



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

LABORATORIO DE BIOLOGÍA ÓSEA

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas

**ESTUDIO DE LA DINÁMICA ÓSEA
MANDIBULAR Y DE LOS PROCESOS
REABSORPTIVOS DE LA CRESTA
ALVEOLAR EN RATAS DIABÉTICAS Y
CONTROLES**

Autor: María Florencia García

Director: Dr. Rodolfo C. Puche

-Año 2005-

A Román

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento:

- Al Dr. Rodolfo Puche: por dirigirme con criterio en el desarrollo de esta Tesis dándome la oportunidad de aprender de su experiencia, formándome como investigadora y transmitiéndome su confianza, tranquilidad y estímulo constante. Por su afecto, calidez y apoyo incondicional.
- A Hilda Moreno: por haber colaborado ardua y generosamente en el desarrollo de esta Tesis, alentándome y acompañándome afectuosamente en todo momento.
- A Martha Siragusa: por invitarme y alentarme a realizar esta Tesis. Por brindarme siempre su incondicional ayuda y depositar su confianza en mi persona.

Agradecimientos

- A Martha Locatto y Verónica Di Loreto: por haber permitido el uso de su Laboratorio en experimentos de esta Tesis y por compartir sus conocimientos y experiencias.
- A Nelly Pérez Jimeno y a la Cátedra de Histología de la Facultad de Cs. Médicas (U.N.R.): por haber contribuido en el procesamiento de las muestras histológicas.
- A Adriana Belmonte: por haber colaborado, en forma desinteresada, en el examen microbiológico realizado en esta Tesis.
- A Silvia Revelli: por su colaboración en la Discusión de los resultados obtenidos en esta Tesis.
- A mi familia: por el amor y la confianza que siempre supieron darme. Por acompañarme y respaldarme en cada decisión. Por respetarme y ayudar a superarme.

Agradecimientos

- A Román: por creer siempre en mí y respetarme, acompañando mis tiempos y necesidades. Por su amor y cuidado. Por su comprensión, contención, ayuda y apoyo incondicional.

ÍNDICE

INDICE

	Página
RESUMEN	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Las estructuras periodontales, asiento de la enfermedad periodontal	1
1.2. La enfermedad periodontal	2
1.3. La rata como modelo experimental	5
1.3.1. Características periodontales de la rata	5
1.3.2. Anatomía y fisiología periodontal de la rata	6
1.3.3. Patogénesis de la enfermedad periodontal en la rata	8
1.3.4. La inflamación de origen no bacteriano como causa de la enfermedad periodontal	11
1.4. Asociación de la diabetes mellitus con la enfermedad periodontal	12
1.5. La enfermedad periodontal como enfermedad del metabolismo óseo	16
1.5.1. Relaciones moleculares entre osteoblasto y osteoclasto	17
1.5.2. Ensayo terapéutico con Bisfosfonatos	21

2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	25
3.1. Animales	25
3.2. Técnicas	26
3.2.1. Técnicas de evaluación de las variables del crecimiento	26
3.2.1.1. Determinación del peso seco de las hemimandíbulas	26
3.2.1.2. Determinación del volumen de las hemimandíbulas	27
3.2.1.3. Determinación de la densidad de las hemimandíbulas	27
3.2.2. Técnicas para la evaluación de las variables que indican progreso de la enfermedad periodontal	27
3.2.2.1. Densitometría radiológica	28
3.2.2.2. Medición del hueso periodontal de soporte (HPS)	30
3.2.2.3. Medición de la distancia desde el límite amelocementario a la cresta ósea alveolar	31
3.2.2.4. Análisis de los cortes histológicos	35
3.2.2.5. Estudios microbiológicos	35
3.2.3. Análisis del metabolismo del calcio corporal	36

Índice

3.2.4. Registro de las imágenes	37
3.2.5. Inducción de la diabetes por aloxano	38
3.2.5.1. Determinación de la Glicemia	38
3.2.6. Tratamiento con bisfosfonatos	40
3.2.7. Técnicas estadísticas y ajuste de curvas	41
4. RESULTADOS	45
I. Ratas controles	45
4.1. Crecimiento	45
4.1.1. Crecimiento de la mandíbula	45
4.1.1.1. Peso corporal y mandibular	45
4.1.1.2. Tasa de crecimiento mandibular	48
4.1.1.3. Relación peso mandibular/ peso corporal	48
4.1.1.4. Densidad y Volumen	50
4.1.1.5. Densidad mineral del hueso periodontal	52
4.1.2. Crecimiento de los molares	53
4.1.2.1. Diámetro mesio-distal de las coronas	53
4.1.2.2. Densidad mineral de las coronas	54
4.1.2.3. Desgaste de las coronas en función de la edad	55

4.1.2.4. Crecimiento radicular en función de la edad	59
4.2. Caracterización y desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea en la rata	59
4.2.1. Técnica de densitometría radiológica	62
4.2.1.1. Número de focos de reabsorción	62
4.2.1.2. Área total en reabsorción	64
4.2.1.3. Densidad mineral del hueso periodontal	65
4.2.2. Medición de la distancia LAC-COA	67
4.2.3. Estimación del HPS	70
4.2.4. Estudios histológicos	79
4.2.4.1. Observaciones a las 4 semanas de edad	79
4.2.4.2. Observaciones a las 19 semanas de edad	80
II. Ratas diabéticas	87
Animales	87
4.3. Crecimiento corporal y mandibular en el estado diabético	87
4.3.1. Peso corporal	87
4.3.2. Relación peso hemimandibular/ peso corporal	89

4.3.3. Peso seco y volumen mandibular	90
4.3.4. Densidad mandibular	93
4.4. Crecimiento de los molares	94
4.4.1. Diámetro mesio-distal de las coronas	94
4.4.2. Densidad mineral de las coronas	96
4.5. Enfermedad periodontal espontánea de la rata en el estado diabético	98
4.5.1. Evaluación con la técnica de densitometría radiológica	98
4.5.1.1. Número de focos de reabsorción	98
4.5.1.2. Área total en reabsorción	100
4.5.1.3. Densidad mineral del hueso periodontal sin patología	101
4.5.1.4. Densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción	103
4.5.2. Medición de la distancia LAC-COA	106
III. Ensayo terapéutico con bisfosfonatos	112
Animales	112
Análisis de los resultados	112

4.6. Crecimiento	113
4.6.1. Efectos sobre el crecimiento corporal y mandibular de la rata	113
4.6.1.1. Peso corporal	113
4.6.1.2. Peso Mandibular	114
4.6.1.3. Volumen Mandibular	115
4.6.1.4. Densidad Mandibular	117
4.6.2. Efecto sobre el crecimiento de los molares	118
4.6.2.1. Densidad mineral de las coronas	118
4.7. Efecto de los bifosfonatos sobre la enfermedad periodontal espontánea de la rata	121
4.7.1. Evaluación con la técnica densitometría radiológica	121
4.7.1.1. Número de focos de reabsorción	121
4.7.1.2. Área total en reabsorción	122
4.7.1.3. Densidad mineral del hueso periodontal sin patología	123
4.7.1.4. Densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción	124
4.7.2. Medición de la distancia LAC-COA	125

5. DISCUSIÓN	128
5.1. Aparato masticatorio de los roedores	128
5.2. Crecimiento	129
5.2.1. Crecimiento en ratas controles	129
5.2.2. Crecimiento en ratas diabéticas por aloxano	135
5.2.3. Crecimiento de ratas tratadas con bisfosfonatos	140
5.3. Técnicas de valoración de la Enfermedad Periodontal	141
5.3.1. Examen clínico	141
5.3.2. Estudios radiológicos. Análisis morfométrico y Densitométrico	144
5.3.3. Examen histológico	145
5.3.4. Medición de la distancia LAC-COA	146
5.3.5. Medición del hueso periodontal de soporte	149
5.4. La enfermedad periodontal no experimental en la rata	150
5.4.1. Desarrollo de la enfermedad periodontal en ratas controles	151
5.4.2. Efectos de la diabetes sobre el desarrollo de la enfermedad periodontal	152

5.4.3. Efectos del tratamiento con bisfosfonatos sobre el desarrollo de la enfermedad periodontal	155
5.4.3.1. Modo de acción de los bisfosfonatos	155
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	159
6.1. Conclusiones	159
6.1.1. Crecimiento	159
6.1.2. Técnicas de evaluación de la enfermedad periodontal	160
6.1.3. Desarrollo de la enfermedad periodontal no experimental en la rata	161
6.2. Perspectivas futuras	163
6.2.1. Origen de los intriganes de esta Tesis	163
6.2.2. Hipótesis de plantean los resultados de esta Tesis	164
7. APÉNDICES	
7.1. APÉNDICE I. Aparato masticatorio de los roedores	171
7.1.1. Características del aparato masticatorio de la rata	174
7.1.2. Aspectos funcionales de la evolución de los molares	182

7.2. APÉNDICE II. Métodos radiológicos para evaluar el contenido mineral óseo	185
7.2.1. Revisión de la literatura	185
7.2.2. Seguridad radiológica	188
7.2.3. Resumen de la teoría	190
7.2.4. Condiciones experimentales	191
7.2.4.1. Influencia de los tejidos blandos	191
7.2.4.2. Variables que afectan la densidad del campo	192
7.2.5. Justificación de la metodología de cálculo	196
7.2.6. Microdensitometría	200
7.2.6.1. Técnica	200
7.2.6.2. Estándares	203
7.2.6.3. Mediciones	206
7.3. APÉNDICE III. Metabolismo del calcio corporal	208
7.3.1. Principio del método	210
7.3.1.1. Análisis de la curva de decrecimiento de la radioactividad específica del calcio sérico	210
7.3.2. Representación esquemática de las grandes vías del metabolismo cálcico	213
7.3.2.1. Cálculo del fondo común	215

Índice

7.3.2.2.	Cálculo de la velocidad total de salida del Ca del fondo común	216
7.3.2.3.	Medida de la excreción urinaria	216
7.3.2.4.	Medida de la vida de excreción fecal	217
7.3.2.5.	Medida de la velocidad de fijación sobre los huesos	218
7.3.2.6.	Medida de la absorción intestinal y de la velocidad de reabsorción ósea	218
8.	BIBLIOGRAFÍA	219
9.	TRABAJOS PUBLICADOS	248

RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad periodontal es una respuesta inflamatoria del tejido periodontal a las bacterias contenidas en la placa bacteriana con destrucción de fibras colágenas, migración apical del epitelio de unión y pérdida del hueso alveolar. El daño producido puede conducir a la pérdida dental.

Con el fin de evaluar el crecimiento mandibular y describir el desarrollo de la enfermedad periodontal "espontánea" de la rata se utilizaron animales controles línea "m" y se corroboraron los hallazgos observados con dos modelos experimentales (diabetes experimental y bisfosfonatos). El modelo de diabetes experimental fue explorado dado que se considera a la diabetes como factor agravante de la enfermedad periodontal. Se efectuó un ensayo terapéutico con bisfosfonatos, drogas de reconocido efecto antiosteoclástico, ya que la enfermedad periodontal puede considerarse una enfermedad del metabolismo óseo por la característica reabsorción de hueso.

El crecimiento mandibular de las ratas controles fue armónico con el corporal. La diabetes tuvo un

efecto adverso sobre el crecimiento corporal que no se manifestó en el peso seco, densidad ni volumen de la mandíbula. En los animales tratados con Lidadronato se encontró un aumento significativo en el peso seco y volumen mandibular respecto de los controles. Estos resultados son congruentes con el conocido efecto antireabsortivo de estas drogas.

La técnica de densitometría ósea radiológica permitió la evaluación simultánea de los tres principales componentes de la estructura ósea: el grosor de la cortical, su porosidad y el grado de mineralización del hueso. La medición de la distancia desde la línea amelocementaria a la cresta ósea alveolar (LAC-COA) resultó un excelente método morfométrico. Esta distancia aumentó con el paso del tiempo y fue mayor en la cara lingual que en la vestibular, tanto en animales controles, diabéticos como tratados con bisfosfonatos. La medición del hueso periodontal de soporte (HPS) no ha demostrado ser un recurso útil para evaluar el curso de la enfermedad periodontal durante el período de rápido crecimiento de la rata ya que se combinan la erupción activa, la erupción pasiva y la enfermedad periodontal. Este método resultaría útil después que el animal haya completado su crecimiento.

La enfermedad periodontal apareció luego del destete y se desarrolló hacia la 6ª o 7ª semana de vida sin evidencias de alteraciones patológicas del tejido gingival.

En los animales diabéticos se observó un mayor número de focos de reabsorción con menor área total en reabsorción involucrada. La disminución del turnover óseo y la probable tolerancia inmunológica a los gérmenes habituales en el alimento y la boca explicarían esta observación. La densidad mineral del hueso periodontal sin patología fue, en promedio, 34% menor comparándolos con los controles. La densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción también fue significativamente menor.

Dosis iguales de dos bisfosfonatos no produjeron los mismos resultados. El Lidadronato redujo el área total en reabsorción. El Olpadronato aumentó significativamente la densidad mineral del hueso periodontal sin patología. Con las técnicas empleadas se observan modificaciones congruentes con el efecto antiosteoclástico de los bisfosfonatos.

La evidencia acumulada fue contradictoria: por una parte, una serie de indicadores (número y amplitud de focos de reabsorción y la pérdida ósea puesta en evidencia por el aumento de la distancia

entre la línea amelocementaria y la cresta ósea alveolar y las imágenes histológicas de reabsorción ósea) indicarían que la enfermedad periodontal "espontánea" progresa con el avance de la edad. Sin embargo, sólo a la 4^a. semana se observaron los acúmulos de linfocitos en el tejido periodontal. Estos resultados sugieren dos hipótesis:

- ♦ La Enfermedad Periodontal "Espontánea" es un ejemplo de tolerancia inmunológica
- ♦ Las modificaciones observadas en el periodonto de ratas muy jóvenes son producto de los antígenos ambientales en un período de inmadurez del sistema inmune.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS ESTRUCTURAS PERIODONTALES, ASIENTO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Se denominó erupción dentaria al proceso por el cual la corona del diente progresa hasta llegar al plano oclusal y los tejidos blandos se desarrollan e insertan alrededor de ella formando el surco gingival, la papila interdental y el hueso de soporte⁽¹⁾. La erupción es llevada a cabo por el folículo o germen dentario. Las células próximas a la dentina radicular se diferencian en cementoblastos, responsables de la deposición del cemento que cubre la raíz. Otras células se diferencian en fibroblastos y osteoblastos. Las primeras son responsables de la formación de las fibras colágenas y las segundas están involucradas en la formación del hueso alveolar. Las fibras colágenas se embeben en cemento y se denominan fibras de Sharpey, las que forman el ligamento periodontal que conecta al diente dentro de su alvéolo. Una vez que el diente entró en oclusión se termina de desarrollar el tercio apical de la

1. Introducción

raíz. En animales donde la raíz ha completado su crecimiento ocurre una lenta erupción pasiva para compensar la atrición de las superficies oclusales de las piezas dentarias. Este fenómeno se debe a la aposición de cemento en el extremo radicular⁽²⁾.

El continuo remodelamiento óseo es un fenómeno normal del tejido, aún cuando el diente haya llegado al plano oclusal y cumple con la función de acomodar pequeños cambios en la posición de los dientes⁽¹⁾.

1.2. LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

En estado de salud^(1,3) la encía es una banda de mucosa especializada adaptada al diente. El epitelio de unión es el tejido que une la superficie interna de la encía al diente y actúa como sello entre el ambiente oral y los tejidos de soporte (Figura 1.1). El ligamento periodontal, que consiste en haces de fibras colágenas es el tejido que une las raíces dentales al alvéolo óseo. En el hombre, la profundidad fisiológica del surco gingival es de 0.5 a 1.5 mm.

Dos patologías afectan al tejido de soporte de las piezas dentarias: gingivitis y periodontitis. La gingivitis es una respuesta inflamatoria de la encía a la placa dental sin que, concurrentemente, exista

1. Introducción

alguna destrucción de los tejidos adyacentes. La periodontitis es una extensión del proceso inflamatorio con destrucción del tejido conjuntivo, del ligamento y pérdida ósea. Resulta en la reabsorción de la encía, movilidad, migración y posible pérdida de las piezas dentales⁽⁴⁾.

La causa primaria de la enfermedad periodontal es la placa dental, o más específicamente, las bacterias contenidas en la placa. En la gingivitis, estas bacterias producen sustancias que penetran el epitelio de unión ocasionando inflamación y edema, lo que produce la separación entre el margen de la encía y el diente (Figura 1.2). La debilitada adherencia del epitelio conduce a la profundización del surco gingival, lo que permite la acumulación de más placa.

La periodontitis es una extensión del proceso inflamatorio, que conduce a la destrucción de los tejidos de soporte. El epitelio de unión acentúa su destrucción y migra hacia el ápice debido a la destrucción de las fibras colágenas, profundizándose el surco hasta transformarse en bolsa periodontal (Figura 1.3). A medida que aumenta la reabsorción del hueso alveolar, la bolsa se hace más profunda. El daño combinado al ligamento periodontal y al hueso alveolar puede conducir a la pérdida dental.

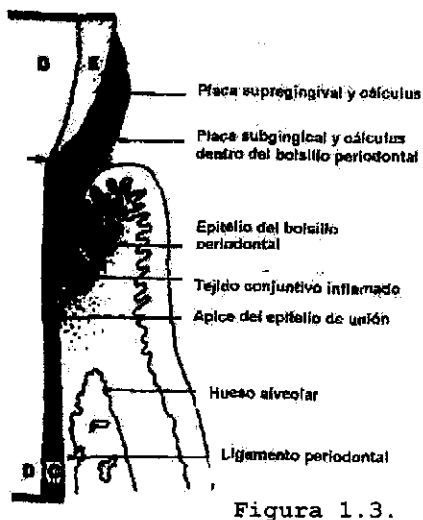
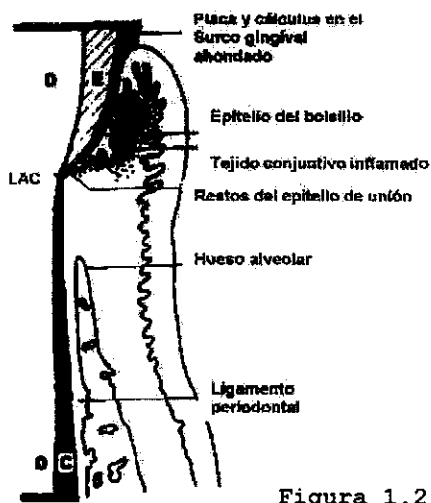
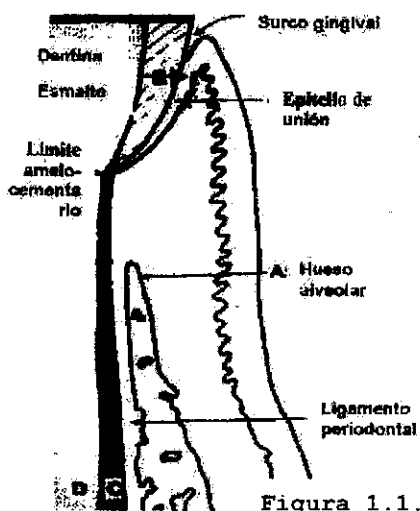
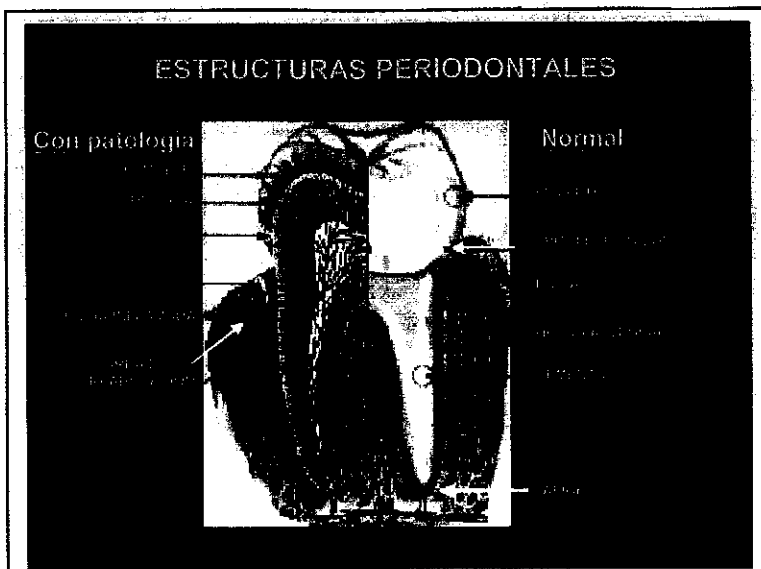


Figura 1.1. Periodonto sano. El surco gingival es poco profundo. El epitelio de unión termina en la línea amelocementaria. E: esmalte; D: dentina; C: cemento.

Figura 1.2. Gingivitis.

Figura 1.3. Periodontitis De Armitage⁽⁴⁾.

1. Introducción

La comprensión actual de la enfermedad periodontal establece que la gingivitis y la periodontitis son entidades separadas y que aunque la segunda requiere la primera como antecedente, no todas las gingivitis progresan hasta periodontitis⁽⁵⁾.

1.3. LA RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL

1.3.1. Características periodontales de la rata

Para el progreso del conocimiento sobre la periodontitis y la búsqueda de recursos terapéuticos, los estudios en el hombre son particularmente difíciles porque no se conocen marcadores clínicos seguros para evaluar su evolución. Por este motivo, los modelos animales que permiten estudios invasivos son muy atractivos.

Por más de cuatro décadas la rata ha sido ampliamente usada en estudios de enfermedad periodontal^(6,7,8,9) ya que la estructura del tejido periodontal es muy similar a la del hombre⁽¹⁰⁾. Además pueden ser mantenidas bajo condiciones libres de gérmenes permitiendo así estudios sobre la patogenicidad de elementos aislados de la microflora periodontal^(11,12).

A diferencia de otras enfermedades que no tienen paralelo en el reino animal, la periodontitis está muy difundida. Varias especies susceptibles han sido identificadas: lauchas, ratones, hamsters, gatos, perros, zorros, ovejas, caballos y varios primates no humanos. Sin embargo, los modelos animales han sido cuestionados por algunos autores⁽¹³⁾.

Como animal de experimentación la rata tiene varias ventajas: bajo costo, facilidad de manejo y posibilidad de criarse en condiciones libres de gérmenes. Se conocen varias líneas inmunológicamente deficitarias que aceleran la evolución de la enfermedad periodontal, y que han contribuido a mejorar la comprensión de la misma.

1.3.2. Anatomía y fisiología periodontal de la rata

La rata tiene como estructura dental un único incisivo separado de los tres molares de la mejilla por un ancho diastema en cada cuadrante de la mandíbula. Pliegues especiales del labio superior ajustan dentro del diastema, protegiendo al resto de la boca cuando los incisivos son usados para roer. Los incisivos tienen crecimiento continuo. El uso y

1. Introducción

afilado mutuo aseguran que estos dientes mantengan una altura constante en la mandíbula⁽¹⁴⁾.

Por no poseer raíz y ser de crecimiento continuo, los incisivos no sirven como modelo para el estudio de enfermedad periodontal. En contraste, la estructura y organización del tejido periodontal en los molares (epitelio gingival oral, epitelio del surco, epitelio de unión, fibras colágenas periodontales, cemento celular y acelular y hueso alveolar) son muy similares en ratas y humanos⁽¹⁵⁾. La diferencia a destacar es que el epitelio del surco gingival de la rata está queratinizado⁽¹⁶⁾. Teóricamente la estructura de este tejido podría interferir con el movimiento de los metabolitos bacterianos dentro del tejido conectivo gingival previniendo la respuesta inflamatoria. Sin embargo, estudios recientes muestran que el material situado en el surco gingival penetra rápidamente en el tejido conectivo vía el epitelio de unión⁽¹⁶⁾. Siendo así no hay razón para creer que la función de la barrera gingival sea fundamentalmente diferente en la rata y en el hombre. La queratinización puede afectar también la adhesión de determinadas bacterias al epitelio. Sin embargo, los experimentos han

demostrado que un número sustancial de gérmenes son capaces de colonizar el área dentogingival de la rata tanto como en seres humanos⁽⁸⁾. Por esto, parece injustificado descartar a la rata como modelo experimental por la queratinización del epitelio del surco.

A las 5 semanas de vida, las ratas generalmente han producido la erupción completa de todos sus molares⁽⁸⁾.

Con el progreso de la edad y como consecuencia de los procesos interproximales de atrición, los molares también migran en sentido distal. Como resultado el hueso interdental es remodelado así como también lo es el hueso alveolar^(17,18,19). La distancia entre esmalte-cemento y la cresta ósea alveolar se mantiene constante en la superficie vestibular cuando no hay enfermedad periodontal. El aumento de esa distancia depende de la edad y puede ser observado en sitios linguales y palatinos.

1.3.3. Patogénesis de la enfermedad periodontal en la rata

En la rata, la enfermedad periodontal se desarrolla en relación a la placa bacteriana

nativa^(20,21,22) y por microorganismos o productos bacterianos introducidos experimentalmente^(17,18,19). La enfermedad periodontal puede también ser ocasionada colocando una ligadura alrededor del cuello del diente para promover la acumulación de gérmenes y sus productos metabólicos⁽²³⁾. Este procedimiento se justifica en grandes animales como perros y primates con el objeto de promover una lesión periodontal que de otro modo tomaría más tiempo en desarrollarse. Debido a que en la rata la destrucción periodontal ocurre rápidamente sin ligaduras, opino que no hay razón para agregar una lesión traumática a la lesión inducida por bacterias.

En ratas infectadas experimentalmente, la pérdida ósea periodontal se produce rápidamente. La destrucción ósea significativa ha sido informada 42 días después de la inoculación y las lesiones progresan considerablemente entre 60 y 90 días después de infectadas. La destrucción ósea periodontal puede ser encontrada en cualquier región molar.

Los hallazgos clínicos e histológicos de la enfermedad periodontal en ratas son similares a los encontrados en el hombre. Pocos días después de la introducción de los patógenos periodontales se ha

podido observar clínicamente un leve sangrado gingival (gingivitis)⁽²⁴⁾. El epitelio de unión experimenta cambios patológicos graduales, incluyendo formación de crestas papilares (rete peg), ulceración y migración apical del mismo^(25,26,27,28,29). En el tejido conectivo aparece un infiltrado celular inflamatorio conteniendo linfocitos T y B, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares^(26,30). Los polimorfonucleares migran a través del epitelio hacia el surco gingival⁽³¹⁾. Las células plasmáticas pueden estar disimuladas en etapas tempranas de la enfermedad pero con el tiempo ellas se vuelven muy importantes⁽³²⁾. También se produce daño de las fibras colágenas y fibroblastos⁽³³⁾. Después de la inoculación de organismos Gram negativos se ha observado elevada actividad osteoclástica que puede ser reproducida por una inyección local de lipopolisacáridos de la pared celular^(34,35). Este fenómeno es mucho menos frecuente por inoculación con bacterias Gram positivas^(34,35).

Ocasionalmente la pérdida ósea puede ocurrir sin migración apical del epitelio de unión y sin pérdida de la adherencia del tejido conectivo (formación de bolsa periodontal)⁽³⁶⁾.

1.3.4. La inflamación de origen no bacteriano como causa de la enfermedad periodontal

Una de las características más sorprendentes del periodonto de la rata es el fuerte impacto que puede producir el pelo y el material de la cama. El impacto del material extraño esta estrechamente relacionado a la pérdida ósea y a la pérdida de la adherencia del la encía al diente^(37,38). La adición de un 1% de pelo de rata en la dieta acelera el deterioro periodontal⁽³⁹⁾. Por consiguiente el impacto agrega un elemento traumático indeseable a la lesión periodontal infecciosa.

En el Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario los animales se crían en jaulas de alambre suspendidas lo que minimiza la cantidad de pelo ambiental. El piso perforado de las jaulas minimiza también la posibilidad de coprofagia⁽⁴⁰⁾, hábito común en la rata.

1.4. ASOCIACIÓN DE DIABETES MELLITUS CON LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Según se informa más abajo, la enfermedad periodontal ha sido reconocida como una complicación de la diabetes. Dada la experiencia de este Laboratorio en la producción de diabetes experimental y en el estudio del metabolismo óseo, se decidió analizar el efecto de este desorden en el desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea de la rata.

La diabetes mellitus (D.M) es un desorden metabólico crónico producido por el déficit de insulina, que afecta el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Aproximadamente 15% de los diabéticos son de tipo I o insulino-dependientes. Esta condición se caracteriza por un inicio abrupto a cualquier edad con destrucción auto inmune de los islotes pancreáticos. Se revierte con la administración de insulina exógena. La forma más frecuente de la diabetes es la tipo II o de inicio adulto que tarda años en desarrollarse e involucra producción reducida de insulina y es controlada generalmente con dieta o hipoglucemiantes orales. Ambos tipos de diabetes se asocian con complicaciones sistémicas que han sido atribuidas a la hiperglucemia crónica. Las 5 complicaciones clásicas son: microangiopatía,

neuropatía, nefropatía, enfermedad vascular y retardo de la cicatrización. El desarrollo de estas complicaciones debe relacionarse a varios factores, incluyéndose el tiempo de inicio y severidad de la diabetes.

Se reconoce la asociación entre diabetes y periodontitis⁽⁴¹⁾. Por ello la enfermedad periodontal ha sido recientemente reconocida como la sexta complicación de la diabetes⁽⁴¹⁾. La encía se puede considerar como un tejido continuamente sujeto a agresiones y en constante reparación. La flora microbiana que coloniza la placa bacteriana es una fuente de toxinas que causan daño tisular. La injuria representa una disrupción de la continuidad del tejido gingival que se acompaña por daño y muerte celular. Se requiere que el proceso de cicatrización sea permanente para mantener la integridad estructural. En este contexto cualquier disturbio metabólico del huésped que comprometa la reparación o la cicatrización del tejido exacerbará la progresión de la periodontitis.

Investigaciones concernientes a la relación entre la diabetes y la periodontitis se han enfocado en los cambios vasculares dentro de los tejidos periodontales tales como la microangiopatía

gingival⁽⁴²⁾, la hipofunción granulocítica⁽⁴³⁾ y el aumento de la actividad de colagenasa gingival⁽⁴⁴⁾. Otros estudios han explorado el impacto de la diabetes como modificador de la expresión de la periodontitis⁽⁴⁵⁾. Pocas investigaciones han sido llevadas a cabo a nivel celular o molecular refiriéndose a los mecanismos y mediadores de la respuesta del huésped a la injuria tisular.

A pesar de algunos estudios contradictorios entre sí^(46,47), la mayoría de la evidencia clínica y epidemiológica demuestra que los diabéticos tipo I y tipo II tienen una mayor prevalencia de periodontitis como así también una forma más severa o rápidamente progresiva que los no diabéticos^(48,49,50). Los pacientes con pobre control de su diabetes exhiben gingivitis y periodontitis de mayor intensidad que los diabéticos bien controlados, sugiriendo que las alteraciones metabólicas inducidas por la diabetes sirven para disminuir la resistencia del huésped a la destrucción periodontal^(51,52).

Aunque se han efectuado avances en la identificación y tratamiento de algunas complicaciones diabéticas, poco progreso se ha hecho en prevenir la morbilidad asociada con la patología periodontal.

1. Introducción

En esta Tesis, la diabetes experimental se ha utilizado para validar los recursos diagnósticos empleados al analizar el desarrollo de la enfermedad periodontal "espontánea" de la rata.

1.5. LA ENFERMEDAD PERIODONTAL COMO ENFERMEDAD DEL METABOLISMO ÓSEO

Las "enfermedades del metabolismo óseo" son aquellas en las que, por diferentes causas, se perturba el acoplamiento entre la formación y reabsorción ósea. La pérdida de hueso periodontal es, de acuerdo con la definición anterior, una osteoporosis focal. El aumento de la actividad osteoclástica concurrente es producido (según la hipótesis de consenso) por la inflamación causada como consecuencia de la actividad bacteriana.

La secreción de citoquinas es una parte integral de la respuesta del huésped a la injuria local. Las citoquinas median las respuestas celulares críticas a la cicatrización incluyendo quimioatracción de células de la inflamación, estimulación de la proliferación de fibroblastos y síntesis proteica y proliferación celular endotelial. Los macrófagos-osteoblastos intervienen durante el complejo proceso de cicatrización. El macrófago-osteoblasto es una fuente clave de citoquinas para el reclutamiento continuado de células del ambiente de la lesión tanto como de la regulación y proliferación de los componentes básicos implicados en la reparación tisular. Las citoquinas actúan como mitógenos

estimulando la migración y proliferación de fibroblastos, los factores proangiogénicos estimulan la necesaria neovascularización y otros factores controlan la síntesis de tejido conectivo o proteína de la matriz extracelular.

1.5.1. Relaciones moleculares entre osteoblasto y osteoclasto

Las células de la progenie macrófagos (polimorfonucleares) dan origen a los progenitores de los osteoclastos. La señal de diferenciación la reciben de los osteoblastos en la forma del "colony stimulating factor-macrophage" (factor estimulante de formación de colonias, macrófagos, M-CSF). Estas células expresan el "receptor-activador del factor de necrosis tumoral κB " (RANK) en sus membranas y reciben la señal del ligando correspondiente (RANKL), expresado en la membrana de los osteoblastos (parte de esta molécula es segregada al espacio extracelular y se llama osteoprotegerina). Luego, los preosteoclastos se fusionan entre sí produciendo células multinucleadas y se activan a osteoclastos maduros, provistos del borde en cepillo característico. La Figura 1.4. muestra una versión simplificada de los resultados experimentales

descriptos en distintas investigaciones^(53,54,55), con el objeto de presentarlos de forma actualizada, sencilla y pertinente al tema de esta Tesis. La secuencia desde las células originarias (stem cells) hasta los osteoclastos maduros se describe en la Figura 1.5.

De las "unidades formadoras de colonias-macrófagos" (CFU-M) y bajo la acción del "factor estimulante de formación de colonias" (M-CSF) se diferencian progenitores de los monocitos y los macrófagos. Estas células mononucleadas se distinguen porque carecen del receptor de calcitonina (CTR) y no producen fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). El efecto conjunto del M-CSF y RANKL produce preosteoclastos, de morfología semejante a las células anteriores que expresan receptores para calcitonina y TRAP en sus membranas.

La fusión de los preosteoclastos se produce por efecto de las citoquinas mencionadas a las que se suma la Interleuquina-1 (IL-1). Las células multinucleadas expresan receptores de calcitonina y fosfatasa ácida resistente al tartrato, pero aún no poseen el borde en cepillo. Cuando éste aparece, las células califican como osteoclastos maduros.

1. Introducción

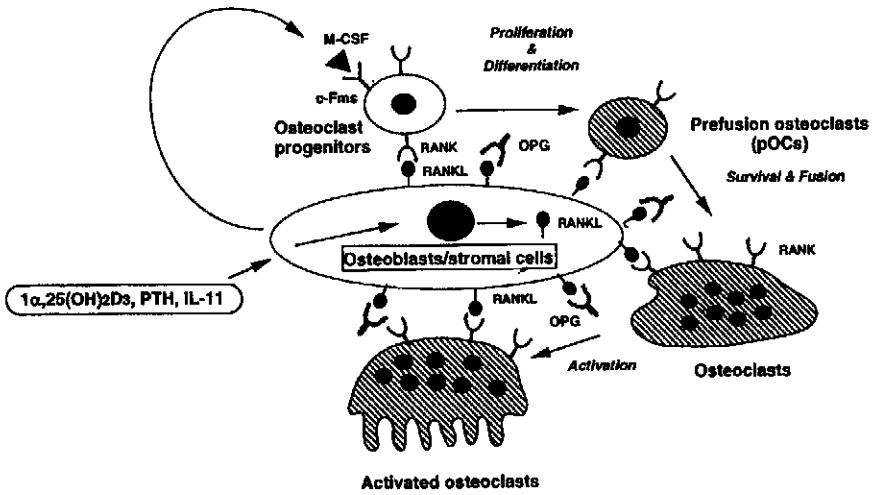


Figura 1.4. Interrelaciones entre los osteoblastos/ células del estroma y los osteoclastos.

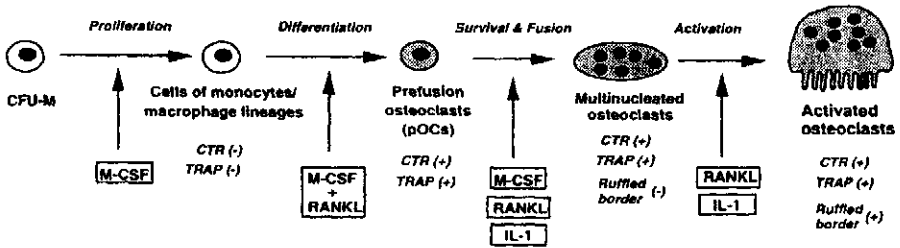


Figura 1.5. Progenie osteoclástica: proliferación, diferenciación, fusión y activación.

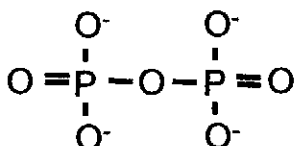
1. Introducción

Es pertinente destacar en esta Introducción, información contenida en el trabajo efectuado por Doxey y col.⁽⁵⁶⁾ con ratas gnotobióticas infectadas experimentalmente. En este trabajo, la estimación de citoquinas en el tejido gingival (expresada en nanogramos por microgramo de ADN, media \pm error standard) mostró el aumento significativo de Interleuquina-1 que se condice con su función como promotora de la osteoclastogénesis y la exacerbación de la pérdida ósea periodontal.

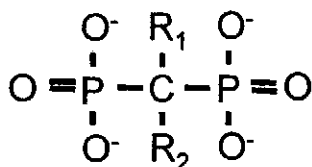
Citoquinas	Controles	Periodontitis
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF- β)	9 \pm 2	24 \pm 6 *
Factor de crecimiento tumoral (TGF- β 1)	4 \pm 1	10 \pm 5
Interleuquina-1 β	126 \pm 6	161 \pm 12 *
Factor de necrosis tumoral (TNF- α)	4 \pm 1	6 \pm 3

1.5.2. Ensayo terapéutico con bisfosfonatos

Esta Tesis también incluye un ensayo terapéutico con bisfosfonatos con el objetivo de obtener demostración experimental de sus efectos sobre la reabsorción ósea corporal y con ello prueba adicional sobre los fenómenos que ocurren en el desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea.



Anión pirofosfato



Fórmula germinal de los bisfosfonatos

Los bisfosfonatos son compuestos sintéticos análogos al pirofosfato. Contienen dos grupos fosfato unidos a un carbono (en lugar de oxígeno) y dos cadenas adicionales de estructura variable (R1 y R2 respectivamente).

Se unen firmemente a los cristales de fosfato de calcio inhibiendo su crecimiento y suprimiendo la reabsorción ósea mediada por los osteoclastos. Como consecuencia de esta acción son utilizados en el tratamiento de desordenes que afectan el esqueleto

como la osteoporosis y otras enfermedades del metabolismo óseo.

Los bisfosfonatos existentes en el mercado tienen características farmacocinéticas y fisicoquímicas similares. A pesar de ello sus actividades antireabsortivas difieren sustancialmente. Esta actividad está incrementada cuando un grupo amino está contenido en la cadena de carbón alifática⁽⁵⁷⁾.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis son:

1. Describir la enfermedad periodontal "espontánea" de la rata ya que la literatura no contiene referencias a la misma.

2. Corroborar en dos modelos experimentales los hallazgos observados en el estudio del desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea en la rata.
 - a) Diabetes experimental. Este modelo experimental fue explorado dado el reconocimiento de que la diabetes es un factor agravante de la enfermedad periodontal y su frecuencia en la población humana.

