resistencia de un hueso ante las fuerzas que es sometido, están la macroestructura, microestructura, nanoestructura (nivel molecular), función celular y acúmulo de daños (Fonseca y cols., 2014).

## **2.2. Dimorfismo sexual óseo del sistema musculoesquelético**

Estrógenos y andrógenos son hormonas sexuales, derivadas del colesterol y sintetizadas principalmente por las gónadas y glándulas adrenales. Éstas se expresan en ambos sexos, con mayor producción de estrógenos en mujeres y andrógenos en hombres. Son localmente activadas y/o catabolizadas por tejidos blanco, como el hueso, a través de la unión con receptores específicos que se asocian a secuencias de ADN llamadas elementos de respuesta a hormonas. Los receptores de estrógenos (ER  $\alpha$  y  $\beta$ ) y andrógenos (AR) han sido detectados en distintos tipos celulares en el proceso de diferenciación mesenquimal y en los precursores de osteoblastos y osteoclastos, entre otros (Vanderschueren y cols., 2004).

En humanos y ratones, los estrógenos suprimen la resorción ósea trabecular y cortical al disminuir el número de osteoclastos. El efecto antirresortivo de estas hormonas es mediado por los receptores de estrógenos con acciones en el linaje osteoclástico, principalmente por la promoción de apoptosis de osteoclastos por la producción de fasL (regulador pro apoptótico) (Nakamura y cols., 2007). Los andrógenos tienen un efecto antiresortivo indirecto en el hueso, primero por su mayor efecto en el aumento de masa, tamaño, fuerza y mantención muscular en comparación con los estrógenos, cuya disminución se asocia mayormente con aumentos de grasa corporal (Seftel, 2014). La carga ejercida en los huesos por el músculo es un factor importante en la mantención ósea, por lo que la pérdida o

aumento de masa muscular tiene un efecto directo en éstos (Frost, 2003). Por otro lado, la testosterona puede pasar por un proceso llamado aromatización, en el que se transforma en un símil del estrógeno, uniéndose a los ER de la misma manera (Vanderschueren y cols., 2004).

Los mecanismos con los que las hormonas sexuales afectan al hueso son complejos y no están del todo claros actualmente. Su función en distintos tejidos, como el muscular, puede generar efectos indirectos en el hueso, haciendo difícil establecer una clara relación de estas hormonas con los procesos de remodelación a los que se enfrenta constantemente el hueso. A diferencia de los hombres, las mujeres de mediana edad pasan por el proceso de menopausia en que ocurre una reducción en la producción de hormonas sexuales. Es por esto que se vuelven más susceptibles a los procesos resorptivos del hueso y enfermedades como la osteoporosis (Lupsa y Insogna, 2015).

### **2.3. Comunicación músculo-hueso**

Existe una importante asociación entre la masa ósea y muscular que ha sido atribuida a sus funciones en conjunto, tanto durante el ciclo de la vida (desarrollo, crecimiento, consolidación, envejecimiento) como frente a entrenamientos o patologías. Se ha evidenciado que la disminución de estos tejidos ya sea por origen patológico o metabólico, ocurre en conjunto (Hirschfeld y cols., 2017). La estimulación mecánica de los tejidos óseos da como resultado una micro deformación de las células y matriz extracelular, siendo éste un factor para el desarrollo y la determinación de la forma ósea en adultos. Estimulaciones mecánicas que generan alta tensión, o tensiones de baja magnitud, pero de alta frecuencia, incrementan la masa ósea. En cambio, la baja o nula tensión promueve resorción ósea (Hsieh y Turner, 2001; Frost, 2003).

Si bien la comunicación entre músculo y hueso ha sido considerada como un proceso principalmente biomecánico, se ha demostrado en la última década que

existe un componente bioquímico en esta interacción, dado que tanto músculo como hueso también se consideran tejidos secretores capaces de liberar moléculas solubles para regularse entre sí. Estas moléculas conocidas como **mioquinas** (Irisina, IL6, IGF-1, miostatina, etc.) y **osteoquinas** (osteocalcina y esclerostina) tienen capacidades metabólicas autocrinas, paracrinas y endocrinas, afectando distintos tejidos y su liberación está altamente asociada con la actividad física y la ingesta calórica. (Brotto y Johnson, 2014; Kirk y cols., 2020; Severinsen y Pedersen, 2020).

### **2.3.1. Atrofia muscular y afectación ósea**

Las fuerzas mecánicas son esenciales para mantener la integridad de los huesos. Los osteocitos son células sensibles al estrés biomecánico, generando la diferenciación y actividad de los osteoblastos, los cuales generan aposición ósea. Existe también una relación entre sarcopenia (pérdida general y progresiva de masa y fuerza muscular) y osteoporosis (enfermedad caracterizada por disminución de masa ósea y reducción de la calidad microestructural de los huesos) (Hirschfeld y cols., 2017)

La atrofia muscular se define como el debilitamiento, disminución y/o pérdida del músculo y su función en relación con el desuso de éste o enfermedades relacionadas (Yin y cols., 2021). El reposo prolongado y el efecto de la microgravedad en astronautas se han utilizado para el estudio de la disminución de carga muscular en humanos. El desuso muscular prolongado produce atrofia muscular, la cual precede a una disminución entre el 0.5 y 1% mensuales de la masa ósea (Lang y cols., 2004) En personas que han sufrido parálisis muscular por daños en la médula espinal, se ha encontrado una reducción de masa ósea de un 1% semanal, pérdida entre 5 a 20 veces mayor que en modelos de microgravedad (Qin y cols., 2010)

Se han generado distintos biomodelos de estudio para detallar el efecto de la atrofia muscular en la comunicación músculo-hueso. En modelos animales se ha utilizado la descarga de extremidades posteriores (“hindlimb unloading”, HLU) y la inyección de toxina botulínica (BoNT). En el primero se utiliza un dispositivo para inmovilizar la pata trasera de un ratón, eliminando la movilidad y los efectos externos, pero conservando la contracción muscular, mientras que en el segundo se paraliza la fibra muscular, generando su atrofia. Se descubrió que el uso de ambos modelos en conjunto generaba aún mayores efectos en la pérdida ósea que de manera separada, concluyendo que el uso de BoNT tiene efectos por sobre el desuso muscular (Warden y cols., 2013).

Distintos estudios han demostrado que, dependiendo del sexo del sujeto, el efecto de la atrofia muscular y posterior pérdida de masa ósea son distintos. En resumen, se ha encontrado que los efectos de desuso en la atrofia muscular en extremidades inferiores son mayores en mujeres humanas (Trappe y cols., 2023), mientras que la atrofia generada por procesos inflamatorios, como la caquexia inducida por cáncer, es mayor en hombres (Rosa-Caldwell y Greene, 2019; Morena da Silva y cols., 2023).

#### **2.4. Trastornos temporomandibulares**

El sistema masticatorio es una unidad funcional compuesta por el hueso mandibular y maxilar, dientes, músculos, nervios y vasos sanguíneos. Las afecciones en este sistema pueden provenir desde distintas estructuras y terminar afectando a otros componentes de manera estructural o funcional. También se sabe que éste tiene la capacidad de adaptarse de manera temporal o permanente, lo que refleja su plasticidad como sistema biológico (Soboļeva y cols., 2005).

Los trastornos temporomandibulares (TTM) son un grupo de afecciones que causan dolor y disfunción en la articulación de la mandíbula y los músculos asociados. Son de etiología compleja, ya que, a pesar de tener bases físicas

reconocibles, muchos casos involucran factores biopsicosociales y síntomas psicológicos, como depresión y ansiedad, dificultando su diagnóstico y posterior tratamiento (Li y Leung, 2021).

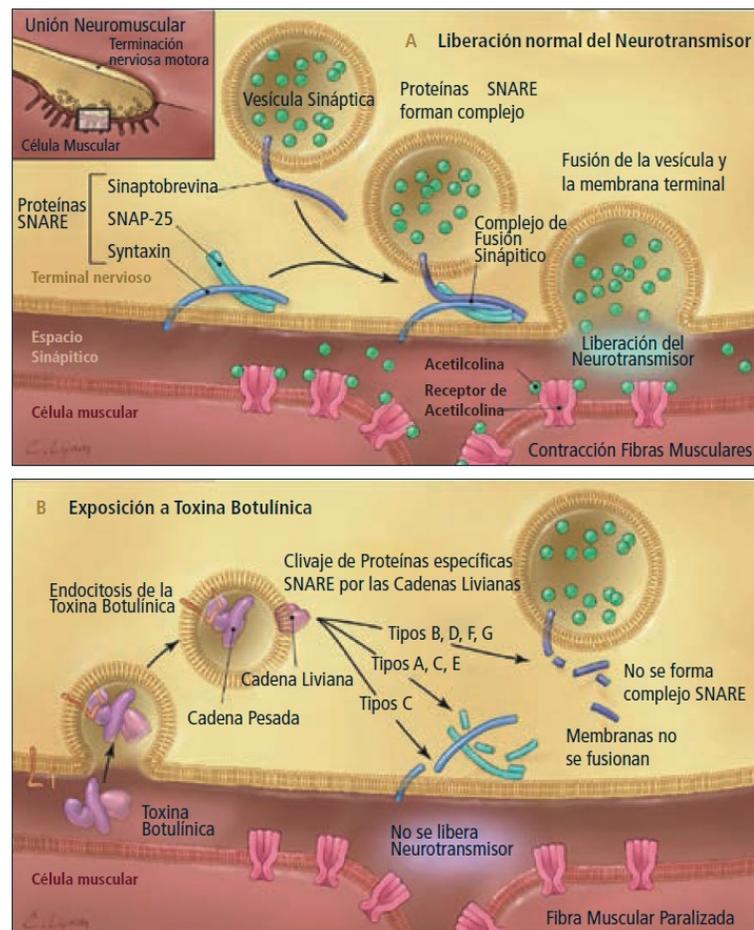
A través de múltiples estudios se ha encontrado que las mujeres en edad fértil no sólo son un 27.3% más afectadas por TTMs que los hombres (Slade y cols., 2013; K. Kim y cols., 2016), sino que expresan mayores niveles de dolor miofascial (Velly y cols., 2003), por lo que podemos afirmar que el sexo del sujeto es un factor altamente contribuyente a la prevalencia de esta patología.

Una de las principales metas para el tratamiento de los TTM es el manejo del dolor asociado y la recuperación de la función mandibular. Se han utilizado distintos métodos para lograr este efecto: dispositivos de oclusión, fisioterapia, analgésicos, relajantes musculares, intervenciones psicológicas, láser e inyecciones en puntos dolorosos (anestésicos o toxina botulínica) (Li y Leung, 2021) Si bien la inyección intramuscular de toxina botulínica en el músculo masetero es utilizada como tratamiento para los TTMs, sus efectos en la mejoría del dolor no son consistentes a través de los estudios (Datta Gupta y cols., 2022). No se ha encontrado un aumento de riesgo para daños causados por este tratamiento, sin embargo, los estudios no han sido diseñados para medir esto de manera rigurosa (La Fleur y Adams, 2020).