 - b) Ensayo terapéutico con bisfosfonatos. La enfermedad periodontal puede considerarse una enfermedad del metabolismo óseo caracterizada por la reabsorción de este tejido. Para

2. Objetivos

corroborar que los fenómenos observados en el objetivo 1 no eran quimeras, se decidió efectuar un ensayo terapéutico con drogas de reconocido éxito en inhibir la reabsorción ósea.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. ANIMALES

Se utilizaron ratas macho, de línea IIM/Fm, sublínea "m", de 2 a 15 semanas de edad, producidas por el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas.

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con los principios de la guía producida por los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos⁽⁵⁸⁾.

La literatura informa que material extraño (pelo o material de la cama) impactado en el surco acelera cualquier proceso inflamatorio del aparato de inserción de las piezas dentarias. El bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario cría los animales en jaulas de alambre suspendidas lo que minimiza la cantidad de pelo ambiental. El piso perforado de las jaulas minimiza también el hábito natural de la coprofagia⁽⁵⁹⁾.

3.2. TÉCNICAS

3.2.1. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES DEL CRECIMIENTO

En el momento de recibir los animales del criadero y darles ingreso al protocolo de estudio, se registraron el número de identificación y el peso corporal.

Los animales fueron sacrificados a las edades indicadas más abajo previa sobre-exposición a los vapores del éter etílico. Se disecaron las mandíbulas y se colocaron en agua hirviendo durante 5 minutos. Se descarnaron con el auxilio de instrumental quirúrgico. Posteriormente se dejaron en agua oxigenada al 3% durante 24 horas y se secaron a 37° C hasta constancia de peso. Salvo que se indique lo contrario la hemimandíbula izquierda se utilizó para estudios morfométricos y radiológicos.

3.2.1.1. Determinación del peso seco de las hemimandíbulas

Se obtuvieron los pesos secos utilizando una balanza analítica marca Sauter, con precisión del décimo de miligramo.

3.2.1.2 Determinación del volumen de las hemimandíbulas

El volumen de las hemimandíbulas se midió aplicando el principio de Arquímedes. Se fijó un trozo de alambre de cobre (10 cm de largo, 0.1 mm de diámetro) a cada una de las piezas. Estas fueron pesadas dos veces: suspendidas en el aire y sumergidas en agua destilada. La diferencia entre pesadas (g), mide el volumen en mililitros.

3.2.1.3. Determinación de la densidad de las hemimandíbulas

Esta variable se obtuvo dividiendo los pesos secos por los volúmenes. Los resultados se expresaron en mg/ml.

3.2.2. TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE LAS VARIABLES QUE INDICAN PROGRESO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

Para el estudio de la evolución de la enfermedad periodontal espontánea de la rata se utilizaron las siguientes técnicas:

3. Materiales y Métodos

	Densitometría radiológica	Hueso Periodontal de soporte	Distancia LAC-COA
Material de análisis	Radiografía – Imagen digital	Radiografía – Imagen digital	Hemimandíbula descarnada y teñida
Caras de la pieza dental	Proyección vestibulo lingual	Interproximales	Vestibular y Lingual
Unidades de la variable	mg de mineral/ mm ² de proyección	Porcentaje radicular inserto en la cresta ósea alveolar	mm de pérdida ósea.

3.2.2.1. Densitometría radiológica

Esta técnica exigió un desarrollo particular cuyos detalles se exponen en el Apéndice II.

Las hemimandíbulas descarnadas y la escala de aluminio se colocaron sobre una película radiográfica dental, contenida en su sobre. Las radiografías fueron escaneadas para obtener las imágenes digitales respectivas (Figura 3.1). La comparación de absorbancias se efectuó con el auxilio de un programa de análisis de imágenes digitales (Image Pro Plus 1.0).

c839

3.2.2.2. Medición del hueso periodontal de soporte (HPS)

Las radiografías de las mandíbulas fueron procesadas como se describiera para la determinación de la densidad mineral ósea.

Las mediciones se efectuaron sobre la imagen digital y con el auxilio de un programa de análisis de imágenes digitales (Image Pro Plus 1.0). Se midieron las distancias:

- a) entre el límite amelo-cementario y el ápice (LAC-A).
- b) entre el fondo del defecto óseo en su punto de máxima depresión y el ápice (AB).

Estas mediciones se realizaron sobre cada una de las raíces de cada uno de los tres molares (Figura 3.2). Las longitudes en pixeles se transformaron en mm usando como factor que toma como referencia el ancho de la escala de aluminio (5mm).

El hueso periodontal de soporte (HPS) fue calculado con la fórmula:

$$\text{HPS} = [(\text{Distancia AB}) \times 100] / (\text{Distancia LAC-A})$$



Figura 3.2. Imagen digitalizada de la hemimandíbula. Se indican las distancias empleadas para el cálculo de HPS.

3.2.2.3. Medición de la distancia desde el límite amelo-cementario a la cresta ósea alveolar (LAC-COA)

En general, el método morfométrico de elección para evaluar el nivel de inserción de la pieza dentaria dentro de su alvéolo ha sido la medición de la distancia desde la línea amelo-cementaria a la cresta ósea alveolar (LAC-COA) sobre las mandíbulas descarnadas. Este método es reproducible y mide la pérdida ósea en las caras libres de las piezas dentarias. Este método no cuantifica la cantidad de

mineral perdido ni la reabsorción ósea en las caras interproximales. La mayor limitación de esta técnica reside en que mide el total de la destrucción tisular que se ha producido hasta el día del sacrificio. No se presta a un estudio prospectivo sobre la actividad de la enfermedad. Un análisis de la cinética del proceso, como la mostrada en esta Tesis, requiere el sacrificio de animales a lo largo del tiempo.

También es posible considerar el nivel de inserción de la pieza en el hueso de soporte sobre cortes histológicos. Este método no sólo es menos práctico que la medición sobre mandíbulas descarnadas sino que además no suministra mejor información y puede crear artefactos ya que la técnica histológica requiere descalcificación y deshidratación. En los estudios efectuados se demostró que la técnica LAC-COA, como se describe en esta sección, provee información de la misma calidad y es de más sencilla realización que el análisis histológico.

Para llevar a cabo esta medición las hemimandíbulas izquierdas se colorearon durante un minuto con azul de metileno (1 g/100 ml) para marcar la línea amelo-cementaria (LAC) más claramente.

3. Materiales y Métodos

La distancia entre la unión amelo-cementaria hasta la cresta ósea alveolar (COA) fue medida usando un microscopio binocular (30X) cuyo ocular contenía una escala graduada. La distancia más pequeña apreciable fue 37 μ mm por división.

Antes de la medición, la hemimandíbula fue orientada de forma tal que las cúspides vestibulares y linguales estuvieran superpuestas. Las mediciones se efectuaron en las caras vestibular y lingual de los tres molares, sobre el eje de cada una de las raíces (Figura 3.3). Las longitudes medidas se expresan en mm.



Figura 3.3. Fotografía de la superficie lingual/vestibular. Se han marcado las distancias que se miden para calcular LACCOA.

3.2.2.4. Análisis de los cortes histológicos⁽⁶⁰⁾

Las hemimandíbulas derechas se fijaron en formol neutro durante 24 horas. Con un disco de carburo de silicio se cortaron por mesial del primer molar y distal del tercero. Se colocaron nuevamente en formol neutro durante 72 horas. Luego se transfirieron a una solución de EDTA (5.5% en agua destilada ajustada a pH 7.4) durante 6 semanas. Las piezas se deshidrataron en alcohol de concentración creciente, xilol y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes de orientación antero-posterior en todo el espesor del fragmento seccionado que se tiñeron con Hematoxilina-eosina.

3.2.2.5. Estudios microbiológicos

Se intentó obtener muestras del contenido del surco gingival con conos endodónticos estériles de papel, con resultados negativos.

Con los mismos medios de cultivo descritos mas abajo se investigó la carga de gérmenes del alimento.

Los medios de cultivo fueron los siguientes:

- Agar base columbia sangre- CLDE- caldo tioglicolado)
- Cultivo en anaerobiosis: (Agar Schaedler-sangre).

3.2.3. ANÁLISIS DE METABOLISMO DEL CALCIO CORPORAL

Las operaciones y metodología analítica se describen en detalle en el Apéndice III. Su objeto es obtener información cuantitativa sobre el metabolismo del calcio corporal. Los resultados no son directamente aplicables al metabolismo del calcio de las hemimandíbulas, pero sirven para interpretar los resultados obtenidos por otras técnicas.

En resumen, los animales se disponen en condiciones de balance alojados en jaulas metabólicas individuales. Se les mide la ingesta de agua y alimentos y se recogen heces y orina diariamente. Después de una semana de controles previos, cada rata recibió una dosis de ^{45}Ca por vía intraperitoneal y fue devuelta a la jaula metabólica. Se recogieron muestras de sangre de la cola a intervalos y orina y heces a las 24 y 48 horas después de la inyección del isótopo.

Los animales se sacrificaron, se evisceraron e incineraron para obtener el total de las cenizas óseas.

Las variables del metabolismo del calcio provistas por este estudio son las siguientes:

3. Materiales y Métodos

Pendiente del Compartimiento de intercambio rápido de Ca	día ⁻¹
Tamaño del Compartimiento de intercambio rápido de Ca	mg
Pendiente del Compartimiento de intercambio lento de Ca	día ⁻¹
Tamaño del Compartimiento de intercambio lento de Ca	mg
Pool de Calcio intercambiable	mg
Tasa de deposición de Ca en el esqueleto	mg/d
Tasa de reabsorción de Ca del esqueleto	mg/d
Masa de calcio esquelético	g
Ingesta de calcio	mg/d
Balance de Ca	mg/d
Calcio fecal endógeno	mg/d
Calcio fecal	mg/d
Absorción verdadera	mg/d
Calciuria	mg/d

3.2.4. REGISTRO DE LAS IMÁGENES

Las imágenes de las piezas disecadas, de los cortes histológicos y de las mandíbulas in vivo se obtuvieron con una cámara digital (Sony Exwave HAD Modelo SSC-DC500A) que se aplicó a un microscopio binocular ZEISS o a un microscopio trinocular Lancet con objetivos $\times 4$, $\times 10$, $\times 40$, según correspondiere. Las imágenes digitales se recogieron con un grabador Sony modelo MVC-FDR1 para su posterior análisis. Cuando fue requerido, las imágenes digitales se analizaron con un software especial (Image Pro Plus 1.0)

3.2.5. INDUCCIÓN DE LA DIABETES POR ALOXANO

Se utilizaron animales de 3 semanas de edad con un peso promedio de 39 ± 7.5 g. (promedio \pm error estándar). Los animales fueron alimentados ad libitum con una dieta balanceada (Cargill). El estado diabético se indujo de acuerdo al método de Prahl y Steenrod⁽⁶¹⁾: las ratas recibieron una inyección intraperitoneal única de 24 mg de aloxano (Sigma Chemical Co) cada 100 g de peso corporal. El aloxano fue disuelto en un buffer citrato-fosfato (pH = 4.0) a una concentración de 2.4 g de aloxano / 100 ml. Las ratas controles recibieron el mismo buffer de citrato-fosfato.

Alrededor del 50% de los animales inyectados con aloxano murieron dentro de la semana posterior a la inyección.

3.2.5.1. Determinación de la glicemia

Las glicemias de los animales tratados se midieron una vez por semana dentro de los 20-30 días posteriores a la administración del aloxano. La determinación se realizó por el método enzimático (Trinder), utilizando el equipo de glicemia enzimática de Laboratorio Wiener.

3. Materiales y Métodos

El plasma se obtuvo de sangre extraída de la cola de animales no ayunados en tubos capilares heparinizados. Las muestras fueron centrifugadas para separar el plasma.

En tubos marcados como blanco, estándar y muestras se colocaron:

	Blanco	Estándar	Muestras
Volumen de Estándar	-	10 μ l	-
Volumen de Muestras	-	-	10 μ l
Volumen de Reactivo de trabajo	2 ml	2ml	2ml

Los tubos fueron incubados en baño de agua a 37° C y leídos en fotolorímetro PERKIN ELMER a 530 nm de longitud de onda llevando el aparato a 0 con el blanco. Los resultados se calcularon en base a la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. de glucosa en plasma} = [T] \cdot LM / LT$$

donde:

[T] = concentración del testigo (1 gr/l).

LM = lectura de la muestra.

LT = lectura del testigo.

Los animales presentaron un amplio rango en los niveles sanguíneos de glucosa (200-1500 mg%). Se descartaron las ratas cuyas glicemias fueran menores a 300 mg/dl⁽⁶²⁾. Los animales permanecieron sin tratamiento hasta el día del sacrificio y fueron mantenidos bajo condiciones de luz y temperatura de acuerdo a las normas internacionales de cuidado de animales de laboratorio⁽⁵⁸⁾.

3.2.6. TRATAMIENTO CON BISFOSFONATOS

Se preparó una solución de bisfosfonato (20 mg) en 100 ml. de agua destilada. Los animales recibieron una dosis de 30 microgramos (0.15 ml de la solución) por cada 100 g de peso, una vez por semana, por vía intraperitoneal, a partir de la quinta semana de edad, durante siete semanas consecutivas. Los animales se sacrificaron a la 12^a. semana de edad. Los controles recibieron volúmenes semejantes de solución fisiológica.

3.2.7. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS Y AJUSTE DE LAS CURVAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

Para la comparación de grupos experimentales se utilizó el Test "t" de Student y el análisis de la variancia, conforme a técnicas estándares⁽⁶³⁾.

Las modificaciones del peso seco, volumen, densidad, en función del tiempo fueron analizadas mediante el ajuste de los datos con la ecuación sigmoidea de Boltzmann (Figura 3.4) con el objeto de efectuar comparaciones alométricas respecto del crecimiento corporal de las ratas usadas (controles y diabéticas) que fueran estudiadas por Locatto & col⁽⁶⁴⁾.

La ecuación es:

$$Y = \text{inicio} + (\text{asíntota} - \text{inicio}) / (1 + \exp((V_{50} - \text{semanas}) / \text{pendiente}))$$

En la que:

Asíntota = valor máximo de la función

Inicio = valor inicial de la función

V_{50} = punto de inflexión

Pendiente = mide la inversa de la inclinación de la recta tangente en V_{50} .

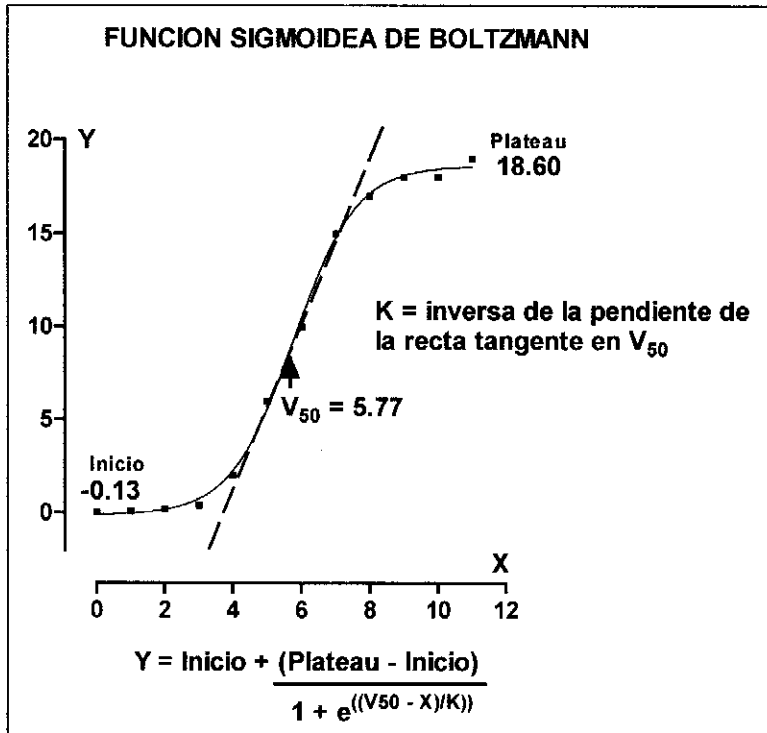


Figura 3.4. Función sigmoidea de Boltzmann.

Las modificaciones de la longitud cérvico-apical de la raíz, en función del tiempo fueron analizadas mediante el ajuste de los datos con la ecuación de decaimiento exponencial simple (Figura 3.5).

La ecuación es:

$$Y = (\text{inicio} + \text{plateau}) \times \exp(-K \times \text{semanas})$$

En la que

plateau = valor de la función a tiempo infinito

Inicio + plateau = valor de la función a $t=0$

K = coeficiente de tiempo

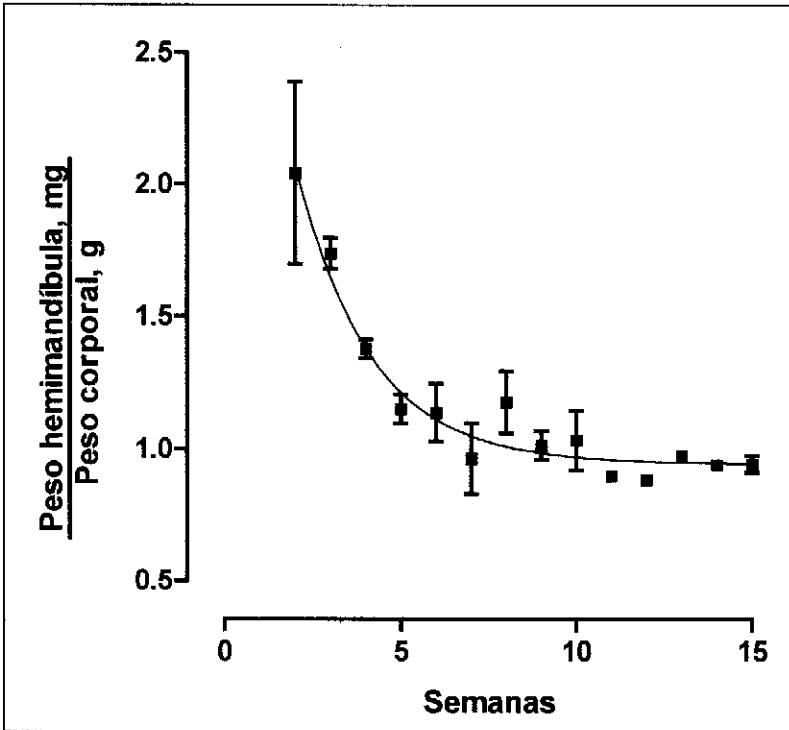


Figura 3.5. Función de decaimiento exponencial simple.

Para algunas variables (por ejemplo la densidad mineral de las coronas en función de la edad) el mejor ajuste se obtuvo con la función exponencial positiva de una sola fase (Figura 3.6).

La ecuación es:

$$Y = Y_{\max} (1 - \exp [-K \cdot X])$$

La función comienza y asciende hasta Y_{\max} con una tasa constante K . La vida media se calcula con el producto $0.69 \times K$.

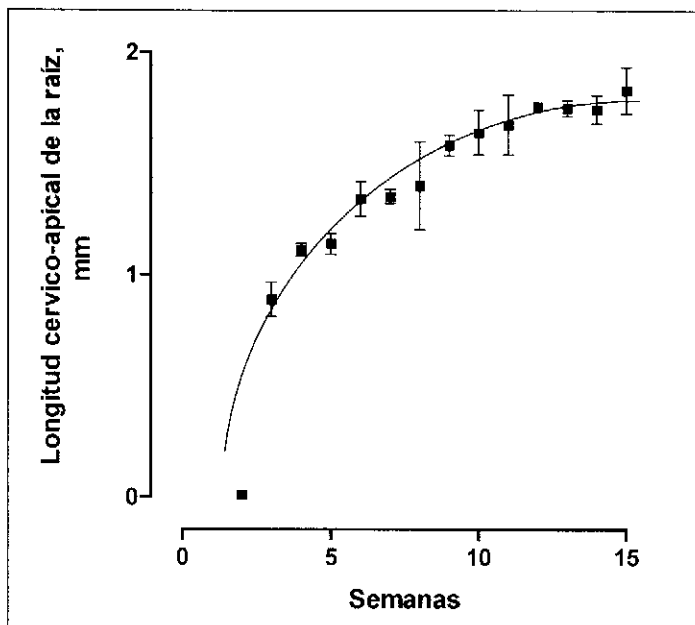


Figura 3.6. Función exponencial positiva de una sola fase.

Los ajustes se efectuaron con un programa estadístico que contiene el ajuste no lineal de la función a los datos. El algoritmo del programa procede por iteraciones hasta que dos sumas de cuadrados consecutivas no discrepen en más del 0.01%.

La decisión sobre la función de mejor ajuste, entre dos o más aparentemente satisfactorias se tomó eligiendo aquella de más alto valor de R^2 .

4 . RESULTADOS

4. RESULTADOS

I- RATAS CONTROLES

4.1. CRECIMIENTO

4.1.1. CRECIMIENTO DE LA MANDIBULA

4.1.1.1. Peso corporal y mandibular

El peso corporal y el peso seco de la hemimandíbula siguen una función sigmoidea que es característica del crecimiento: la función tiende a una asíntota y tiene un punto de inflexión que corresponde al momento de tasa de crecimiento más elevada. Esta función fue seleccionada por las siguientes razones: a) a diferencia de la Ecuación de Parks⁽⁶⁵⁾ no exige la determinación semanal del consumo de alimento, b) no requiere inferencias sobre la ingesta de alimentos y su efecto sobre el crecimiento, c) es sencilla y permite obtener la curva de mejor ajuste con los datos experimentales obtenidos (Figura 4.1). En la Tabla 4.1 se comparan los parámetros de las dos funciones mencionadas.

4. Resultados

Tabla 4.1. Análisis alométrico del peso corporal y peso seco de la hemimandíbula izquierda. Parámetros de la función de ajuste.

	Peso corporal s/ Parks	Peso corporal s/Boltzmann (n=43)	Peso hemimandíbula s/Boltzmann (n=43)
Punto de inflexión, sem	7±1	6.704±0.517	4.807±2.241
Asíntota, g	480±11	417.1±20.51	0.427±0.0428
Pendiente*		2.568±0.516	4.288±1.551

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Material y Métodos- Técnicas estadísticas por el significado de los parámetros.

Las figuras indican la media ± error estándar (número de animales).

Tanto el punto de inflexión como la asíntota de peso tienen valores comparables con cualquiera de las dos funciones. La coincidencia del punto de inflexión de la curva de peso corporal (vivo) y la de peso mandibular (seco) indica que ambos procesos son armónicos.

4. Resultados

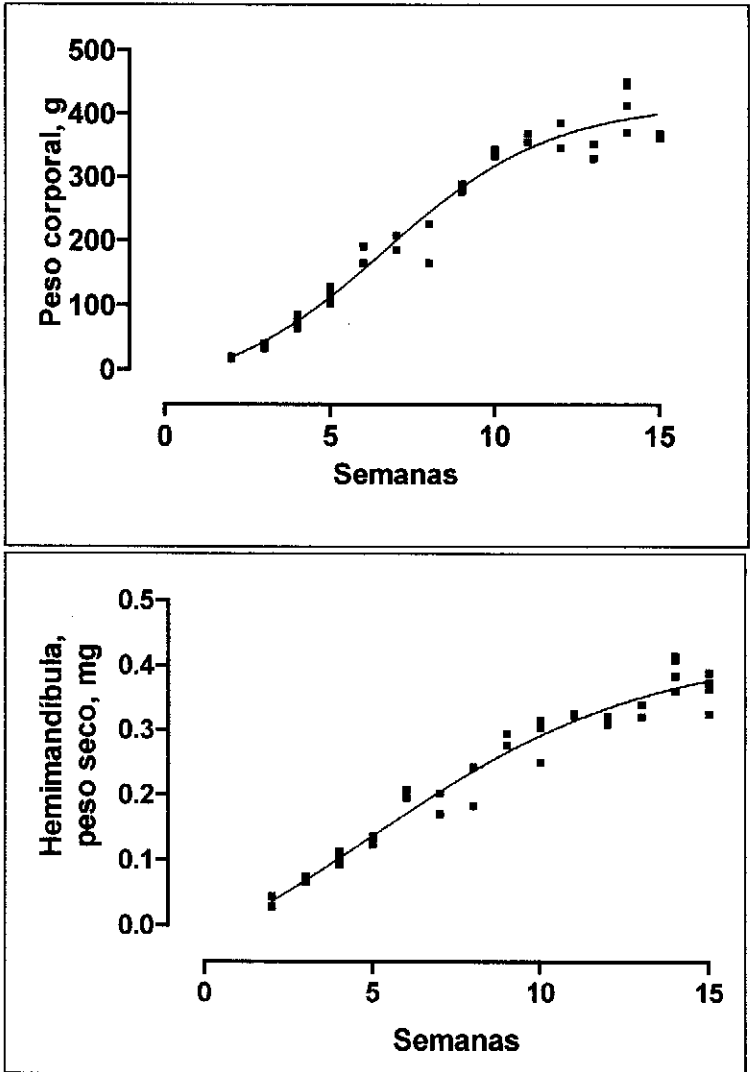


Figura 4.1. Panel superior: Evolución del peso corporal.
Panel Inferior: Evolución del peso seco de la hemimandíbula.

4.1.1.2. Tasa de crecimiento mandibular

Se calculó la tasa de crecimiento de la hemimandíbula como el aumento de peso seco (en mg) por semana. La Figura 4.2 revela que el máximo ocurre a la 6ª. semana, en coincidencia con los resultados de Locatto y col⁽⁶⁶⁾, obtenidos con la misma línea de ratas.

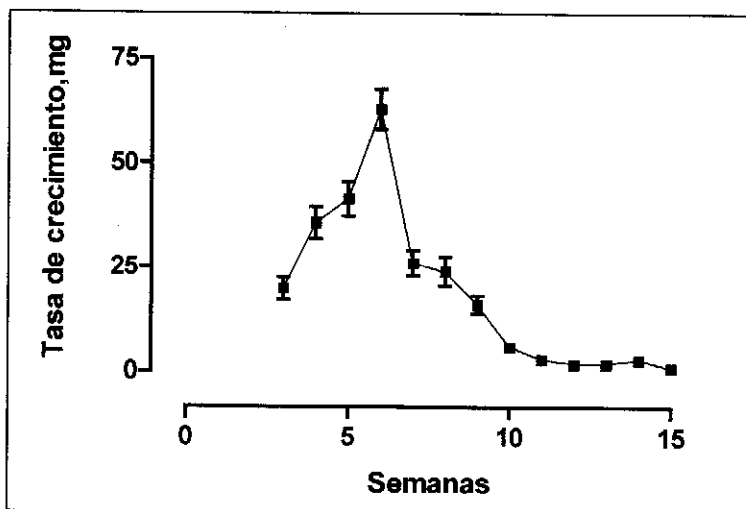


Figura 4.2. Tasa de crecimiento del peso seco de la hemimandíbula en función de la edad.

4.1.1.3. Relación peso mandibular / peso corporal

Tal como sucede en otras especies, la relación peso de la cabeza / peso corporal es mayor al nacimiento que cuando se alcanza la madurez. La Figura 4.3 muestra la relación existente entre el

4. Resultados

peso seco de la hemimandíbula (expresada como fracción del peso corporal) en función de la edad. La función de mejor ajuste es la función exponencial negativa de una sola fase (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Parámetros de la función de ajuste de la relación peso seco de la hemimandíbula (mg) por gramo de peso corporal en función de la edad.

	Relación hemimandíbula/ peso corporal (n=41)
Inicio, $t=0$, mg/g	2.913 ± 0.584
K , sem^{-1}	0.473 ± 0.081
Asíntota, mg/g	0.944 ± 0.044
$T_{1/2}$, sem	1.464
R^2	0.793

Los números indican la media \pm error estándar (número de animales).

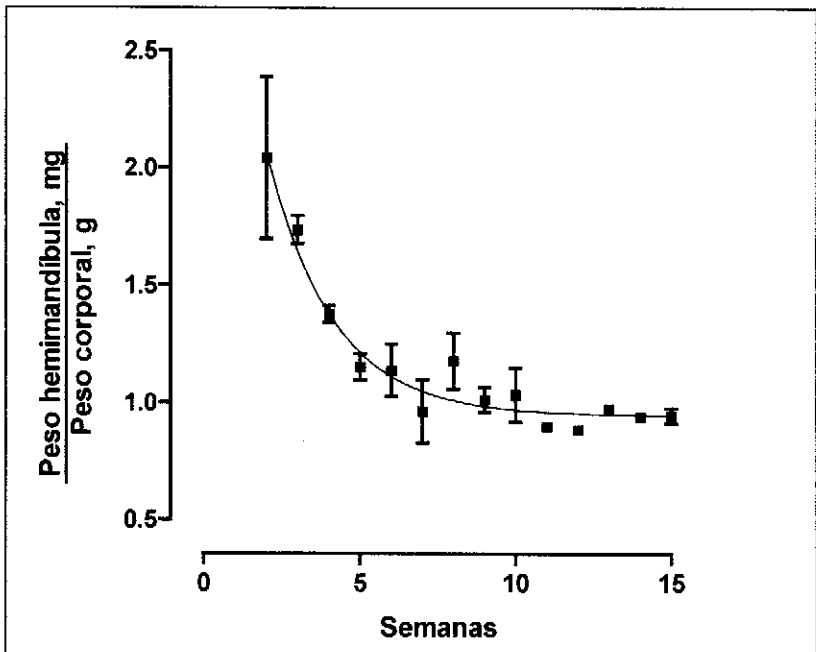


Figura 4.3. Relación del peso seco de la hemimandíbula al peso corporal.

4.1.1.4. Densidad y Volumen

Las radiografías de las hemimandíbulas muestran una importante actividad de modelación ósea. Por este motivo se midió el volumen de las mismas (Figura 4.4). Los datos se ajustan a la función sigmoidea de Boltzmann. Los parámetros de la función se exponen en la Tabla 4.3. Además, se calculó la densidad (definida como la relación peso/volumen) para cada hemimandíbula y los valores se ajustaron con la función de Boltzmann (Figura 4.5), cuyos parámetros se detallan en Tabla 4.3.

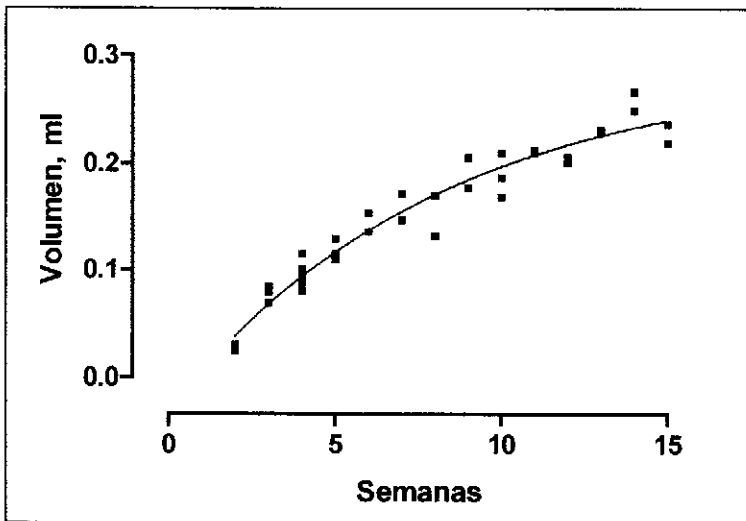


Figura 4.4. Volumen de la hemimandíbula en función de la edad.

4. Resultados

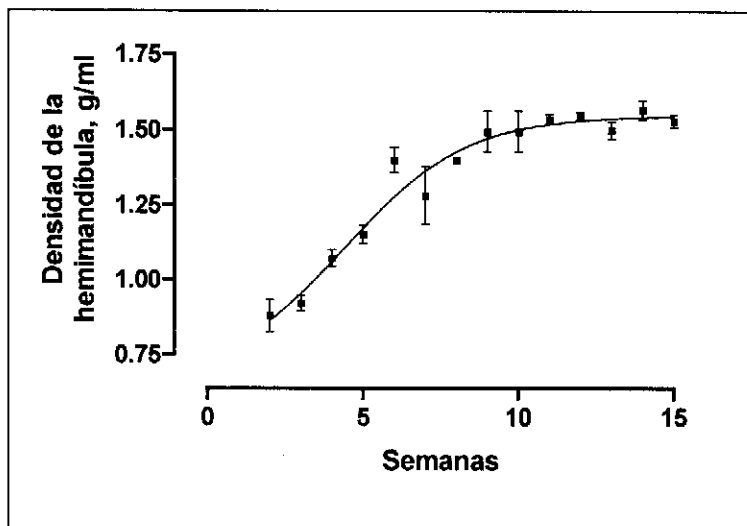


Figura 4.5. Evolución de la densidad de las hemimandíbulas en función de la edad.

Tabla 4.3. Parámetros de la función de ajuste del volumen y densidad de las hemimandíbulas en función de la edad.

	Volumen, ml (n=41)	Densidad, g/ml (n=41)
Punto de inflexión, sem	-19.15 ± 171	4.412 ± 0.871
Asíntota	0.286 ± 0.075	1.547 ± 0.024
Pendiente*	7.549 ± 9.138	1.939 ± 0.512
R ²	0.952	0.928

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Material y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media ± error estándar (número de animales).

4.1.1.5. Densidad mineral del hueso periodontal

La densidad mineral del hueso periodontal (estimada por densitometría) se ajustó con la función de Boltzmann (Figura 4.6). La densidad mineral ósea crece alcanzando un máximo a la 6ª semana y a partir de esa edad permanece estable. Los parámetros de la función se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Parámetros de la función de ajuste de la densidad mineral (mg/mm^2) del hueso periodontal de la hemimandíbula izquierda en función de la edad.

	Densidad mineral del hueso periodontal (n=37)
Asíntota, mg/mm^2	3.238 ± 0.27
V_{50}	4.56 ± 0.67
Pendiente*	0.401 ± 0.44
R^2	0.3053

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Material y Métodos- Técnicas estadísticas. Los números indican la media \pm error estándar (número de animales).

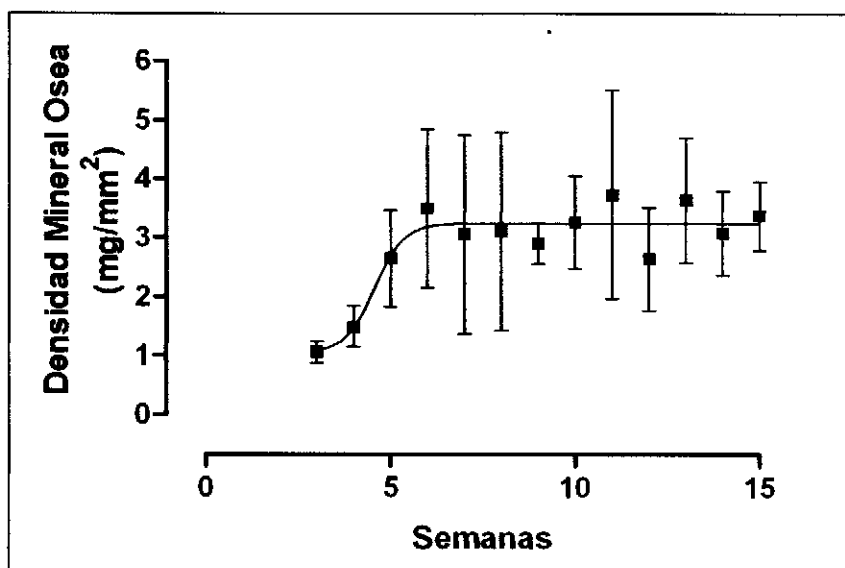


Figura 4.6. Evolución de la densidad mineral del hueso periodontal sano en función de la edad.

4.1.2. CRECIMIENTO DE LOS MOLARES

La enfermedad periodontal afecta las estructuras de soporte de las piezas dentarias. Esta patología se estudió en la zona de molares debido a las características especiales de la dentición de la rata.

4.1.2.1. Diámetro mesio-distal de las coronas

El diámetro mesio-distal de las coronas no se modificó en función de la edad (Figura 4.7), en concordancia con la característica monophiodonte de la especie. El diámetro del 1° molar es mayor que el del segundo y éste mayor que el del 3° molar (Tabla 4.5). El diámetro del 3° molar se pudo medir recién a la 4° semana, cuando se produce la erupción.

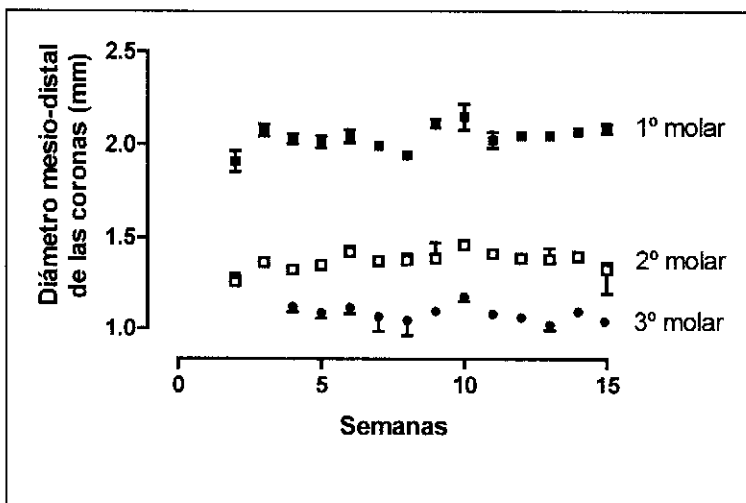


Figura 4.7. Evolución del diámetro de los molares.

Tabla 4.5. Diámetro medio-distal de las coronas del 1°, 2° y 3er molar.

	Longitud mesio-distal, mm	Comparaciones
Primer Molar (n=39)	2.036 ± 0.012	
Segundo Molar (n=39)	1.363 ± 0.0097	1er. vs. 2do. Molar: P< 0.0001
Tercer Molar (n=31)	1.119 ± 0.023	2do. Vs. 3er Molar P< 0.0001*

Los números indican la media ± error estándar (número de animales)

*Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch = 9.776, 40 GL, P<0.0001.

4.1.2.2. Densidad mineral de las coronas

La densidad mineral de las coronas se modifica en función de la edad (Figura 4.8). La cinética de este proceso no difiere significativamente entre el 1° y 2° molar cuya erupción se produce conjuntamente. La densidad mineral aumenta de la 3ª a la 6ª semana de edad en la que alcanza el plateau.

Como se dijo anteriormente, la erupción del tercer molar se produce tardíamente. El máximo de su densidad mineral es dos veces mayor que la del 1° y 2° molar. La tasa con que ocurre este proceso (de calcificación) es 4 veces más lenta que para los otros dos molares. La función de mejor ajuste es una exponencial positiva de una sola fase. Esta variable

mostró una gran variancia reflejada en la magnitud relativa del error estándar y el bajo valor del coeficiente de determinación (R^2 , Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Cinética de la calcificación de las coronas de los molares de la rata en función de la edad. Parámetros de la función de mejor ajuste.

	Primer Molar (n=40)	Segundo Molar (n=39)	Tercer Molar (n=29)
Plateau, mg/mm ²	2.706 ± 0.335	3.131 ± 0.380	6.492 ± 2.481
K, sem ⁻¹	0.482 ± 0.309	0.412 ± 0.214	0.106 ± 0.075
T _{1/2} , sem	1.435	1.684	6.528
R ²	0.077	0.125	0.307

Los números indican la media ± error estándar (número de animales)

4.1.2.3. Desgaste de las coronas en función de la edad

La masticación provoca la atrición de las superficies oclusales de las coronas de los molares como se observa en las Fotos 4.1.a, 4.1.b y Figura 4.9. La longitud ocluso-cervical de las coronas, medida en mm sobre las imágenes digitales de las radiografías, se ajusta a una función exponencial

4. Resultados

negativa de una sola fase cuyos parámetros se exhiben en la Tabla 4.7.

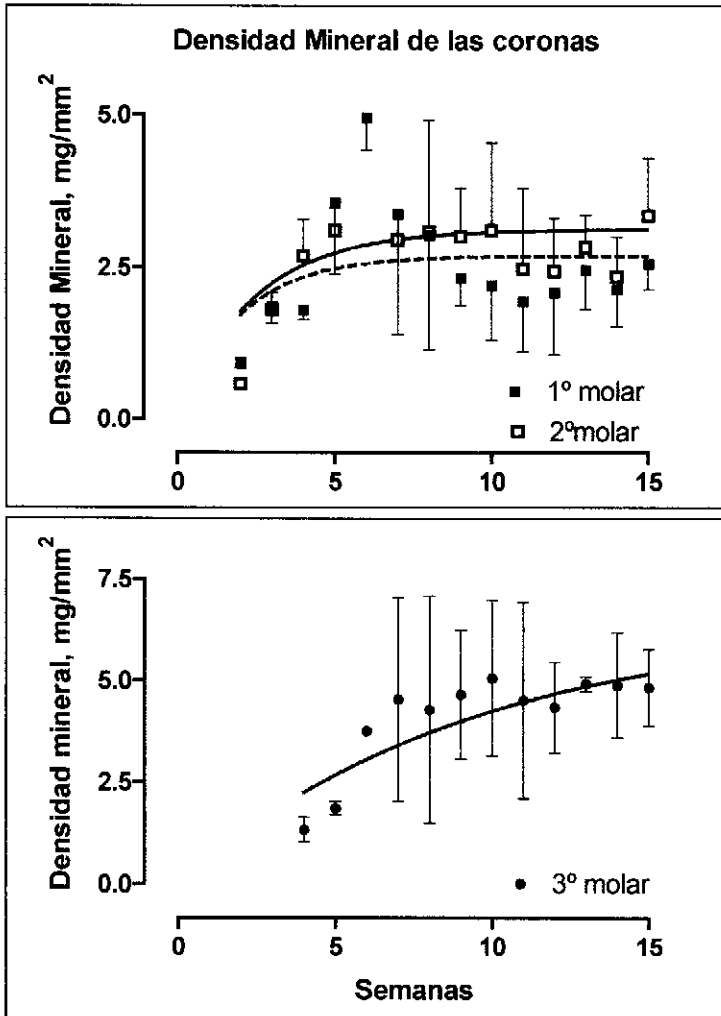


Figura 4.8. Densidad mineral de las coronas en función de la edad.

4. Resultados

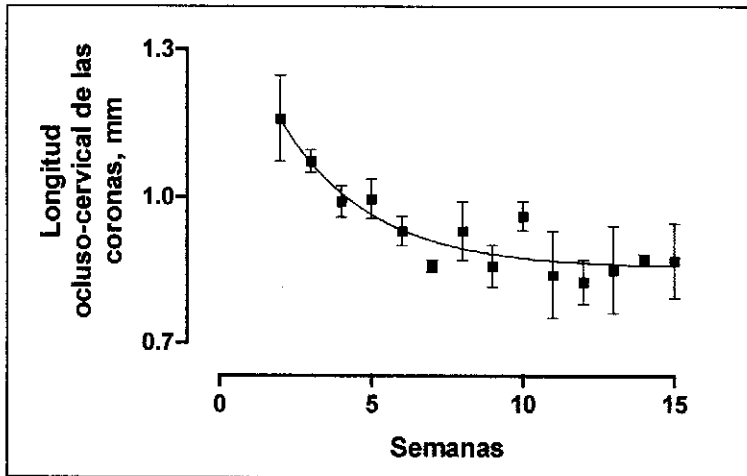


Figura 4.9. Atrición de las superficies oclusales de los molares. Altura ocluso-cervical de las coronas

Tabla 4.7. Parámetros de la cinética del desgaste coronario en función de la edad.

Asíntota, mm	0.854 ±0.021 (n=42)
K sem ⁻¹	0.34 ±0.10
T _{1/2} , sem	2.03
R ²	0.872

Los números indican la media ± error estándar
(número de animales)

4. Resultados



Foto 4.1.a. Vista de las superficies oclusales del primer y segundo molar de una rata de 3 semanas de edad. Nótese la ausencia del tercer molar cuya erupción aún no se ha producido.



Foto 4.1.b. Vista de las superficies oclusales de los molares de una rata de 15 semanas de edad. Nótese el desgaste de las cúspides y la diferencia en el diámetro mesio-distal de las coronas de los molares.

4.1.2.4. Crecimiento radicular en función de la edad

Se midió la longitud ápico-cervical de la raíz distal del 1° molar (que se tomó como ejemplo de esta variable para todos los molares (ver Materiales & Métodos)) sobre las imágenes digitales de las placas radiográficas. Tal como era de esperar, esta longitud expresada en mm, sigue una función exponencial de una sola fase como se observa en la Figura 4.10. En la Tabla 4.8 se exhiben los parámetros de la cinética del proceso.

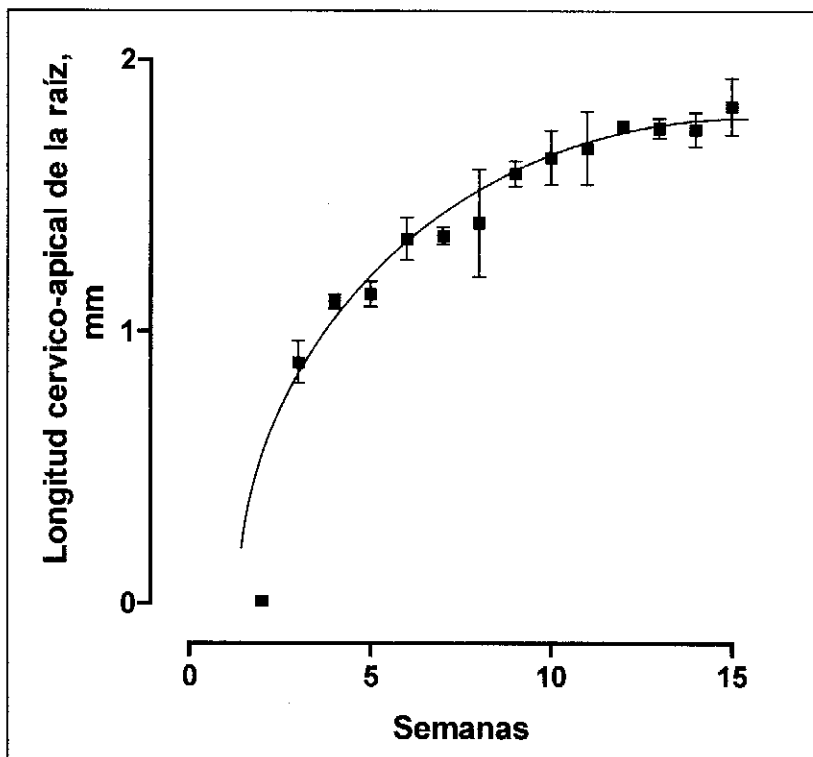


Figura 4.10. Cinética del crecimiento de la raíz distal del primer molar en función de la edad.

4. Resultados

Tabla 4.8. Parámetros de la cinética del crecimiento de la raíz distal del primer molar en función de la edad.

Asíntota, mm	2.0 ±0.19 (n=42)
K, sem ⁻¹	0.157 ±0.034
T _{1/2} , sem	4.4
R ²	0.8841

Los números indican la media ± error estándar (número de animales)

4.2. CARACTERIZACION Y DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD

PERIODONTAL ESPONTANEA EN LA RATA

La evolución de la enfermedad periodontal espontánea de la rata en función de la edad se investigó con las siguientes técnicas:

4.2.1. DENSITOMETRÍA ÓSEA: Análisis de las imágenes digitales de las radiografías correspondientes con el objeto de identificar y caracterizar áreas en reabsorción y medir la densidad ósea de las mismas.

4.2.2. MEDICIÓN DE LA DISTANCIA DESDE EL LÍMITE AMELO-CEMENTARIO A LA CRESTA ÓSEA ALVEOLAR (LAC-COA), en mm.

4.2.3. ESTIMACIÓN DEL HUESO PERIODONTAL DE SOPORTE (HPS), expresado como porcentaje radicular insertado en el hueso alveolar (ver Materiales & Métodos).

4.2.4. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

4.2.5. ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS: En esta Tesis, no se efectuaron estudios microbiológicos longitudinales de la población bacteriana bucal de la rata. Se analizó el alimento comprobándose que el mismo contiene pocos gérmenes de la especie bacillus, no agresivos. Los cultivos para gérmenes anaeróbicos fueron negativos.

4.2.1. TÉCNICA DE DENSITOMETRÍA RADIOLÓGICA

4.2.1.1. Número de focos de reabsorción

Sobre las imágenes digitales de las radiografías se contaron los focos interproximales e interradiculares, identificables por su radio-lucidez (ver Materiales & Métodos). El análisis de dichas imágenes revela que los focos de reabsorción ósea aparecen a la 4^a. semana de edad, una semana después del destete. El número de focos aumenta a expensa de los focos interradiculares. El número de focos interproximales se mantiene constante en 2, debido a que hay sólo 2 puntos de contacto entre los tres molares. La evolución del total del número de focos llega a un plateau en 5, a la 6^a ó 7^a semana de edad (Figura 4.11). El mejor ajuste se obtiene con la función sigmoidea de Boltzmann cuyos parámetros se muestran en la Tabla 4.9.

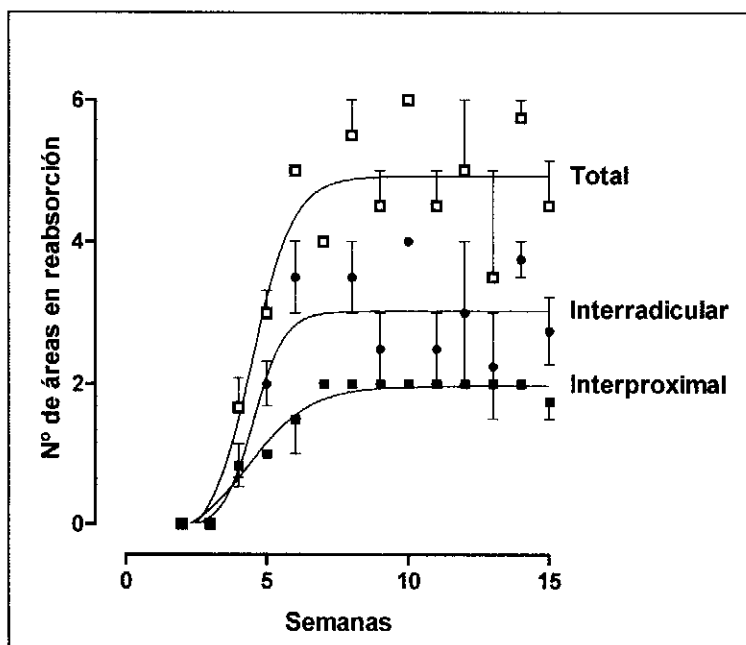


Figura 4.11. Cinética de la aparición de focos en reabsorción.

Tabla 4.9. Parámetros de la función de ajuste de la cinética del número de focos en reabsorción en función de la edad.

	Interproximal (n=41)	Interradicular (n=41)	Total (n=41)
Punto de inflexión, sem	4.3 ± 0.4	4.5 ± 0.3	4.4 ± 0.3
Asíntota, número	1.9 ± 0.06	3.0 ± 0.16	4.9 ± 0.2
Pendiente*	1.1 ± 0.33	0.54 ± 0.25	0.74 ± 0.28
R ²	0.88	0.80	0.98

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Material y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media \pm error estándar. (Número de animales).

4.2.1.2. Área total en reabsorción

El área total en reabsorción, medida en mm^2 en proyección vestibulo-lingual, aumenta de la 3ª. a la 6ª. semana de edad alcanzando el plateau en ese momento (Figura 4.12). La función de mejor ajuste es la de Boltzmann cuyos parámetros se muestran en la Tabla 4.10. Puede observarse gran variancia de esta variable en la población debido, en parte, a la imprecisión impuesta por la técnica utilizada (ver Materiales & Métodos).

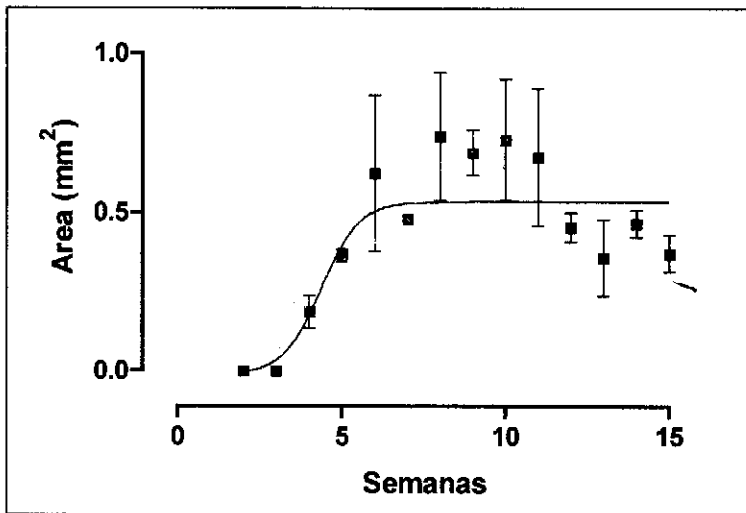


Figura 4.12. Evolución del área total de hueso periodontal en reabsorción.

Tabla 4.10. Parámetros de la función de ajuste de la cinética del área total en reabsorción en función de la edad.

	Area, mm ² (n=38)
Punto de inflexión, sem	4.367 ± 0.5141
Asíntota, mm ²	0.5353 ± 0.0379
Pendiente *	0.5761 ± 0.3716
R ²	0.4932

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Material y Métodos-Técnicas estadísticas. Los números indican la media ± error estándar (Número de animales).

4.2.1.3. Densidad mineral del hueso periodontal

La densidad mineral del hueso periodontal normal aumenta entre la 3^a. y 6^a. semana siguiendo una función sigmoidea. A partir de la 6^a. semana alcanza el plateau. El hueso periodontal en reabsorción no tiene una tendencia definida entre la 6^a. y 15^a. semana de edad (Figura 4.13). La Tabla 4.11 muestra los valores promedio de esta variable.

4. Resultados

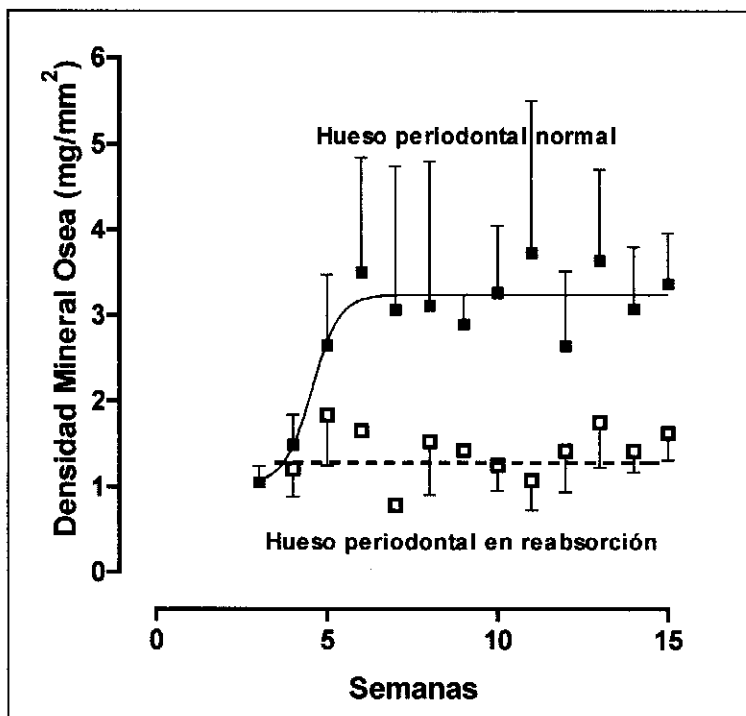


Figura 4.13. Evolución de la densidad mineral del hueso periodontal sano y en reabsorción.

Tabla 4.11. Densidad mineral del hueso periodontal entre la 6ª y 15ª semana de edad.

	Hueso periodontal sin patología	Hueso periodontal en reabsorción	P
D.M.O., mg/mm ²	3.24 ± 0.27 (n=32)	1.43 ± 0.12 (n=32)	*

*Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch= 6.12, 42 GL, P<0.0001.

La densidad mineral ósea del hueso periodontal normal sigue una función sigmoidea con los siguientes parámetros: inicio: 1.04±0.91, Plateau: 3.24±0.27, V50: 4.56±0.67, Pendiente: 0.40±0.44

Los números indican la media ± error estándar. (Número de animales).

Por unidad de área de proyección, las áreas en reabsorción pierden, en promedio, un 56% del mineral del hueso periodontal normal (Figura 4.14).

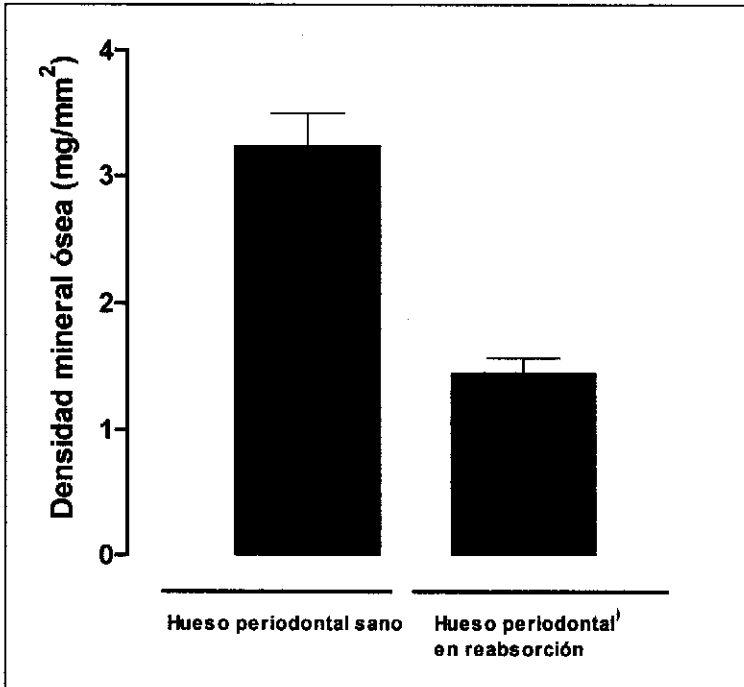


Figura 4.14. Densidad mineral ósea periodontal, ratas de 6 a 15 semanas de edad.

4.3.2. MEDICIÓN DE LA DISTANCIA DESDE EL LÍMITE AMELO-CEMENTARIO A LA CRESTA ÓSEA ALVEOLAR (LAC-COA)

La distancia desde el límite amelo-cementario a la cresta ósea alveolar en ambas caras (vestibular y lingual) de cada molar se midió al microscopio, sobre

las hemimandíbulas teñidas con azul de metileno (ver Materiales & Métodos). La distancia es mayor en la vista lingual que en la vestibular para los tres molares. Como se observa en la Figura 4.15, la función de mejor ajuste es la exponencial positiva de una sola fase. La Tabla 4.12 muestra los parámetros de dicha función.

Tabla 4.12. Parámetros de la cinética de las modificaciones de la distancia desde el límite amelocementario a la cresta ósea alveolar en función de la edad.

		Plateau, mm	K, sem ⁻¹	Vida media, sem	R ²
1er molar	Lingual (n=111)	1.211 ± 0.14	0.112 ± 0.024	6.2	0.499
	Vestibular (n=111)	0.418 ± 0.02	0.182 ± 0.027	3.8	0.378
2do molar	Lingual (n=80)	0.659 ± 0.05	0.185 ± 0.029	3.8	0.496
	Vestibular (n=80)	0.501 ± 0.09	0.111 ± 0.037	6.3	0.371
3er molar	Lingual (n=57)	0.753 ± 0.11	0.109 ± 0.029	6.3	0.530
	Vestibular (n=57)	0.376 ± 0.08	0.115 ± 0.052	6.0	0.229

Los números indican la media ± error estándar.
(Número de animales).

4. Resultados

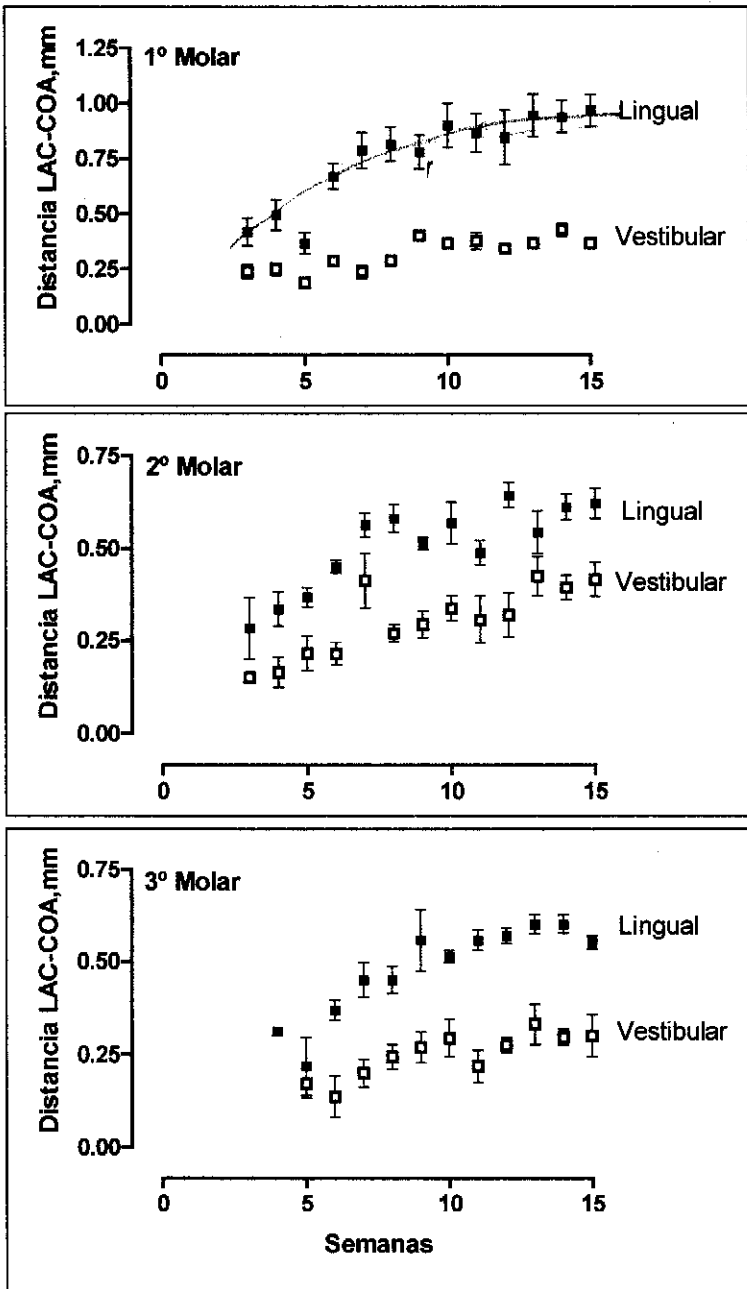


Figura 4.15. Cinética de la modificación de la distancia LAC-COA en las caras libres de los molares.

4.2.3. ESTIMACIÓN DEL HUESO PERIODONTAL DE SOPORTE (HPS).

PÉRDIDA ÓSEA EN LAS CARAS PROXIMALES DE LOS MOLARES

Se midió la distancia, en mm, desde el límite amelo-cementario al ápice y desde dicho límite al piso del defecto óseo sobre las imágenes digitales de las placas radiográficas (ver Materiales & Métodos). Las longitudes se expresaron como porcentaje de raíz insertada en el hueso alveolar. La cinética del HPS en las tres raíces (mesial, media y distal) del 1° molar sigue una función lineal cuya pendiente no discrepa de cero. La inserción promedio es del 60% (Figura 4.16).

La cinética de este proceso en el 2° y 3° molar muestra una curva bifásica para todas las raíces (Figura 4.17 y 4.18). El porcentaje radicular insertado decae de la 3ª a la 7ª semana de edad desde valores promedio de 75% a 45% y a partir de esa edad aumenta hasta llegar al valor inicial hacia la 15ª semana. En la Tabla 4.13 se muestra el rango del porcentaje radicular insertado en el hueso alveolar para cada molar.

4. Resultados

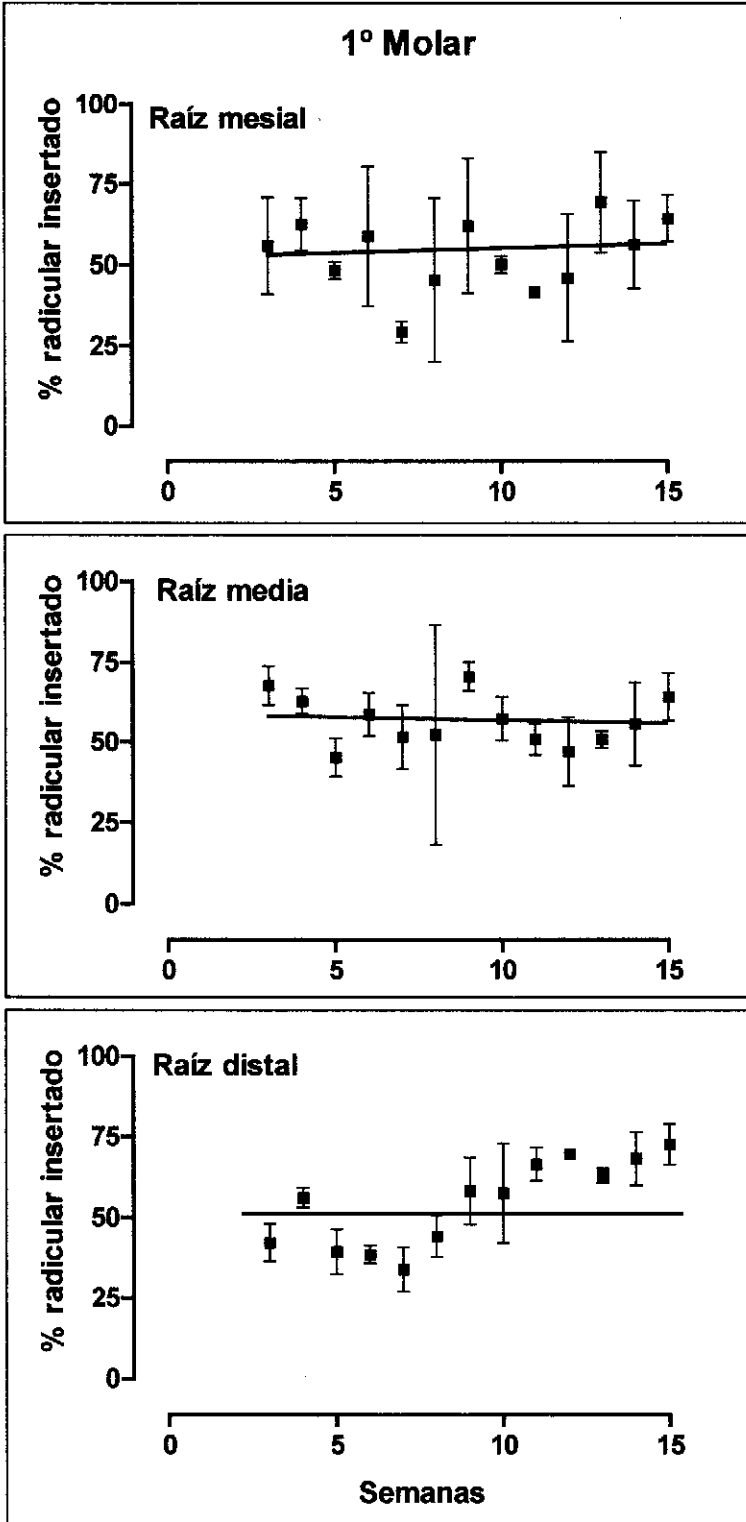


Figura 4.16. Hueso periodontal de soporte de las raíces del primer molar inferior.

4. Resultados

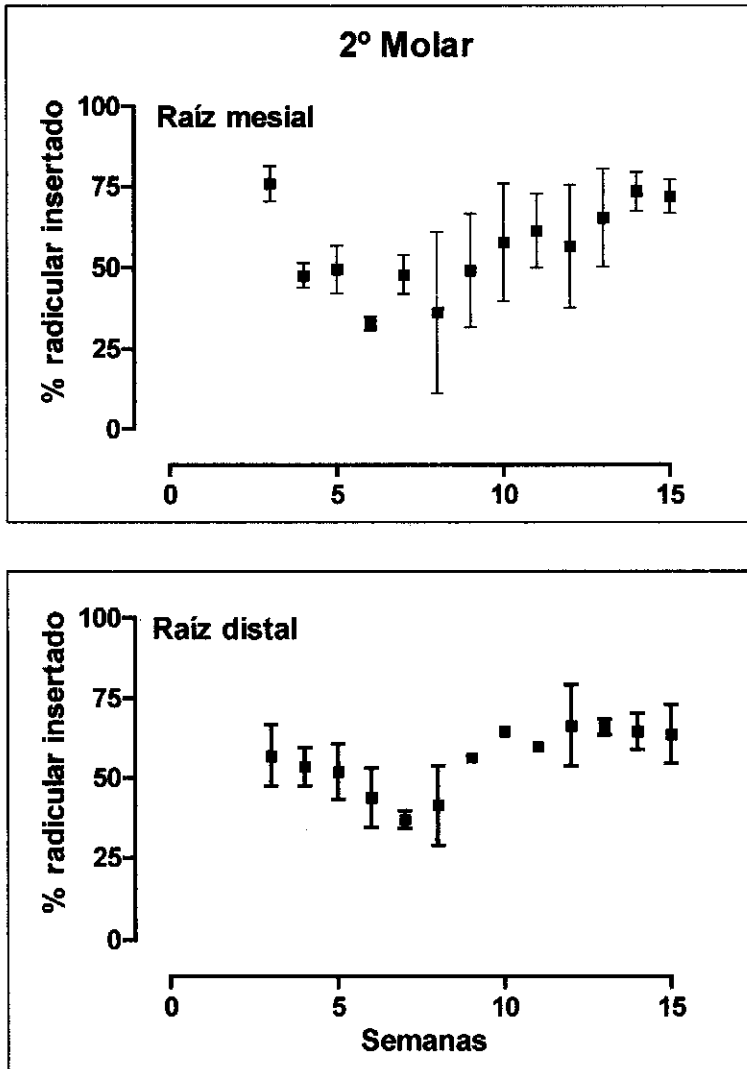


Figura 4.17. Hueso periodontal de soporte de las raíces, segundo molar inferior.

4. Resultados

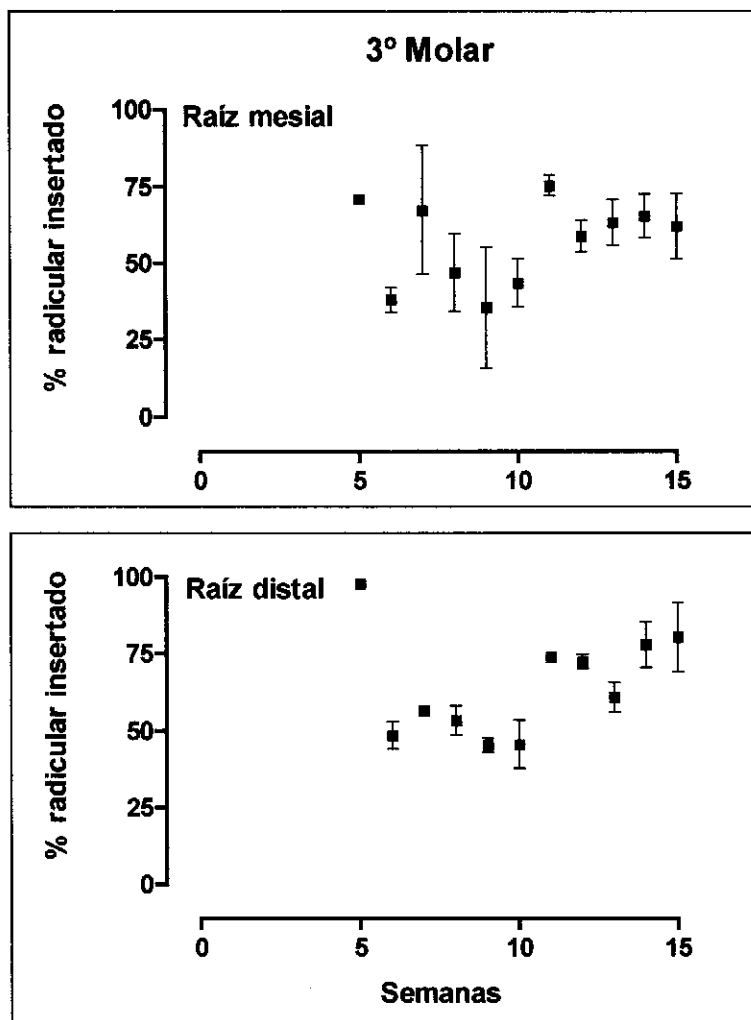


Figura 4.18. Hueso periodontal de soporte de las raíces, tercer molar inferior.

Tabla 4.13. Rangos del porcentaje de la longitud radicular insertada en el hueso alveolar.

	1er molar	2do molar	3er molar
Raíz mesial	23.7-80.4 (n=39)	11.3-87.6 (n=38)	15.8-88.5 (n=25)
Raíz media	20.8-86.7 (n=39)		
Raíz distal	17.1-81.4 (n=39)	23.8-91.2 (n=38)	37.7-100.0 (n=25)

Los números indican la media \pm error estándar.
(Número de animales)

Con el fin de obtener una explicación sobre el carácter bifásico de la curva, se midió el crecimiento: a) de la longitud cervico-apical de la raíz y b) de la longitud vertical de las áreas en reabsorción en función del tiempo. Ambas longitudes, expresadas en mm, siguen una función exponencial positiva de una sola fase como se observa en las Figuras 4.19 y 4.20. La diferencia entre ambas medidas elimina del cálculo los fenómenos de erupción de los molares y atrición de las superficies oclusales. Los parámetros de la cinética de dichos procesos se muestran en las Tablas 4.14 y 4.15.

4. Resultados

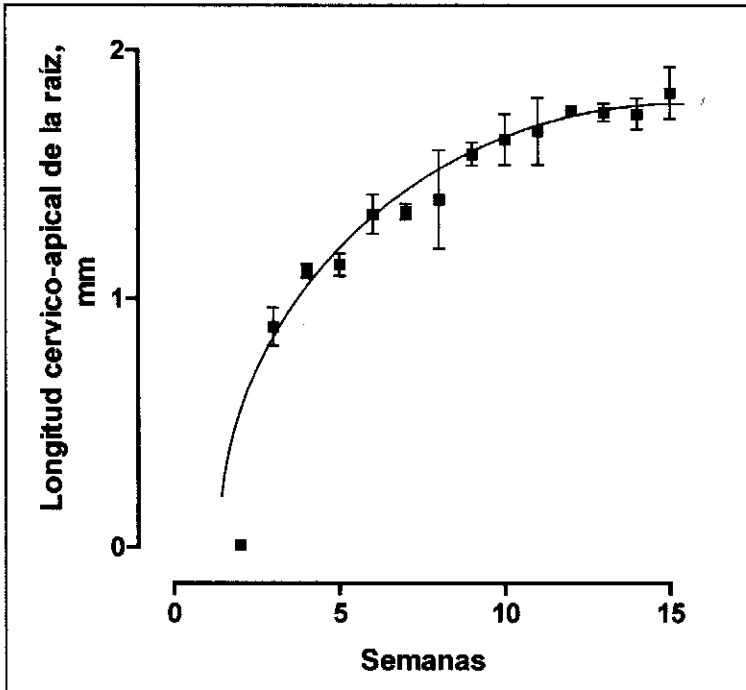


Figura 4.19. Cinética del crecimiento de la longitud radicular del primer molar en función del tiempo.

Tabla 4.14. Parámetros del crecimiento de la longitud radicular (1er. Molar, raíz distal) en función de la edad.

	Raíz distal 1er. Molar (n=42)
Plateau, mm	2.03±0.2
K, sem ⁻¹	0.157±0.034
Vida media, sem	4.4
R ² = 0.884	

Los números indican la media ± error estándar.
(Número de animales).

4. Resultados

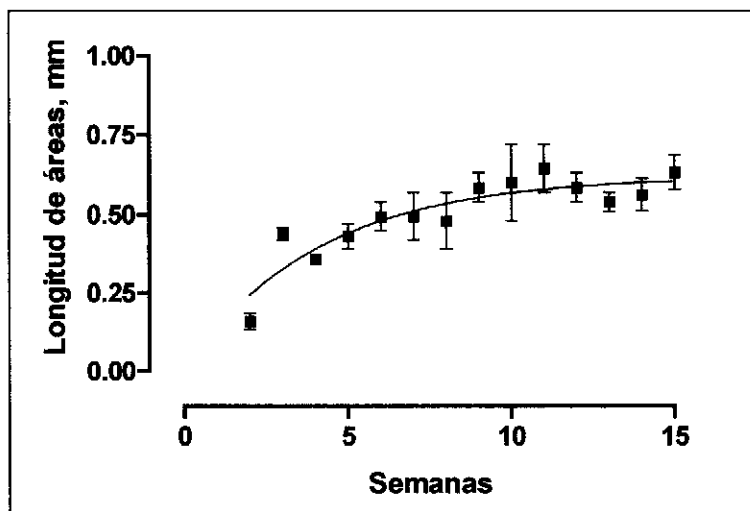


Figura 4.20. Cinética del crecimiento de la longitud vertical del área en reabsorción interproximal entre el 1° y 2° molar.

Tabla 4.15. Parámetros de la cinética del crecimiento de la altura del área en reabsorción interproximal entre el 1° y 2° molar (longitud vertical).

	Altura total del área en reabsorción incluyendo el espacio interproximal (n=42)	Altura neta del área en reabsorción (n=42)
Plateau, mm	0.619±0.033	0.514±0.076
K, sem ⁻¹	0.250±0.043	0.149±0.048
Vida media, sem	2.7	4.6
R ²	0.831	0.790

Los números indican la media ± error estándar.
(Número de animales)

4. Resultados

Descartando los fenómenos de erupción y de atrición de las superficies oclusales y analizando la variable HPS de la 3^a.- 7^a. y de la 7^a.- 15^a. semana de edad por separado, se observa que la curva de mejor ajuste es la exponencial negativa de una sola fase (Figura 4.21), expresando a la variable como porcentaje de pérdida ósea/ total de la longitud radicular. Los parámetros de la cinética de este proceso se exhiben en la Tabla 4.16.