#### **2.4.1. Toxina Botulínica**

La toxina botulínica (BoNT) es una neurotoxina producida por bacterias anaeróbicas Gram positivas llamadas *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyrricum*, *Clostridium barati*, entre otras especies. Actúa a nivel de la unión neuromuscular, bloqueando el proceso de secreción de acetilcolina desde la neurona motora, mediado por proteínas SNAREs (SNAP Receptors). Al impedir la secreción del neurotransmisor, el estímulo de la neurona motora no se transmite a la fibra muscular, y se genera parálisis muscular flácida (Figura 2). Las distintas

cepas bacterianas secretan esta neurotoxina junto a otro tipo de proteínas con acción hemoaglutinadora, conocidas como proteínas asociadas a neurotoxina (NAPs), las cuales le otorgan protección contra el ambiente, como acidez y temperatura. Estas formas complejas de BoNT son usadas actualmente en aplicaciones terapéuticas (Choudhury y cols., 2021). Se han descrito 8 serotipos de toxina botulínica, de los cuales los tipos A (BoNTA) y B (BoNTB) son de uso clínico.



**Figura 2. Esquema del efecto de la toxina botulínica en la unión neuromuscular.** (A) Liberación normal del neurotransmisor en unión neuromuscular. (B) Mecanismo de acción de la toxina botulínica en la unión neuromuscular (Revista Médica clínica las Condes, 2014).

El efecto de éstos es temporal (2-6 meses), donde BoNTA tiene mayor duración de acción que el tipo B. Ambas son ampliamente utilizadas para fines estéticos y el tratamiento de desórdenes musculares, incluyendo distonías, espasmos, temblores y migrañas, sin embargo, su uso en el músculo masetero no está aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, EE. UU.). En Chile, estos usos están aprobados por el ISP, incluyendo su uso para el tratamiento del bruxismo (Folleto para información al profesional: OnabotulinumtoxinA, ISP).

Actualmente BoNTA es utilizado como tratamiento para el bruxismo. Ésta intervención consta de la inyección de toxina en los músculos maseteros para disminuir su función y nocicepción, sin embargo, se requieren estudios a mayor profundidad, debido a la complejidad de la enfermedad y los posibles efectos secundarios (Miller y Clarkson, 2016).

#### **2.4.2. Tratamiento con BoNTA en músculo masetero y su efecto en el cóndilo mandibular.**

El uso de BoNTA en el músculo masetero y el efecto que tiene este proceso en el hueso mandibular ha sido estudiado previamente a través de distintos modelos preclínicos y clínicos. Dentro de los principales resultados obtenidos se encuentran cambios a diferentes niveles: celular, microestructural y morfológico. A nivel molecular-celular se ha encontrado una disminución de la densidad mineral ósea y un aumento de marcador de resorción ósea RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear K B), principalmente localizadas en el cóndilo mandibular en ratones macho adultos (Balanta-Melo y cols., 2018). Desde el punto de vista de microestructura, se ha evidenciado una disminución del grosor trabecular y cortical. En cuanto a la morfología, en el mismo modelo animal, se halló reducción del grosor de la rama mandibular, cambios en las zonas de inserción muscular y un “alargamiento” anteroposterior con una disminución de grosor de los cóndilos (Balanta-Melo, Toro-Ibacache, y cols., 2019).

Los modelos de estudio existentes presentan diferencias en los protocolos de experimentación, tales como los sujetos a tratar (ratones, ratas y conejos), la zona a tratar (mayor cantidad de estudios realizados en extremidades posteriores), en el uso o no uso de inyección de control (Brent y cols., 2021), el tiempo post exposición a la inyección de BoNTA (Cid, 2021), entre otras variables, sin embargo, no existe actualmente un modelo que realice un estudio comparativo del dimorfismo sexual en el territorio maxilofacial, siendo un área investigativa de interés.

Considerando la información previamente expuesta, podemos señalar que:

- Existen dimorfismos sexuales altamente mediados por hormonas en distintos tejidos, tales como el muscular y óseo.
- Los tratamientos con BoNTA para el dolor miofascial son mayormente utilizados por mujeres.
- Se ha evidenciado que la parálisis muscular mediada por el uso de BoNTA en el músculo masetero genera daños en la microestructura ósea del cóndilo mandibular
- No existe un modelo de estudio actual que compare diferencias por sexo en el territorio maxilofacial al utilizar BoNTA.

Teniendo esto en cuenta, nos preguntamos: ¿Existe alguna diferencia entre sexos en la disminución de los valores de microestructura ósea condilar generada por la parálisis muscular del músculo masetero al utilizar BoNTA?

### **3. HIPÓTESIS**

Existe dimorfismo sexual en la microestructura del cóndilo mandibular de ratones adultos. Paralelamente, la parálisis del músculo masetero inducida por inyección de BoNTA altera en mayor grado la microestructura del cóndilo mandibular en hembras que en machos.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar y comparar la microestructura normal del cóndilo mandibular de ratones adultos de ambos sexos, y su afectación frente a la parálisis del músculo masetero inducida por inyección de BoNTA.

#### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar y comparar la microestructura ósea del cóndilo mandibular en ratones machos y hembras adultos a través de análisis tridimensional.

2. Comparar el efecto de la parálisis muscular inducida por BoNTA en el músculo masetero en la microestructura del cóndilo mandibular de ratones machos y hembras adultos.

#### **6. METODOLOGÍA**

##### **6.1. Tipo de estudio**

Estudio de análisis comparativo de datos digitales, provenientes de un estudio experimental en modelo animal.

##### **6.2. Diseño experimental y tamaño muestral**

Para caracterizar la microestructura ósea de los cóndilos mandibulares de ratones macho y hembra, y comparar su afectación luego de parálisis unilateral de músculo masetero, se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

- Ratones sin intervenir: 6 machos y 6 hembras
- Ratones con inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero: 29 machos y 28 hembras. De este grupo, se eutanasiaron animales a distintos días

post-intervención (2-7-14), para comparar entre machos y hembras no sólo la amplitud, sino que la temporalidad de los efectos. El número de animales utilizados y su distribución se resume en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Número de animales utilizados en cada grupo de estudio.**

	Grupo sin Intervención	Grupos intervenidos con BoNTA		
Tiempo post intervención	No aplica	2 días	7 días	14 días
Número de machos	6	10	11	8
Número de hembras	6	10	10	8

El tamaño muestral necesario para evaluar por microCT la diferencia en los parámetros de microestructura ósea entre los lados inyectados con BoNTA y solución salina es de  $n=8$ , en base a un estudio reportado y validado previamente por nuestro grupo (Balanta-Melo, Torres-Quintana, y cols., 2019). Como en este trabajo se utilizaron muestras derivadas del proyecto Fondecyt 1201385, algunos grupos intervenidos tienen un  $n>8$ , pues se utilizaron todas las muestras disponibles.

El manejo de animales se rigió por el protocolo de bioética aprobado por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de la Universidad de Chile #20381-ODO-UCH-e1.

Inmediatamente después de la eutanasia, se diseccionó la mandíbula, se almacenó en formalina 10%, y se envió para su escaneo por microCT a la Universidad de Humboldt (Berlín, Alemania), como se describirá en detalle en las secciones posteriores. Cabe mencionar que todo el trabajo con animales y toma de muestras forma parte del proyecto Fondecyt 1201385 (IR: Sonja Buvinic), y fue realizado por personal certificado (Sonja Buvinic, Noelia Blanco). El trabajo de esta tesis involucró exclusivamente el análisis de los datos computacionales obtenidos a partir de los escaneos en microCT de las muestras.

### 6.3. Intervención con BoNTA en músculo masetero

Ratones BALB/c adultos (8-9 semanas de edad; 18-28 g) fueron utilizados para este experimento. Éstos fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina 80 mg/kg y xilacina 8 mg/kg. Luego, los animales recibieron una única inyección de BoNTA (0,2U/10 µL; Onabotulinumtoxin A; BOTOX®, Allergan Chile, Santiago, Chile) en el músculo masetero derecho. La dosis se basa en un estudio anterior (Balanta-Melo y Buvinic, 2018) y fue escalada a la masa del músculo masetero del ratón según las dosis informadas para procedimientos clínicos en humanos (Van Eijden y cols., 1997; Miller y Clarkson, 2016). El músculo masetero izquierdo se inyectó con 10 µl de solución salina (0,9% p/v de NaCl) como control intra individuo. Los animales se alojaron en condiciones controladas ( $20 \pm 2$  °C, humedad relativa 42% -48% y 12 horas ciclo luz / oscuridad), con agua y comida ad libitum (LabDiet® JL Rata y ratón / Auto 6F 5K67; Lab Diet, St Louis, MO, EE. UU.). Se realizó a diario la evaluación general del bienestar animal, con registro de la masa corporal día por medio. Después de 2, 7 y 14 días, los animales fueron eutanasiados por sobredosis de anestésico intra peritoneal (i.p.). Posteriormente, las mandíbulas fueron diseccionadas y almacenadas en formalina al 10% (tamponado neutro, Sigma - Aldrich®, St Louis, MO, EE. UU.) y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la toma de imagen por microCT (Balanta-Melo, Toro-Ibacache, y cols., 2019). Seis ratones de cada sexo fueron el grupo control, recibiendo solo la anestesia i.p. y eutanasiados junto con el grupo de 7 días. Todas las mandíbulas fueron codificadas y anonimizadas para su posterior análisis en ciego.

Se registraron y tabularon las masas corporales de los animales al comienzo, en el transcurso y al final del protocolo. Luego de la eutanasia, se diseccionaron los músculos maseteros derecho e izquierdo y se determinó su masa, como un indicador de atrofia muscular en el caso de inyección de BoNTA.

El manejo de animales se rigió por el protocolo de bioética aprobado por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de la Universidad de Chile #20381-ODO-UCH-e1.

#### **6.4. Escaneo de muestras por microtomografía computarizada**

Las mandíbulas se escanearon en el equipo de microtomografía computarizada marca Yxlon modelo FF20 (Laboratorio Dr. John Nyakatura, Humboldt University, Berlín, Alemania; Operador: Dr. Léo Botton-Divet), con los siguientes parámetros: tamaño de voxel isotrópico 5.8  $\mu\text{m}$ , voltaje 45 kV, corriente 110  $\mu\text{A}$ , filtro de aluminio de 0,5 mm, tiempo de exposición 333 ms, 10 min de duración del escaneo por muestra en modo de rotación continua en 360°, generando 2000 imágenes por muestra.

#### **6.5. Análisis de microestructura ósea**

La reconstrucción 3D, segmentación y análisis de microestructura ósea se realizó con el programa DRAGONFLY (V.2022.2.0.1361, Object Research System, Canadá). Se trabajó en ciego, con las muestras codificadas, sin saber a qué condición correspondían. Las imágenes de microCT fueron recibidas en formato TIFF, que consta de múltiples imágenes 2D en secuencia que permiten una reconstrucción en 3 dimensiones. Cada muestra fue enviada con sus respectivos datos volumétricos, es decir, información interna que permite la reconstrucción a la escala de tamaño adecuada. El proceso de recorte y análisis fue el siguiente:

- Se cargaron los archivos TIFF en el programa DRAGONFLY, que reconstruye las muestras en tamaño real utilizando los datos incluidos en los archivos. Se comparó cada reconstrucción de muestra con los datos enviados de manera paralela para evitar fallas.
- El modelo en 3D fue contrastado y reposicionado para mejor visualización de los cóndilos mandibulares. Para el recorte de los cóndilos

mandibulares se utilizó como referencia un trabajo previo de nuestro grupo (Figura 3; Cid, 2021)

- Las referencias de recorte fueron utilizadas para cada cóndilo mandibular, siendo revisadas múltiples veces debido a la sensibilidad de los movimientos en 3 dimensiones. Una vez que se cumplieron los parámetros en todas las referencias al mismo tiempo, se procedió con el recorte.

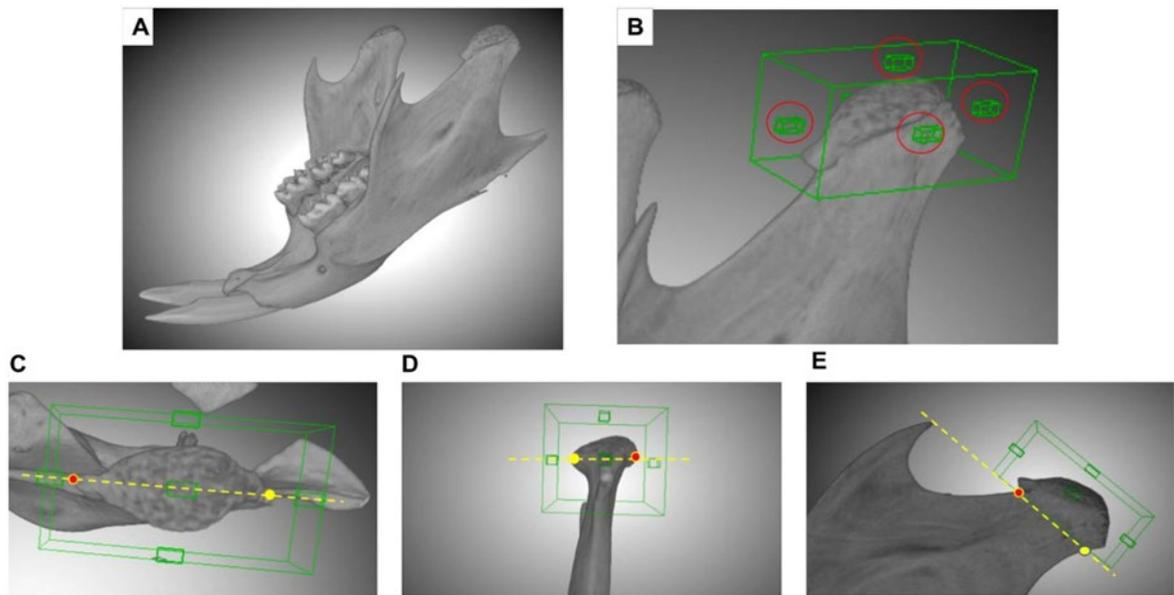
- Cada recorte de cóndilo fue analizado con la herramienta “Bone Analysis Wizard”, en donde se definieron las regiones de interés (ROI) manualmente. Una vez definidas, fueron utilizadas para realizar la medición de los parámetros óseos.

- Los resultados del análisis fueron exportados en formato CSV, el que es compatible con Excel. Estos fueron compilados y guardados con su identificación correspondiente para su posterior análisis estadístico.

Los parámetros de microestructura ósea evaluados en cada cóndilo mandibular fueron los siguientes: grosor trabecular (Tb.Th.; promedio del grosor de trabéculas; mm), separación trabecular (Tb.Sp.; distancia promedio entre trabéculas; mm), volumen de tejido (TV; volumen total de tejido del cóndilo mandibular segmentado, mm<sup>3</sup>), volumen óseo (BV; porción ósea del cóndilo mandibular segmentado, mm<sup>3</sup>), fracción de volumen óseo (BV/TV; relación entre el volumen de hueso segmentado y el volumen total de tejido de la región de interés; %) (Bouxsein y cols., 2010).

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

Los datos de microestructura ósea obtenidos fueron ordenados y asociados a las muestras correspondientes ya que el proceso de determinación de los parámetros de microestructura ósea fue realizado en ciego. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism 9.0d (La Jolla, CA, EE. UU.), donde  $p < 0,05$  definió una diferencia estadística.



**Figura 3. Reconstrucción mandibular en 3D y referencias para recorte condilar utilizando software DRAGONFLY V.2022.2.0.1361.** (A) Mandíbula reconstruida en 3D. (B) Reconstrucción en 3D centrada en cóndilo mandibular izquierdo. En verde se visualiza herramienta de recorte en forma de hexágono, donde los círculos rojos marcan las pestañas que permiten modificación de tamaño y posición de la forma. (C) Visualización superior de cóndilo mandibular izquierdo, donde el hexágono de recorte se posiciona transversal la línea imaginaria (línea punteada amarilla) que cruza desde el punto más anterior (punto rojo) hasta el más posterior (punto amarillo) del cóndilo. (D) Visualización posterior de cóndilo mandibular izquierdo, donde el hexágono de recorte se posiciona transversal a la línea imaginaria formada entre el extremo más interno (punto rojo) y externo (punto amarillo) del cóndilo. (E) Visualización lateral externa del cóndilo mandibular izquierdo, donde el piso del hexágono de recorte se posiciona paralelo a la línea imaginaria formada entre el punto más anteroinferior (punto rojo) y posteroinferior (punto amarillo) del cuello condilar. (Imagen obtenida desde Cid, 2021)

La comparación de la masa corporal, la masa de los músculos maseteros entre machos y hembras no intervenidos se realizó mediante ANOVA de una vía.

En las mediciones de microestructura ósea para los animales intervenidos, se identificaron tres sujetos por análisis de outliers (método de ROUT, Q=1%). Dado

que el tamaño muestral era suficiente, estos sujetos fueron eliminados de todos los parámetros.

Los resultados de microestructura ósea en animales intervenidos y no intervenidos fueron evaluados mediante la prueba Shapiro-Wilk, arrojando una distribución normal de los datos. Por lo tanto, se utilizó test de  $t$  pareado para comparar los dos lados de un mismo animal (derecho vs izquierdo) y test  $t$  no pareado para comparar el delta (diferencia lado izquierdo – lado derecho) en cada parámetro óseo entre machos y hembras.

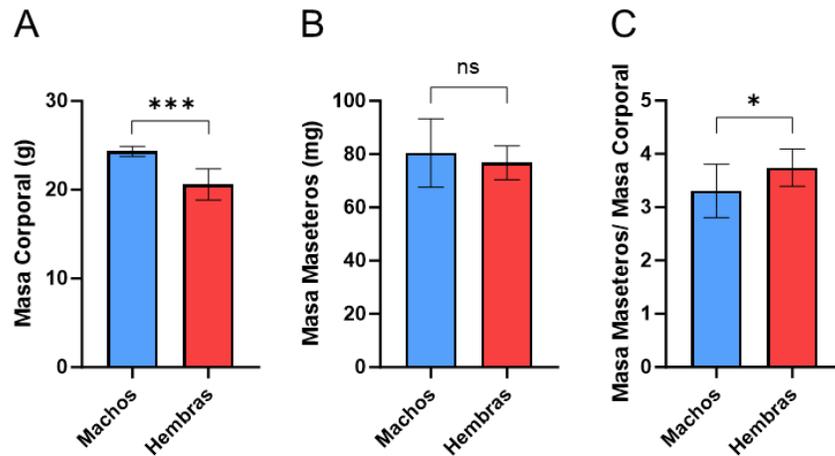
## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Comparación de parámetros físicos generales y de sistema musculoesquelético masticatorio en ratones machos y hembras sin intervención.**

Para caracterizar y comparar los parámetros físicos y de sistema musculoesquelético masticatorio en los ratones en condiciones normales, se evaluaron ratones hembras y machos sin intervención. Se evaluó la masa corporal como indicador de dimensión general de los animales. Paralelamente, se evaluó la masa normal de los músculos maseteros, que más adelante se utilizará como un indicador de efectividad del tratamiento con BoNTA. Finalmente, se compararon parámetros de microestructura ósea de los cóndilos mandibulares de machos y hembras.

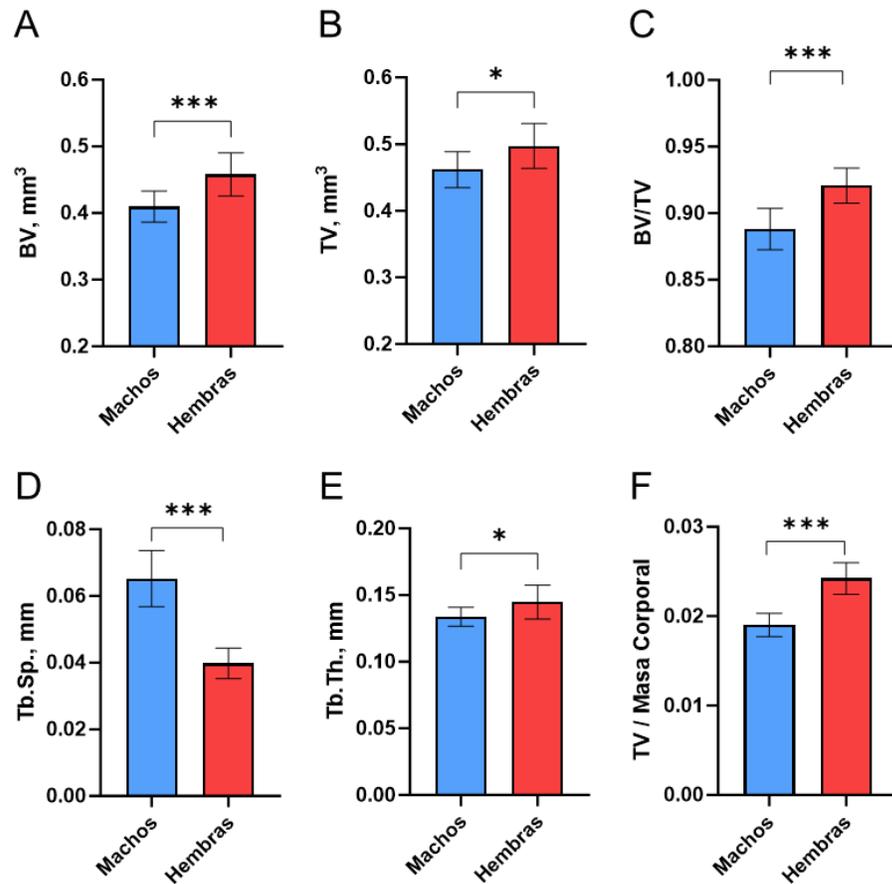
La masa corporal de los ratones macho fue un 15% mayor que la de las hembras de la misma edad (Figura 4A). Sin embargo, la masa de los músculos maseteros no tuvo diferencia significativa entre sexos (Figura 4B). Normalizando la masa de los músculos maseteros por la masa corporal, se observó que los músculos

maseteros de las hembras eran más grandes en relación con su tamaño que la de los machos (Figura 4C).



**Figura 4. Comparación de masa corporal y masa de músculos maseteros entre ratones machos y hembras no intervenidos.** Se compararon los parámetros físicos de ratones BALB/c machos y hembras de 9 semanas, sin intervención. (A) Masa corporal. (B) Masa de músculos maseteros. (C) Masa de músculos maseteros normalizada por masa corporal.  $n = 6$  animales por sexo. Datos expresados como promedio  $\pm$  DE. *Test T no pareado*, ns: no significativo, \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,005$ .

Al analizar la microestructura ósea del cóndilo mandibular se encontraron diferencias significativas entre ratones machos y hembras en todos los parámetros, con un evidente aumento óseo en las hembras (Figura 5). Al comparar los parámetros óseos las hembras presentaron un incremento de 9% en el volumen óseo (Figura 5A), 8% en el volumen tejido (Figura 5B), 3% en la fracción de volumen óseo (Figura 5C) y 8% en el grosor trabecular (Figura 5D) respecto de los machos. El parámetro de microestructura ósea con mayor variación fue la separación trabecular, que fue 40% menor en hembras que en machos (Figura 5E). Al normalizar el volumen óseo total de los cóndilos por la masa corporal, se observó que las hembras tenían un volumen relativo un 20% mayor que los machos (Figura 5F).