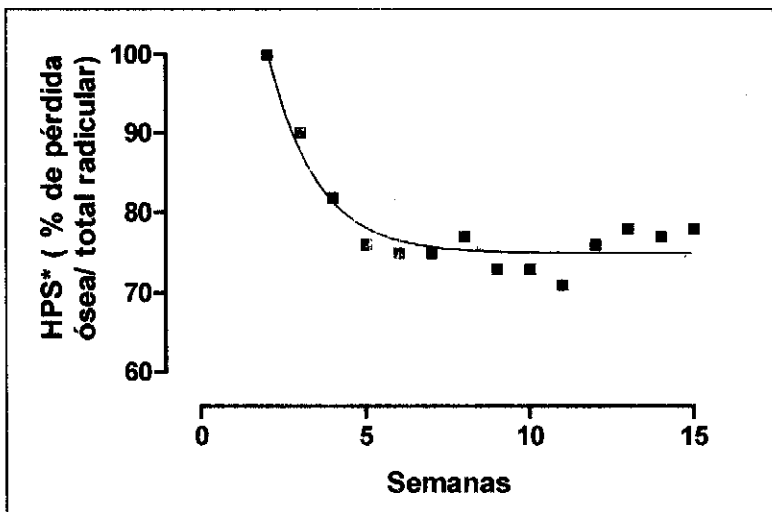


Figura 4.21. Cinética del porcentaje radicular insertado en el hueso alveolar.

4. Resultados

Tabla 4.16. Parámetros de la cinética de la modificación de la fracción radicular insertada en el hueso alveolar (n=42).

Inicio a t=0, %	104.4±33.7
K, sem ⁻¹	0.70±0.14
Plateau, %	74.9±0.9
Vida media, sem	0.99
R ²	0.92

Los números indican la media ± error estándar.
(Número de animales).

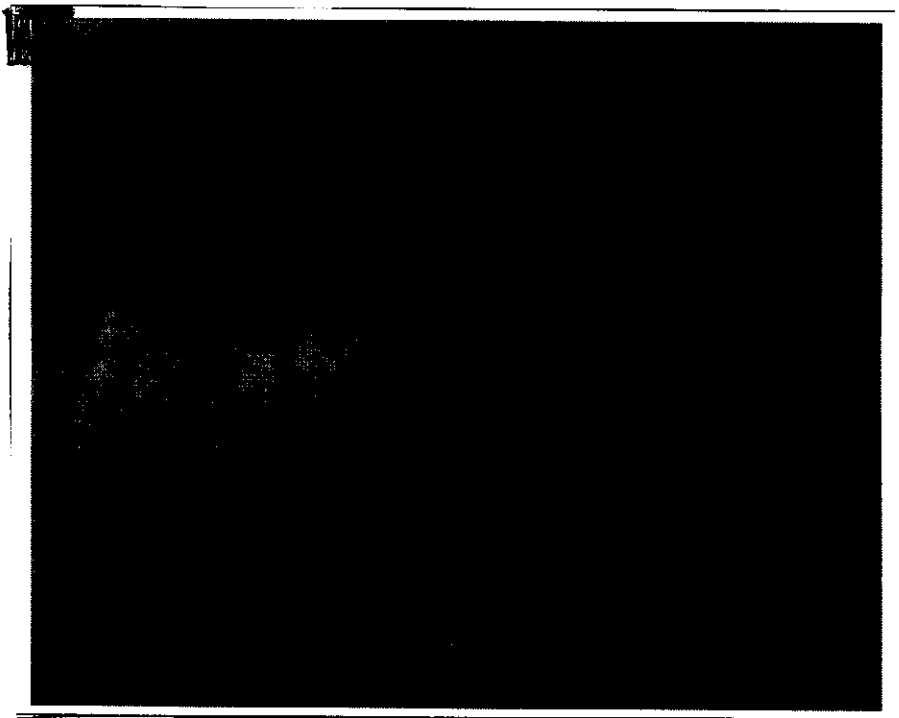


Figura 4.22.a. Radiografía de la hemimandíbula de una rata de 3 semanas de edad. Nótese que las raíces y el hueso alveolar de soporte del primer y segundo molar están limitadas por el incisivo.

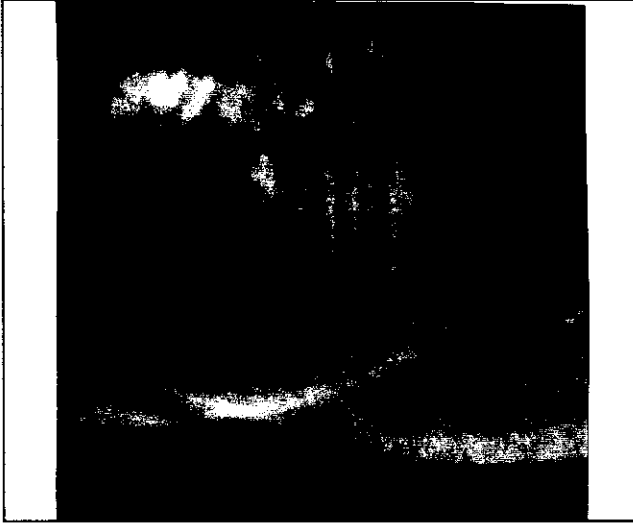


Figura 4.22.b. Radiografía de la hemimandíbula de una rata de 15 semanas de edad. Nótese que las raíces y el hueso alveolar de soporte de los molares se han desarrollado simultáneamente. La comparación de las coronas con las de la Figura 4.22.a permite apreciar el desgaste de las cúspides.

4.2.4. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

4.2.4.1. Observaciones a las 4 semanas de edad

En la zona de contacto entre la corona y la encía se observan cúmulos de células mononucleadas en las cercanías del surco gingival (Foto 4.2.a.) indicadores de la inflamación o del inicio de la inflamación de origen bacteriano. En la zona del ligamento periodontal también se observan cúmulos de células mononucleadas cercanas a zonas de reabsorción de hueso alveolar (Foto 4.2.b). La identificación de las células mononucleadas mediante técnicas de inmunohistoquímica estuvo fuera de los

alcances de esta Tesis y de los medios de este laboratorio.

En el extremo apical de la raíz de un corte histológico de un molar se observó el depósito de cemento, compensador del desgaste por atrición y consecuente con la actividad remodeladora en el hueso alveolar (Foto 4.2.c).

Del análisis de las imágenes histológicas de ratas de cuatro semanas de edad se deduce que el hueso alveolar exhibe una elevada tasa de remodelación ósea, como lo revelan los túneles de reabsorción osteoclástica normales a la superficie de la raíz (Fotos 4.2.d, 4.2.e y 4.2.f), en concordancia con la edad de la rata caracterizada por una alta tasa de crecimiento (ver Figuras 4.1 y 4.2).

4.2.4.2. Observaciones a las 19 semanas de edad

Cuando se analizaron histológicamente las hemimandíbulas de animales de 6, 12 y 19 semanas de edad, imaginando encontrar un aumento progresivo en la intensidad de la enfermedad periodontal, no se observaron cúmulos de células mononucleadas (Foto 4.2.g) y la imagen histológica del hueso alveolar continuó mostrando intensa actividad metabólica reabsortiva en ausencia de células mononucleadas en

4.Resultados

la proximidad (Foto 4.2.h) y curiosamente, sin actividad de formación ósea (Fotos 4.2.i y 4.2.j). Estas imágenes son contemporáneas con las de la presencia de placa bacteriana (Foto 4.2.k).

Se discute más abajo, como hipótesis, que lo anterior es evidencia indirecta de tolerancia inmunológica a los gérmenes de la placa.

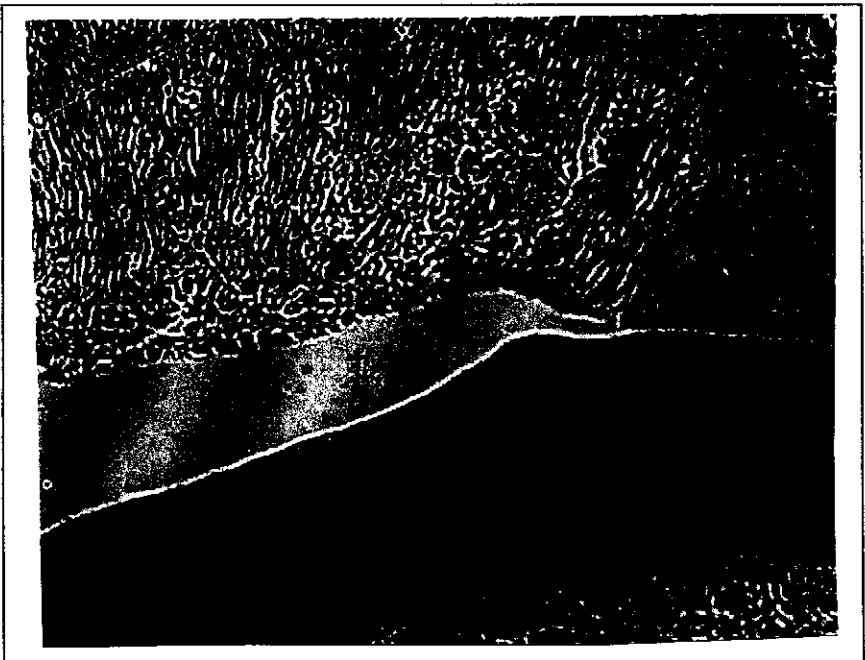


Foto 4.2.a. Corte histológico de un molar de rata hembra de 4 semanas de edad. Obsérvese la intensa reabsorción ósea y la acumulación de células mononucleadas en la zona del surco gingival.

4. Resultados



Foto 4.2.b. Corte histológico de un molar de rata hembra de 4 semanas de edad. Obsérvense los cúmulos de células mononucleadas en el ligamento periodontal y los túneles de reabsorción en el hueso alveolar.



Foto 4.2.c. Corte histológico del extremo apical de la raíz de un molar de rata hembra de 4 semanas de edad. Nótese el depósito de cemento compensador del desgaste por atrición.

4. Resultados



Foto 4.2.d. Corte histológico de un molar de rata hembra de 4 semanas de edad. Obsérvense las células mononucleadas en el ligamento periodontal.

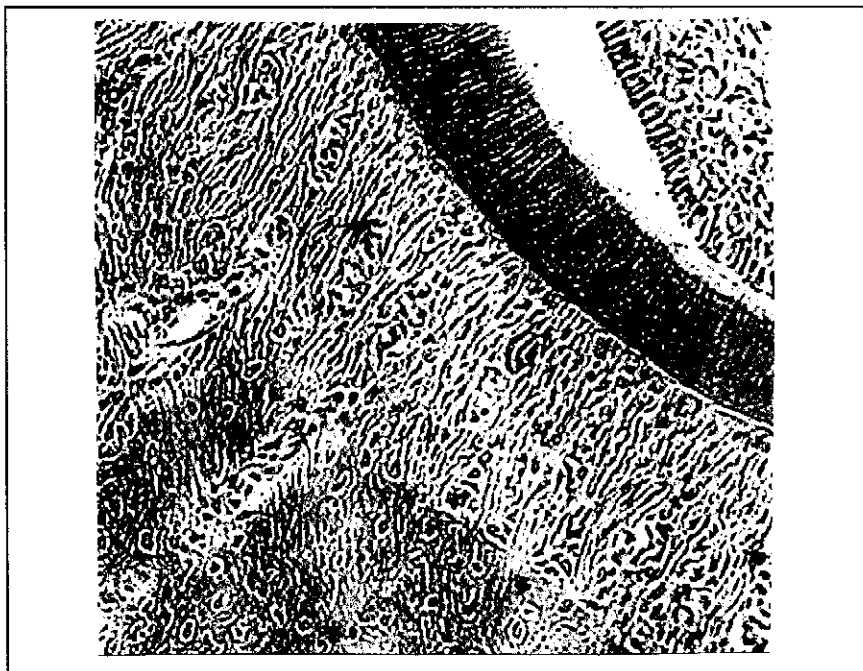


Foto 4.2.e. Corte histológico de un molar de rata hembra de 4 semanas de edad. Obsérvense los túneles de osteoclasia en el hueso trabecular, dispuestos perpendicularmente a la superficie de una raíz.

4.Resultados



Foto 4.2.f. Corte histológico de un molar de rata hembra de 4 semanas de edad. Túneles de reabsorción osteoclástica en el hueso alveolar.



Foto 4.2.g. Corte histológico de un molar de rata hembra de 19 semanas de edad. Hueso alveolar interradicular fracturado (flecha). No se observan células mononucleadas en el espacio ocupado por el ligamento periodontal.

4. Resultados



Foto 4.2.h. Corte histológico de un molar de rata hembra de 19 semanas de edad. Túneles de reabsorción (flechas) del hueso alveolar en ausencia de células mononucleadas en la proximidad.

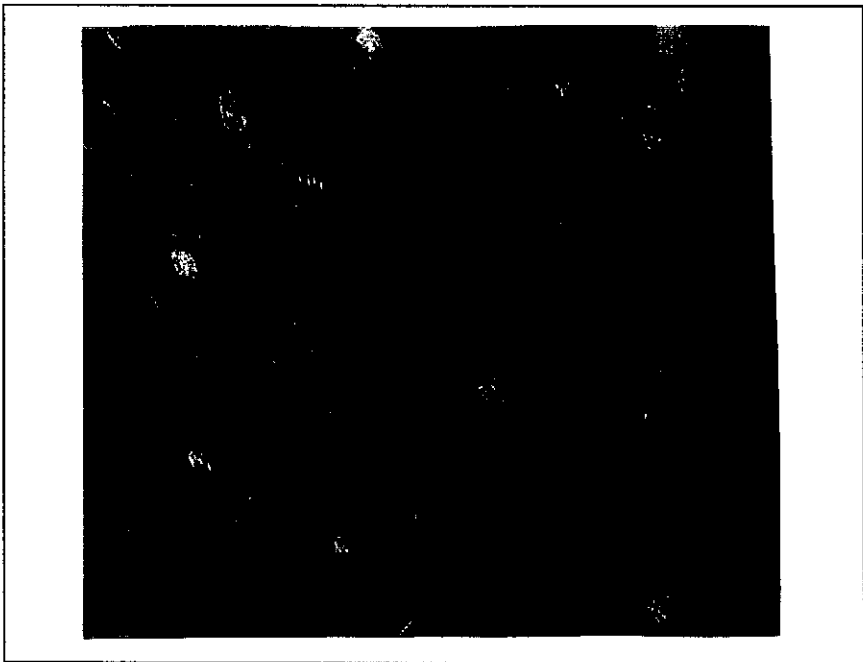


Foto 4.2.i. Corte histológico de un molar de rata hembra de 19 semanas de edad. Túneles de reabsorción del hueso trabecular sin evidencia de formación.

4. Resultados



Foto 4.2.j. Corte histológico de un molar de rata hembra de 19 semanas de edad. Túneles de reabsorción del hueso trabecular sin evidencia de formación.



Foto 4.2.k. Molares de rata hembra de 19 semanas de edad. Tinción in vivo con eritrosina. Nótese la acumulación de placa bacteriana en el surco gingival (flecha blanca) y la zona interproximal (flecha azul).

II- RATAS DIABÉTICAS

Animales

Los animales cuyas glucemias matinales superaron los 300 mg/dl, una semana después de la inyección intraperitoneal de aloxano (ver Materiales & Métodos) fueron seleccionados para efectuar las observaciones que se describen a continuación. A partir de ese momento fueron sacrificados a las edades indicadas en las Figuras. Al sacrificio, sus glicemias oscilaban entre 312 y 1970 mg/dl¹.

4.3. CRECIMIENTO CORPORAL Y MANDIBULAR EN EL ESTADO DIABÉTICO

4.3.1. Peso corporal

El peso corporal de los animales diabéticos evoluciona con cinética semejante a la de los controles. La función de mejor ajuste es la sigmoidea de Boltzmann (Figura 4.23). Comparando la asíntota de peso de ambos grupos, se observa que los animales diabéticos pesan en promedio 172.6 g menos que los controles. Los parámetros de esta variable se exhiben en la Tabla 4.17.

¹ Este rango de valores implica, en principio, que no todos los animales padecieron estados diabéticos de igual intensidad. Experimentos anteriores (Loccato & col, 1993) habían demostrado que no obstante ese detalle, los animales diabéticos se diferencian netamente de los controles. Los experimentos se habrían encarecido al seleccionar animales con un estrecho rango de glucemias

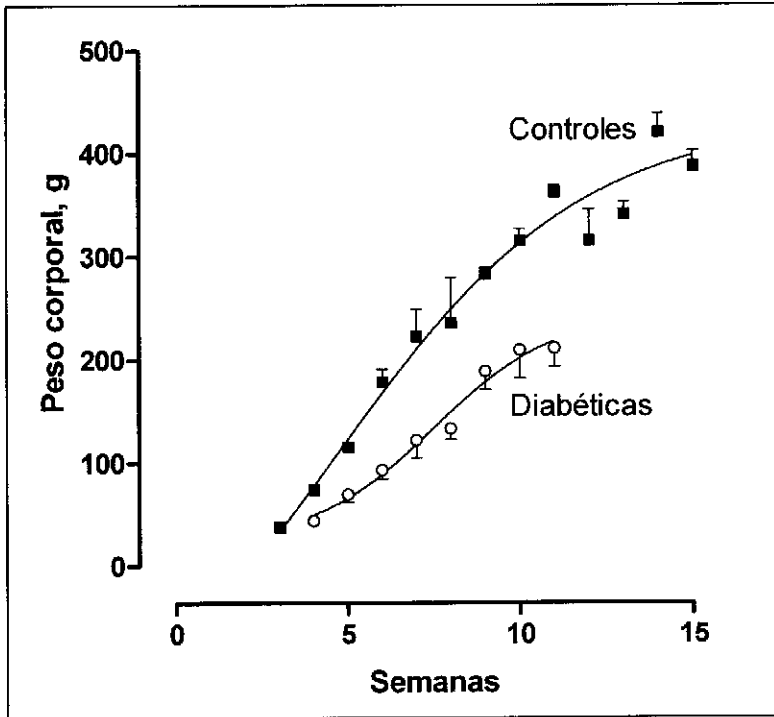


Figura 4.23. Evolución del peso corporal de ratas diabéticas comparado con las controles.

Tabla 4.17. Parámetros de la función de ajuste del peso corporal (gr) de animales diabéticos y controles en función de la edad.

	Controles (n=43)	Diabéticas (n=37)	P
Asíntota, gr.	417.1 ± 20.51	244.5 ± 59.38	0.0087
V ₅₀	6.704 ± 0.517	7.535 ± 0.873	n.s
Pendiente*	2.568 ± 0.516	1.738 ± 1.327	n.s
R ²	0.9687	0.7346	

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Material y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s. = diferencia no significativa.

Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch. Asíntota: $t=2.747$, 44 GL, $P=0.0087$; V₅₀: $t=0.82$, 59 GL, $P=0.416$; Pendiente: $t=0.583$, 46GL, $P=0.569$.

4.3.2. Relación peso hemimandibular / peso corporal

La pérdida de peso corporal producida por el estado diabético (no obstante la hiperfagia de los animales afectados) produjo una relación entre peso de la hemimandíbula / peso corporal superior a la de los controles. Los valores se ajustaron con la función exponencial negativa de una sola fase (Figura 4.24), cuyos parámetros se detallan en la Tabla 4.18.

Tabla 4.18. Parámetros de la función de ajuste de la relación peso seco de la hemimandíbula (mg) por gramo de peso corporal en función de la edad, en ratas controles y diabéticas.

	Controles (n=41)	Diabéticas (n=37)	P
Inicio, t=0, mg/g	2.913 ± 0.584	3.703 ± 2.269	n.s
K, sem ⁻¹	0.473 ± 0.081	0.317 ± 0.180	n.s
Asíntota, mg/g	0.944 ± 0.044	1.165 ± 0.233	n.s
T _{1/2} , sem	1.464	2.186	
R ²	0.793	0.507	

Los números indican la media ± error estándar (Número de animales). n.s.= diferencia no significativa. Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch. Asíntota: t=0.932, 38 GL, P=0.357; K: t=0.79, 50 GL, P=0.433; Inicio: t=0.337, 40GL, P=0.738.

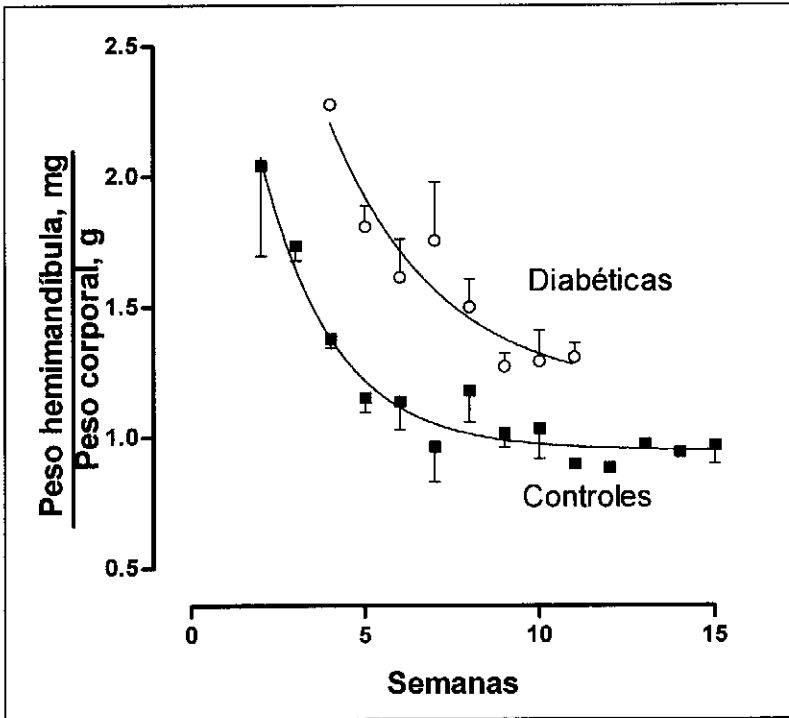


Figura 4.24. Evolución de la relación peso seco de la hemimandíbula / peso vivo, ratas diabéticas y controles.

4.3.3. Peso seco y volumen mandibular

No obstante lo expuesto, no se observaron diferencias significativas en el peso seco y el volumen de la hemimandíbula, atribuibles a la baja proporción de tejidos blandos, que son los que más se deterioran en el estado diabético. Como se observa en las Figuras 4.25 y 4.26, ambas variables se ajustaron con la función de Boltzmann. Los parámetros se muestran en las Tablas 4.19 y 4.20.

Tabla 4.19. Parámetros de la función de mejor ajuste del peso seco de la hemimandíbula (g) de animales diabéticos y controles en función de la edad.

	Controles (n=43)	Diabéticas (n=37)	P
Asíntota, gr.	0.427 ± 0.043	0.346 ± 0.114	n.s
V ₅₀	4.807 ± 2.241	7.788 ± 1.034	n.s
Pendiente*	4.288 ± 1.551	2.672 ± 2.221	n.s
R ²	0.965	0.8898	

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Material y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch. Asíntota: t=0.519, 43 GL, P=0.607; V₅₀: t=1.357, 71 GL, P=0.179; Pendiente: t=0.403, 53GL, P=0.689.

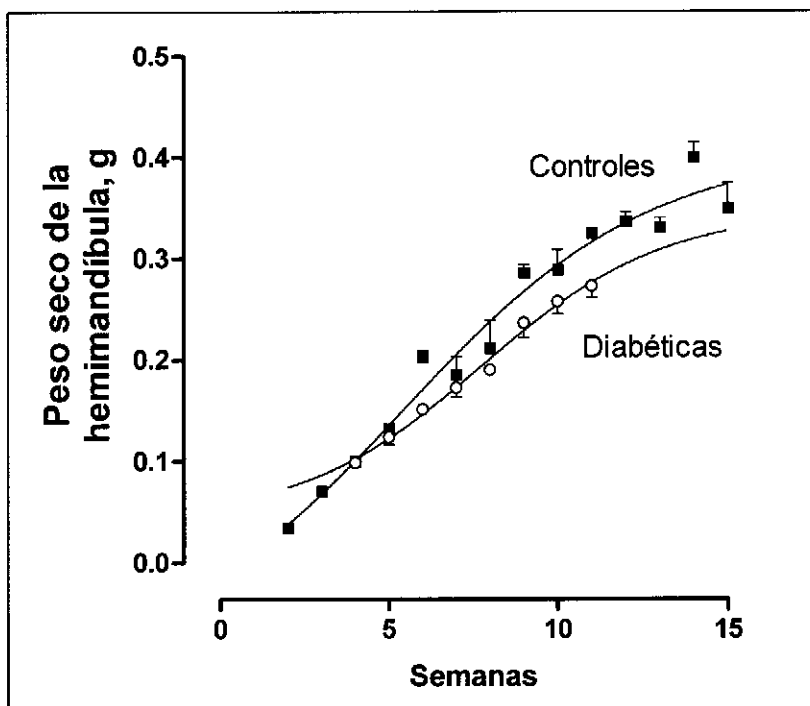


Figura 4.25. Evolución del peso seco de la hemimandíbula de los animales diabéticos comparada con la de los controles.

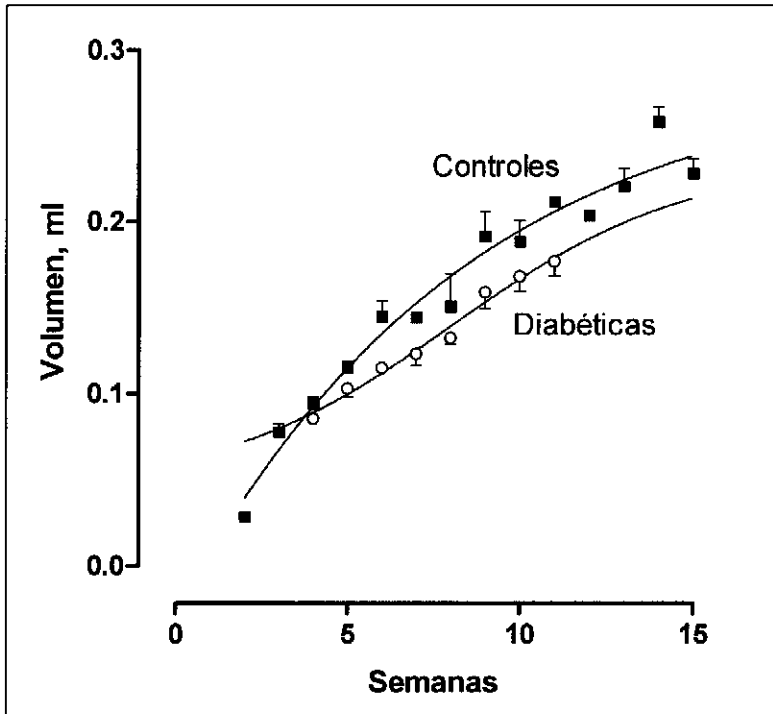


Figura 4.26. Evolución del volumen de la hemimandíbula de los animales diabéticos comparada con la de los controles.

Tabla 4.20. Parámetros de la función de mejor ajuste del volumen de la hemimandíbula (ml) de animales diabéticos y controles en función de la edad.

	Controles (n=41)	Diabéticas (n=37)	P
Asíntota, ml.	0.286 ± 0.075	0.235 ± 0.160	n.s
V_{50}	-19.15 ± 171.0	8.087 ± 2.488	n.s
Pendiente*	7.549 ± 9.138	3.364 ± 5.505	n.s
R^2	0.9509	0.8092	

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Materiales y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media \pm error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa. Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch. Asíntota: $t=0.289$, 51 GL, $P=0.774$; V_{50} : $t=0.159$, 40 GL, $P=0.874$; Pendiente: $t=0.392$, 64GL, $P=0.696$.

4.3.4. Densidad mandibular

La densidad de la hemimandíbula (relación del peso seco / volumen) tampoco mostró diferencias significativas entre animales controles y diabéticos. Como se observa en la Figura 4.27, la función de mejor ajuste es la de Boltzmann y sus parámetros se muestran en la Tabla 4.21.

Tabla 4.21. Densidad de la hemimandíbula (g/ml) de animales diabéticos y controles en función de la edad. Parámetros de la función de ajuste.

	Controles (n=41)	Diabéticas (n=37)	P
Asíntota, ml.	1.547 ± 0.024	1.553 ± 0.048	n.s
V ₅₀	4.412 ± 0.871	5.357 ± 1.770	n.s
Pendiente*	1.939 ± 0.512	1.618 ± 0.971	n.s
R ²	0.928	0.8021	

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Materiales y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch. Asíntota: t=0.163, 56GL, P=0.871; V₅₀: t=0.479, 52GL, P=0.634; Pendiente: t=0.292, 54GL, P=0.771.

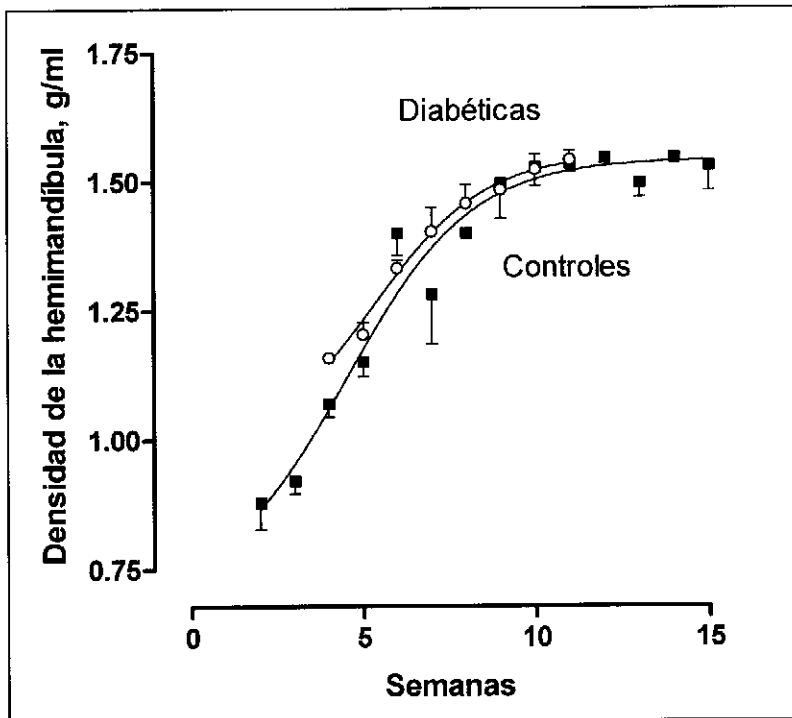


Figura 4.27. Evolución de la densidad de la hemimandíbula de los animales diabéticos comparada con la de los controles.

4.4. CRECIMIENTO DE LOS MOLARES

4.4.1. Diámetro mesio-distal de las coronas

Como se indicó más arriba, el diámetro mesio-distal de las coronas no se modificó en función de la edad (Figura 4.28). Al igual que en el grupo control, el diámetro del 1° molar es mayor que el del 2° y éste mayor que el del 3° (Tabla 4.22). Como se muestra en la Tabla 4.23, el diámetro mesio-distal de las coronas de animales controles y diabéticos no difirió significativamente.

Tabla 4.22. Diámetro mesio-distal de las coronas del 1°, 2° y 3° molar, ratas diabéticas.

	Longitud mesio-distal, mm.	P
Primer Molar (n=37)	2.017 ± 0.017	
Segundo Molar (n=37)	1.344 ± 0.014	1er. vs. 2do. Molar*: P< 0.0001
Tercer Molar (n=37)	1.109 ± 0.026	2do. vs. 3er Molar **: P< 0.0001

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: $t= 30.559,72$ GL, $P<0.0001$.

**Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch: $t= 7.96,55$ GL, $P<0.0001$.

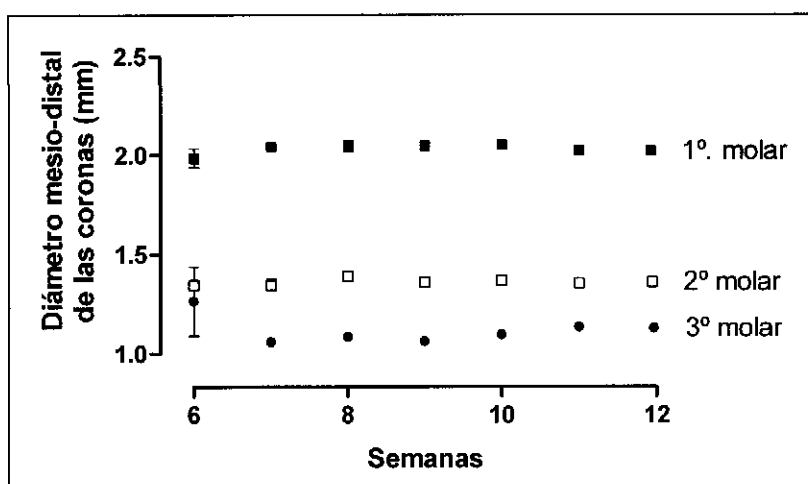


Figura 4.28. Evolución del diámetro mesio-distal de las coronas, ratas diabéticas.

Tabla 4.23. Comparación del diámetro mesio-distal de las coronas (mm) del 1°, 2° y 3° molar en ratas controles y diabéticas.

	Controles	Diabéticas	P
Primer Molar	2.036 ± 0.012 (n=41)	2.017 ± 0.017 (n=37)	n.s
Segundo Molar	1.363 ± 0.0097 (n=41)	1.344 ± 0.014 (n=37)	n.s
Tercer Molar	1.119 ± 0.023 (n=31)	1.109 ± 0.026 (n=37)	n.s

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch: Primer Molar: t=0.913, 66GL, P=0.365. Segundo Molar: t=1.116, 65GL, P=0.269. Tercer Molar: t=0.288, 65GL, P=0.774.

4.4.2. Densidad mineral de las coronas

La densidad mineral de las coronas no se modifica desde la 6ª y 11ª semana de edad. La cinética de este proceso no difiere significativamente entre el 1° y 2° molar, de erupción simultánea (Figura 4.29, panel superior). La erupción del tercer molar se produce a la 4ª semana y evoluciona hasta tener más alta densidad mineral como puede apreciarse en las radiografías (ver Figura 4.22.a y 4.22.b), pero sin la diferencia observada entre los animales controles (Figura 4.29, panel inferior).

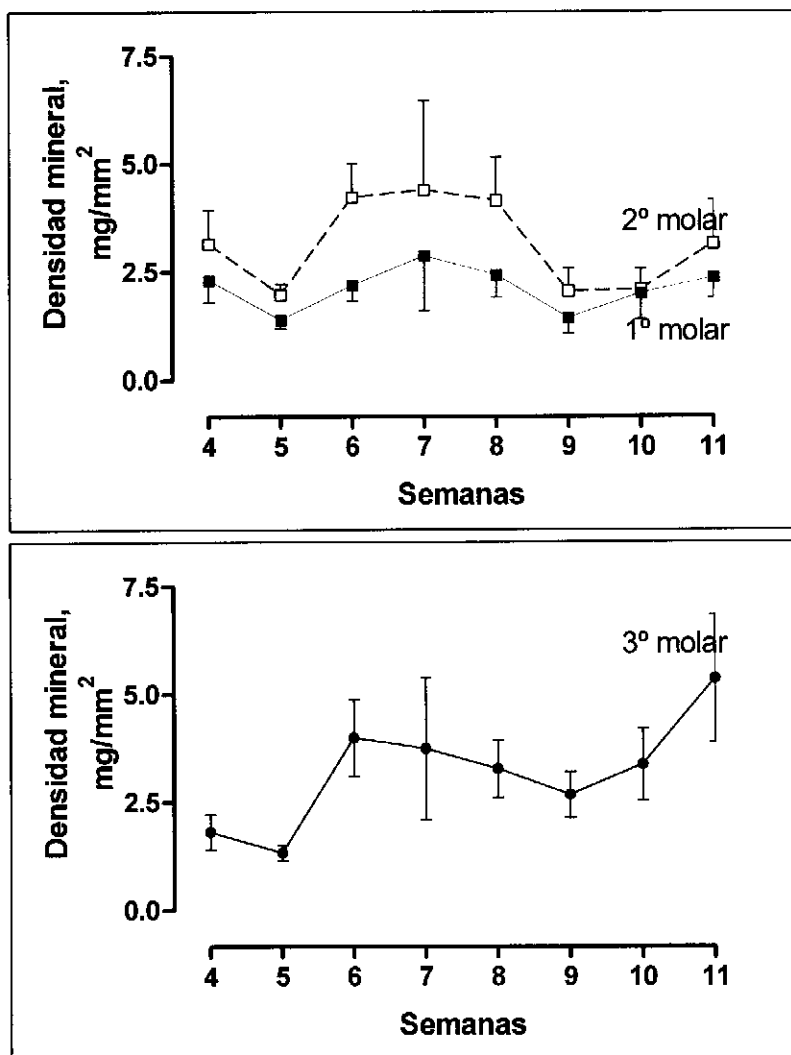


Figura 4.29. Densidad mineral de las coronas en función de la edad.
Panel Superior: 1º y 2º molar.
Panel Inferior: 3º molar.

4.5. ENFERMEDAD PERIODONTAL ESPONTÁNEA DE LA RATA EN EL ESTADO DIABÉTICO

4.5.1. EVALUACIÓN CON LA TÉCNICA DE DENSITOMETRÍA RADIOLÓGICA

4.5.1.1. Número de focos de reabsorción

El examen de la Figura 4.30 revela que el número de focos de reabsorción en las ratas diabéticas sigue una cinética diferente de la de los controles. A medida que se instala el estado diabético el número de focos crece no tan rápidamente como en los controles, con tendencia a alcanzar valores semejantes o más altos que estos, hacia la 12^o-15^o semana. Esta variable se ajusta satisfactoriamente con la función sigmoidea de Boltzmann y sus parámetros se exhiben en la Tabla 4.24.

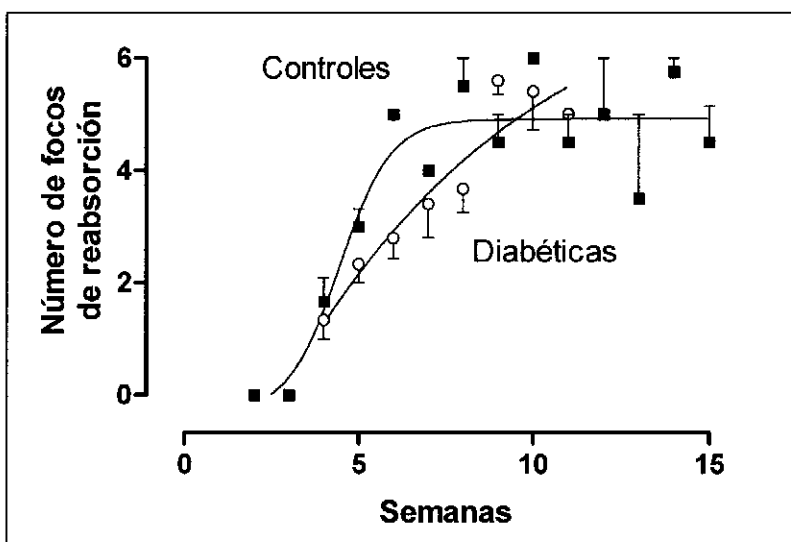


Figura 4.30. Evolución del número de focos de reabsorción en ratas diabéticas y controles.

Tabla 4.24. Número de focos de reabsorción de ratas diabéticas y controles en función de la edad.

Parámetros de la función de ajuste.

	Controles (n=41)	Diabéticas (n=37)	P
Asíntota, ml.	4.917 ± 0.215	7.752 ± 18.6	n.s
V ₅₀	4.462 ± 0.312	-9.401 ± 560.7	n.s
Pendiente*	0.738 ± 0.277	6.224 ± 56.03	n.s
R ²	0.798	0.602	

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Materiales y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el Valor de t aproximado según Welch. Asíntota: t=0.152, 36GL, P=0.88; V₅₀: t=0.025, 36GL, P=0.980; Pendiente: t=0.098, 36GL, P=0.923.