**Figura 5. Comparación de parámetros de microestructura ósea entre ratones macho y hembra no intervenidos.** (A) Volumen óseo (mm<sup>3</sup>). (B) Volumen de tejido (mm<sup>3</sup>). (C) Fracción de volumen óseo. (D) Separación trabecular (mm). (E) Grosor trabecular (mm). n = 6 animales por sexo. Datos expresados como promedio ± DE. *Test de T no pareado*, ns: no significativo, \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

## 7.2. Efecto de la inyección de BoNTA en la masa corporal y masa de músculo masetero de ratones machos y hembras.

Para evaluar si la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero afectaba la ingesta de alimentos, se utilizó como indicador el registro de masa corporal previo a la inyección (“inicial”) e inmediatamente posterior a la eutanasia

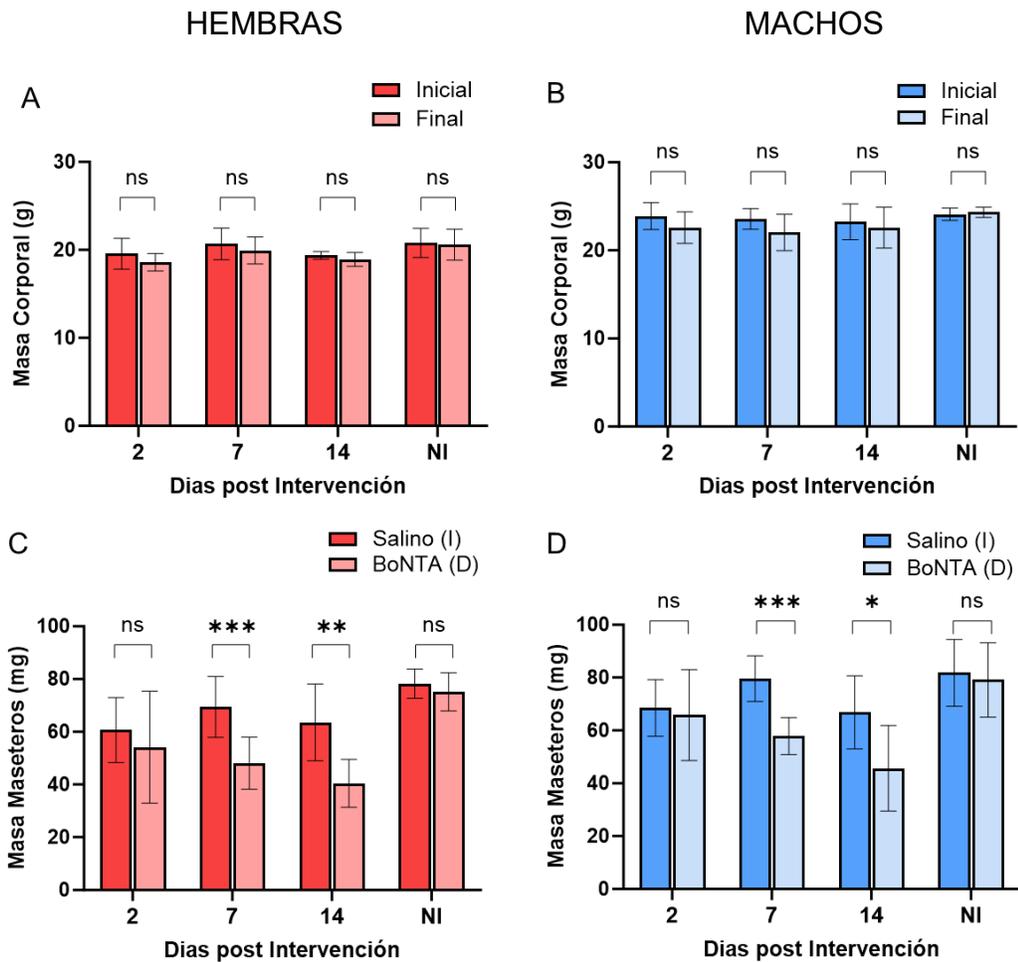
("final"). Esto se comparó con los indicadores registrados para animales no intervenidos incorporados en los grupos de estudio.

El tratamiento unilateral con BoNTA en el músculo masetero no generó diferencias en las masas corporales de los ratones machos ni hembras (Figura 6A-B).

En animales no intervenidos no se detectó cambios en la masa de músculo masetero izquierdo/derecho (Figura 6C-D). Lo mismo ocurrió al comparar el músculo masetero luego de 2 días de inyección de BoNTA, respecto del músculo masetero contralateral inyectado con solución salina (Figura 6C-D). Sin embargo, sí se observó reducción de masa del músculo masetero a los 7-14 días post inyección de BoNTA, en machos y hembras (Figura 6C-D). La masa del músculo masetero intervenido con BoNTA se redujo en un 30% (7 días) y un 38% (14 días) en hembras, respecto del músculo masetero contralateral inyectado con solución salina (Figura 6C). En el caso de los machos, la reducción en la masa del músculo masetero del lado inyectado con BoNTA fue de 28% (7 días) y 31% (14 días) (Figura 6D).

### **7.3. Efecto de la parálisis muscular inducida por BoNTA en la microestructura del cóndilo mandibular de ratones machos y hembras.**

Para evaluar si existe dimorfismo sexual en el efecto de la inyección unilateral de BoNTA en músculo masetero sobre la microestructura ósea del cóndilo mandibular, se analizaron imágenes de microCT derivadas de mandíbulas de ratones hembras y machos a los 2, 7 o 14 días post intervención, además de ratones no intervenidos. Se evaluaron los parámetros de volumen óseo (BV), volumen de tejido (TV), fracción de volumen óseo (BV/TV), separación trabecular (Tb.Sp.) y grosor trabecular (Tb.Th.). Para la representación y discusión de los datos, en cada figura se muestra: un gráfico pareado por cada sexo, que une con una línea los lados tratados y no tratados de cada individuo y un gráfico de barra por cada sexo,



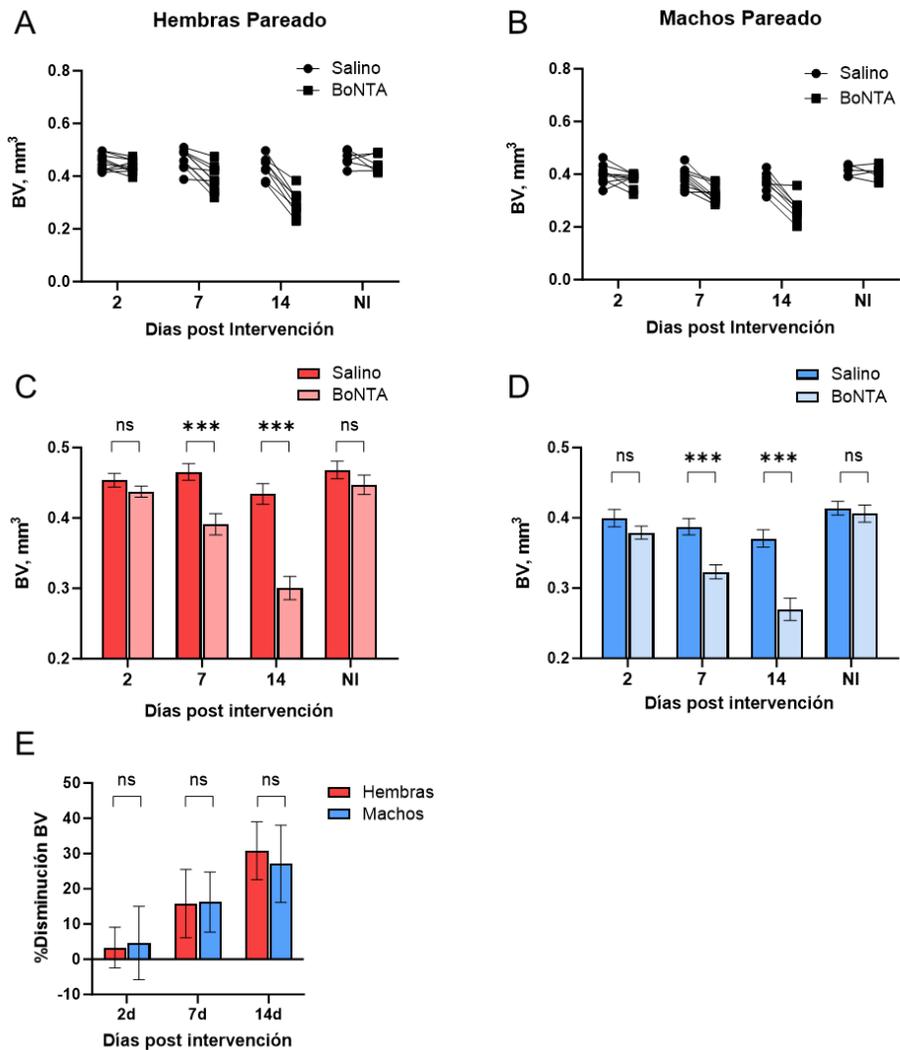
**Figura 6. Efecto del tratamiento unilateral con BoNTA a diferentes días en la masa corporal y la masa del músculo masetero en ratones machos y hembras.** (A-B) Comparación de la masa corporal previa a la inyección de BoNTA/Salino (“inicial”) e inmediatamente posterior a la eutanasia (“final”) a diferentes días post intervención en ratones hembras (A) y machos (B). (C-D) Comparación de la masa del músculo masetero inyectado con solución salina, o su contralateral inyectado con BoNTA, a diferentes días post intervención en ratones hembras (C) o machos (D). Se muestran gráficas de todas las temporalidades en cada sexo para facilitar la visualización, pero el análisis estadístico se realizó de manera pareada entre los mismos animales al inicio y final del tratamiento (A-B), o entre los lados derecho e izquierdo de los mismos animales (C-D). Datos expresados como promedio  $\pm$  DE.  $n=6-11$ , test ANOVA de una vía, ns: no significativo, \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ . NI: No intervenido

que muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de cada medición, junto con la significancia estadística de las diferencias entre lado inyectado con BoNTA o solución salina, además de un gráfico del porcentaje de cambio de cada parámetro (aumento o disminución en lado BoNTA respecto de lado salino), comparando hembras con machos.