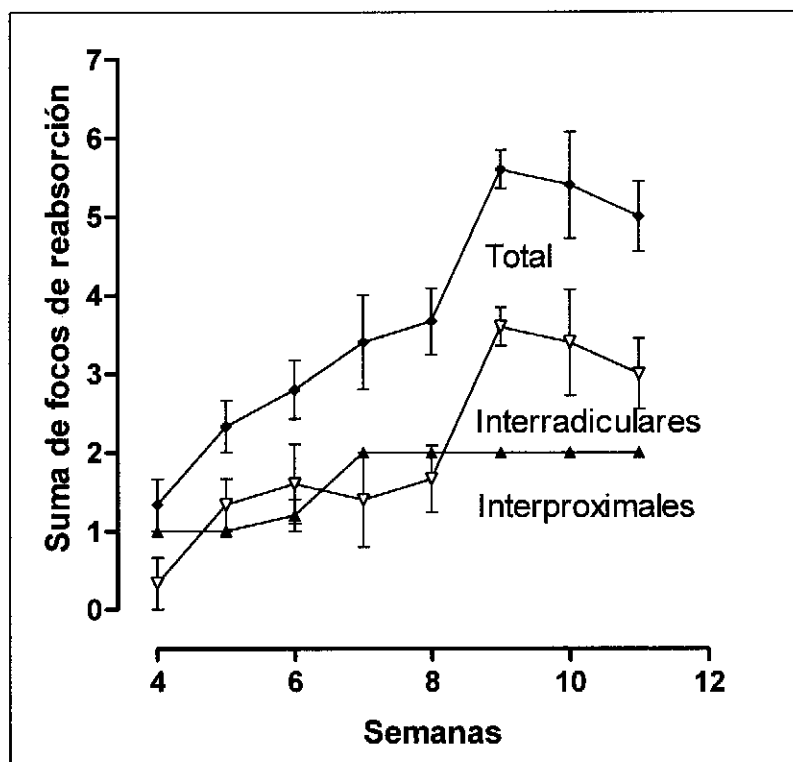


Figura 4.31. Evolución del número de focos de reabsorción periodontal, ratas diabéticas.

Como se muestra en la Figura 4.31, el número de focos de reabsorción aumenta a expensas de los focos interradiculares tal como se observara en los animales controles.

4.5.1.2. Área total en reabsorción

El área total en reabsorción (suma de las áreas de los focos interproximales e interradiculares) es menor en las ratas diabéticas que en las controles (Figura 4.32). Esta variable se ajustó con la función de Boltzmann y los parámetros se muestran en la Tabla 4.25.

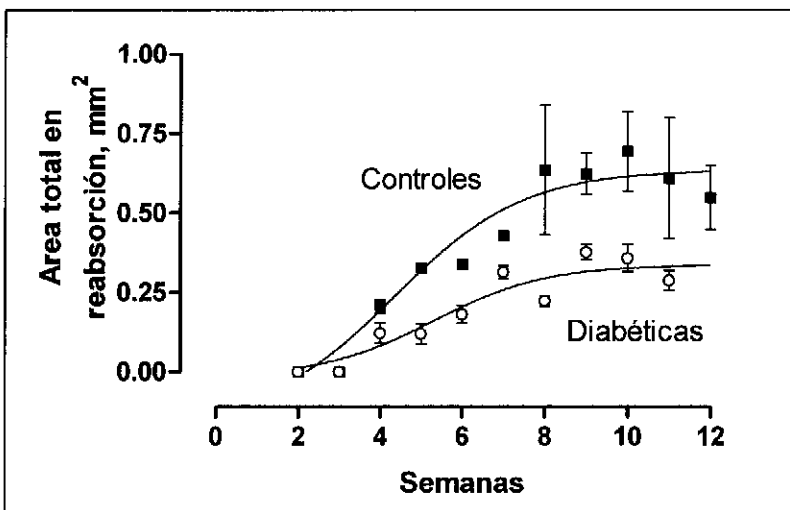


Figura 4.32. Área total en reabsorción de los animales diabéticos comparada con controles.

Tabla 4.25. Parámetros de la función de ajuste del área total en reabsorción de ratas diabéticas y controles en función de la edad.

	Controles (n=41)	Diabéticas (n=37)	P
Asíntota, ml.	0.637 ± 0.065	0.339 ± 0.034	0.0001
V ₅₀	4.356 ± 1.534	5.316 ± 1.067	n.s
Pendiente*	1.574 ± 0.990	1.367 ± 0.798	n.s
R ²	0.7731	0.6189	

*Pendiente de la ecuación sigmoidea de Boltzmann. Ver Materiales y Métodos-Técnicas estadísticas.

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch. Asíntota: $t=4.062$, 59GL, $P=0.0001$; V₅₀: $t=0.514$, 69GL, $P=0.609$; Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student para la pendiente fue: $t=0.161$, 76GL, $P=0.873$.

4.5.1.3. Densidad mineral del hueso periodontal sin patología

La densidad mineral del hueso periodontal sin patología también revela el impacto del estado diabético. La evolución de esta variable en animales diabéticos no se encontró correlacionada con la edad, por ello se compara la media general de los animales diabéticos con la asíntota de los controles (Figura 4.33). Los valores de la asíntota de esta variable se muestran en la Tabla 4.26.

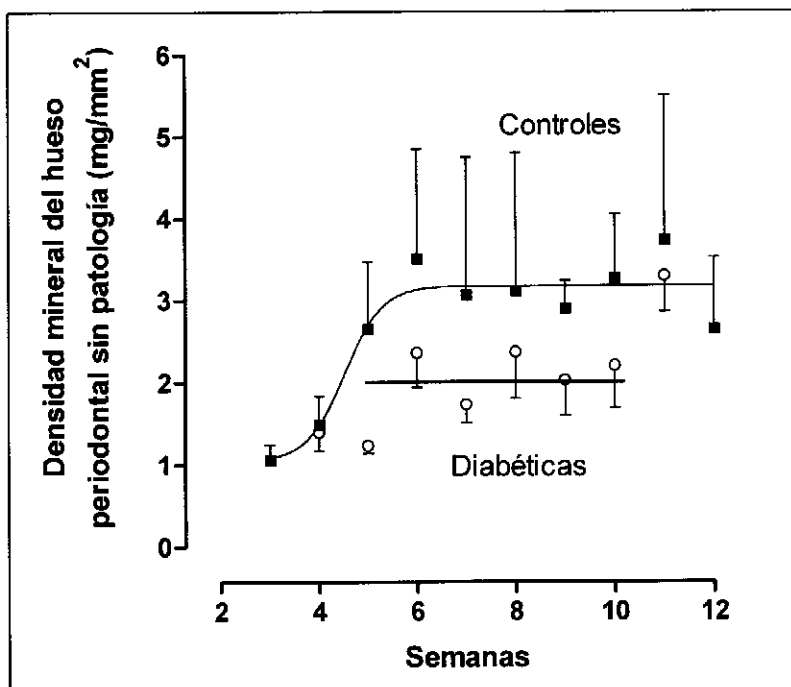


Figura 4.33. Evolución de la densidad mineral del hueso periodontal sin patología de los animales diabéticos comparada con la de los controles.

Tabla 4.26. Densidad mineral del hueso periodontal sin patología de ratas diabéticas y controles entre la 6^a y 11^a semana de edad.

	Controles (n=32)	Diabéticas (n=37)	P=
D.M.O., mg/mm ²	3.24 ± 0.27	2.17 ± 0.17	0.0014

Los números indican la media ± error estándar.
(Número de animales).

Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch= 3.363, 53 GL, P=0.0014.

4.5.1.4. Densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción

De manera semejante a lo observado en el hueso periodontal sano, la densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción de los animales diabéticos es significativamente menor que en los controles (Figura 4.34). En la Tabla 4.27 se exhiben los valores de esta variable y el significado de la diferencia.

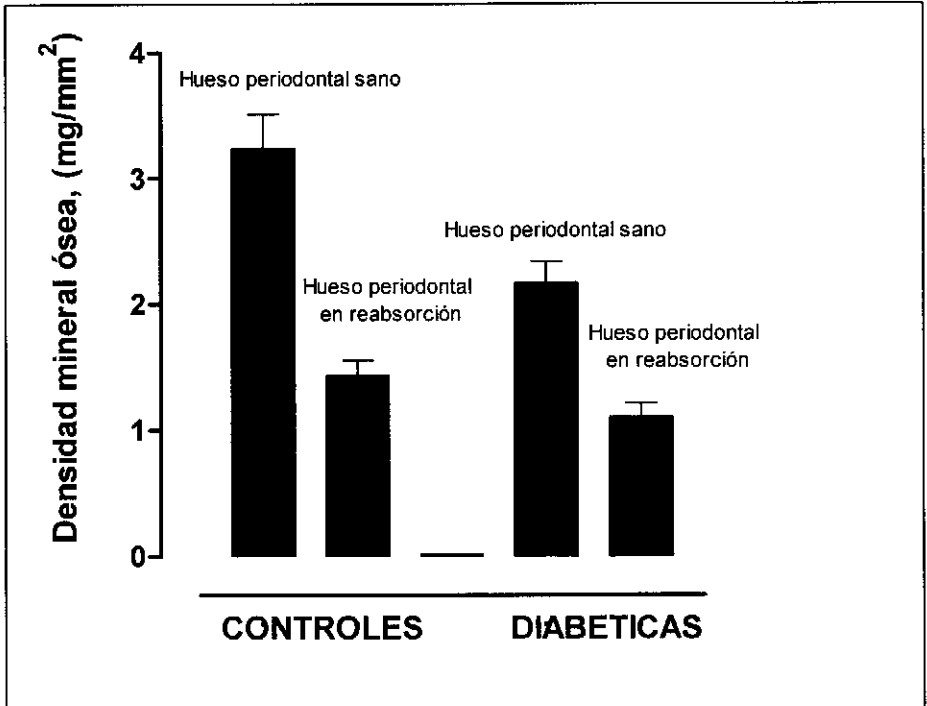


Figura 4.34. Densidad mineral del hueso periodontal sano y en reabsorción de ratas diabéticas y controles.

Tabla 4.27. Densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción de ratas diabéticas y controles entre la 6^a y 11^a semana de edad.

	Controles (n=32)	Diabéticas (n=37)	P=
D.M.O., mg/mm ²	1.43 ± 0.12	1.104 ± 0.109	0.048*

Los números indican la media ± error estándar.
(Número de animales).

* t = 2.014, 67 GL, P = 0.048.

En el estado diabético la densidad mineral del hueso periodontal sin patología de ratas de cuatro a once semanas de edad se ajusta a una función sigmoidea. Como la densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción no sigue una función definida se tomó como referencia el valor de la media general (Figura 4.35). El promedio de esta variable en los controles (6^a. a 11^a. semana) se compara con la media general de los diabéticos en la Tabla 4.28.

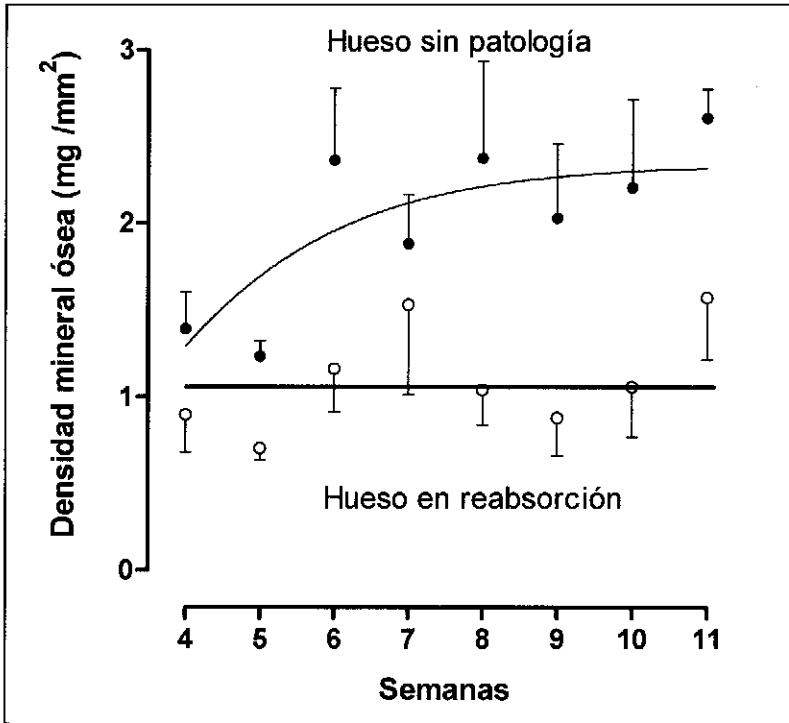


Figura 4.35. Evolución de la densidad mineral del hueso sin patología y en reabsorción, ratas diabéticas.

Tabla 4.28. Densidad mineral hueso periodontal sano y en reabsorción de ratas diabéticas entre la 7^a. Y 11^a. semana de edad.

	Hueso periodontal sin patología (n=34)	Hueso periodontal en reabsorción (n=34)	P<
D.M.O., mg/mm ²	2.167 ± 0.17	1.104 ± 0.109	0.001*

La densidad mineral ósea del hueso periodontal sin patología, entre la 4^a. Y 11^a. semana de edad, sigue una función sigmoidea con los siguientes parámetros: Inicio: -1.79±149.2, Plateau: 2.33±0.63, V₅₀: 2.18±74.05, Pendiente: 1.65±8.71

Los números indican la media ± error estándar (Número de animales)

* Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch: t= 5.264, 56 GL, p<0.0001.

4.5.2. MEDICIÓN DE LA DISTANCIA DESDE EL LÍMITE AMELOCEMENTARIO A LA CRESTA ÓSEA ALVEOLAR (LAC-COA)

Esta distancia se midió bajo el microscopio en ambas caras de cada molar (vestibular y lingual) sobre las hemimandíbulas teñidas con azul de metileno (ver Materiales & Métodos). En los tres molares, la distancia es mayor en la cara lingual que en la vestibular. La función de mejor ajuste es la exponencial positiva de una sola fase (Figura 4.36). En la Figura no se han dibujado las curvas de ajuste para facilitar su comprensión. La Tabla 4.29 muestra los parámetros de dicha función.

Tabla 4.29. Parámetros de la cinética de las modificaciones de la distancia desde el límite amelo-cementario a la cresta ósea alveolar en función de la edad.

	Cara de la corona	Asíntota, mm	K, sem^{-1}	Vida media, sem	R ²
1er molar	Lingual (n=103)	3.034±2.317	0.033±0.030	20.81	0.461
	Vestibular (n=76)	0.718±0.361	0.059±0.038	11.85	0.409
2do molar	Lingual (n=76)	0.571±0.063	0.172±0.041	4.02	0.305
	Vestibular (n=76)	0.719±0.510	0.051±0.045	13.60	0.295
3er molar	Lingual (n=70)	1.772±1.619	0.034±0.037	20.61	0.435
	Vestibular (n=70)	0.208±0.069	0.146±0.093	4.74	0.108

Los números indican la media ± error estándar. (Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch: 1° Molar Lingual vs Vestibular: Asíntota: t=0.988, 106GL, P=0.326; 2° Molar Lingual vs Vestibular: Asíntota: t=0.288, 77GL, P=0.774; 3° Molar Lingual vs Vestibular: Asíntota: t=0.965, 69GL, P=0.338.

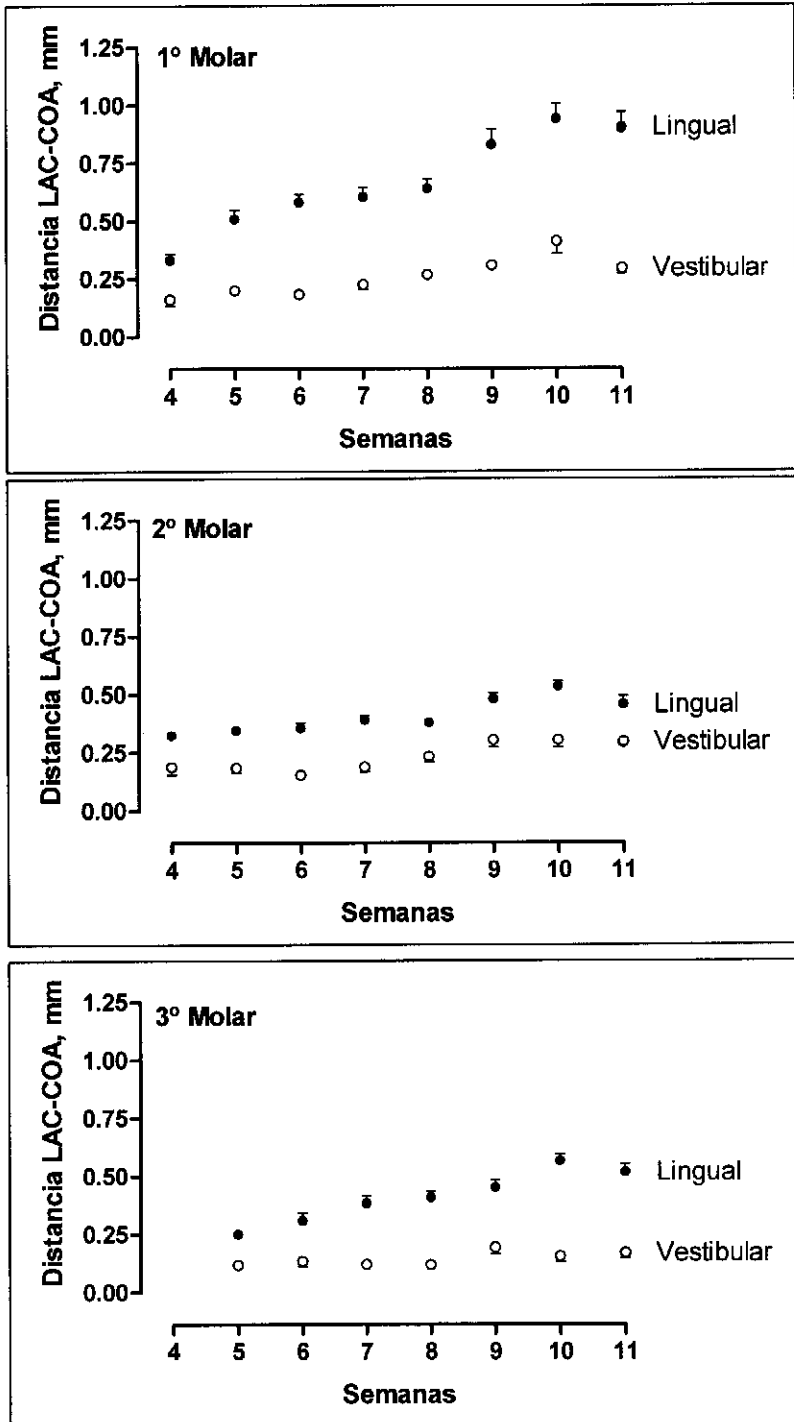


Figura 4.36. Cinética de la modificación de la distancia LAC-COA en las caras libres de los molares.

La inspección de las graficas que componen la Figura 4.37 sugieren que la evolución en función del tiempo de la distancia IAC-COA entre las dos caras de los tres molares no difiere entre controles y diabéticos.

Los valores de la variable analizada se ajustaron con la función exponencial positiva de una sola fase. La Tabla 4.32 expone analíticamente las conclusiones del párrafo anterior.

Estos resultados se discuten más adelante. Sin embargo, a esta altura de la exposición cabe decir que otros factores aún no determinados y no la alteración endocrina característica del estado diabético, afectan la pérdida ósea medida como la distancia entre el límite amelocementario y la cresta ósea alveolar.

4. Resultados

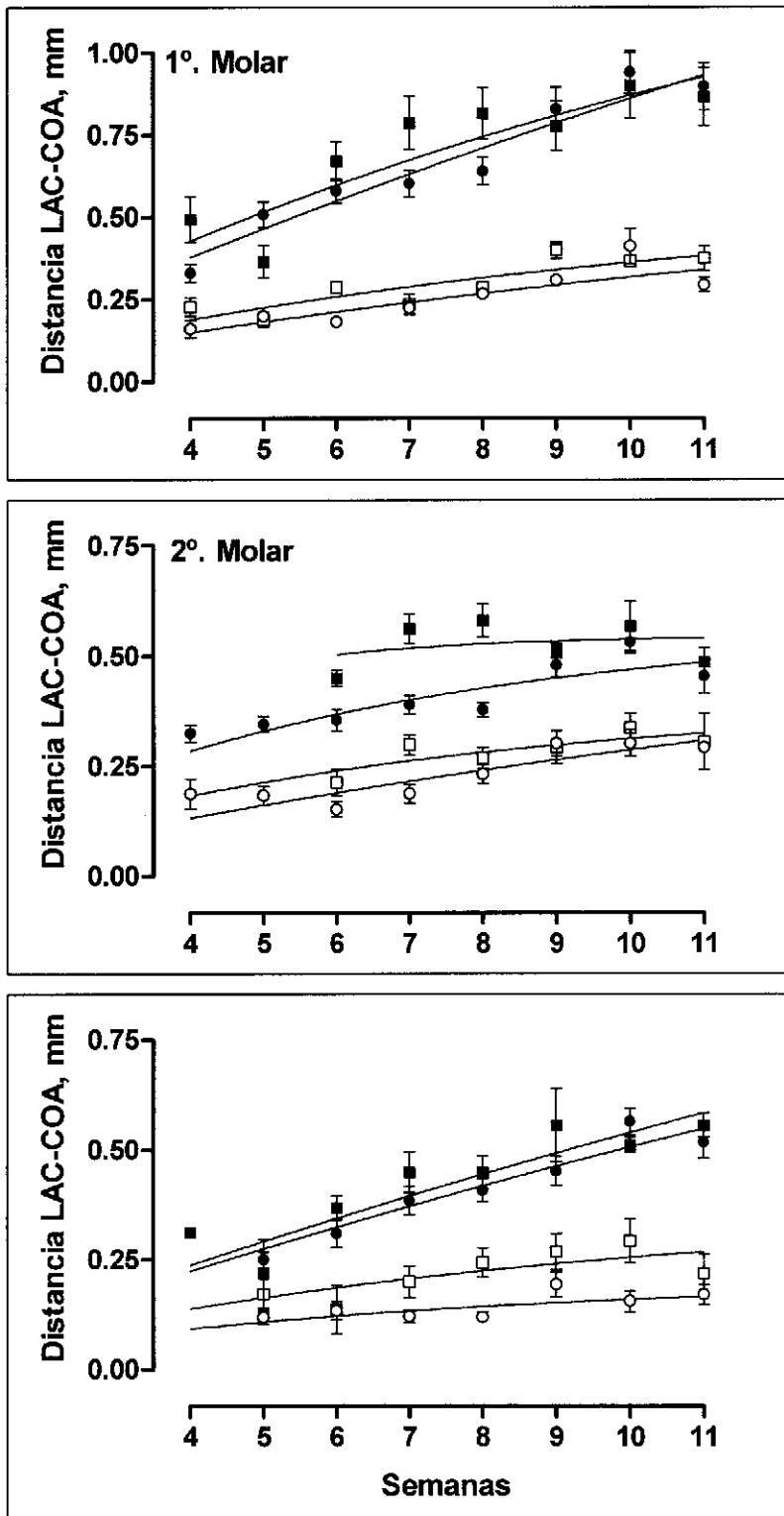


Figura 4.37. Evolución de la distancia límite amelo cementario-cresta ósea alveolar en ratas diabéticas (círculos) y controles (cuadrados) en función de la edad. La vista lingual se presenta con símbolos llenos, la vestibular con símbolos vacíos.

Tabla 4.30. Parámetros de la función de mejor ajuste de la variable límite amelocementario-cresta ósea alveolar de los tres molares, ratas controles y diabéticas.

	PRIMER MOLAR				
	Cara vestibular		P	Cara lingual	
	Contr. (n=66)	Diab. (n=75)		Contr. (n=66)	Diab. (n=103)
Asíntota, mm	0.58±0.16	0.72±0.36	n.s *	1.65±0.72	3.03±2.32
K sem ⁻¹	0.1±0.04	0.06±0.04	n.s **	0.08±0.04	0.03±0.03
T _{1/2}	6.9	11.8		9.3	20.8
R ²	0.362	0.410		0.381	0.461

	SEGUNDO MOLAR				
	Cara vestibular		P	Cara lingual	
	Contr. (n=24)	Diab. (n=76)		Contr. (n=25)	Diab. (n=76)
Asíntota, mm	0.45±0.13	0.72±0.51	n.s *	0.55±0.04	0.57±0.06
K sem ⁻¹	0.15±0.10	0.05±0.05	n.s **	0.42±0.22	0.17±0.04
T _{1/2}	4.6	13.6		1.6	4.0
R ²	0.163	0.295		0.047	0.305

	TERCER MOLAR				
	Cara vestibular		P	Cara lingual	
	Contr. (n=24)	Diab. (n=76)		Contr. (n=25)	Diab. (n=76)
Asíntota, mm	0.38±0.21	0.21±0.07	n.s *	1.95±2.8 7	1.77±1.62
K sem ⁻¹	0.12±0.10	0.15±0.09	n.s **	0.03±0.0 6	0.03±0.03
T _{1/2}	6.0	4.7		21.4	20.6
R ²	0.161	0.108		0.439	0.435

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximado según Welch. Primer molar-cara vestibular: Asíntota: t=0.361, 102GL, P=0.719; Primer molar, cara lingual: Asíntota: t=0.568, 120GL, P=0.571; Segundo molar, cara vestibular: Asíntota: t=0.51, 84GL, P=0.611; Segundo molar, cara lingual: Asíntota: t=0.277, 96GL, P=0.782; K: t=0.1.117, 25GL, P=0.275; Tercer molar, cara vestibular: Asíntota: t=0.769, 37GL, P=0.447.

4. Resultados

**Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student. Primer molar, cara vestibular: \underline{K} : $t=0.704$, 139GL, $P=0.483$;

Primer molar, cara lingual: \underline{K} : $t=0.875$, 167GL, $P=0.383$; Segundo molar, cara vestibular: \underline{K} : $t=0.959$, 98GL, $P=0.34$; Tercer molar, cara vestibular: \underline{K} : $t=0.222$, 72GL, $P=0.825$; Tercer molar, cara lingual: Asíntota: $t=0.058$, 100GL, $P=0.954$, \underline{K} : $t=0.03$, 100GL, $P=0.976$;

III- ENSAYO TERAPÉUTICO CON BISFOSFONATOS

Animales

Ratas macho línea "m", de 5 semanas de edad, de 97 ± 3 gr. de peso recibieron una dosis semanal de 30 microgramos de olpadronato o lidadronato por cada 100 g. de peso. Las dosis se ajustaron semanalmente por peso. Las drogas se administraron disueltas en un volumen fijo (0.15 ml) de solución fisiológica por vía intraperitoneal durante 7 semanas consecutivas a partir de la quinta semana de edad. Las ratas controles recibieron el mismo volumen de solución fisiológica por la misma vía. A la 12^o semana de edad los animales se sacrificaron por sobre-exposición al éter y se disecaron las mandíbulas para su posterior análisis (ver Materiales y Métodos).

Análisis de los resultados

Los resultados se comparan con los valores de las variables obtenidas de animales controles de 12 semanas de edad.

4.6. CRECIMIENTO4.6.1. EFFECTOS SOBRE EL CRECIMIENTO CORPORAL Y MANDIBULAR DE LA RATA4.6.1.1. Peso corporal

No se observaron diferencias significativas en el peso entre animales controles y tratados (Figura 4.38). En la Tabla 4.31 se exhiben los valores de esta variable.

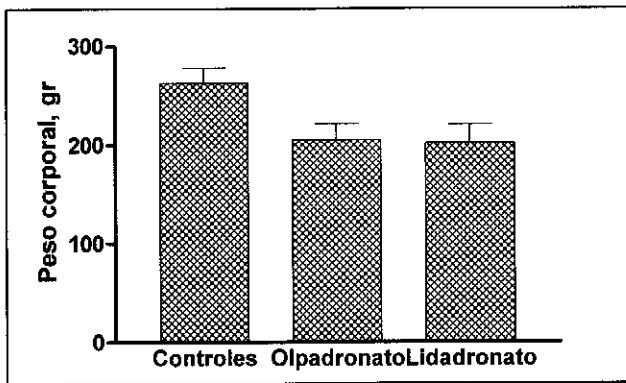


Figura 4.38. Peso corporal de ratas controles y tratadas.

Tabla 4.31. Valores del peso corporal de los animales controles y tratados.

	Controles (n = 3)	Olpadronato (n = 3)	Lidadronato (n = 3)
Peso corporal (gr)	262.77 ± 15.69	205.03 ± 16.26	201.5 ± 19.
Significado estadístico		n.s.*	n.s.*

Los números indican la media ± error estándar. (Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student. Controles vs. Olpadronato: t=2.55, 4GL, P=0.0629; Controles vs. Lidadronato: t=2.468, 4GL, P=0.0691.

4.6.1.2. Peso Mandibular

Las diferencias en el peso seco de la hemimandíbula fueron significativas entre los grupos control y tratados con lidadronato, no observándose diferencias entre los controles y aquellos tratados con olpadronato (Figura 4.39). Los valores promedios se muestran en la Tabla 4.32.

Tabla 4.32. Peso seco de la hemimandíbula de animales controles y tratados.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
Peso Seco de Hemimandíbula, gr	0.35 ± 0.002	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.007
Significado Estadístico		n.s**	P=0.005

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: $t = 5.494$, 4GL, $P = 0.0053$.

**Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t de Welch: $t = 0.9806$, 2GL, $P = 0.4302$.

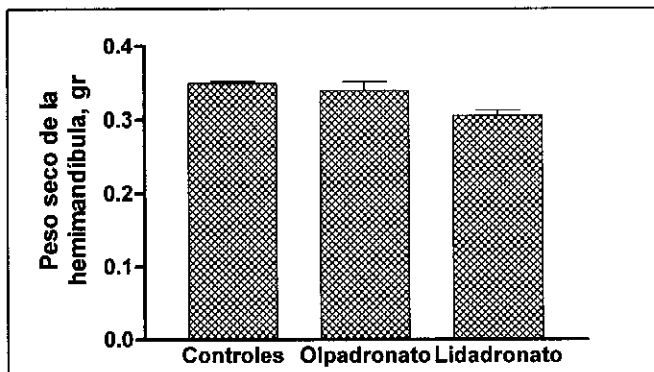


Figura 4.39. Peso seco de la hemimandíbula, animales controles y tratados.

4.6.1.3. Volumen Mandibular

Al analizar el volumen mandibular se observaron diferencias significativas entre los grupos control y tratado con lidadronato, no observándose diferencia entre el grupo control y tratado con olpadronato (Figura 4.40). La Tabla 4.33 muestra los valores para esta variable.

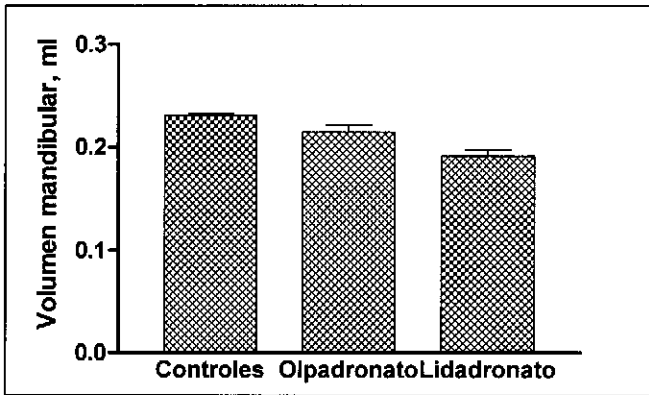


Figura 4.40. Volumen mandibular, grupo control y tratado.

Tabla 4.33. Volumen mandibular, ratas controles y tratadas.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
Volumen mandibular, ml	0.23 ± 0.002	0.215 ± 0.006	0.191 ± 0.0035
Significado Estadístico		n.s.*	P=0.0035

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student. Controles vs. Olpadronato: t=2.372, 4GL, P=0.0767; Controles vs. Lidadronato: t=6.166, 4GL, P=0.0035.

La relación volumen mandibular / peso vivo ($\mu\text{l}/100 \text{ gr}$) no fue significativa entre los grupos (Figura 4.41). Los valores de esta variable se exhiben en la Tabla 4.34.

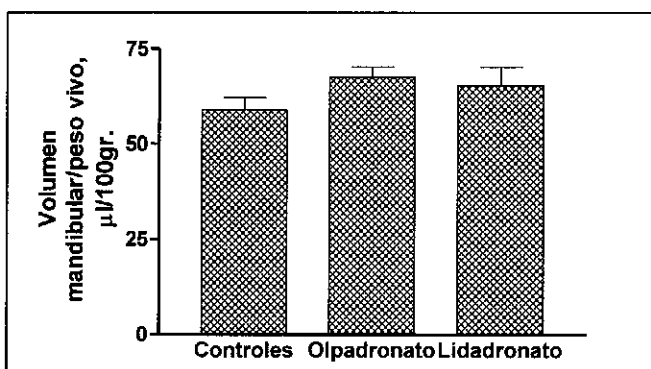


Figura 4.41. Relación volumen mandibular/ peso corporal.

Tabla 4.34. Relación volumen mandibular / peso vivo de ratas controles y tratadas.

	Control (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
Relación volumen mandibular/ peso, $\mu\text{l}/100\text{gr.}$	58.96 ± 3.17	67.58 ± 2.65	65.2 ± 4.84
Significado Estadístico		n.s.*	n.s.*

Los números indican la media \pm error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: Controles vs. Olpadronato: $t=2.086$, 4GL, $P=0.1053$; Controles vs. Lidadronato: $t=1.079$, 4GL, $P=0.3415$.

4.6.1.4. Densidad Mandibular

La densidad de la hemimandíbula (Peso seco/volumen, calculada por el Principio de Arquímedes) de animales controles y tratados mostró tendencia a aumentar (tratados vs. Controles) pero sin diferencias significativas entre los grupos (Figura 4.42). Los valores de esta variable se exhiben en la Tabla 4.35.

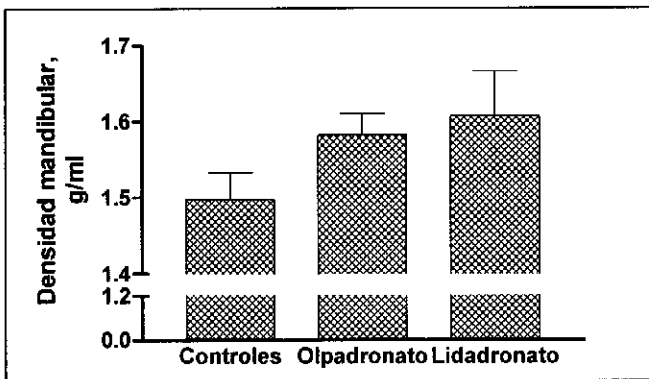


Figura 4.42. Densidad de la mandíbula de ratas controles y tratadas.

Tabla 4.35. Densidad de la mandíbula de ratas controles y tratadas, calculada por el Principio de Arquímedes.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
Densidad Mandibular, g/ml	1.47 ± 0.06	1.58 ± 0.03	1.61 ± 0.06
Significado Estadístico		n.s.*	n.s.*

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: Controles vs. Olpadronato: t=1.640, 4GL, P=0.1764; Controles vs. Lidadronato: t=1.64, 4GL, P=0.1743.

4.6.2. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MOLARES

4.6.2.1. Densidad mineral de las coronas

Como se observa en la Figura 4.43, la densidad mineral de las coronas no mostró diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los tres molares. La Tabla 4.36 muestra los valores de esta variable.

Tabla 4.36. Densidad mineral de las coronas de los tres molares inferiores de ratas controles y tratadas.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
<u>1° Molar</u>			
Densidad de las coronas, mg/mm ²	2.38 ± 0.24	2.81 ± 0.13	4.49 ± 2.00
Significado estadístico		n.s.*	n.s.*
<u>2° Molar</u>			
Densidad de las coronas, mg/mm ²	2.67 ± 0.23	3.09 ± 0.22	5.73 ± 2.00
Significado estadístico		n.s.*	n.s.*
<u>3° Molar</u>			
Densidad de las coronas, mg/mm ²	4.77 ± 0.58	5.11 ± 0.4	10.04 ± 2.00
Significado estadístico		n.s.*	n.s.*

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s. = diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student. Primer Molar: Controles vs. Olpadronato: t=1.58, 4GL, P=0.1903; Controles vs. Lidadronato: t=1.02, 4GL, P=0.3644; Segundo Molar: Controles vs. Olpadronato: t=1.32, 4GL, P=0.2574; Tercer Molar:

Controles vs. Olpadronato: t=0.48, 4GL, P=0.6546.

**Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t aproximada de Welch. Segundo Molar: Controles vs. Lidadronato: t=1.117, 2GL, P=0.3802; Tercer Molar: Controles vs. Lidadronato: t=1.1, 2GL, P=0.3864.

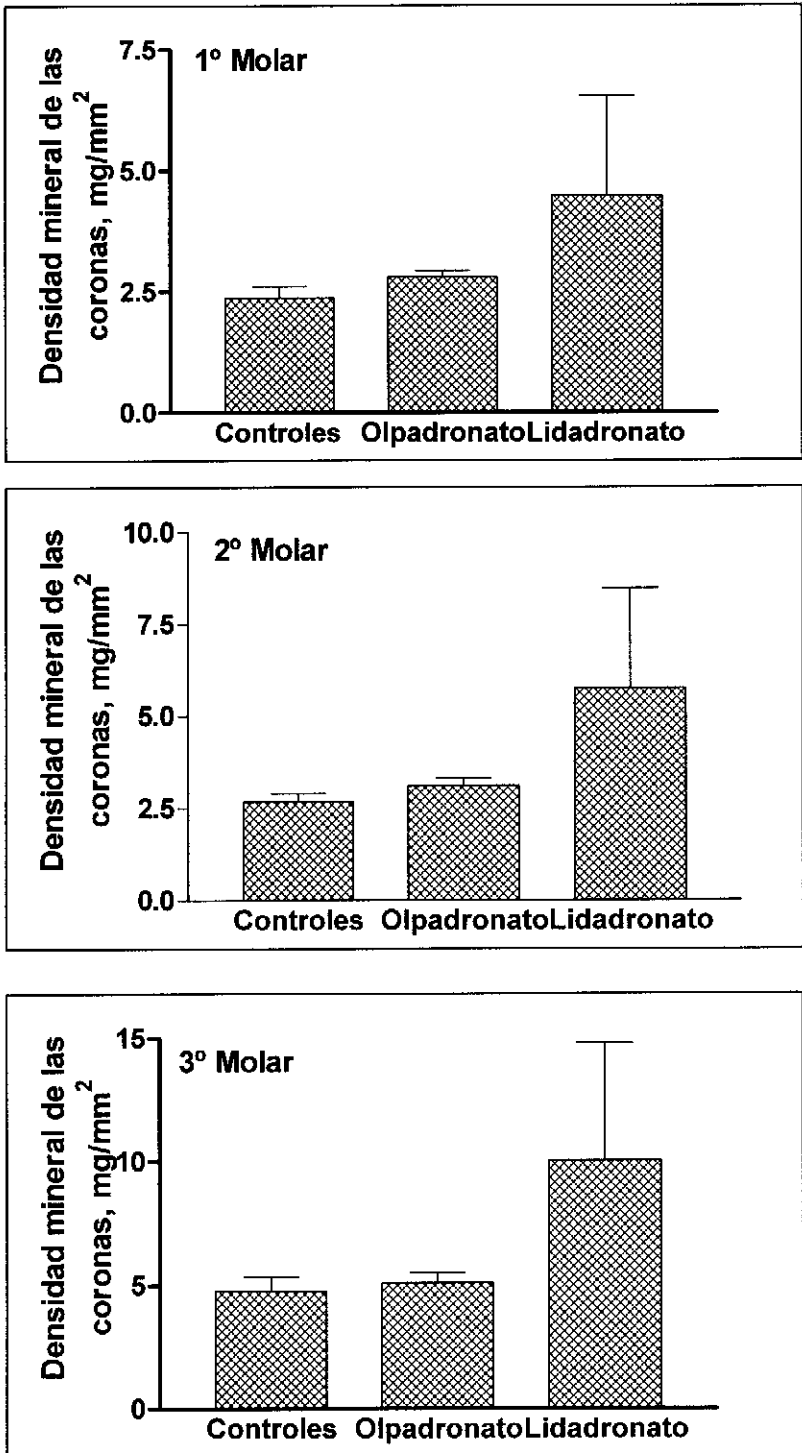


Figura 4.43. Densidad mineral de las coronas de los tres molares inferiores de animales controles y tratados con bisfosfonatos.