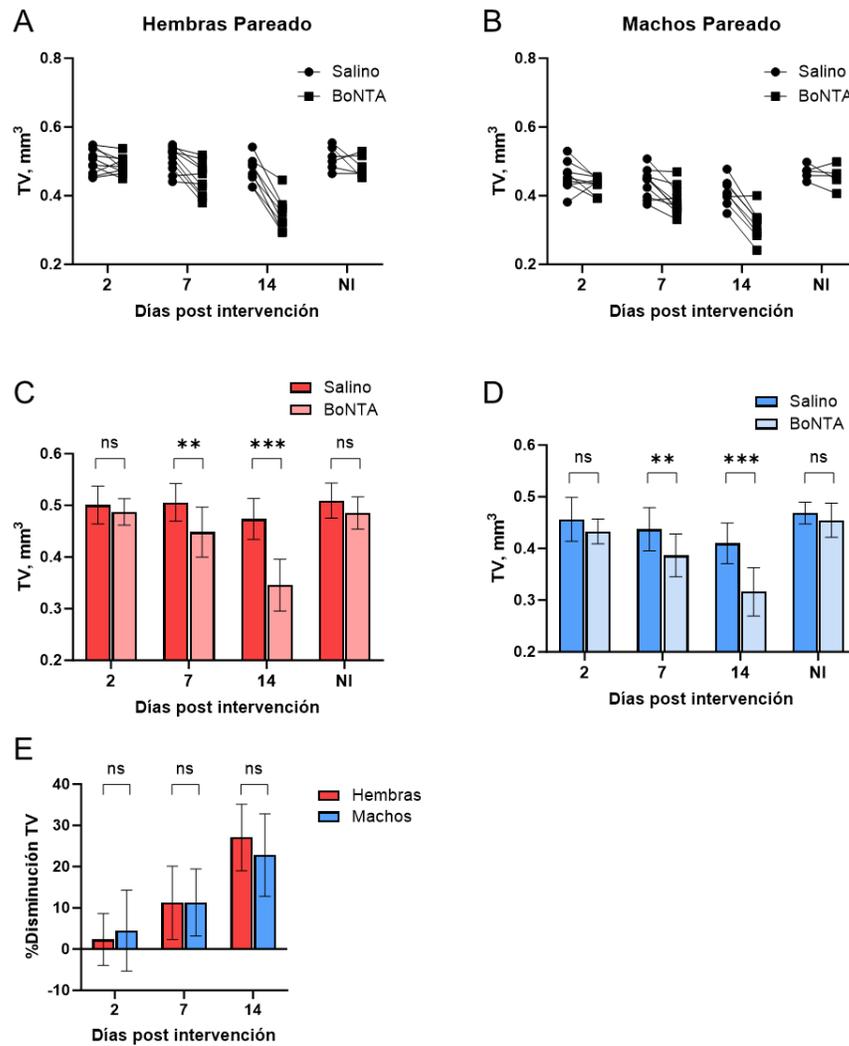
Los resultados de BV fueron similares entre machos y hembras (Figura 7A-C). Ambos sexos presentaron diferencias significativas desde los 7 días post tratamiento con BoNTA, con disminución de BV del lado tratado (Figura 7B-D). El análisis del porcentaje de disminución de BV muestra que no existe una diferencia en la pérdida de este parámetro entre sexos (Figura 7E), incluso cuando las hembras presentan un mayor BV que los machos.

El análisis de TV muestra que ambos sexos reaccionan de manera similar al tratamiento con BoNTA con disminución del lado tratado (Figura 8A-C), arrojando diferencias desde los 7 días post tratamiento y siendo éstas mayormente significativas a los 14 días (Figura 8B-D). El análisis de porcentaje de disminución (Figura 8E) muestra un aumento progresivo de esta pérdida, sin diferencias significativas entre sexos en ninguna temporalidad.

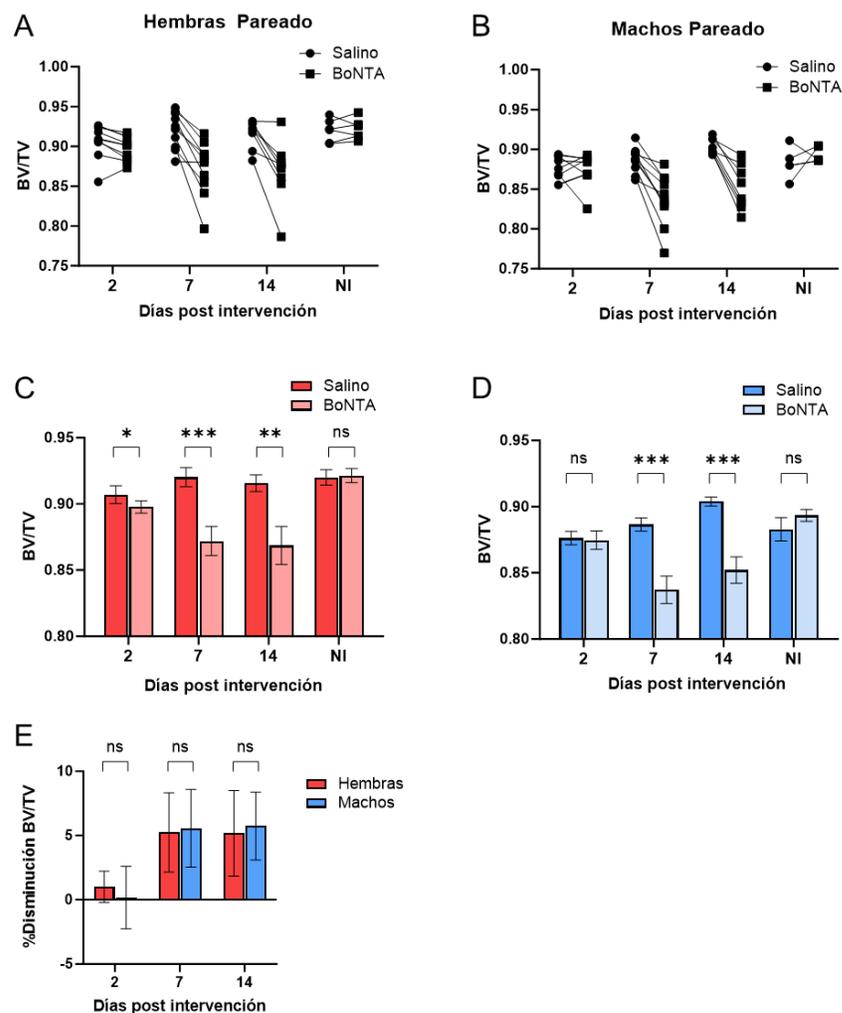
El análisis de BV/TV presenta diferencias más extremas entre los lados tratado y no tratado (Figura 9A-C). Encontramos aquí una primera diferencia entre sexos, donde las hembras presentan una diferencia significativa a los 2 días post tratamiento con disminución del lado tratado con BoNTA (Figura 9B). Las diferencias a los 7 y 14 días post tratamiento siguen siendo significativas para ambos sexos (Figura 9B-D). El porcentaje de diferencia comparado entre sexos no arroja diferencias significativas (Figura 9E).



**Figura 7. Efecto de la parálisis unilateral inducida por BoNTA en el volumen óseo del cóndilo mandibular de ratones machos y hembras.** Ratones hembras o machos fueron inyectados con BoNTA en el músculo masetero derecho y solución salina en el músculo masetero izquierdo. A distintos tiempos post intervención (2-7-14 días) los animales se eutanasiaron y las mandíbulas se diseccionaron y conservaron para escaneo por  $\mu$ CT. Se muestra la cuantificación del parámetro volumen óseo (BV) en hembras (A-B) y en machos (C-D) a distintos tiempos. Los gráficos A-C son pareados, para evaluar el cambio en el parámetro observado en cada uno de los individuos; el parámetro en los cóndilos contralaterales del mismo animal se representa por puntos unidos por una línea. Los gráficos B-D corresponden a la representación de la media  $\pm$  desviación estándar de los valores, e incluyen el análisis estadístico comparativo entre lado BoNTA versus lado salino de su misma condición.  $n=8-11$ , *test de t pareado*, \*\*\*:  $p<0,001$ . (E) Comparación del porcentaje de disminución del parámetro BV inducido por BoNTA en los distintos tiempos en machos y hembras.  $n=9-11$ , *test de t no pareado*, ns: no significativo. NI: no intervenido.



**Figura 8. Efecto de la parálisis unilateral inducida por BoNTA en el volumen de tejido del cóndilo mandibular de ratones machos y hembras.** Se muestra la cuantificación del parámetro volumen de tejido (TV) en hembras (A-B) y en machos (C-D) a distintos tiempos. Los gráficos A-C son pareados, para evaluar el cambio en el parámetro observado en cada uno de los individuos; el parámetro en los cóndilos contralaterales del mismo animal se representa por puntos unidos por una línea. Los gráficos B-D corresponden a la representación de la media  $\pm$  desviación estándar de los valores, e incluyen el análisis estadístico comparativo entre lado BoNTA versus lado salino de su misma condición.  $n=9-11$ , *test de t pareado*, \*\*:  $p < 0,01$ . \*\*\*:  $p < 0,001$ . (E) Comparación del porcentaje de disminución del parámetro TV inducido por BoNTA en los distintos tiempos en machos y hembras.  $n=8-11$ , *test de t no pareado*, ns: no significativo. NI: no intervenido.



**Figura 9. Efecto de la parálisis unilateral inducida por BoNTA en fracción de volumen óseo del cóndilo mandibular de ratones machos y hembra.** Se muestra la cuantificación del parámetro fracción de volumen óseo (BV/TV) en hembras (A-B) y en machos (C-D) a distintos tiempos. Los gráficos A-C son pareados, para evaluar el cambio en el parámetro observado en cada uno de los individuos; el parámetro en los cóndilos contralaterales del mismo animal se representa por puntos unidos por una línea. Los gráficos B-D corresponden a la representación de la media  $\pm$  desviación estándar de los valores, e incluyen el análisis estadístico comparativo entre lado BoNTA versus lado salino de su misma condición.  $n=8-11$ , *test de t pareado*, \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$ . (E) Comparación del porcentaje de disminución del parámetro BV/TV inducido por BoNTA en los distintos tiempos en machos y hembras.  $n=9-11$ , *test de t no pareado*, ns: no significativo. NI: no intervenido.

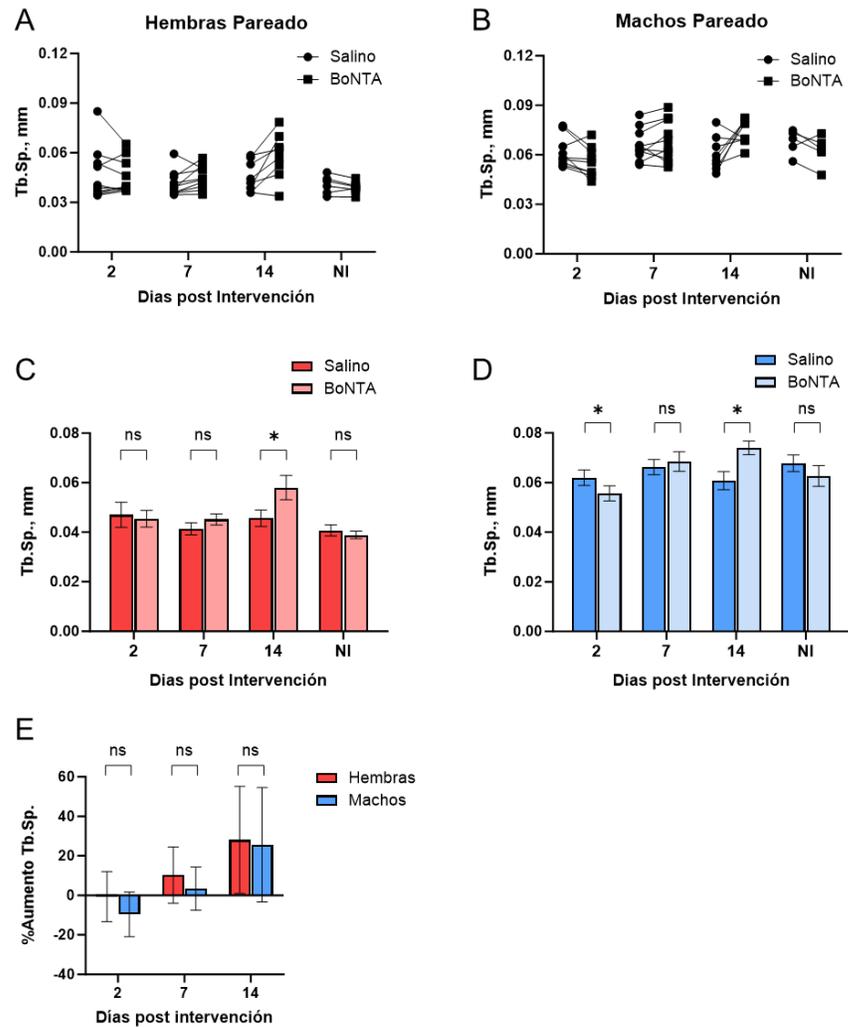
En el análisis de Tb.Sp. presenta la mayor diferencia de resultados entre sexos (Figura 10A-C). Mientras que en hembras presenta diferencias significativas sólo a los 14 días post tratamiento, con aumento del Tb.Sp. del lado tratado (Figura 10B), en machos se presenta una diferencia significativa a los 2 días post tratamiento con mayor Tb.Sp. del lado no tratado (Figura 10D). Esta diferencia se pierde a los 7 días, mientras que a los 14 vuelve a aparecer de manera inversa, con un mayor Tb.Sp. del lado tratado con BoNTA (Figura 10D). El porcentaje de aumento de Tb.Sp. por sexo no muestra diferencias significativas (Figura 10E).

En el análisis de Tb.Th. volvemos a encontrar similitudes entre machos y hembras (Figura 11A-C). En hembras presenta una diferencia significativa desde los 2 días, con un aumento en el lado no tratado, la cual se invierte el día 7 y se mantiene a los 14 (Figura 11B). En machos las diferencias significativas entre lados se observan desde los 7 días, con menores valores del lado tratado con BoNTA (Figura 11D). No existe diferencia entre sexos en el porcentaje de disminución de Tb.Th. en ninguna temporalidad (Figura 11E).

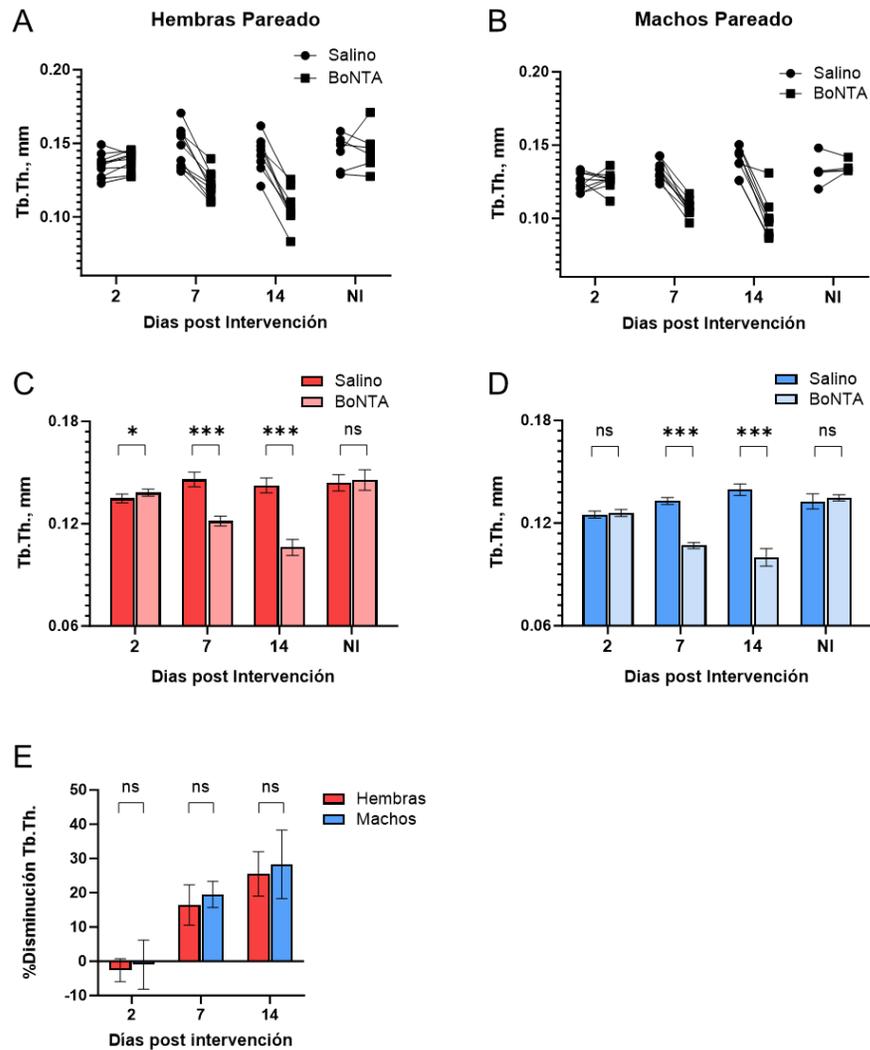
## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. Caracterización por sexo de masa corporal, maseterina y parámetros de microestructura ósea condilar en ratones BALB/c sin intervenir.**

Nuestra primera meta fue caracterizar los parámetros de peso total, peso maseterino y microestructura del cóndilo mandibular entre ratones machos y hembras no intervenidos. Esto para posteriormente generar comparaciones de microestructura post tratamiento con la mayor cantidad de variables en cuenta. Si bien el efecto de la inyección de BoNTA en el músculo masetero y su consecuencia en el cóndilo mandibular han sido previamente descritos por nuestro grupo y otros



**Figura 10. Efecto de la parálisis unilateral inducida por BoNTA en separación trabecular del cóndilo mandibular de ratones machos y hembras.** Se muestra la cuantificación del parámetro separación trabecular (Tb.Sp.) en hembras (A-B) y en machos (C-D) a distintos tiempos. Los gráficos A-C son pareados, para evaluar el cambio en el parámetro observado en cada uno de los individuos; el parámetro en los cóndilos contralaterales del mismo animal se representa por puntos unidos por una línea. Los gráficos B-D corresponden a la representación de la media  $\pm$  desviación estándar de los valores, e incluyen el análisis estadístico comparativo entre lado BoNTA versus lado salino de su misma condición.  $n=8-11$ , *test de t pareado*, \*:  $p<0,05$ . (E) Comparación del porcentaje de disminución del parámetro Tb.Sp. inducido por BoNTA en los distintos tiempos en machos y hembras.  $n=9-11$ , *test de t no pareado*, ns: no significativo. NI: no intervenido



**Figura 11. Efecto de la parálisis unilateral inducida por BoNTA en grosor trabecular del cóndilo mandibular de ratones machos y hembras.** Se muestra la cuantificación del parámetro grosor trabecular (Tb.Th.) en hembras (A-B) y en machos (C-D) a distintos tiempos. Los gráficos A-C son pareados, para evaluar el cambio en el parámetro observado en cada uno de los individuos; el parámetro en los cóndilos contralaterales del mismo animal se representa por puntos unidos por una línea. Los gráficos B-D corresponden a la representación de la media  $\pm$  desviación estándar de los valores, e incluyen el análisis estadístico comparativo entre lado BoNTA versus lado salino de su misma condición.  $n=8-11$ , *test de t pareado*, \*:  $p<0,05$ , \*\*\*:  $p<0,001$ . (E) Comparación del porcentaje de disminución del parámetro Tb.Th. inducido por BoNTA en los distintos tiempos en machos y hembras.  $n=9-11$ , *test de t no pareado*, ns: no significativo. NI: no intervenido.

(Balanta-Melo y cols. 2018; Dutra y Yadav, 2019), no existen diseños experimentales que aborden el posible dimorfismo sexual del efecto.

El primer hallazgo fue encontrar diferencias basales en la masa de los músculos maseteros entre ratones BALB/c machos y hembras (Figura 4). Mientras que las hembras presentan una menor masa corporal en comparación a los machos de la misma especie y edad, sus músculos maseteros presentan valores de masas similares. Así, al normalizar la masa muscular por la masa corporal de los sujetos, las hembras muestran valores mayores, indicando una posible mayor fuerza de mordida relativa a su tamaño.

Siguiendo esta línea, analizamos los cóndilos mandibulares de machos y hembras no intervenidos y comparamos su microestructura, arrojando resultados que se condicen con el hallazgo anterior. Las hembras presentaron mayor volumen óseo, volumen de tejido, fracción de volumen óseo, grosor trabecular y menor separación trabecular, indicando que poseen cóndilos de mayor tamaño y con mayor cantidad de hueso que los machos. Esto coincide en parte con estudios sobre dimorfismo sexual óseo en ratones, donde se ha encontrado que la tibia de ratones hembra presenta mayores niveles de hueso trabecular, con mayores medidas de fracción de volumen óseo, número de trabéculas y menor separación trabecular que machos (Hefferan y cols., 2003).

Por último, determinamos si el tratamiento con BoNTA afecta la masa corporal de los ratones, comparando este parámetro al inicio del tratamiento (día de inyección de BoNTA) con su valor al final, el día de eutanasia y toma de muestras. Encontramos que en ambos sexos no existieron diferencias significativas en las masas corporales de los ratones previo o posterior al tratamiento en ninguna temporalidad, por lo que podemos concluir que el tratamiento no afectó las capacidades de alimentación de los ratones.

El efecto de la inyección de BoNTA en la masa y volumen del músculo masetero intervenido fue previamente descrito por nuestro grupo, aunque exclusivamente en ratones machos (Balanta-Melo y cols. 2018; Balanta-Melo y cols., 2023). En el presente trabajo se confirmó la disminución significativa de la masa del músculo masetero de ratones machos inyectados con BoNTA, respecto del músculo contralateral intervenido con solución salina, desde los 7 días post intervención. Además, se demostró que en ratones hembras esto ocurre con la misma temporalidad y en similar magnitud.

## **8.2. Diferencias en microestructura ósea entre ratones BALB/c machos y hembras posterior al tratamiento unilateral con BoNTA en músculo masetero.**

Previos trabajos de nuestro grupo (Balanta-Melo, Torres-Quintana, y cols., 2019) han descrito que en ratones macho inyectados unilateralmente con BoNTA en el músculo masetero existe una disminución significativa de fracción de volumen óseo (BV/TV), grosor trabecular (Tb.Th.) y un aumento de separación trabecular (Tb.Sp.) en el cóndilo del lado tratado a los 14 días, mientras que en modelos de temprana temporalidad (Cid, 2021) se demostró que a los 2 días post intervención con BoNTA, BV/TV y Tb.Th. del cóndilo del lado tratado no fueron afectados; sin embargo, sólo se utilizaron ratones machos para el estudio.

En el presente trabajo encontramos que las hembras tuvieron diferencias significativas en ambos parámetros a los 2 días, con una disminución de BV/TV y un aumento de Tb.Th. en el lado tratado. Esta descrito que los macrófagos presentes en hembras tienen una mayor capacidad de fagocitosis y de presentación de antígenos ante los linfocitos T, traducándose a una respuesta inmune acelerada en comparación con las células de los machos, quienes presentan mayor respuesta a marcadores inflamatorios como el LPS (Klein y Flanagan, 2016), lo que podría

indicar el mecanismo de acción ante la diferencia en la velocidad de respuesta al tratamiento.

Otro hallazgo interesante fue el encontrado para Tb.Sp., donde los machos presentaron diferencias significativas a los 2 días, con mayor valor en el lado no tratado, lo que nos lleva a preguntarnos: ¿Podría esto deberse a una reacción temprana de los procesos de remodelado óseo ante la sobrecarga funcional del cóndilo no afectado del que depende la alimentación del animal? Esta diferencia se pierde a los 7 días y vuelve a aparecer a los 14 días de manera inversa, con mayor valor en el lado tratado, como era esperado. En hembras sólo ocurrió una diferencia significativa en Tb.Sp. a los 14 días, con mayor valor en el lado tratado como era esperado. Con esto podemos concluir que el tratamiento con BoNTA afecta en diferentes temporalidades a machos y hembras en parámetros de microestructura ósea, sin embargo, los efectos encontrados no siempre se ajustan con lo esperado.