4.7. EFFECTO DE LOS BIFOSFONATOS SOBRE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL ESPONTÁNEA DE LA RATA

4.7.1. EVALUACIÓN CON LA TÉCNICA DE DENSITOMETRÍA RADIOLÓGICA

4.7.1.1. Número de focos de reabsorción

La Figura 4.44 muestra que no hay diferencias significativas en el número de focos de reabsorción entre los animales controles y los tratados. En la Tabla 4.37 se exhiben los valores para esta variable.

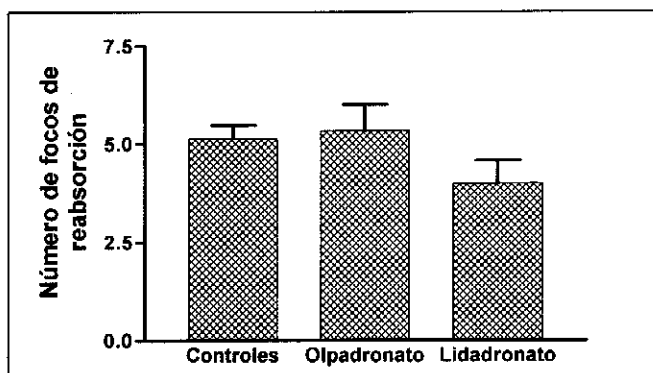


Figura 4.44. Número de focos de reabsorción de animales controles y tratados.

Tabla 4.37. Número de focos de reabsorción de ratas controles y tratadas con bisfosfonatos.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
N° de focos	5.14 ± 0.34	5.33 ± 0.67	4 ± 0.58
Significado Estadístico		n.s.*	n.s.*

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: Controles vs. Olpadronato: t=0.2529, 4GL, P=0.8128; Controles vs. Lidadronato: t=1.696, 4GL, P=0.1652.

4.7.1.2. Área total en reabsorción

El total de las áreas en reabsorción en las ratas tratadas con lidadronato es inferior a los valores del grupo control y del tratado con olpadronato, no observándose diferencias significativas entre estos dos últimos grupos (Figura 4.45). En la Tabla 4.38 se muestran los valores para esta variable.

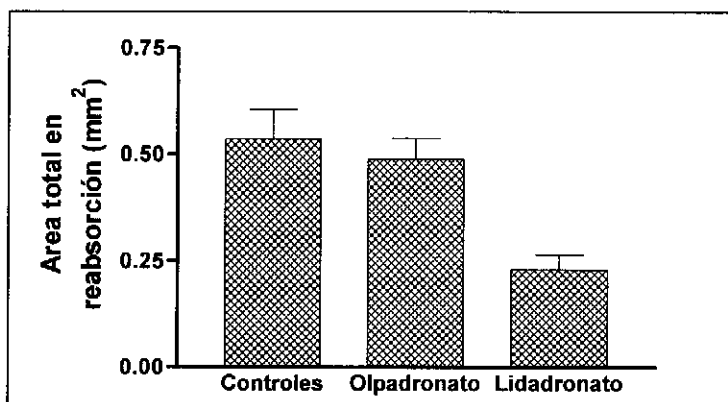


Figura 4.45. Área total de hueso periodontal en reabsorción, ratas controles y tratadas.

Tabla 4.38. Área total de hueso periodontal en reabsorción de ratas controles y tratadas con bisfosfonatos.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
Área total en reabsorción (mm ²)	0.52 ± 0.07	0.50 ± 0.06	0.23 ± 0.03
Significado estadístico		n.s*	P=0.0190*

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: Controles vs. Olpadronato: t=0.2169, 4GL, P=0.8389; Controles vs. Lidadronato: t=3.808, 4GL, P=0.0190.

4.7.1.3. Densidad mineral del hueso periodontal sin patología

En el grupo tratado con olpadronato, la densidad mineral del hueso periodontal sin patología está significativamente aumentada respecto de los controles. No se observan diferencias en el significado estadístico entre los grupos controles y tratados con lidadronato (Figura 4.46). En la Tabla 4.39 se exhiben los parámetros para esta variable.

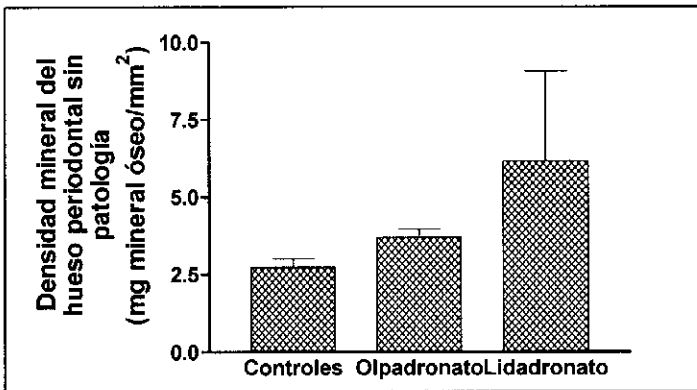


Figura 4.46. Densidad mineral del hueso periodontal sin patología de ratas controles y tratadas.

Tabla 4.39. Densidad mineral del hueso periodontal sin patología de ratas controles y tratadas.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
Densidad mineral hueso s/ patología (mg/mm ²)	2.74 ± 0.26	3.69 ± 0.27	6.16
Significado estadístico		P=0.0644*	n.s.

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: Controles vs. Olpadronato: t=2.534, 4GL, P=0.0644.

**Como las distribuciones no son homogéneas se calculó el valor de t de Welch: Controles vs. Lidadronato: t=1.175, 2GL, P=0.3611.

4.7.1.4. Densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción

La densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 4.47). Los valores para esta variable se exhiben en la Tabla 4.40.

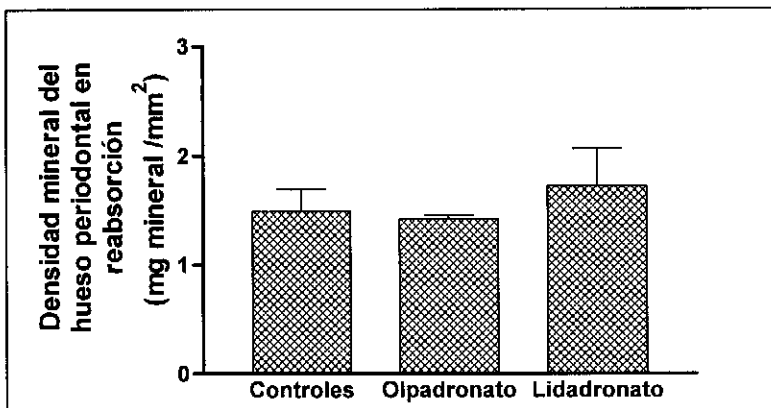


Figura 4.47. Densidad mineral de las áreas en reabsorción de ratas controles y tratadas.

Tabla 4.40. Densidad mineral de las áreas en reabsorción, ratas controles y tratadas con bisfosfonatos.

	Controles (n=3)	Olpadronato (n=3)	Lidadronato (n=3)
Densidad mineral hueso en reabsorción (mg/mm ²)	1.49 ± 0.21	1.42 ± 0.35	1.72 ± 0.34
Significado estadístico		n.s.*	n.s.*

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: Controles vs. Olpadronato: t=0.1715, 4GL, P=0.8722; Controles vs. Lidadronato: t=0.5755, 4GL, P=0.5958.

4.7.2. MEDICIÓN DE LA DISTANCIA DESDE EL LÍMITE AMELOCEMENTARIO A LA CRESTA ÓSEA ALVEOLAR

En la medición de la distancia desde el límite amelocementario a la cresta ósea alveolar (ver Materiales y Métodos) no se observaron diferencias significativas entre los animales controles y los tratados para el primer y segundo molar (Figura 4.48). Sin embargo en el tercer molar se observó una disminución significativa de esta distancia en el grupo tratado con lidadronato como se observa en la Tabla 4.41.

Tabla 4.41. Distancia LAC-COA de los tres molares inferiores de ratas controles y tratadas.

	Controles (n=)	Olpadronato (n=)	Lidadronato (n=)
1° Molar			
Distancia LAC-COA, mm	0.92 ± 0.07	1.05 ± 0.10	0.9 ± 0.09
Significado estadístico		n.s	n.s
2° Molar			
Distancia LAC-COA, mm	0.65 ± 0.03	0.67 ± 0.06	0.56 ± 0.04
Significado estadístico		n.s	n.s
3° Molar			
Distancia LAC-COA, mm	0.6 ± 0.01	0.63 ± 0.03	0.5 ± 0.04
Significado estadístico		n.s	P < 0.05

Los números indican la media ± error estándar.

(Número de animales). n.s.= diferencia no significativa.

*Como las distribuciones son homogéneas se calculó el valor de t de Student: Controles vs. Olpadronato: t=0.1715, 4GL, P=0.8722; Controles vs. Lidadronato: t=0.5755, 4GL, P=0.5958.

4. Resultados

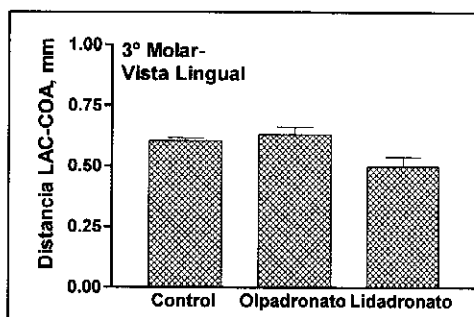
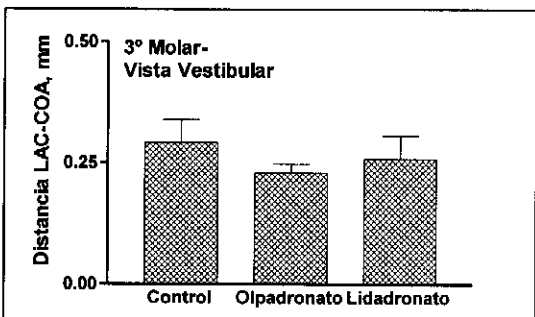
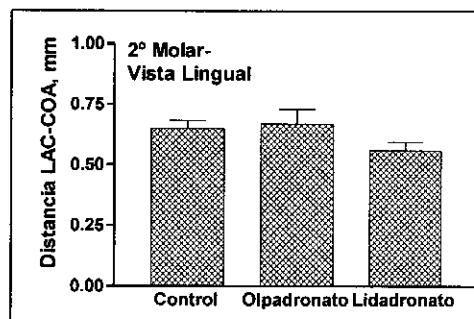
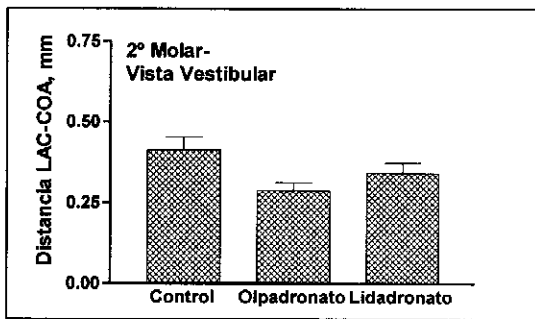
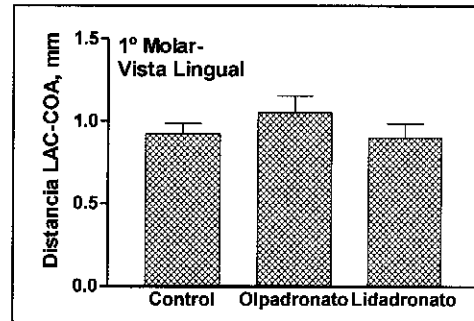
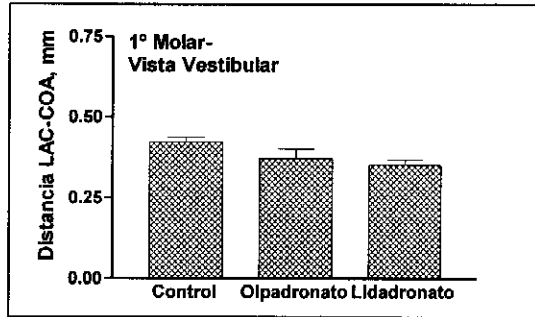


Figura 4.48. Distancia desde el límite amelo-cementario a la cresta ósea alveolar medida sobre las caras vestibulares y linguales de los tres molares inferiores de la rata.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Esta Tesis contiene el estudio de las modificaciones de las estructuras periodontales de la rata, en animales controles, diabéticos por aloxano y tratados con bisfosfonatos.

5.1. APARATO MASTICATORIO DE LOS ROEDORES

El cráneo y la mandíbula son construcciones diseñadas para resistir cargas externas aplicadas por los músculos. Dentro del género roedores y teniendo en cuenta la inserción del músculo masetero, que es el principal aductor de la mandíbula, el aparato masticatorio de la rata se clasifica dentro del suborden *miomorfo* en razón de su especialización cigo-masetérica (ver Apéndice I).

Las ratas se caracterizan por poseer una sola dentición. Los incisivos (superiores e inferiores) tienen crecimiento continuo. Un amplio diastema separa estos incisivos de los molares. Roer y masticar son los dos movimientos mandibulares que realiza la rata durante la ingesta, involucrando en estos movimientos a los músculos masetero, pterigoideo y temporal.

5.2. CRECIMIENTO

Como la información obtenida en este trabajo indica que la enfermedad periodontal espontánea se inicia a edad temprana, es pertinente discutir el factor crecimiento que servirá de marco a dicha enfermedad.

5.2.1. CRECIMIENTO EN RATAS CONTROLES

El crecimiento global de la mandíbula de la rata normal es armónico con el corporal. Esta afirmación se basa en la comparación de los puntos de inflexión de las curvas de mejor ajuste del peso seco en función de la edad. Desde el nacimiento hasta el punto de inflexión, el crecimiento se puede representar por una función exponencial que implica que los procesos anabólicos superan en magnitud a los catabólicos. Desde el punto de inflexión en adelante los procesos catabólicos y anabólicos entran en una etapa de regulación compleja, probablemente determinada genéticamente, aún indefinida, que conduce a alcanzar la asíntota de peso.

Trabajos anteriores de este Laboratorio evaluaron el crecimiento utilizando el peso de los animales a diferentes edades y el consumo de alimento acumulado hasta cada uno de esos puntos. La

aplicación de la función de Parks⁽⁶⁵⁾ a los resultados experimentales permite definir el punto de inflexión, que podría coincidir con la ocurrencia de la pubertad. En apoyo de esta hipótesis, se menciona que en el bioterio, las hembras se ponen en plantel a la 7° semana de edad.

En esta Tesis no se controló el consumo de alimento y por ello los valores experimentales se ajustaron con la función de Boltzmann. Esta es una ecuación empírica que permite la definición del punto de inflexión y el peso asintótico y no requiere justificación biológica de sus parámetros.

El máximo de la tasa de crecimiento mandibular se registró a la 6ª semana de edad en coincidencia con el máximo del crecimiento corporal observado en el trabajo de Locatto y col⁽⁶⁶⁾.

Tal como sucede en otras especies, la relación cabeza/cuerpo al nacimiento es mayor que en la madurez.

El crecimiento de la hemimandíbula en peso seco y volumen es armónico con el crecimiento del peso corporal. Como consecuencia, las modificaciones de la densidad (peso/volumen) siguen la misma ley. La densidad de las hemimandíbulas, medida en g/ml, tiene un punto de inflexión a las 4.4 ± 0.9 semanas que no

discrepa del punto de inflexión de la curva de peso corporal (6^a semana de edad). La densidad medida en los términos indicados es función de la mineralización de la matriz. La mineralización del hueso periodontal sano, estimada por densitometría radiológica, coincide con los resultados anteriores.

Como la rata es un animal que tiene sólo una dentición (*monofiodonte*) era de esperar que los molares no modificaran su diámetro mesio-distal durante el crecimiento. Como se discute más abajo, por razones funcionales el diámetro del 1° molar es mayor que el del 2° y éste que el del 3°. La erupción del tercer molar recién ocurre a la 4° semana de edad.

En general, la lactancia de las ratas dura tres semanas. Sin embargo, las crías comenzaron a consumir alimento sólido, durante la última semana de lactancia. El hecho de que la erupción del 1° y 2° molar ocurre a la 2^a semana coopera con la incorporación del alimento sólido a la dieta. El 3er. molar, en cambio, lo hace a la 4^a semana cuando los animales acceden exclusivamente al alimento sólido.

La densidad mineral de las coronas se modifica en función del tiempo de la misma manera para el 1° y 2° molar. La densidad mineral máxima corresponde al

3° molar el cual erupciona dos semanas más tarde que los anteriores y aumenta su densidad mineral (en proyección vestibulo-lingual) en función del tiempo a una tasa 4 veces más lenta que los otros dos molares alcanzando un máximo de contenido mineral que duplica al del 1° y 2° molar.

El aparato masticatorio se considera como un sistema mecánico donde fuerzas con ciertas direcciones y amplitudes son generadas por los músculos para causar movimientos que satisfagan los requerimientos de la alimentación.

La articulación de la mandíbula tiene una estructura tal que cuando los incisivos ocluyen, los molares no se tocan. Durante la masticación los molares están en contacto y los incisivos no.

Desde un punto de vista mecánico, la mandíbula satisface la definición de palanca: aparato que permite equilibrar o vencer ciertas fuerzas llamadas resistencias por medio de otras fuerzas llamadas potencias⁽⁶⁷⁾. La mandíbula es una palanca de segundo grado: la Resistencia se encuentra entre el punto de apoyo y el de aplicación de la Potencia.

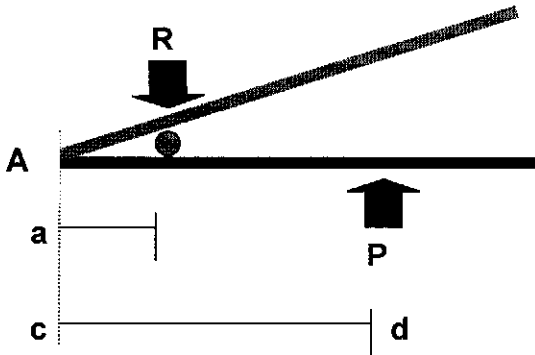


Figura 5.1. Palanca de 2º grado. R: resistencia, A: punto de apoyo, P: potencia.

La Ley de equilibrio de la palanca establece que el producto de la Potencia por su brazo de palanca ($P \times cd$) es igual a la Resistencia por el suyo ($R \times ab$).

La Figura 5.1 explica que como el brazo de palanca de la Potencia (P) es 3 ó más veces más largo que el de la Resistencia (R, el alimento) la disposición de los elementos del aparato masticatorio reducen, en 3 ó más veces la fuerza requerida para moler los alimentos.

El mayor grado de calcificación de los terceros molares respecto de los primeros y segundos y su disposición en la mandíbula implicaría una adaptación a su función. Además, el menor diámetro de los terceros molares permite aumentar la presión en el

punto de apoyo sobre el alimento, facilitando su fraccionamiento.

Masticar y roer son acciones que involucran a los principales músculos: el masetero y el temporal que actúan a distinto tiempo en el proceso de masticación. El registro electromiográfico muestra que primero llega a su pico de acción el temporal, luego el masetero profundo y por último el superficial, como se describe en la Figura 5.2⁽⁶⁸⁾.

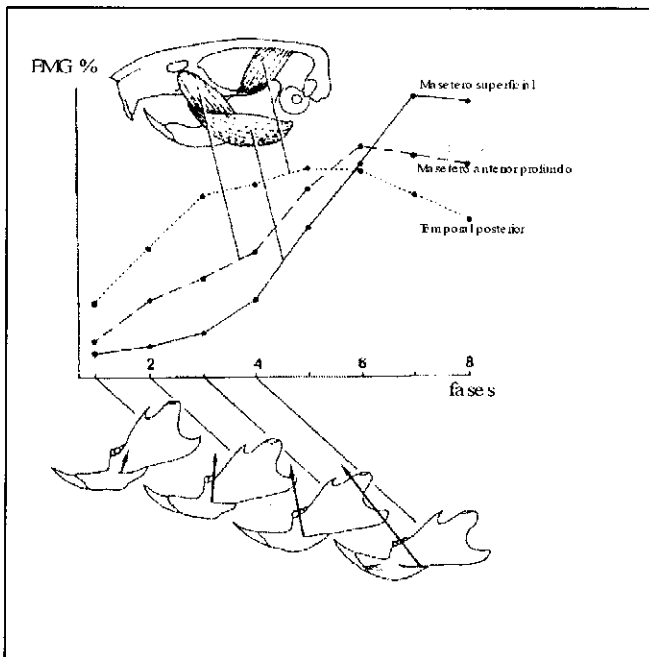


Figura 5.2. Valores electromiográficos de la contracción de los músculos aductores de la mandíbula: temporal posterior, masetero anterior profundo y masetero superficial

Tal como era de esperar, por la calidad del alimento utilizado, las superficies oclusales muestran desgaste y la longitud ocluso-cervical de las coronas se reduce con el progreso de la edad.

Los procesos de erupción activa y pasiva aumentan la longitud radicular en función del tiempo. Como se discute más adelante estos fenómenos oscurecen la interpretación de la medida del hueso periodontal de soporte (HPS) cuando el animal está en la etapa de pleno crecimiento.

Se han puesto en evidencia interesantes aspectos del aparato masticatorio de la rata que, probablemente, sean evidencia de la adaptación al acceso de alimentos de variada dureza.

5.2.2. CRECIMIENTO EN RATAS DIABÉTICAS POR ALOXANO

En esta Tesis, la inclusión del estado diabético en el desarrollo de la enfermedad periodontal "espontánea" de la rata tuvo dos objetivos:

a) estudiar el impacto de la diabetes mellitus sobre la hemimandíbula y el periodonto.

b) comprobar en este modelo experimental las técnicas desarrolladas durante el estudio de los animales controles.

El análisis de investigaciones en animales ha perfeccionado nuestro conocimiento sobre los mecanismos afectados por el estado diabético. Aunque éste es producido por la falta de insulina, el estado diabético es un cuadro mucho más complejo.

El análisis de los efectos de la insulina sobre las células óseas ha demostrado que posee un claro efecto anabólico sobre la matriz y el mineral óseo⁽⁶⁹⁻⁷²⁾.

La diabetes tiene un efecto adverso sobre el crecimiento corporal porque implica una grave perturbación en la eficiencia de la distribución de la energía⁽⁷³⁾. Algunos resultados sugieren que la diabetes implica la aceleración del envejecimiento: la constante de Brody asociada con la cinética del apetito está reducida respecto de los controles y los animales diabéticos alcanzan el plateau de peso corporal antes que los controles con valores absolutos más bajos⁽⁷³⁾. Esto coincide con los resultados obtenidos en esta Tesis, ya que las ratas diabéticas mostraron una disminución del peso corporal, a pesar de la hiperfagia, al ser comparada con los animales controles.

Wettenhall y col⁽⁷³⁾ demostraron que las ratas diabéticas por aloxano (administrado en el momento

del pico de crecimiento) muestran, respecto de sus controles y en función de la deficiencia de insulina, una progresiva reducción del peso seco del fémur, del grosor de la corteza diafisiaria, del volumen de hueso trabecular metafisiario y del espesor del cartílago de crecimiento.

En las ratas diabéticas por aloxano ó estreptozotocina, el arresto del crecimiento tiene un obvio impacto en todas las variables del tejido óseo ^(69,74-76). Las tasas de formación y reabsorción óseas están reducidas. El efecto es evidente aun normalizando sus valores por unidad de peso de la masa ósea ⁽⁶⁹⁾.

El impacto de la diabetes sobre la masa ósea puede ser evaluado comparándola con la de los animales controles de la misma edad. Si la insuficiencia insulínica es leve (glucemias matutinas entre 1 y 3 g/l) la masa ósea corporal no está afectada ^(69,77).

Los animales diabéticos utilizados en esta Tesis no mostraron diferencias significativas en peso seco, volumen ni densidad mandibular al compararlos con los controles. Esto se puede deber a la baja proporción de tejidos blandos que contiene la hemimandíbula, ya

que los tejidos blandos son los que más se deterioran en el estado diabético.

Como era de esperar, la disminución del peso corporal produjo una relación entre peso de la hemimandíbula/peso corporal superior a la de los controles.

La diabetes experimental por aloxano cursa con altos niveles circulantes de hormona paratiroidea, que no se normaliza aumentando el contenido de calcio de la dieta⁽⁶⁹⁾. Este peculiar fenómeno ha sugerido los siguientes interrogantes:

a) Actúa la PTH del mismo modo que en los animales normales?. La respuesta parece ser negativa, ya que modificaciones importantes del calcio dietario no se acompañan de dramáticos descensos en los niveles de PTH.

b) Es biológicamente activa la PTH de los animales diabéticos?. Según muestra un estudio, la glicosilación de la hormona (fenómeno común a muchas proteínas en el estado diabético), le hace perder actividad⁽⁷⁸⁾.

c) Responde el tejido óseo diabético de manera normal a la PTH?. La respuesta es también negativa como lo indican los resultados

expuestos por Locatto y col⁽⁷⁰⁾, y la demostración de que, in vitro, la tasa de reabsorción es función directa de la concentración de insulina.

Locatto y col.⁽⁷⁴⁾ han demostrado efectos de la interacción entre la hormona paratiroidea y la insulina. Altas dosis de hormona paratiroidea promueven la reabsorción ósea en animales tiro-paratiroidectomizados y muestran un efecto aditivo sobre la calcemia y fosfatemia cuando la insulina y el extracto paratiroideo se administran conjuntamente.

El colágeno es la proteína más abundante de los mamíferos, que se glucosila durante el estado diabético. Es difícil evitar la conclusión de que la glucosilación del colágeno es un componente significativo de la reducción en la tasa de reabsorción ósea en el estado diabético. Se ha demostrado que el colágeno extraído de los huesos de ratas diabéticas es más resistente a la hidrólisis enzimática por colagenasa que el proveniente de ratas controles⁽⁷⁴⁾.

En la rata diabética por pancreatectomía⁽⁷⁹⁾, modelo experimental no utilizado en esta Tesis, la

tasa de reabsorción ósea es elevada y no enteramente acoplada con la formación. El lector debe advertir que por ausencia del páncreas exocrino, estos animales tienen un grave defecto en la absorción de calcio (entre otros nutrientes) con el consecuente estímulo paratiroideo. La remodelación ósea de estos animales se asemeja a la que ocurre en el síndrome de Cushing⁽⁸⁰⁾. Las ratas diabéticas no tienen concentraciones plasmáticas elevadas de corticosterona. Esto ocurre sólo cuando están cetóticas y su estado general es malo⁽⁸¹⁾.

5.2.3. CRECIMIENTO DE RATAS TRATADAS CON BISFOSFONATOS

Dada la brevedad del tratamiento con una dosis adecuada pero reducida de bisfosfonatos, el crecimiento no fue afectado significativamente.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos en los valores de peso corporal, relación volumen mandibular/peso vivo y densidad mineral de las coronas. Con respecto a la densidad de la hemimandíbula, si bien no se observó una diferencia significativa entre los grupos, el valor

de esta variable tiende a aumentar al comparar los animales controles con los tratados.

Se encontró un aumento significativo en el peso seco y volumen mandibular de los animales tratados con Lidadronato respecto de los controles. Estos resultados observados son congruentes con el conocido efecto antireabsortivo de estas drogas⁽⁸²⁾.

5.3. TÉCNICAS DE VALORACION DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

A continuación se discute la eficiencia de cada una de las técnicas empleadas para la valoración de la enfermedad periodontal espontánea de la rata.

5.3.1. Examen clínico

Los incisivos de los roedores no son adecuados para el estudio de la Enfermedad Periodontal ya que son de crecimiento continuo. Los molares son la alternativa debido a su semejanza en anatomía y función con los de los seres humanos^(10,16).

La enfermedad periodontal en las ratas puede ser evaluada utilizando técnicas que requieren el examen directo bajo microscopio. La anatomía bucal de la rata es un factor limitante para la evaluación aludida, dado el difícil acceso clínico a la zona

posterior por la invaginación de la encía hacia la línea media en el diastema que separa incisivos de molares.

No obstante la información recogida sobre el progreso de la Enfermedad Periodontal Espontánea en función de la edad, las imágenes clínicas no evidencian alteraciones patológicas del tejido gingival (Foto 5.1).

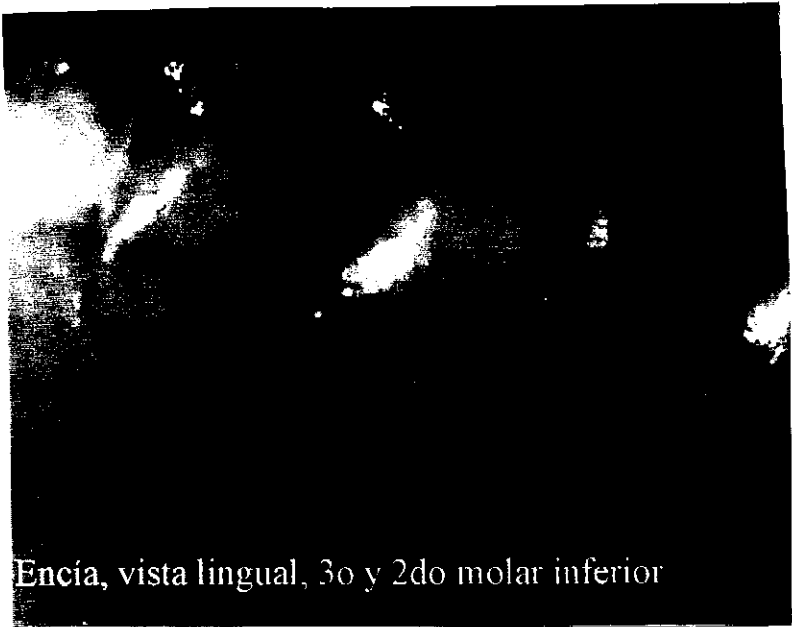


Foto 5.1. Imagen clínica de la encía de la rata. Obsérvese el aparente estado de salud gingival.

5.3.2. Estudios radiológicos. Análisis morfométrico y densitométrico

Esta Tesis contiene la descripción minuciosa del desarrollo de la técnica de densitometría ósea radiológica (Apéndice II), aplicada al examen de la enfermedad periodontal de la rata.

La radiografía simple del hueso no es suficiente para diagnosticar pérdidas tempranas de masa ósea. La inspección ocular de las radiografías requiere pérdidas mayores al 40% de la masa ósea para que el cambio sea aparente. Se han desarrollado procedimientos que mejoraron las mediciones del contenido mineral. La técnica de densitometría ósea radiológica está basada en la comparación de las densidades ópticas producidas en la placa radiográfica por un estándar y por el hueso en una exposición simultánea. La técnica mide el contenido mineral por unidad de superficie de la proyección del espécimen sobre el film. La "densidad" mineral en un sitio estandarizado de medición (tal como las hemimandíbulas) unifica en un solo resultado los tres principales componentes de la estructura ósea: el grosor de la cortical, su porosidad, el grado de mineralización del hueso cortical + trabecular (con y

sin evidencia de reabsorción) y la densidad mineral de las coronas.

Además de medir el grado de mineralización, el análisis de las imágenes digitales de las radiografías ha permitido medir el diámetro de los molares, el número de focos de reabsorción y su área. La técnica tiene las ventajas de su bajo costo, reproducibilidad, facilidad de ejecución y utilización de equipamiento estándar.

5.3.3. Examen histológico

Los estudios histológicos dan información relevante porque permiten evaluar factores causales de la enfermedad tales como la infiltración linfocitaria^(8,25,31) y la inflamación concomitante⁽⁸⁾ que resulta en la pérdida de inserción de los tejidos blandos al hueso y el incremento de la actividad osteoclástica⁽²⁷⁻²⁹⁾ que, según la literatura, es inducida por las citoquinas segregadas por los linfocitos⁽³⁵⁾.

Sobre cortes histológicos, también es posible analizar el nivel óseo periodontal (nivel de inserción de la pieza en el hueso de soporte). Este método es menos práctico y más laborioso que la medición sobre mandíbulas descarnadas. Además podría introducir un error metodológico ya que la técnica

histológica requiere descalcificación y deshidratación. Hay evidencia experimental que demuestra que la medición de la distancia entre el límite amelocementario y la cresta ósea alveolar (distancia LAC-COA) en las mandíbulas descarnadas es más precisa que mediante el análisis histológico^(8,31).

5.3.4. Medición de la distancia LAC-COA sobre la pieza disecada (Examen macroscópico)

En general, el método morfométrico de elección utilizado en esta Tesis ha sido la medición de la distancia desde la línea amelocementaria a la cresta ósea alveolar (LAC-COA) sobre las mandíbulas descarnadas. Este método es reproducible y mide la pérdida ósea en las caras libres de las piezas dentarias, fenómeno ya aludido en la Introducción. Este método no cuantifica la cantidad de mineral perdido ni la reabsorción ósea en las caras interproximales. La mayor limitación de esta técnica es que mide el total de la destrucción tisular que se ha producido hasta el día del sacrificio. Es decir, no se presta a un estudio prospectivo sobre la actividad de la enfermedad. Un análisis de la cinética del proceso, como la mostrada en esta Tesis,

requiere el sacrificio de una serie animales a diferentes edades.

La distancia LAC-COA aumenta con el paso del tiempo y es mayor en la cara lingual que en la vestibular (Foto 5.2). Este hallazgo concuerda con un estudio efectuado por Jossi y Schoeder⁽¹¹⁾ quienes encontraron un mayor incremento de esta distancia en las caras linguales que en las caras vestibulares de los molares. Esta diferencia en ambas caras estaría relacionada con la topografía del hueso alveolar mandibular, que es más grueso en la cara vestibular que en la lingual.

En otro estudio⁽⁸⁾ realizado con ratas libres de gérmenes infectadas con gérmenes asociados con la enfermedad periodontal humana desde los 21 a los 84 días de edad, se observó que la destrucción de los tejidos periodontales aumentó con el tiempo. El aumento de la distancia LAC-COA (pérdida de hueso) fue mayor en los infectados que en los controles. El efecto fue particularmente notorio en la vecindad del surco por el material foráneo introducido.



Foto 5.2. Imagen de la mandíbula descarnada y teñida con azul de metileno. Medición de la distancia LAC-COA.
Cuadro Superior: Cara vestibular
Cuadro inferior: Cara lingual.

5.3.5. Medición del Hueso Periodontal de Soporte

En esta Tesis la enfermedad periodontal "espontánea" se estudió en ratas de 3 a 15 semanas de edad, etapa que incluye el período de rápido crecimiento en esta especie.

La cinética de la pérdida del hueso periodontal de soporte para las tres raíces del primer molar siguió una función lineal con una pendiente no diferente de cero, mostrando una inserción promedio del 60%. La cinética de este proceso para el 2° y 3° molar mostró una curva bifásica para todas las raíces.

En este período los molares erupcionan en coincidencia con una intensa tasa de remodelación ósea. Como consecuencia de ello, en la medición del hueso periodontal de soporte se combinan tres fenómenos:

a) la erupción activa. Este fenómeno que se evalúa clínicamente y/o radiográficamente se produce entre la tercera a la quinta semana de edad.

b) la erupción pasiva. Este fenómeno ocurre fisiológicamente cuando los molares entran en oclusión. Compensa la atrición provocada por la masticación, depositando cemento por aposición en sus ápices

c) la enfermedad periodontal.

La combinación de estos fenómenos mencionados explicaría las curvas bifásicas descriptas anteriormente (Ver Resultados Figuras 4.17 y 4.18).

Por lo expresado, este método no es aplicable en la etapa de activo crecimiento del animal. La medición del hueso periodontal de soporte es un recurso útil y válido después que el animal haya completado su crecimiento. Con excepción de esta técnica, las demás han sido muy útiles en el examen de la Enfermedad Periodontal Espontánea de la rata.

5.4. LA ENFERMEDAD PERIODONTAL NO EXPERIMENTAL EN LA RATA

En esta Tesis se denominó "espontánea" a la enfermedad periodontal de la rata, ya que ésta se desarrolla sin ser inducida experimentalmente por introducción de microorganismos o elementos extraños en el surco.

5.4.1. Desarrollo de la enfermedad periodontal en ratas controles

Los focos de reabsorción ósea periodontal aparecen a la 4^a semana, luego del destete, llegando al máximo a la 6^a o 7^a semana. El área total en reabsorción sigue la misma evolución.

La densidad mineral del hueso periodontal de soporte aumenta alcanzando el máximo a la 6^a semana y luego permanece constante. La densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción no tiene una tendencia definida entre la 6^a y 15^a semana. Las áreas en reabsorción pierden en promedio 56% del mineral del hueso periodontal normal.

La distancia desde el límite amelocementario a la cresta ósea alveolar (LAC-COA) es mayor en la cara lingual que en la vestibular para los tres molares.

La cinética de la pérdida del hueso periodontal de soporte para las tres raíces del primer molar siguió una función lineal con una pendiente no diferente de cero, mostrando una inserción promedio del 60%. La cinética de este proceso para el 2° y 3° molar mostró una curva bifásica para todas las raíces.

5.4.2. Efectos de la diabetes sobre el desarrollo de la enfermedad periodontal

Estudios publicados asocian el retardo de la cicatrización y la periodontitis en la diabetes con la alteración de la expresión genética de citoquinas por los macrófagos⁽⁸³⁻⁸⁷⁾. Así el déficit en citoquinas debido a la hipofunción de los macrófagos inducida por la diabetes puede representar una alteración sistémica generalizada que produce un retardo o un defecto en la cicatrización que conduce a una periodontitis severa.

Las alteraciones inducidas por la diabetes en los mecanismos de defensa del huésped o en la oxigenación tisular pueden favorecer el crecimiento de ciertos gérmenes creando un ambiente que hace prevalecer la microflora periodontal anaeróbica o más virulenta⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾. Defectos en la función de los neutrófilos, incluyendo quimiotaxis perturbada, fagocitosis y muerte han sido informados en diabéticos⁽⁹²⁻⁹⁴⁾. Pocas son las investigaciones de periodontitis en diabéticos que han sido llevadas a cabo a nivel celular o molecular refiriéndose a los mecanismos y mediadores de la respuesta del huésped a la injuria tisular.

Aunque se han efectuado avances en la identificación y tratamiento de algunas complicaciones diabéticas, poco progreso se ha hecho en prevenir la morbilidad asociada con la patología periodontal.

Como demostración del impacto de la ausencia de insulina en el desarrollo del tejido óseo, se ha informado que seres humanos con diabetes de inicio juvenil tienen baja masa ósea⁽⁹⁵⁻⁹⁹⁾. En los diabéticos con inicio adulto de su enfermedad, los informes son variados: poseen baja⁽¹⁰⁰⁾, normal⁽⁹⁹⁾ o elevada masa ósea⁽¹⁰¹⁾.

La enfermedad periodontal desarrollada por los animales diabéticos utilizados en esta Tesis se caracterizó por:

- a) Un mayor número de focos de reabsorción que en los animales controles hacia la 11^o semana, aunque de crecimiento más lento. A pesar de esto, se observó un menor área total de reabsorción involucrada. La disminución del turnover óseo y la probable tolerancia inmunológica a los gérmenes habituales en el alimento y la boca explicarían esta observación (ver Conclusiones).

- b) La densidad mineral del hueso periodontal sin patología es, en promedio, un 34% menor en los animales diabéticos comparándolo con los controles, no encontrándose su evolución correlacionada con la edad.
- c) De manera semejante a lo observado con la densidad del hueso periodontal sano, la densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción de los animales diabéticos es significativamente menor que en los controles.
- d) Comparando la densidad mineral del hueso sin y con patología, entre la 6^a y 11^a semana de edad, los animales diabéticos pierden aproximadamente 49% de la densidad mineral en las áreas en reabsorción.
- e) La evolución de la distancia LAC-COA en función del tiempo para ambas caras de los tres molares no difirió entre animales diabéticos y controles.

5.4.3. Efecto del tratamiento con bisfosfonatos sobre el desarrollo de la enfermedad periodontal

Dosis iguales de dos bisfosfonatos no produjeron los mismos resultados. La droga Lidadronato redujo el área total en reabsorción a valores inferiores a los del grupo control. El Olpadronato no produjo modificaciones significativas en esta variable.

La densidad mineral del hueso periodontal sin patología aumentó significativamente en el grupo tratado con Olpadronato. Esta variable no se modificó por efectos de la administración de Lidadronato.

Para el primer y segundo molar, la distancia entre el límite amelocementario y la cresta ósea alveolar no difirió entre los animales controles y los tratados. Sin embargo en el tercer molar se observó una disminución significativa de esta distancia en el grupo tratado con Lidadronato.

Estos resultados confirman que, en principio, con las técnicas empleadas se observan modificaciones congruentes con el efecto antiosteoclástico de los bisfosfonatos.

5.4.3.1. Modo de acción de los bisfosfonatos

Los bisfosfonatos, compuestos sintéticos que se desarrollaron en los últimos 30 años, son poderosos

inhibidores de la reabsorción ósea y agentes eficaces para el control de la osteoporosis y otras enfermedades del metabolismo óseo.

Se supone que el principal mecanismo de la acción antireabsortiva de los bisfosfonatos es la depresión en el desarrollo de las células progenitoras de osteoclastos, del reclutamiento de osteoclastos y la promoción de la apoptosis de osteoclastos maduros que conduce a la reducción en la remodelación ósea. Algunos de los efectos de los bisfosfonatos sobre el desarrollo de los osteoclastos parecen deberse a efectos de estas drogas sobre el linaje respectivo.

La disponibilidad de dos cadenas laterales en la estructura de estos compuestos permite una serie de sustituciones y el desarrollo de una variedad de análogos con diferentes propiedades farmacológicas. Usualmente la cadena R₂, considerada primariamente responsable de sus acciones biológicas, ha dado origen al desarrollo de una serie de bisfosfonatos clínicamente útiles que poseen importantes actividades⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾. Las sustituciones en la cadena R₁ han recibido menos atención. Se cree que esta parte de la molécula, junto con el enlace P-C-P, determina la afinidad o ligamiento a los cristales de fosfato

de calcio. En la jerga de estas investigaciones, los sustituyentes en R1 son aludidos como el "anzuelo" ó "gancho" y, habitualmente, no contribuyen sustancialmente a la actividad de los bisfosfonatos.

El mecanismo de acción molecular de estas drogas está en pleno análisis pero aun no ha sido elucidado totalmente. Luckman y col⁽¹⁰⁵⁾ han sugerido que las enzimas de la ruta metabólica del mevalonato (precursor del colesterol) son el blanco más probable. Esta ruta metabólica conduce a la formación de varios productos que terminan en colesterol y que tiene isoprenoides como intermediarios (como el farnesil-pirofosfato y el geranil-pirofosfato) que se usan para "prenilar" proteínas que requieren esta modificación postraslacional para alcanzar su estructura óptima. Los bisfosfonatos actúan inhibiendo la síntesis del colesterol a partir de la acetilcoenzima A⁽⁸²⁾, bloqueando la formación de geranil pirofosfato y farnesil pirofosfato. Esto inhibe la prenilación de proteínas como Ras, Rho, Rac y Rab. La prenilación es una reacción que adiciona una cadena isoprenica a la estructura proteica. Esta cadena fija esas proteínas a la membrana del osteoclasto y células precursoras, en un dominio intracelular determinado. Las proteínas aludidas

están implicadas en los procesos de proliferación y diferenciación celular que se requieren para formar el borde en cepillo, característico del osteoclasto maduro. El borde en cepillo le permite segregar protones y liberar vesículas de enzimas proteolíticas para reabsorber el hueso. Además de bloquear la diferenciación, los bisfosfonatos también inducen la cascada de eventos que llevan a la apoptosis de los osteoclastos⁽¹⁰⁶⁾.

En esta Tesis se han probado los efectos del Olpadronato, bisfosfonato de reconocido éxito clínico y el NH₂-Olpadronato (Lidadronato) con el objeto de comprobar si la modificación efectuada en R1 mejoraba los efectos del primero sobre la reabsorción ósea en las estructuras periodontales.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1. CONCLUSIONES

6.1.1. CRECIMIENTO

- El crecimiento global de la mandíbula de las ratas controles es armónico con el corporal.
- La diabetes tiene un efecto adverso sobre el crecimiento corporal. Este efecto no se manifiesta en el peso seco, densidad ni volumen de la mandíbula.
- Como era de esperarse, en función de la brevedad del tratamiento y lo reducido de las dosis empleadas, no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con bisfosfonatos y controles en los valores de peso corporal, relación volumen mandibular/peso vivo, densidad mineral de las coronas y densidad de la hemimandíbula.
- Se encontró un aumento significativo en el peso seco y volumen mandibular de los animales tratados con Lidadronato respecto de los controles. Estos resultados observados son congruentes con el conocido efecto antireabsortivo de estas drogas.

6.1.2. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL

- La técnica de densitometría ósea radiológica, asociada al análisis de la imagen digital de la radiografía, ha demostrado ser de gran utilidad ya que permite la evaluación simultánea de los tres principales componentes de la estructura ósea: el grosor de la cortical, su porosidad y el grado de mineralización del hueso cortical + trabecular.
- La medición de la distancia desde la línea amelocementaria a la cresta ósea alveolar (LAC-COA) es un excelente método morfométrico utilizado en esta Tesis. Esta distancia aumenta con el paso del tiempo y es mayor en la cara lingual que en la vestibular, tanto en animales controles, diabéticos como tratados con bisfosfonatos.
- La medición del hueso periodontal de soporte (HPS) no ha demostrado ser un recurso útil para evaluar el curso de la enfermedad periodontal de ratas de 3-15 semanas, etapa que incluye el período de rápido crecimiento en esta especie. En este período los molares erupcionan en coincidencia con una intensa tasa de

remodelación ósea donde se combinan la erupción activa, la erupción pasiva y la enfermedad periodontal. Se concluye que este método será útil después que el animal haya completado su crecimiento.

6.1.3. DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL NO EXPERIMENTAL EN LA RATA

- En ratas controles, la enfermedad periodontal aparece luego del destete y se desarrolla hacia la 6ª o 7ª semana de vida sin evidencias de alteraciones patológicas del tejido gingival.
- La enfermedad periodontal desarrollada por los animales diabéticos muestra un mayor número de focos de reabsorción aunque de crecimiento más lento. A pesar de esto, se observa menor área total en reabsorción involucrada. La disminución del turnover óseo y la probable tolerancia inmunológica a los gérmenes habituales en el alimento y la boca explicarían esta observación.

- En los animales diabéticos la densidad mineral del hueso periodontal sin patología es, en promedio, 34% menor comparándolos con los controles. La densidad mineral del hueso periodontal en reabsorción también es significativamente menor. La distancia LAC-COA no difiere de la observada en los controles.
- Con las técnicas empleadas se observan modificaciones congruentes con el efecto antiosteoclástico de los bisfosfonatos. Dosis iguales de dos bisfosfonatos no produjeron los mismos resultados. El Lidadronato, bisfosfonato de tercera generación, reduce el área total en reabsorción y disminuye significativamente la distancia entre el límite amelocementario y la cresta ósea alveolar en el tercer molar. El Olpadronato aumenta significativamente la densidad mineral del hueso periodontal sin patología.

6.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

6.2.1. ORIGEN DE LOS INTRIGANTES DE ESTA TESIS

Realizando experimentos para poner a punto la técnica de infección de los animales con bacterias periodontopáticas inoculadas experimentalmente, se observó que las ratas que no habían sido inoculadas exhibían focos de reabsorción interradiculares e interproximales asociados con el desarrollo de la enfermedad periodontal por lo que se decidió estudiar esta enfermedad "espontánea".

La evidencia acumulada en el desarrollo de esta Tesis es contradictoria: por una parte, una serie de indicadores (número y amplitud de focos de reabsorción evidentes por su radiolucidez, la pérdida ósea puesta en evidencia por el aumento de la distancia entre la línea amelocementaria y la cresta ósea alveolar y las imágenes histológicas de reabsorción ósea) indican que la enfermedad periodontal "espontánea" progresa con el avance de la edad. Sin embargo, sólo a la 4ª. semana se observaron los acúmulos de linfocitos en el tejido periodontal.

6.2.2. HIPÓTESIS QUE PLANTEAN LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS

Los resultados de este trabajo sugieren dos hipótesis:

A.- ¿La Enfermedad Periodontal "Espontánea" es un ejemplo de tolerancia inmunológica?.

B.- ¿Las modificaciones observadas en el periodonto de ratas muy jóvenes son producto de los antígenos ambientales en un período de inmadurez del sistema inmune?.

A.- ¿Es la Enfermedad Periodontal "Espontánea" un ejemplo de tolerancia inmunológica?

La evidencia acumulada en la literatura sobre la pérdida de hueso periodontal ha producido el siguiente consenso: las bacterias de la placa producen inflamación, las células características de la inflamación segregan citoquina interleuquina-1 (IL-1), de reconocida capacidad reclutadora de osteoclastos, los que comienzan a reabsorber hueso alveolar, iniciándose así la enfermedad periodontal⁽¹⁰⁷⁻¹¹¹⁾.

La explicación de la tolerancia a las toxinas de los gérmenes de la placa dental puede encuadrarse dentro del fenómeno de tolerancia inmunológica.

La literatura⁽¹¹²⁾ revela que antígenos extraños pueden administrarse de forma que induzcan preferentemente tolerancia en vez de una respuesta inmunitaria. En general, los antígenos proteicos administrados con adyuvantes favorecen la inmunidad, mientras que las dosis altas de antígenos administrados por vía sistémica sin coadyuvantes tienden a producir tolerancia.

La razón más probable de este fenómeno es que los adyuvantes estimulan la expresión de coestimuladores en las células presentadoras de antígenos (CPA) y, en ausencia de coestimulación, los linfocitos T que reconocen el antígeno se pueden tornar anérgicos. Es posible que los antígenos tolerógenos también activen a linfocitos T reguladores o favorezcan la diferenciación de los linfocitos T en células productoras de citocinas, tales como interleuquina-4 (IL-4), que no induce la inmunidad celular. Otras características de los antígenos, así como su vía de administración también influyen en este equilibrio entre inmunidad y tolerancia (Tabla 6.1). En la Tabla 6.2. se muestran las similitudes y diferencias de los mecanismos de tolerancia de los linfocitos T y B.

Tabla 6.1. Factores que determinan la inmunogenicidad y tolerogenicidad de los antígenos.

Factor	Factores que favorecen la estimulación de la respuesta inmunitaria	Factores que favorecen la tolerancia
Cantidad	Varía según los distintos antígenos	Dosis elevadas
Persistencia	Corta duración (desaparece por la respuesta inmunitaria)	Prolongada (la estimulación repetida de los linfocitos T induce su apoptosis).
Vía de entrada, <u>Localización</u>	Subcutánea, intradérmica; ausencia en los órganos primarios.	Intravenosa, oral; presencia en los órganos primarios.
Presencia de Adyuvantes	Antígenos con adyuvantes: estimulan a los linfocitos T cooperadores.	Antígenos sin adyuvantes: no son inmunógenos ni tolerógenos.
Propiedades de las células presentadoras de antígenos (CPA)	Concentraciones elevadas de coestimuladores.	Concentraciones bajas de coestimuladores y citocinas.

Tabla 6.2. Diferencias entre linfocitos T y B respecto del fenómeno de tolerancia inmunológica.

Características	Linfocitos T	Linfocitos B
Localización principal de la inducción de tolerancia.	Timo (corteza), periferia.	Médula ósea, Periferia.
Estadios madurativos sensibles a la tolerancia.	Timocitos CD4+CD8+ (doble positivo).	Linfocito B inmaduro (IgM+IgD-).
Estímulos para la inducción de tolerancia.	<u>Central:</u> reconocimiento de un antígeno en el timo con avidéz elevada. <u>Periférica:</u> presentación de un antígeno por una CPA que carece de coestimuladores, estimulación repetida por un autoantígeno.	<u>Central:</u> reconocimiento de un antígeno multivalente en la médula ósea con avidéz elevada. <u>Periférica:</u> reconocimiento antigénico sin la ayuda de linfocitos T.
Mecanismos principales de tolerancia.	<u>Tolerancia central:</u> eliminación clonal (apoptosis). <u>Tolerancia periférica:</u> anergia, muerte celular por activación, supresión	<u>Tolerancia central:</u> eliminación local (apoptosis), edición del receptor <u>Tolerancia periférica:</u> bloqueo de la transducción de señales (anergia); incapacidad para penetrar en los folículos linfáticos.

La administración oral de un antígeno proteico suele provocar una importante supresión de la respuesta inmunitaria sistémica, tanto humoral como celular, con respecto a la inmunización con el mismo antígeno. Este fenómeno se conoce como tolerancia oral y se cree que su importancia fisiológica estriba en que es un mecanismo diseñado para evitar las respuestas inmunitarias frente a los antígenos de los alimentos y las bacterias que suelen residir como comensales en la luz intestinal y que son necesarias para la digestión y absorción.

Antígenos administradas en dosis adecuadas por vía oral pueden inducir anergia en linfocitos T específicos para el antígeno o estimular la síntesis de citocinas, tales como el "transforming growth factor beta" ($TGF\beta$), que inhiben la proliferación linfocítica y suprimen la respuesta inmunitaria. De hecho, $TGF\beta$ puede participar en ambos tipos de respuestas frente a la inmunización oral, es decir, la síntesis de inmunoglobulina A (IgA) en las mucosas y la tolerancia sistémica, dado que esta citocina induce el cambio de isotipo de los linfocitos B hacia IgA e inhibe su proliferación.

Esta área de la biología tiene aún amplias áreas vacantes de conocimiento. Todavía no se sabe por qué la administración oral de algunos antígenos (ejemplo: proteínas solubles en cantidades elevadas) induce la tolerancia sistémica de los linfocitos T, mientras que la inmunización oral con otros antígenos, como la vacuna con virus atenuados de la poliomielitis, induce una respuesta protectora de anticuerpos dependiente de linfocitos T y memoria de duración prolongada.

B.- ¿ Las modificaciones observadas en el periodonto de ratas muy jóvenes son producidas por la inmadurez del sistema inmune?

Se conoce que la respuesta inmune, producida por inmunización a una edad temprana, difiere de aquellas producidas en adultos. Algunos estudios indican que las respuestas cuantitativas en los animales jóvenes se desarrollan lentamente y son débiles. Cualitativamente la respuesta tiene un fuerte sesgo TH2 con predominio de producción de anticuerpos y pobre reacción celular⁽¹¹³⁻¹¹⁵⁾.

En ratas de línea "1" del Bioterio de esta Facultad, Pascutti y col⁽¹¹⁶⁾ han observado que la

inoculación con *Tripanosoma cruzi* al destete (3-4 semanas de edad) se resuelve espontáneamente no obstante coincidir con marcadas parasitemias. En los adultos (24-28 semanas de edad) el mismo tratamiento produjo una enfermedad leve con muy baja parasitemia. Las ratas jóvenes presentaron niveles significativamente más bajos de inmunoglobulina inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG) anticuerpos anti-T.-cruzi durante la primer semana de infección. El aumento de resistencia de los adultos parece ser el resultado de la adecuada producción de anticuerpos.

7. APÉNDICES

7.1. APÉNDICE I

7.1. APARATO MASTICATORIO DE LOS ROEDORES

Los roedores son mamíferos exitosos en supervivencia. El número de especies ha sido estimado en dos mil y constituyen cerca del 40% del total de las especies de mamíferos⁽¹¹⁷⁾.

El roedor más primitivo se halló en el Paleoceno tardío (45-55 millones de años AP). En general son pequeños aunque algunos de ellos, como el capibara, pesan unos 50 kilos. Algunos son vegetarianos, comen desde hongos a frutos. Otros se especializan en comer corteza de madera como el castor o insectos como la laucha saltamontes (grasshopper mouse). Las ratas y las lauchas han vivido tanto tiempo en asociación con el hombre que son omnívoros. Aunque tienen diversos aspectos y hábitos todos comparten la particularidad de poseer incisivos característicos que les permiten roer.

Las características definitorias de los miembros del orden Rodentia⁽¹¹⁸⁾ son: un cerebro con pocas convoluciones; un cerebelo que no está cubierto por lóbulos cerebrales; incisivos superiores con forma de escoplo; incisivos que están en continuo crecimiento;

un amplio diastema entre los incisivos y los molares; 4 dientes en cada cuadrante, músculos maseteros bien desarrollados; clavícula y ciego importante; pentadáctilos y plantígrados.

El cráneo y la mandíbula son construcciones diseñadas para resistir cargas externas aplicadas por los músculos y las fuerzas de reacción. El aparato masticatorio se considera como un sistema mecánico donde fuerzas con ciertas direcciones y amplitudes son generadas por los músculos para causar movimientos oclusales que satisfagan los requerimientos de la función alimentaria.

Los sub-órdenes se reconocen basándose en los 3 arreglos de las divisiones del masetero (aductor principal de la mandíbula que se divide en lateral y medio (Figura 7.1)) y en las estructuras del cráneo que acomodan dichas divisiones⁽¹¹⁹⁾.

- protrogomorfos: todo el masetero se origina principalmente en el borde inferior al arco zigomático. Ejemplo: castor.

- **histicomorfos:** la división lateral del masetero se alza sobre el arco zigomático, pero la división media pasa a través del foramen infraorbitario hasta el rostro. Ejemplo: cobayo.
- **sciurormorfos:** la división lateral del masetero se origina en el lado del rostro, la división medial se origina en el lado medial del arco cigomático. Ejemplo: ardilla.
- **miomorfos:** la división lateral del masetero es semejante a los sciurormorfos, pero la división medial cursa hacia arriba a través de la órbita y llega hasta el rostro por medio del foramen infraorbitario. El suborden miomorfos tiene un esquema de especialización cigomasetérica. La porción anterior del masetero lateral se origina en una muy modificada extensión anterior del arco cigomático (formando la placa cigomática que comprime la parte ventral del foramen infraorbitario). La parte anterior del masetero medio que se origina sobre el rostro, pasa a través de la parte dorsal del foramen infraorbitario⁽¹²⁰⁾. Esta combinación de los

arreglos histrico y sciurormorfos contribuye a una más eficiente acción de roer. Ejemplo: rata.

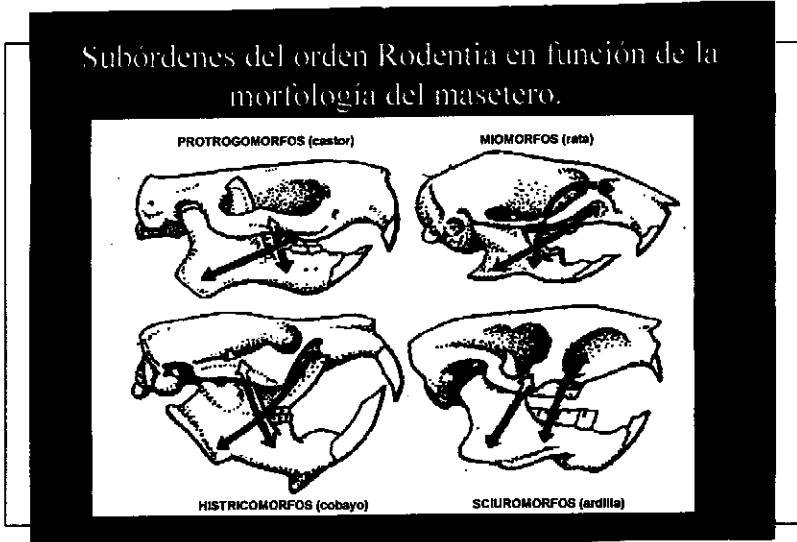


Figura 7.1. Subórdenes del género rodentia en función de la morfología del masetero. Arriba a la izquierda: Protrogomorfos. Arriba a la derecha: Miomorfos. Abajo a la izquierda: Histicomorfos. Abajo a la derecha: Sciurormorfos.

7.1.1. CARACTERÍSTICAS DEL APARATO MASTICATORIO DE LA RATA

1. A diferencia de la mayoría de las especies en las que poseen dos denticiones (diphyodontes), las ratas son monophyodontes es decir que tienen sólo una dentición y exhiben especialización regional (heterodontes) ⁽¹¹⁹⁾.



Figura 7.2. Imagen lateral del cráneo de la rata.

2. La característica común a todos los roedores es un par de incisivos al frente de las mandíbulas superior e inferior (Figura 7.2). Los ápices de los 2 incisivos se extienden hacia atrás en las mismas (Figura 7.3). Estos dientes continúan creciendo toda la vida y deben gastarse al roer. Este proceso mantiene un neto borde afilado al frente de cada incisivo y está en equilibrio la tasa de crecimiento. Se ha medido el crecimiento de los incisivos y en algunas especies es de unos 2 milímetros por semana. Si se pierden los incisivos superiores o inferiores, el otro par crece

descontroladamente y el animal muere porque no puede roer y masticar.

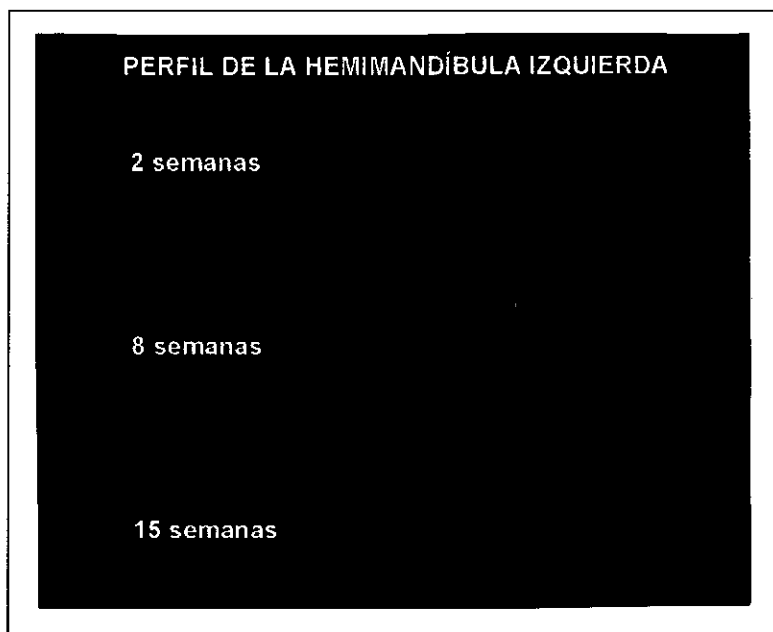


Figura 7.3. Radiografía de la hemimandíbula de la rata a las 2, 8 y 15 semanas de edad.

3. Los roedores no tienen otros incisivos, caninos ni premolares. Esto deja un espacio llamado diastema entre los incisivos y los molares, en el cual las mejillas pueden extenderse y encontrarse en la línea media separando de esta forma las porciones caudal y anterior de la boca (Figura 7.2).

4. La cara frontal de cada incisivo está cubierta con esmalte. El resto del diente está compuesto por dentina que es más blanda. La dentina se desgasta con un ritmo superior al del esmalte. Esto resulta en un desgaste diferencial dejando un extremo distal afilado. El desgaste resultante procede en ángulo, lo que le da el característico perfil de escoplo (Figura 7.4).

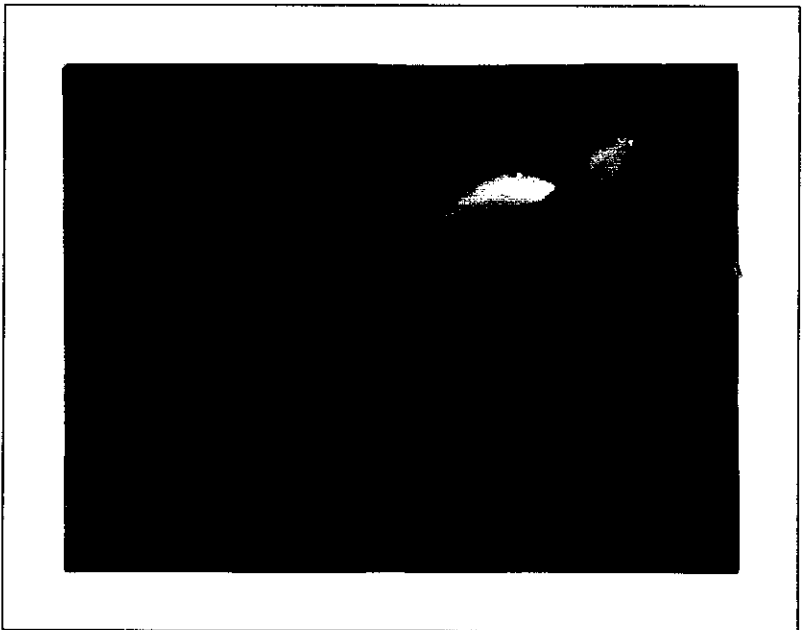


Figura 7.4. Vista proximal del incisivo inferior. Nótese el característico perfil de escoplo.

5. La función de los incisivos es roer, lo que implica movimientos hacia atrás y adelante de la mandíbula, con los incisivos superiores sujetando un objeto duro y los inferiores cortando contra él. El movimiento antero-posterior de la mandíbula es posible porque la fosa glenoide del maxilar superior en la que se articula es elongada y no tiene ningún proceso óseo limitante.

6. Los molares exhiben un crecimiento limitado. El esmalte no se forma en la punta de las cúspides. Conforme los molares se gastan exponen áreas cada vez más amplias de dentina rodeadas por anillos de esmalte. El diferente desgaste de esmalte y dentina sobre las superficies oclusales aumenta la eficacia masticatoria.

7. Los movimientos de la mandíbula inferior durante la alimentación han sido descriptos⁽¹²¹⁾ como ocurriendo en dos ciclos: una fase de ingesta y un ciclo masticatorio. Ambos ciclos tienen tres

golpes que implican movimientos verticales y horizontales (Figura 7.5). La articulación de la mandíbula es tal que cuando los incisivos ocluyen, los molares no se tocan. Durante la masticación los molares están en contacto y los incisivos no. Masticar y roer involucran a los músculos principales: masetero, temporal y pterigoideo (Figura 7.6).

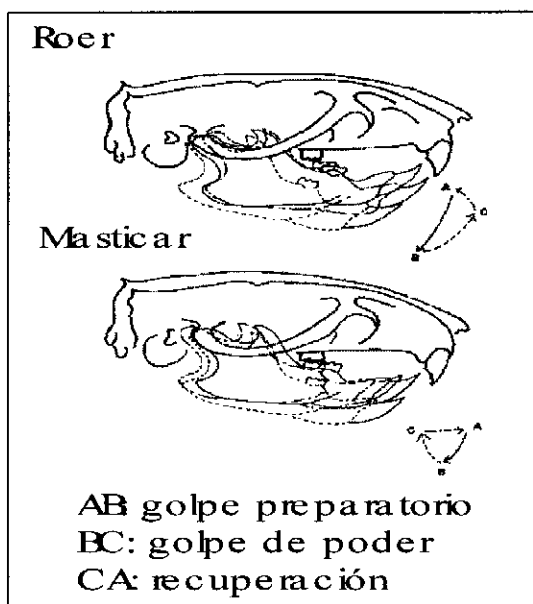


Figura 7.5. Posiciones correspondientes durante el ciclo masticatorio. Superior: Muestra la posición de la mandíbula inferior al inicio del golpe preparatorio A, al inicio del golpe de poder B y al inicio del golpe recuperatorio C. Inferior: Inicio del golpe preparatorio A, inicio del golpe de poder B e inicio del golpe recuperatorio C.

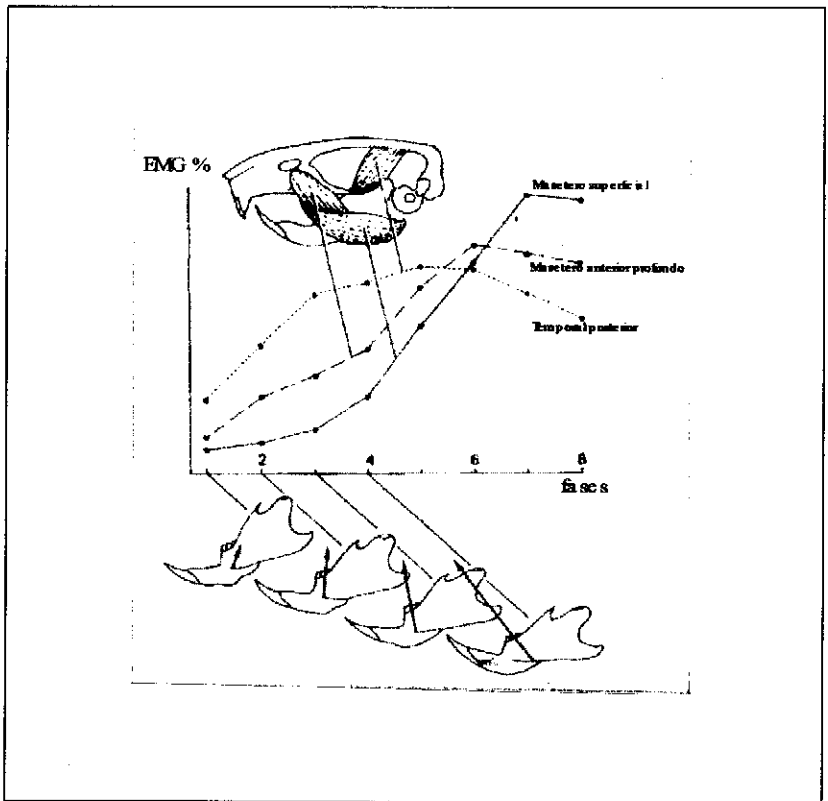


Figura 7.6. Aumento sucesivo de los niveles de disparo (% del área de la curva electromiográfica) del temporal anterior, masetero anterior profundo y masetero superficial durante el cierre de la mandíbula.

8. Algunos estudios han formulado los requerimientos para la alimentación de los herbívoros y carnívoros y sus consecuencias en la forma del aparato bucal⁽¹²²⁻¹²⁷⁾. Los carnívoros se caracterizaban por un músculo temporal muy desarrollado cuya función es cerrar rápidamente la mandíbula, acción retrusiva para resistir fuerzas hacia adelante ejercida sobre los caninos por una

presa que intenta huir. El músculo temporal se inserta en un proceso coronoide ensanchado. El masetero y el pterigoideo son mucho más pequeños y se suponen funcionalmente relacionados a los molares o mordida de los carnívoros. La articulación de la mandíbula está situada ligeramente por encima del plano oclusal (aumentando el poder mecánico del temporal) y es del tipo bisagra, resistentes a fuerzas hacia adelante o hacia atrás. En los ungulados, en contraste, el masetero y el pterigoideo son grandes y poseen un largo brazo de palanca relativo a la articulación, que está localizada por encima del plano oclusal. La fuerza de masticado es vertical y distribuida más parejamente que en los carnívoros sobre los dientes de la mejilla. El masticado transverso unilateral es posible porque la articulación permite movimientos del cóndilo. Los roedores difieren de los ungulados en la articulación localizada relativamente cerca del plano oclusal y que permite considerables deslizamientos antero-posteriores.

7.1.2. ASPECTOS FUNCIONALES DE LA EVOLUCIÓN DE LOS MOLARES

Las teorías de la evolución de los molares han sido dominadas por el concepto de cúspide⁽¹²⁸⁾. El proceso de desarrollo de un diente es repetido en cada cúspide del complejo dental. La idea de que el molar se construye con cúspides está fuertemente incluida en la Teoría Tritubercular⁽¹²⁹⁾. Una cúspide se reconoce porque sobresale de la superficie circundante. Emerge con cúspides adyacentes y aunque en algunos casos pueden delimitarse con fosas, en otros la superficie de las cúspides vecinas es continua y las líneas divisorias son arbitrarias. Las crestas se desarrollan del mismo modo que las cúspides, la única diferencia es que su calcificación está hermanada con la de la cúspide vecina desde el principio.

La evolución de los molares superiores e inferiores ocurrió conservando o reteniendo las interrelaciones oclusales de las cúspides. Las cúspides tienen significado funcional. Ryder⁽¹³⁰⁾ y Cope⁽¹³¹⁾ han relacionado la forma y posición de las cúspides con la dirección de los movimientos masticatorios. Los cambios en el tamaño y orientación de las facetas están asociados con cambios en los

hábitos alimentarios y modos de movimiento de la mandíbula que se reflejan en el diseño de las cúspides (Figuras 7.7 y 7.8).

El estudio de la forma de desgaste de las piezas dentarias provee información sobre cómo han sido usadas. Se distinguen dos tipos de desgaste⁽¹³²⁾: atrición cuando los dientes están en contacto oclusal y abrasión cuando no lo están. La abrasión se debe a los alimentos, la tierra, huesos o cualquier material extraño en la boca. La atrición conduce a la producción de facetas de desgaste en los sitios de mayor contacto. Estas facetas son aplastadas, pulidas y se identifican porque reflejan la luz.



Figura 7.7. Facetas de desgaste en molares superiores de la rata.



Figura 7.8. Facetas de desgaste en molares inferiores de la rata.

7.2. APÉNDICE II

7.2. MÉTODOS RADIOLOGICOS PARA EVALUAR EL CONTENIDO MINERAL OSEO

7.2.1. Revisión de la literatura

La técnica radiogramétrica mide el grosor de la cortical de un hueso metacarpiano (proyección dorsoventral de la mano) u otros huesos tubulares en radiografías estándar. En tales mediciones se calculan varios índices derivados del volumen del hueso cortical. La técnica es simple y ampliamente aceptada, requiriendo solo la habilidad de hacer radiografías reproducibles y realizar mediciones precisas. Pequeños cambios en el hueso cortical (superficies endosteal y periosteal) pueden definirse por mediciones seriadas en el tiempo. A pesar de esto, la radiogrametría no refleja la absoluta realidad del contenido mineral óseo y no mide la porosidad del mineral óseo. Por ello, esta técnica sólo provee información de cambios relativos respecto de una medición inicial⁽¹³³⁾.

La fotodensitometría usa la atenuación producida por el mineral óseo sobre una película radiográfica estándar. Indirectamente mide el contenido mineral.

La graduación del ennegrecimiento del film es medida por fotodensitometría (u ocasionalmente por ensayo químico del contenido de plata sobre la película expuesta). La calibración de cada film es acompañada por la exposición simultánea de una referencia de aluminio que permite obtener un patrón de comparación, ya que tiene similar grado de atenuación de los rayos X que el mineral óseo⁽¹³³⁾.

La absorciometría de fotones monocromáticos se usa para medir el contenido mineral del esqueleto apendicular. El instrumento incorpora una fuente monoenergética de fotones, como los emitidos por el ^{125}I , asociada a un detector de centelleo sólido de NaI. La diferencia en la absorción de los fotones entre el hueso y los tejidos blandos permite calcular el contenido total de mineral óseo presente en la trayectoria examinada. El contenido mineral óseo es expresado en gramos de mineral óseo por centímetro cuadrado del área de proyección ósea⁽¹³³⁾.

La absorciometría de fotones con dos niveles de energía⁽¹³³⁾ es un perfeccionamiento de la técnica con un haz monocromático. Usa un radioisótopo que emite fotones con dos niveles de energía o una fuente de rayos X con filtros adecuados. La medición de la absorción de los fotones de dos energías elimina la

necesidad de mantener constante el grosor del tejido blando a través de la trayectoria examinada, permitiendo su utilización en áreas previamente inaccesibles como la columna vertebral. La señal producida es independiente de la variación en el espesor del tejido blando⁽¹³⁴⁾.

La tomografía computada⁽¹³³⁾ también puede ser usada para medir contenido mineral óseo. Se requiere un estándar de referencia para su calibración. Esta técnica usa haces de energía simple o dual y permite calcular la densidad mineral ósea por unidad de volumen tanto en hueso cortical como trabecular.

El análisis de la activación de neutrones⁽¹³³⁾ es una técnica de investigación que usa una fuente de neutrones de alta energía para activar el contenido de ⁴⁸Calcio del esqueleto y transformarlo transitoriamente en ⁴⁹Calcio. El decaimiento del ⁴⁹Calcio a ⁴⁸Calcio puede ser medido por un contador de radiación gamma logrando la medición del total del calcio corporal. Debido a que el esqueleto contiene más del 98% del total del calcio corporal, esta técnica permite conocer el total del contenido de calcio corporal con gran precisión.

7.2.2. Seguridad radiológica

Las mencionadas son técnicas no invasivas, pero el paciente debe ser expuesto a la radiación. La radiogrametría y fotodensitometría implican una mínima exposición a la radiación^(135,136) como se resume en la Tabla 7.1. Las consideraciones de seguridad radiológica explican las dificultades del estudio de la enfermedad periodontal con técnicas radiológicas en seres humanos.

Tabla 7.1. Comparación de técnicas usadas para medir el contenido mineral óseo⁽¹³⁷⁾.

Técnica	Precisión %	Reproducibilidad %	Exposición local, mrads
Radiogrametría	1-4	6	< 100
Fotodensitometría	1-4	5	< 100
Absorciometria fotónica, Haz simple	3-5 1-3	1-4 4-6	2.5 5-15
Doble haz			
Tomografía computada	1-3	8	200-250
Activación neutrónica	2-3	6	300-5000

Debido a la naturaleza heterogénea del esqueleto y la diferencia entre las técnicas, cada método tiene sus ventajas y limitaciones.

La fotodensitometría tiene problemas técnicos relacionados con la técnica radiográfica y los métodos de procesamiento del film que limitan su uso. A pesar de esto, los recientes avances técnicos de absorciometría radiográfica han reducido la magnitud de este problema⁽¹³⁸⁾. La determinación radiográfica del contenido mineral del hueso esponjoso está limitada por dos razones:

- a) el hueso esponjoso esta siempre rodeado por el cortical, de espesor variable
- b) hay una amplia variación normal en la textura del hueso trabecular.

La absorciometria fotónica de energía simple depende del cuidadoso posicionamiento del sitio examinado del hueso durante el testeo secuencial. Adicionalmente, la técnica requiere un grosor uniforme de los tejidos blandos que rodean el hueso.

La radiogrametría, la fotodensitometría y la absorciometria de un haz monocromático son usadas para medir el contenido mineral de sectores seleccionados del esqueleto (especialmente el esqueleto apendicular).