Para comparar el nivel de efecto del tratamiento entre machos y hembras, decidimos analizar el porcentaje de disminución o aumento de los parámetros de microestructura del lado tratado contra el lado no tratado. De esta manera la comparación entre sexos no se vería afectada por las diferencias basales de microestructura ósea que presentan.

En todos los parámetros de microestructura ósea analizados no encontramos diferencias significativas en los porcentajes de disminución o aumento entre machos y hembras, con lo que podemos concluir que, a pesar de su diferencia basal, ambos sexos son afectados de la misma manera por el tratamiento con BoNTA en el músculo masetero a nivel de efecto en su microestructura condilar.

### **8.3. Dimorfismo sexual de microestructura y remodelación ósea en modelos experimentales.**

Existen múltiples modelos para el estudio del desuso muscular y su efecto en el hueso, como la suspensión de extremidades posteriores, nefrectomía, inyección con toxina botulínica y uso de elementos ortodónticos. Entre éstos, el uso de ratas ha sido históricamente predilecto, mientras que el uso de ratones ha ido en aumento desde el año 2000 aproximadamente (Brent y cols., 2021).

El uso de ratones machos y hembras en conjunto se ha visto en limitados estudios, con distintas conclusiones. En modelos de suspensión de extremidades posteriores se ha descrito que el sexo y genotipo de los ratones estudiados tiene correlación directa con mayores cambios morfológicos y reducción de valores de microestructura y aposición mineral en tibia y fémur en hembras (Squire y cols., 2008), diferencias óseas basales, como mayor cantidad de hueso trabecular en hembras y cortical en tibia de machos con análisis histomorfométrico, pero sin diferencias en la respuesta al tratamiento (Hefferan y cols., 2003). Se ha descrito una reversión del proceso de crecimiento en hembras y acentuación de características óseas relacionadas con mayor edad (David y cols., 2006) y en un modelo de nefrectomía de extremidad posterior (denervación quirúrgica) se reportó que la disminución de densidad mineral en tibia y fíbula fue mayor en hembras que en machos (Ko y cols., 2011). Un estudio de inyección de BoNTA intramuscular en extremidad posterior encontró mayores pérdidas de densidad mineral en tibia y mayores tiempos de recuperación de la masa ósea asociados a las cepas de los ratones, pero no al sexo de éstos (Grimston y cols., 2007).

Se ha descrito una asociación cromosómica entre mayor masa corporal de los machos y su mayor masa ósea en comparación con hembras (transcripciones genéticas asociadas al cromosoma Y) (Orwoll y cols., 2001), aunque, por otro lado, se ha encontrado que en huesos axiales (extremidades) ratones machos presentan

mayores niveles de resorción ósea, mientras que en hembras éstos presentan mayor tamaño (Wolfe y Klein, 1996). Los resultados actuales en estos modelos comparativos por sexo son heterogéneos y sus conclusiones tienden a asociar la respuesta al tratamiento a las características de cada hueso más que a la respuesta producida por el sexo del sujeto. Es crucial entonces describir las características de los huesos a estudiar, para poder diferenciar entre dimorfismos preexistentes y diferentes respuestas al tratamiento.

Actualmente no existe un modelo que compare efectos de atrofia muscular en mandíbula por sexo, que describa características basales de dimorfismo sexual y que analice la misma cantidad de parámetros de microestructura al mismo tiempo como en el desarrollado en el presente trabajo. Nuestro modelo experimental estaba basado en trabajos previos de nuestro grupo (Balanta-Melo, Torres-Quintana, y cols., 2019), evaluando una temporalidad temprana del efecto de BoNTA (Cid, 2021) en ambos sexos. Cabe mencionar que en ratones se ha demostrado que la inyección de BoNTA no presenta reinervación (“sprouting”) hasta los 14 días post tratamiento, por lo que los tiempos utilizados en este trabajo corresponden a la fase denominada “aneural” (Worton y cols., 2018).

Si bien los resultados no demuestran una diferencia entre sexos en la magnitud de respuesta al tratamiento con BoNTA en el cóndilo mandibular, sí muestran diferencias significativas en microestructura ósea basal entre machos y hembras y en la temporalidad de su respuesta al tratamiento.

#### **8.4. Análisis de muestras mediante microtomografía computarizada.**

El microCT es un proceso de obtención de imagen, actualmente el “Gold standard” para procesos de visualización y análisis en 3D de morfología ósea en animales pequeños. Incluso en huesos de ratones, es eficiente y certero para la evaluación de microestructuras como lo son la BV/TV, Tb.Sp. y Tb.Th. (Y. Kim y cols., 2021).

La microestructura trabecular ósea es considerada una malla arquitectural, cuya dificultad de análisis se encuentra en la caracterización de sus propiedades elásticas debido a las limitaciones de los métodos en 2D. Actualmente la anisotropía, definida como la variación de las propiedades físicas de las partes de un sistema según su dirección al ser examinadas, se considera como un valor clave para la cuantificación de este tipo de estructuras y que puede ser calculado por métodos basados en volumen o interfaz (Odgaard, 1997).

El programa DRAGONFLY, que fue utilizado para el análisis de resultados obtenidos por microCT, usa un método estadístico de interfaz clásico llamado Mean Intercept Length (MIL) con el que construye una superficie llena de vectores, los cuales entregan valores de magnitud (concentración) y dirección con los cuales posteriormente calcula distintos valores de microestructura. Esta construcción se realiza por encima del tejido óseo (modelo en 3D reconstruido a partir de microCT), donde la anisotropía natural de éste es un reflejo de la adaptación a la que es sometido y por lo tanto sus características biomecánicas. Así mismo, DRAGONFLY cuenta con un módulo exclusivo para análisis del tejido óseo en 3D, el Bone Analysis Wizard. Este se ha implementado previamente en el análisis de la microestructura ósea de la cortical del fémur en ratones (Deosthale y cols., 2023).

DRAGONFLY es un software simple para el usuario, disminuye el error humano y permitió obtener resultados similares a previos experimentos que utilizaron distintos softwares de análisis óseo en cóndilos mandibulares (Balanta-Melo, Torres-Quintana, y cols., 2019; Cid, 2021), sin embargo, es poca la bibliografía actual que describa su uso y resultados. Si bien es una herramienta de pago, entrega licencias académicas gratuitas para el trabajo no comercial, mejorando su disponibilidad para la ciencia.

## **8.5. Limitaciones del modelo actual**

Si bien los resultados de este trabajo de investigación son claros y similares a otros modelos de estudio, existen muchas variables que deben ser consideradas.

Como previamente establecimos, las hormonas sexuales afectan enormemente el desarrollo y mantención del tejido óseo (Bellido y Hill Gallant, 2019). En mujeres, la disminución de la producción de estrógenos con la menopausia no es homologable en ratones ya que las hembras no alcanzan a ser afectadas por un proceso similar debido a su edad. Por esto, el desarrollo de un modelo con uso de ratones ovariectomizados podría generar más información sobre los efectos protectores de estas hormonas en hembras (Souza y cols., 2019).

La cepa de ratones es también un factor a considerar ya que no sabemos si distintas cepas de ratones presentan mayor dimorfismo óseo. Se han descrito cepas de ratones (C3H) que no sufren pérdida ósea significativa ante los modelos de desuso, en contraste con BALB/c, (Judex y cols., 2004) y caracterizaciones microestructurales similares a este estudio sólo se han realizado en extremidades posteriores (Squire y cols., 2008), por lo que caracterizar basalmente los sujetos a tratar es crucial antes de comparar efectos en huesos craneofaciales.

## **9. CONCLUSIONES**

- Existe dimorfismo sexual en la microestructura de los cóndilos mandibulares de ratones BALB/c adultos. Las hembras presentan cóndilos más grandes en relación a su masa corporal, y con mayor fracción de volumen óseo y grosor de trabéculas. Paralelamente, las hembras presentan mayor masa de los músculos maseteros, en relación a su masa corporal.

- El efecto de la parálisis unilateral del músculo masetero inducida por BoNTA a nivel de microestructura ósea condilar del lado tratado no es sexualmente dimórfico en su magnitud. Sin embargo, al considerar el parámetro de fracción de volumen óseo, en hembras se reduce más tempranamente que en machos (2d versus 7d).

## **10. ALCANCES Y PROYECCIONES**

Este trabajo describe por primera vez la diferencia microestructural del cóndilo mandibular entre sexos. Será relevante estudiar a futuro si esto se replica en humanos, y considerarlo para intervenciones clínicas.

El hallazgo de que el daño condilar inducido por inyección de BoNTA en músculo masetero es más temprano en hembras, es una alerta por considerar en la intervención con BoNTA en humanos. Principalmente, teniendo en cuenta que las mujeres tienen mayor prevalencia de trastornos temporomandibulares, y son quienes mayoritariamente se intervienen con BoNTA con fines clínicos y estéticos.

Si bien el presente trabajo se realizó en ratones jóvenes, sería interesante evaluar el efecto diferencial de BoNTA en individuos envejecidos, o en modelos que remeden menopausia en hembras. Es relevante considerar que el efecto osteopénico causado por la parálisis muscular inducida por BoNTA podría agravarse en pacientes con osteoporosis.

## **11. REFERENCIAS**

Allen, M. R., y Burr, D. B. (2019). Bone Growth, Modeling, and Remodeling. *Basic and Applied Bone Biology*, 85–100. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813259-3.00005-1>

- Balanta-Melo, J., y Buvinic, S. (2018). Mandibular bone loss: A hidden side effect of botulinum toxin type A injection in masticatory muscles. *Journal of Oral Research*, 7(2), 44–46. <https://doi.org/10.17126/joralres.2018.014>
- Balanta-Melo, J., Eyquem-Reyes, A., Blanco, N., Vásquez, W., Kupczik, K., y cols. (2023). Unilateral Hypofunction of the Masseter Leads to Molecular and 3D Morphometric Signs of Atrophy in Ipsilateral Agonist Masticatory Muscles in Adult Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/ijms241914740>
- Balanta-Melo, J., Toro-Ibacache, V., Kupczik, K., y Buvinic, S. (2019). Mandibular bone loss after masticatory muscles intervention with botulinum toxin: An approach from basic research to clinical findings. *Toxins*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/toxins11020084>
- Balanta-Melo, J., Toro-Ibacache, V., Torres-Quintana, M. A., Kupczik, K., Vega, C., y cols. (2018). Early molecular response and microanatomical changes in the masseter muscle and mandibular head after botulinum toxin intervention in adult mice. *Annals of Anatomy*, 216, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.11.009>
- Balanta-Melo, J., Torres-Quintana, M. A., Bemmann, M., Vega, C., González, C., y cols. (2019). Masseter muscle atrophy impairs bone quality of the mandibular condyle but not the alveolar process early after induction. *Journal of Oral Rehabilitation*, 46(3), 233–241. <https://doi.org/10.1111/joor.12747>
- Balanta-Melo, J., Vargas, J. P., Bendersky, J., y Villanueva, J. (2022). Toxina Botulínica tipo A para el bruxismo del sueño en adultos. *International journal of interdisciplinary dentistry*, 15(1), 101–107. <https://doi.org/10.4067/s2452-55882022000100101>

- Bellido, T., y Hill Gallant, K. M. (2019). Hormonal Effects on Bone Cells. En *Basic and Applied Bone Biology* (pp. 299–313). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813259-3.00015-4>
- Bellido, T., Plotkin, L. I., y Bruzzaniti, A. (2019). Bone Cells. *Basic and Applied Bone Biology*, 37–55. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813259-3.00003-8>
- Bouxsein, M. L., Boyd, S. K., Christiansen, B. A., Guldberg, R. E., Jepsen, K. J., y cols. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(7), 1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
- Brent, M. B., Brüel, A., y Thomsen, J. S. (2021). A Systematic Review of Animal Models of Disuse-Induced Bone Loss. En *Calcified Tissue International* (Vol. 108, Número 5, pp. 561–575). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00799-9>
- Brotto, M., y Johnson, M. L. (2014). Endocrine crosstalk between muscle and bone. *Current Osteoporosis Reports*, 12(2), 135–141. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0209-0>
- Buck, D. W., y Dumanian, G. A. (2012). Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals. En *Plastic and Reconstructive Surgery* (Vol. 129, Número 6, pp. 1314–1320). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31824eca94>
- Caeiro, J. R., González, P., y Guede, D. (2013). Biomechanics and bone (& II): trials in different hierarchical levels of bone and alternative tools for the determination of bone strength. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 5(2), 99–108.
- Chang, M. K., Raggatt, L.-J., Alexander, K. A., Kuliwaba, J. S., Fazzalari, N. L., y cols. (2008). Osteal Tissue Macrophages Are Intercalated throughout Human

and Mouse Bone Lining Tissues and Regulate Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, 181(2), 1232–1244. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1232>

Choudhury, S., Baker, M. R., Chatterjee, S., y Kumar, H. (2021). Botulinum toxin: An update on pharmacology and newer products in development. *Toxins*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13010058>

Cid, F. (2021). *Efecto temprano de la parálisis del músculo masetero de ratón por toxina botulínica tipo A en la calidad ósea de la cabeza mandibular: Análisis tridimensional con microtomografía computarizada. Trabajo de Investigación.* Facultad de Odontología. Universidad de Chile.

Datta Gupta, A., Edwards, S., Smith, J., Snow, J., Visvanathan, R., y cols. (2022). A Systematic Review and Meta-Analysis of Efficacy of Botulinum Toxin A for Neuropathic Pain. En *Toxins (Basel)* (Vol. 14, Número 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/toxins14010036>

David, V., Ne Lafage-Proust, M.-H., Laroche, N., Christian, A., Ruegsegger, P., y cols. (2006). Two-week longitudinal survey of bone architecture alteration in the hindlimb-unloaded rat model of bone loss: sex differences. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290, 440–447. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00293.2004.-The>

Deosthale, P., Balanta-Melo, J., Creecy, A., Liu, C., Marcial, A., y cols. (2023). Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1 (FMR1), a novel inhibitor of osteoblast/osteocyte differentiation, regulates bone formation, mass, and strength in young and aged male and female mice. *Bone Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00256-x>

- Dutra, E. H., y Yadav, S. (2019). The effects on the mandibular condyle of Botox injection into the masseter are not transient. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 156(2), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2018.08.023>
- Felsenthal, N., y Zelzer, E. (2017). Mechanical regulation of musculoskeletal system development. *Development (Cambridge)*, 144(23), 4271–4283. <https://doi.org/10.1242/dev.151266>
- Fonseca, H., Moreira-Gonçalves, D., Coriolano, H. J. A., y Duarte, J. A. (2014). Bone quality: The determinants of bone strength and fragility. *Sports Medicine*, 44(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0100-7>
- Frontera, W. R., y Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behavior Genetics*, 45(2), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Frost, H. M. (2003). Bone's Mechanostat: A 2003 Update. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 275(2), 1081–1101. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10119>
- Grimston, S. K., Silva, M. J., y Civitelli, R. (2007). Bone loss after temporarily induced muscle paralysis by Botox is not fully recovered after 12 weeks. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116, 444–460. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.009>
- Hefferan, T. E., Evans, G. L., Lotinun, S., Zhang, M., Morey-Holton, E., y cols. (2003). Effect of gender on bone turnover in adult rats during simulated weightlessness. *J Appl Physiol*, 95, 1775–1780. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00455.2002.-Prolonged>

- Hirschfeld, H. P., Kinsella, R., y Duque, G. (2017). Osteosarcopenia: where bone, muscle, and fat collide. *Osteoporosis International*, 28(10), 2781–2790. <https://doi.org/10.1007/s00198-017-4151-8>
- Hsieh, Y. F., y Turner, C. H. (2001). Effects of loading frequency on mechanically induced bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(5), 918–924. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.5.918>
- Judex, S., Garman, R., Squire, M., Busa, B., Donahue, L. R., y cols. (2004). Genetically linked site-specificity of disuse osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(4), 607–613. <https://doi.org/10.1359/JBMR.040110>
- Kim, K., Wojczyńska, A., y Lee, J. Y. (2016). The incidence of osteoarthritic change on computed tomography of Korean temporomandibular disorder patients diagnosed by RDC/TMD; a retrospective study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(5), 337–342. <https://doi.org/10.3109/00016357.2015.1136678>
- Kim, Y., Brodt, M. D., Tang, S. Y., y Silva, M. J. (2021). MicroCT for Scanning and Analysis of Mouse Bones. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2230, pp. 169–198). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1028-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1028-2_11)
- Kini, U., y Nandeesh, B. N. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. En *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging* (Vol. 9783642024009, pp. 29–57). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-02400-9_2)
- Kirk, B., Feehan, J., Lombardi, G., y Duque, G. (2020). Muscle, Bone, and Fat Crosstalk: the Biological Role of Myokines, Osteokines, and Adipokines. *Current Osteoporosis Reports*, 18(4), 388–400. <https://doi.org/10.1007/s11914-020-00599-y>

- Klein, S. L., y Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. En *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Número 10, pp. 626–638). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Ko, C. Y., Seo, D. H., y Kim, H. S. (2011). Deterioration of bone quality in the tibia and fibula in growing mice during skeletal unloading: Gender-related differences. *Journal of Biomechanical Engineering*, 133(11). <https://doi.org/10.1115/1.4005350>
- La Fleur, P., y Adams, A. (2020). Botulinum Toxin for Temporomandibular Disorders: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines. *Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health*.
- Lang, T., LeBlanc, A., Evans, H., Lu, Y., Genant, H., y cols. (2004). Cortical and trabecular bone mineral loss from the spine and hip in long-duration spaceflight. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(6), 1006–1012. <https://doi.org/10.1359/JBMR.040307>
- Li, D. T. S., y Leung, Y. Y. (2021). Temporomandibular disorders: Current concepts and controversies in diagnosis and management. *Diagnostics*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030459>
- Lupsa, B. C., y Insogna, K. (2015). Bone Health and Osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 44(3), 517–530. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.05.002>
- Marotti. G., Palazzini. S, y Palumbo, C. (1993). *Structure-function relationships in the osteocyte*. <https://www.researchgate.net/publication/284675692>
- Miller, J., y Clarkson, E. (2016). Botulinum Toxin Type A. Review and Its Role in the Dental Office. *Dental Clinics of North America*, 60(2), 509–521. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.11.007>

- Morena da Silva, F., Lim, S., Cabrera, A. R., Schrems, E. R., Jones, R. G., y cols. (2023). The time-course of cancer cachexia onset reveals biphasic transcriptional disruptions in female skeletal muscle distinct from males. *BMC Genomics*, 24(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09462-7>
- Morgan, E. F., y Gerstenfeld, L. C. (2021). The bone organ system: form and function. En *Marcus and Feldman's Osteoporosis*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813073-5.00002-2>
- Nakamura, T., Imai, Y., Matsumoto, T., Sato, S., Takeuchi, K., y cols. (2007). Estrogen Prevents Bone Loss via Estrogen Receptor  $\alpha$  and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell*, 130(5), 811–823. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.025>
- Odgaard, A. (1997). Three-Dimensional Methods for Quantification of Cancellous Bone Architecture. En *Bone* (Vol. 20, Número 4).
- Orwoll, E. S., Belknap, J. K., y Klein, R. F. (2001). Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(11), 1962–1971. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.11.1962>
- Pette, D., y Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
- Qin, W., Bauman, W. A., y Cardozo, C. (2010). Bone and muscle loss after spinal cord injury: Organ interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1211, 66–84. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05806.x>

- Rosa-Caldwell, M. E., y Greene, N. P. (2019). Muscle metabolism and atrophy: Let's talk about sex. *Biology of Sex Differences*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0257-3>
- Schiaffino, S., y Reggiani, C. (2011). Fiber types in Mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91(4), 1447–1531. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2010>
- Seftel, A. D. (2014). Re: Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. *Journal of Urology*, 191(5), 1351–1353. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2014.02.073>
- Severinsen, M. C. K., y Pedersen, B. K. (2020). Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocrine Reviews*, 41(4), 594–609. <https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAA016>
- Slade, G. D., Bair, E., Greenspan, J. D., Dubner, R., Fillingim, R. B., y cols. (2013). Signs and symptoms of first-onset TMD and sociodemographic predictors of its development: The OPPERA prospective cohort study. *Journal of Pain*, 14(12 SUPPL.), T20-T32.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.07.014>
- Soboļeva, U., Lauriņa, L., y Slaidiņa, A. (2005). The masticatory system--an overview. *Stomatologija / issued by public institution "Odontologijos studija" ... [et al.]*, 7(3), 77–80.
- Souza, V. R., Mendes, E., Casaro, M., Antiorio, A. T. F. B., Oliveira, F. A., y cols. (2019). Description of Ovariectomy Protocol in Mice. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1916, pp. 303–309). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_29)
- Squire, M., Brazin, A., Keng, Y., y Judex, S. (2008). Baseline bone morphometry and cellular activity modulate the degree of bone loss in the appendicular

skeleton during disuse. *Bone*, 42(2), 341–349.  
<https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.09.052>

Trappe, T. A., Tesch, P., Alkner, B., y Trappe, S. (2023). Microgravity-induced skeletal muscle atrophy in women and men: implications for long-duration spaceflights to the Moon and Mars. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 135(5), 1115–1119.  
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00412.2023>

Van Eijden, T. M. G. J., Korfage, J. A. M., y Brugman, P. (1997). Architecture of the human jaw-closing and jaw-opening muscles. *Anatomical Record*, 248(3), 464–474. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199707\)248:3<464::AID-AR20>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199707)248:3<464::AID-AR20>3.0.CO;2-M)

Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M. K., Bouillon, R., y cols. (2004). Androgens and bone. *Endocrine Reviews*, 25(3), 389–425.  
<https://doi.org/10.1210/er.2003-0003>

Velly, A. M., Gornitsky, M., y Philippe, P. (2003). Contributing factors to chronic myofascial pain: A case-control study. *Pain*, 104(3), 491–499.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00074-5)

Warden, S. J., Galley, M. R., Richard, J. S., George, L. A., Dirks, R. C., y cols. (2013). Reduced gravitational loading does not account for the skeletal effect of botulinum toxin-induced muscle inhibition suggesting a direct effect of muscle on bone. *Bone*, 54(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.01.043>

Wolfe, M. S., y Klein, L. (1996). *Sex Differences in Absolute Rates of Bone Resorption in Young Rats: Appendicular Versus Axial Bones* (Vol. 59). <https://doi.org/doi:10.1007/s002239900085>

Worton, L. E., Gardiner, E. M., Kwon, R. Y., Downey, L. M., Ausk, B. J., y cols. (2018). Botulinum toxin A-induced muscle paralysis stimulates Hdac4 and differential miRNA expression. *PLoS ONE*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207354>

Yin, L., Li, N., Jia, W., Wang, N., Liang, M., y cols. (2021). Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacological Research*, 172(August). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105807>