Estudios microradiográficos en humanos⁽¹³⁹⁾ muestran que la cortical de un sujeto joven tiene una estructura homogénea. Al envejecer, aparece un aumento en la porosidad de la cortical ósea y hay evidencia de un aumento de reabsorción ósea. El contenido mineral del hueso cortical reportado por Arnolt⁽¹⁴⁰⁾ y obtenido por análisis químico es 1.140 a 1.210 mg/cc.

En años recientes hubo un incremento en la demanda de métodos clínicos prácticos para determinar el contenido mineral del hueso in vivo. El tema ha sido revisado extensamente⁽¹⁴¹⁾.

7.2.3. Resumen de la teoría

Los métodos radiológicos de medición de densidad mineral están basados en la comparación de la densidad producida por un estándar y la densidad producida por el hueso en una exposición simultánea sobre una placa radiográfica. La cantidad de energía transmitida por cualquier sustancia expuesta a radiación diagnóstica está relacionada con el número atómico de la sustancia (Z), de la siguiente manera⁽¹⁴²⁾:

$$\mu/\rho = n_o (k Z^{2.94}\lambda^3 + \sigma_6) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Es ventajoso que los números atómicos efectivos, del estándar y la hidroxiapatita ósea, sean similares. El aluminio, que tiene un número atómico de 13 comparado con 15.86⁽¹³⁵⁾ de la hidroxiapatita, tiene como principal desventaja que no siempre puede obtenerse puro. Este hecho hace laboriosa la estandarización o la comparación de resultados entre laboratorios.

El fosfato dipotásico suele elegirse como estándar debido a su efectivo número atómico 15.59⁽¹³⁵⁾ y a que se puede obtener puro. Se utiliza en solución acuosa y por ello la solución acuosa de este estándar debe encapsularse en una cuña de plástico.

7.2.4. Condiciones experimentales

7.2.4.1. Influencia de los tejidos blandos

El error introducido por los tejidos blandos ha sido ampliamente reconocido⁽¹⁴³⁾. Cuando el sector óseo lo permite (por ejemplo: el antebrazo) tanto el miembro como el estándar son sumergidos en agua que tiene casi el mismo coeficiente de absorción que los tejidos blandos^(135,136,140,141). Los rayos x que

atraviesan el hueso y el estándar, también lo hacen sobre el músculo, grasa subcutánea y tejido adiposo de reserva.

7.2.4.2. Variables que afectan la densidad del campo

Deben controlarse los factores que afectan la densidad fotográfica:

- a) Geometría roentgen y los efectos del agua sobre la absorción. El campo de rayos X es constante como lo demuestra la regularidad del trazado de la absorbancia de una placa irradiada aisladamente. La distancia de la fuente de rayos y del espécimen (hemimandíbula y patrón de aluminio) al film debe mantenerse constante (Figura 7.9). De este modo se estandariza el "efecto fotográfico" que la distancia espécimen-film produce sobre la imagen. La mayoría de los errores que afectan la reproducibilidad de la técnica se deben a modificaciones en la posición del espécimen (Figura 7.10). Las mismas consideraciones se aplican al estándar de aluminio que sirve como patrón único y permanente de atenuación. De esta forma se mantuvieron constantes las proyecciones de los especímenes. Todos los especímenes fueron desecados hasta peso constante y descarnados de

manera que sus contenidos de agua y grasa se redujeron al mínimo. En estas condiciones este método tiene toda la precisión y exactitud deseable en un método aplicable a experimentos de biología experimental⁽¹⁴⁴⁾.

- b) Variables asociadas con la técnica fotográfica. A pesar de que el revelado de los films fue efectuado manualmente, el análisis de la imagen del espécimen junto con la del estándar tienden a minimizar los efectos adversos de esta variable.

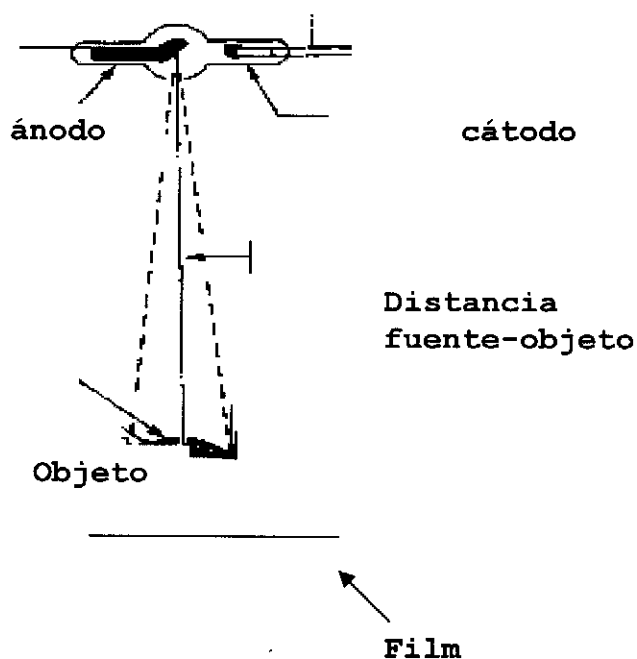


Figura 7.9. Disposición general de los elementos necesarios para la producción de una radiografía.

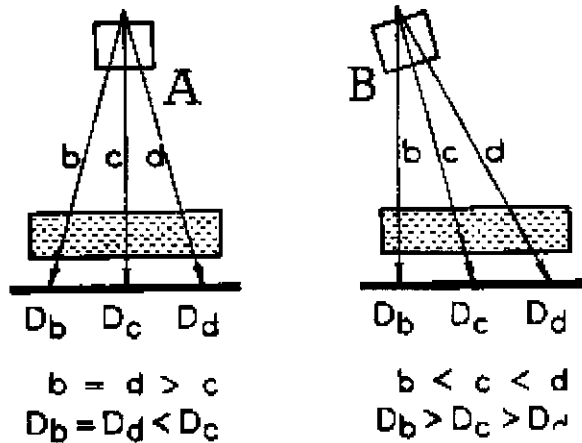


Figura 7.10. Este esquema muestra como las posiciones relativas del espécimen y el haz de rayos X modifican las absorbancias (D) en las diferentes zonas de proyección.

c) Área de proyección y expresión de los resultados. El lector debe apreciar que como la atenuación por el aire es nula y la del agua (ausente en los especímenes) y grasa (muy escasa en los especímenes) son despreciables, la atenuación de la radiación de una esponja ósea es la misma que si dicha esponja fuera comprimida hasta reducirla a un espécimen compacto de mineral (Figura 7.11). En consecuencia la técnica mide el contenido mineral por unidad de superficie de la proyección del espécimen sobre el film. La "densidad" mineral en un sitio estandarizado de

medición (tal como las hemimandíbulas) unifica en un solo resultado los tres principales componentes de la estructura ósea: el grosor de la cortical, su porosidad y el grado de mineralización del hueso cortical + trabecular.

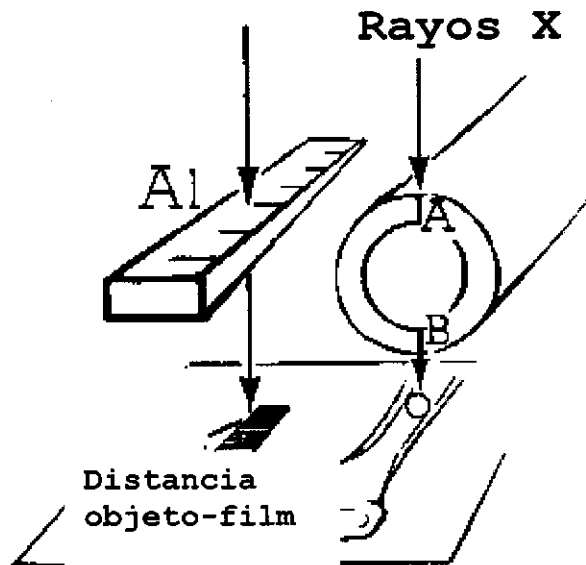


Figura 7.11. Visión cercana de los elementos intervinientes en la producción de una radiografía. Obsérvese que la imagen del espécimen resulta proyectada en un plano y por ello los resultados se expresan en equivalentes de mg de mineral óseo por mm^2 .

7.2.5. Justificación de la metodología de cálculo

La radiografía simple del hueso no es suficiente para diagnosticar pérdidas óseas tempranas. La inspección ocular de las radiografías requiere pérdidas mayores al 40% de la masa ósea para que el cambio sea detectable⁽¹⁴⁵⁾. En los últimos veinte años se han desarrollado procedimientos analíticos que permiten mejorar sensiblemente las mediciones del contenido mineral.

El espécimen atenúa la radiación incidente I_0 según la ecuación:

$$I = I_0 e^{-\mu d} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde

I es la intensidad de la radiación que llega al film,

μ es el coeficiente de extinción lineal y

d es el espesor del espécimen.

La densidad óptica del film (ó absorbancia) D en función de la exposición es:

$$D = D_0 + m I t \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde

D es la absorbancia medida,

D_0 es la absorbancia de base producida por la "niebla química", retro-dispersión de rayos X, y características de la emulsión y base del film,

m es una constante que incluye las características del film a la radiación y detalles del procesamiento fotográfico,

I es la intensidad de la radiación que llega al film,

t es el tiempo de exposición.

Combinando las ecuaciones (1) y (2) tenemos:

$$D - D_0 = m I_0 t e^{-\mu d} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Según la ecuación 4, el producto " $m I_0 t$ " es constante para cada film e igual a la máxima absorbancia del fondo (D_m , no hubo atenuación por ausencia del objeto). Cualquier medición a la que se le resta el fondo ($D_m - D_0$) es "neta".

La forma logarítmica de la ecuación (3)

$$\ln (D-D_0) = \ln (D_m-D_0) - \mu d \quad (\text{Ecuación 5})$$

indica que el logaritmo de las absorbancias netas es función directa del espesor del espécimen (o de su contenido mineral).

El valor de μ depende de la densidad (masa/unidad de volumen), longitud de onda de la radiación y número atómico promedio (Z) del material.

La radiación X es policromática. No obstante, para simplificar el razonamiento, se puede pensar solo en la longitud de onda más representativa ("efectiva") y relacionarla con μ . La longitud de onda efectiva está gobernada por el tipo de tubo de Rayos X, el prefiltro y el kilovoltaje. Estas variables son reproducibles se ajustan automáticamente para cada espécimen al exponerlo simultáneamente con el estándar.

Con el valor de $\mu = 4.3 \text{ cm}^{-1}$ para el aluminio y el de μ/ρ obtenido en manuales de referencia, la longitud de onda de la radiación efectiva es de 0.473 Ångstroms (27.6 KeV) a 50 kvp.

El espécimen actúa como filtro de longitudes de onda cuando la radiación es policromática, lo que significa que el valor de μ variará con el espesor y la composición del espécimen (hueso $\mu = 0.8-0.9 \text{ cm}^{-1}$, tejidos blandos $\mu=0.3 \text{ cm}^{-1}$). La grasa, por ser anhidra, tiene un valor más bajo que los tejidos blandos.

La principal debilidad inherente a las técnicas que miden absorbancias puntuales y las comparan con las producidas por una cuña de aluminio, deriva que por ese camino se determinan las inversas de μ para dichas sustancias. La inversa de μ es función de la longitud de onda y puede afectarse por inestabilidad (envejecimiento) del tubo y fluctuación del alto voltaje. Nuevamente, esta variable se ajusta automáticamente para cada espécimen al exponerlo simultáneamente con el estándar.

7.2.6. Microdensitometría. Medición de la densidad mineral ósea el hueso periodontal de la rata

7.2.6.1. Técnica

- Se disecciona la hemimandíbula izquierda, se descarna y deseca según se indicó en Material y Métodos. Se dispone el espécimen con la cara vestibular hacia abajo, encima del sobre que contiene la película radiográfica marca Kodak ultra-rápida. Se dispone la escala de aluminio próxima al espécimen.
- Se radiografió el conjunto con un aparato dental de rayos X marca Raix 70 cuyo kilovoltaje es 70kV y su miliamperaje 70mA, con una distancia foco-película constante de 5 cm y un tiempo de exposición de 0.8 segundos.
- Se revela manualmente el film utilizando revelador y fijador dental marca Kodak a 20°C de temperatura, lavándose con abundante agua corriente después de fijada.
- Se obtuvieron las imágenes digitales de las radiografías con un scanner Genius provisto de un adaptador de transparencias para

negativos o placas radiográficas dentales. El aparato tiene una resolución de 19.200 dpi (600 × 1200 óptico). Las imágenes digitales obtenidas, se archivan adecuadamente.

- Con un programa de análisis de imágenes digitales (Image Pro Plus 1.1) se mide la absorbancia del hueso y del estándar de aluminio. Se archiva el cuadro con el trazado de la absorbancia en función del espesor de aluminio, que se usará para el cálculo de la densidad de áreas seleccionadas del hueso periodontal (Figura 7.12).

Las áreas de interés de la imagen del hueso periodontal se miden con otro recurso específico del programa de imágenes digitales.

Cada meseta marcada por las barras verticales muestra el promedio y desvío estándar de la absorbancia. Estas barras deben disponerse teniendo en cuenta los efectos de dispersión de la radiación sobre los filos de la escala de aluminio.

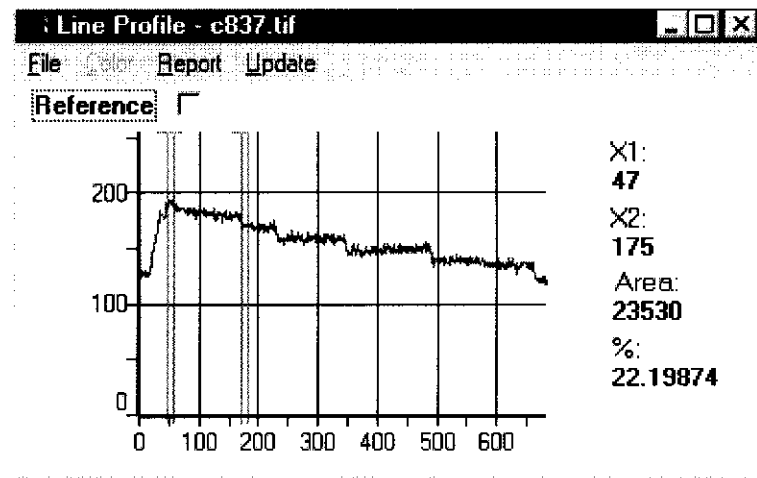


Figura 7.12. Trazado de las absorbancias a lo largo de la escala de espesores de aluminio. Las líneas verticales pueden desplazarse a voluntad con el objeto de medir diferentes tramos. Las oscilaciones del trazado se deben al carácter discontinuo del ennegrecimiento del film (gránulos de plata metálica precipitada por la radiación).

- Cálculo estadístico: El programa tiene la opción de incorporar el análisis estadístico, pudiendo obtener la media y la desviación estándar de las absorbancias.
- Cálculo manual: Después de imprimir el gráfico, se trazan las mesetas promedio. Se mide la distancia a la base en mm (L). Se resta la absorbancia del fondo (F, en mm) y calculo el valor de L como fracción de la distancia S (100%) (también en mm) = $(L - F) / S$. Luego se realiza el gráfico de los

valores de L en función de la densidad del estándar.

7.2.6.2. Estándares

7.2.6.2.1. Estándar de aluminio

Fue confeccionado con láminas de aluminio de 5 mm de ancho, 1 mm de espesor y longitud variable, pegadas con laca. Por medición y pesada de las placas se obtuvo el valor promedio de 138 mg de Al por cm^2 .

De modo que cada escalón del estándar tiene un equivalente que se estima en $138 \text{ mg/cm}^2 \times \text{número de láminas de aluminio del mismo}$.

Estándar de Aluminio

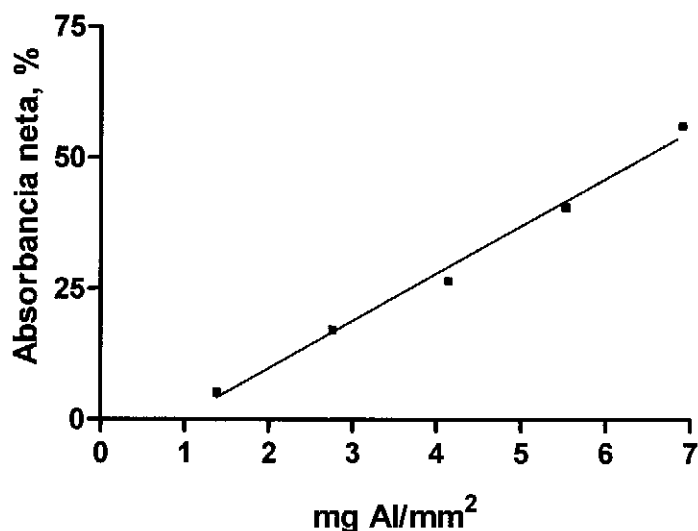


Figura 7.13. Relación entre la absorción neta y la masa de aluminio interpuesta como estándar de atenuación de la radiación X.

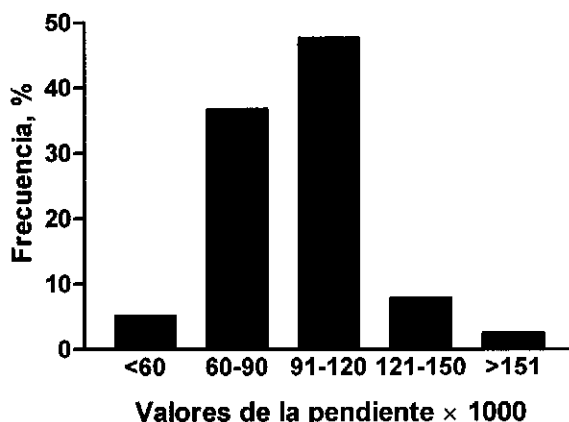


Figura 7.14. Distribución de las pendientes (Figura 7.13) de la relación entre absorbancia y densidad del atenuador, indicadora de la reproducibilidad de la técnica.

En el ejemplo de la Figura 7.13, el valor de la pendiente (que se calcula y/x) es 0.090, % absorbancia por cada mm Al. El valor de la pendiente cambia con las características de la exposición a los rayos X y el revelado fotográfico. Por esto hay que calcularla para cada espécimen. No obstante la participación del revelado manual, obsérvese la reproducibilidad de la pendiente en la distribución expuesta en la Figura 7.14.

7.2.6.2.2. Estándar de hueso cortical bovino

Se obtuvo un bloque de hueso cortical bovino de 5 x 5 x 30 mm de longitud, utilizando una sierra circular de baja velocidad Isomet. El hueso fue

desengrasado con acetona y llevado a sequedad hasta peso constante. Posteriormente se obtuvieron secciones de 5 x 5 mm de área y espesores variables: 1 a 3 mm. Estas secciones se radiografiaron simultáneamente con el estándar de aluminio. Después de haber obtenido una radiografía satisfactoria los trozos de hueso fueron incinerados a 500°C durante 10 horas. El peso de las cenizas permitió establecer el contenido de mineral óseo para cada espesor. Tal como para el estándar de aluminio, los valores se expresan en mg de mineral/cm² de proyección (Figura 7.15).

$$\text{Densidad Mineral} = 0.6175 \exp(0.3445 \cdot \text{Al})$$

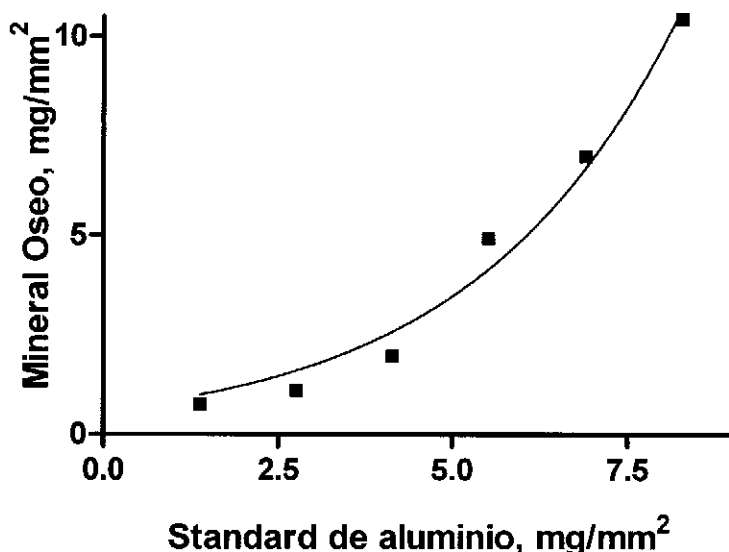


Figura 7.15. Relación entre los estándares de aluminio y hueso cortical. La relación descripta permite transformar las densidades obtenidas mediante el estándar de aluminio en equivalentes de mineral óseo.

7.2.6.3. Mediciones

7.2.6.3.1. Medición de la densidad mineral ósea "puntiforme"

En la línea inferior de la pantalla del programa Image Pro Plus se observaron tres números: los dos primeros determinaron la posición (x,y) del punto del vértice de la flecha. El tercero, midió la absorbancia del vértice de la flecha. Se fijó la punta de la flecha en el lugar deseado, se restó el fondo y el resultado se multiplicó por el factor (0.09 en este caso).

7.2.6.3.2. Medición de la densidad mineral ósea de un área determinada

Sobre la imagen de la radiografía de la hemimandíbula se midieron las áreas radiolúcidas. Para ello se usó la herramienta "Forma Indeterminada" con la cual se dibujó el contorno del área a medir. En el cuadro de diálogo apareció el valor del área en píxeles. El valor de la absorbancia del área marcada se obtuvo utilizando la herramienta "Perfil". El mismo se obtuvo trazando la línea sobre el área en cuestión (Figura 7.16).

7.2.6.3.3. Medición de áreas

Sobre la imagen del archivo gráfico y con la herramienta "Forma Libre" se delimitó el área de interés. El valor del área se mostró en píxeles. Para transformar las unidades de las superficies (de píxeles a mm^2) se utilizó un factor derivado de la medición del estándar de aluminio, de 25 mm^2 de área (cuadrado de $5 \times 5 \text{ mm}$).

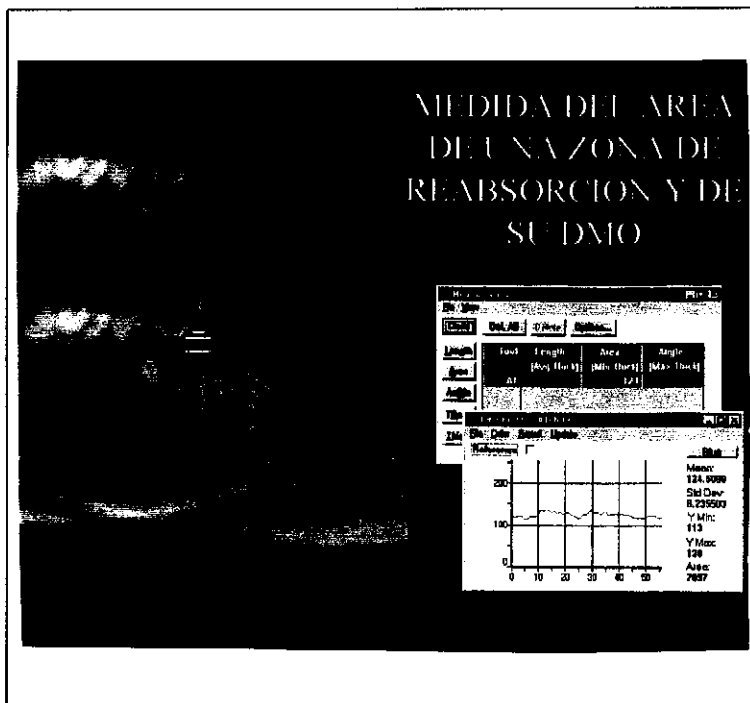


Figura 7.16. Medición de la densidad mineral ósea de un área determinada.

7.3. APÉNDICE III

7.3. INVESTIGACIÓN DEL METABOLISMO DEL CALCIO

El calcio (Ca) está presente en todos los tejidos y el plasma de la sangre representa un compartimiento central en el que ingresa el Ca exógeno y endógeno y egresa el Ca que será o excretado o fijado en otras partes del organismo.

Las grandes vías fisiológicas del metabolismo del Ca son las siguientes:

- Una parte del calcio de los alimentos es absorbido por la mucosa intestinal y pasa a la sangre.
- El calcio es excretado por el riñón y el intestino. Las heces contienen el Ca alimentario no absorbido y el Ca excretado (calcio fecal endógeno).
- Los huesos, que están en continua renovación, presentan los dos fenómenos: el de deposición y el de reabsorción.

El Ca de las células óseas se intercambia con el del líquido extracelular. Se distinguen dos fenómenos:

- a) El intercambio isoiónico, fenómeno rápido de superficie que corresponde al exceso de Ca que las células óseas encierran para intercambiar con el fosfato tricálcico óseo.
- b) El intercambio que implica la cristalización o envejecimiento de los cristales de apatita. Este fenómeno es más lento y corresponde a la penetración del Ca fácilmente intercambiable al interior de la molécula de hidroxapatita.

Resulta imposible medir la intensidad de todos esos procesos. El dosaje químico del Ca permite conocer la calcemia, calciuria, el Ca ingerido y el Ca fecal. La calcemia varía relativamente poco, los otros dosajes dan una imagen lejana del metabolismo.

El empleo de Ca radioactivo permite demostrar el aspecto dinámico del metabolismo del calcio. Este método permite medir las perturbaciones en los diferentes procesos, en casos normales y patológicos.

7.3.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO⁽¹⁴⁶⁾

La medida de la intensidad de los diferentes procesos del metabolismo del calcio se funda en la combinación de los datos obtenidos por los balances clásicos y la interpretación de la curva de decrecimiento de la radioactividad específica del calcio sérico después de la inyección intravenosa de una dosis trazadora de ^{45}Ca .

7.3.1.1. Análisis de la curva de decrecimiento de la radioactividad específica del calcio sérico

La variación en función del tiempo de la radioactividad específica del Ca sérico después de la inyección intravenosa de una dosis trazadora de ^{45}Ca , se presenta en la Figura 7.17. Para la rata, las modificaciones metabólicas se resuelven dentro de las 36 horas posteriores a la inyección del isótopo. El análisis de la curva permite calcular la masa y la tasa de intercambio de dos compartimientos: de intercambio rápido y de intercambio lento.

La curva de los datos experimentales se emplea para aproximar primero el comportamiento de la actividad específica del calcio sérico (cpm de ^{45}Ca /mg de Ca) en el compartimiento lento (primera sustracción) y en el rápido (segunda sustracción).

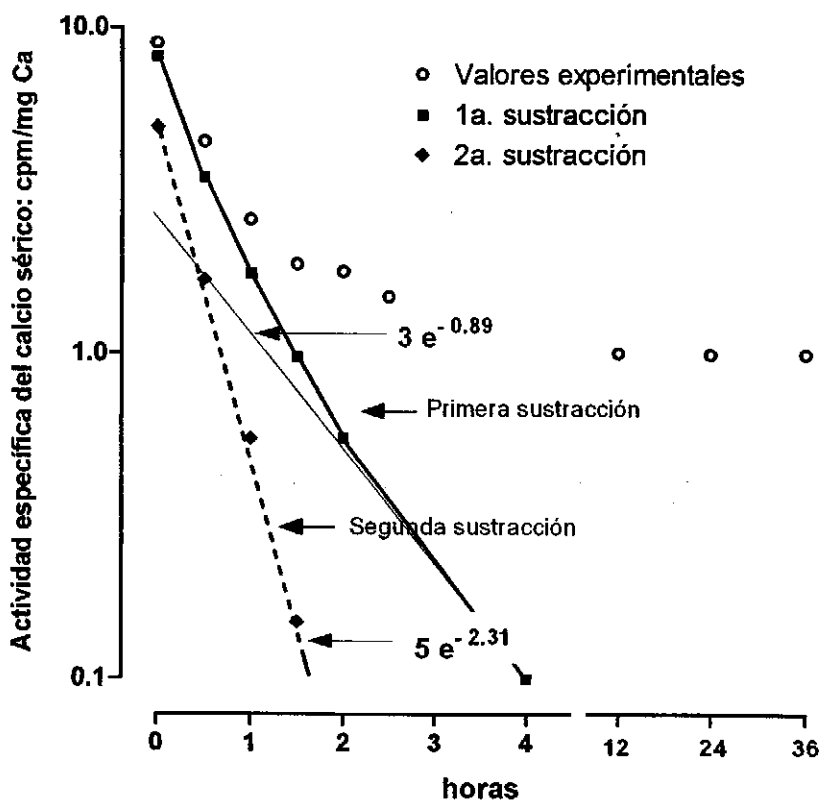


Figura 7.17. Variación de la radioactividad específica del Ca sérico en función del tiempo.

Para el caso del metabolismo cálcico de la rata, la curva puede dividirse en diferentes segmentos:

- AB: es el segmento correspondiente a un período comprendido entre 0 y 6 horas. Representa una serie de fenómenos muy complejos de intercambio rápido.
- BC: este segmento corresponde a un período comprendido entre 6 y 48 horas. Puede ser asimilado a una recta lo que indicaría que corresponde a una función exponencial simple y que fisiológicamente se atribuye a la movilización del mineral óseo por reabsorción.

Los diferentes segmentos de la curva permiten estudiar separadamente los procesos que nos interesan. La linealidad de los segmentos indica que la radioactividad específica del Ca intercambiable del organismo es prácticamente homogénea y sólo la entrada de Ca no radioactivo dentro de la masa intercambiable y la salida de Ca radioactivo fuera de ella son responsables de la disminución de la radioactividad específica del Ca sérico.

7.3.1.1.1. Interpretación del decrecimiento monoexponencial del segmento AB

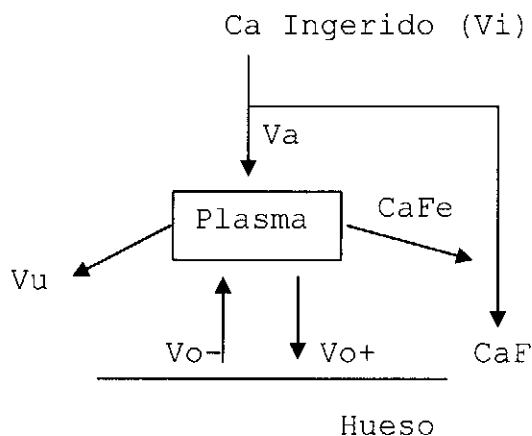
El comportamiento del trazador identifica un compartimiento de intercambio rápido, presumiblemente

ubicado en los tejidos blandos, en rápido intercambio con el plasma.

7.3.1.1.2. Interpretación del decrecimiento monoexponencial del segmento BC

Este compartimiento es de intercambio más lento, como lo muestra el valor de la pendiente. Se presume que representa parte del intercambio entre el tejido óseo y el espacio extracelular.

7.3.2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS GRANDES VÍAS DEL METABOLISMO CÁLCICO



Donde:

Vi: mg de Ca ingerida por día.

Va: mg de Ca absorbida por el intestino por día.

Vu: mg de Ca excretado por el riñón por día.

Vo+: mg de Ca fijada por los huesos por día.

Vo-: mg de Ca absorbida desde los huesos por día.

El dosaje químico del Ca permite conocer el Ca ingerido (gramos de comida ingeridos por día multiplicados por su contenido en calcio, V_i), el Ca urinario (V_u) y el Ca total de las heces ($F; (v_i - v_a) + v_f$).

Entre los 2 y 7 días el decrecimiento de la radioactividad específica (R_s) del Ca sanguíneo o urinario (expresado por ejemplo en cuentas por minuto por mg de Ca) sigue, para cada uno de los segmentos, una ley exponencial del tipo:

$$R_s = M \cdot e^{-mt} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Experimentalmente M es netamente inferior a la radioactividad específica inicial, definida como la relación entre radioactividad total inyectada y Ca sanguíneo.

Esto significa que el Ca inyectado se diluye en una masa un poco más grande de Ca: el fondo común cálcico donde la radioactividad específica se equilibra en 48 horas con el Ca sanguíneo.

El conocimiento experimental de M y de m permite calcular la velocidad global: v_t de salida del Ca fuera del fondo común.

Es obvio que:

$$V_t = v_u + v_f + v_{o+} + v_{o-} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Pero se puede admitir sin gran error que durante el tiempo relativamente corto de la prueba, el Ca que sale de los huesos por los procesos fisiológicos no es radioactivo. Por ello:

$$V_t = v_u + v_f + v_{o+} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Esta expresión traduce fisiológicamente la suma de la intensidad de fijación irreversible del Ca sobre el hueso (en el tiempo considerado) y de la excreción urinaria y fecal.

7.3.2.1. Cálculo del fondo común (P)

Sea R_i la radiactividad total inyectada, la ecuación (1) indica

$$T = 0$$

$$R_{s_0} = A = R_i/P \quad (\text{Ecuación 4}) \quad \therefore P = R_i/A \quad (\text{Ecuación 5})$$

R_i es la radioactividad específica obtenida por extrapolación a $T=0$ de las rectas de la Figura 2.

7.3.2.2. Cálculo de la velocidad total de salida del Ca del fondo común (Vt)

Sea R la radiactividad total del Ca intercambiable, entonces:

$$R = PR_s$$

Reemplazando P por la (Ecuación 5):

$$R = (R_i / A) \cdot R_s \quad (\text{Ecuación 6})$$

Y reemplazando R_s por la (Ecuación 1)

$$R = R_i \cdot e^{-at}$$

La velocidad total de salida del Ca del fondo común Vt es igual:

$$Vt = (R / R_s) \cdot dt \quad (\text{Ecuación 7})$$

7.3.2.3. Medida de la excreción urinaria (Vu)

Se mide por el dosaje clásico de la calciuria.

7.3.2.4. Medida de la vida de excreción fecal (Vf)

Varios métodos permiten calcular la medida de Vf:

a) El más simple consiste en medir la radioactividad total emitida por la orina (Ru) y por las heces (Rf) en un lapso de tiempo correspondiente, teniendo en cuenta el retardo de la excreción fecal con respecto a la excreción urinaria.

La radioactividad específica excretada en la orina es la misma en un instante dado que la del Ca sérico en ese instante y se puede admitir que es la misma para el Ca excretado por el intestino. La velocidad de excreción fecal está dada por:

$$V_f = V_u \cdot (R_f / R_u) \quad (\text{Ecuación 8})$$

Este método no necesita el trazado de la curva exponencial de decrecimiento y puede ser utilizado ventajosamente en un estudio de la velocidad de excreción.

b) Cuando se conoce la (Ecuación 1) se puede calcular Vf teniendo en cuenta la siguiente consideración:

$$V_f = (1/R_s) \cdot (dR_f/dt) \quad (\text{Ecuación 9})$$

7.3.2.5. Medida de la velocidad de fijación sobre los huesos

Sabiendo que $V_t = V_u + V_f + V_{o+}$ y conociendo V_t , V_u , V_f ; se saca V_{o+} por diferencia

$$V_{o+} = V_t - (V_u + V_f) \quad (\text{Ecuación 10})$$

7.3.2.6. Medida de la absorción intestinal y de la velocidad de reabsorción ósea

El balance cálcico permite determinar el Ca alimentario (V_i) y el Ca fecal total (F). Se ha observado que el fondo común (P) no varía durante el transcurso de la prueba. Escribiendo que la cantidad de Ca que entra en el fondo común es igual a la que sale:

$$V_a + V_{o-} = V_t = V_u + V_f + V_{o+} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Por otra parte el dosaje de Ca fecal total da:

$$F = V_f + (V_i - V_a) \quad (\text{Ecuación 12})$$

Estas dos ecuaciones permiten conocer la velocidad de osteólisis (V_{o-}) y la tasa de absorción intestinal V_a/V_i .

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Hillson S. "Teeth". Cambridge University Press, (1990); página 180.
2. Isogai E, Isogai H, Sawada H, Kaneko H, Ito N. (1985). "Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis". Infect Immun; 48: 520-527.
3. Genco RJ, Slots J. (1984). "Host responses in periodontal diseases". J Dent Res; 63:441-451.
4. Armitage GC. "Biologic basis of periodontal maintenance therapy". Berkeley, CA, Praxis, (1980).
5. Burt BA. (1988). "Public health implications of recent research in periodontal diseases". J. Public Health Dent; 48:252-256.
6. Fitzgerald RJ, Jordan HV, Stanley HR. (1960). "Experimental caries and gingival pathologic changes in gnotobiotic rats". J Dent Res; 39:923-935.

7. Jordan HV, Keyes PH, Bellack S. (1972). "Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with Actinomyces of human origin". J Periodontal Res; 7:21-28.

8. Heijl L, Wennström J, Lindhe J, Socransky SS. (1980). "Periodontal disease in gnotobiotic rats". J Periodontal Res; 15:405-419.

9. Klausen B, Hougen HP, Eriksen WH, Fiehn NE. (1986). "Induction of periodontal bone loss in athymic (nude) rats monoinfected with Streptococcus Mutans". J Periodontal Res; 21:5-12.

10. Page RC, Schroeder HE. "Periodontitis in man and other animals. A comparative review". Basel, Karger, (1982).

11. Amstad-Jossi M, Schroeder HE. (1978). "Age related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germfree rats". J Periodontal Res; 13:76-90.

12. Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. (1978). "The natural history of periodontal bone lesion in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms". J Periodontal Res; 13:316-325.

13. Allmon HB. (1971). "Man is not a giant rat". J Publ Health Dent; 31:218-224.

14. Navia JM. "Animal models in Dental Research". (1977). Birmingham, AL: University of Alabama press.

15. Hillson S. "Teeth". Cambridge University Press, (1990).

16. Listgarten MA. (1975). "Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man". J Periodontol; 46:677-680.

17. Yoshie H, Taubman MA, Ebersole JL, Smith DJ, Olson CL. (1985). "Periodontal bone loss and immune characteristics of congenitally athymic and thymus cell - reconstituted athymic rats". Infect Immun; 50:403-408.

18. Suzumura Y, Kameyama Y, Mizutani M, Kato M, Kondo K, Mabuchi R. (1989). "Long junctional epithelium produced by application of bacterial protease in rats". *J Periodont Res*; 24:217-221.

19. Bab IA, Sela MN, Ginsburg Y, Dishon T. (1979). "Inflammatory lesions and bone resorption induced in the rat periodontium by lipoteichoic acid of *Streptococcus mutans*". *Inflammation*; 3:345-358.

20. Ijuhin N. (1988). "Light and electron microscopic studies of experimentally-induced pathologic changes in the rat periodontal tissue". *Adv Dent Res*; 2:209-214.

21. Garant PR, Cho MI. (1979). "Histopathogenesis of spontaneous periodontal disease in conventional rats. Histometric and histologic study". *J Periodont Res*; 14:297-309.

22. Isogai E, Isogai H, Sawada H, Kaneko H, Ito N. (1985). "Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis". *Infect Immun*; 48:520-527.

23. Irving JT, Heeley JD, Amdur BH, Socransky SS. (1979). "Pathological changes caused by the injection of lipids isolated from Gram - positive organisms into the gingiva of rats". J Periodont Res; 14:160-166.
24. Lekic P, Klausen B, Friis-Hasché E, Beloica D, Knezevic M, Hougen HP. (1989). "Influence of age and immunization on development of gingivitis in rats". Acta Odontol Scand; 47:233-238.
25. Sallay K, Sanavi F, Ring Y, Pham P, Behling UH, Nowotny A. (1982). "Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat". J Periodont Res; 17:263-274.
26. Socransky SS, Hubersak C, Propas D. (1970). "Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*". Arch Oral Biol; 15:993-995.
27. Irving JT, Socransky SS, Heeley JD. (1974). "Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters". J Periodont Res; 9:73-80.

28. Irving JT, Newman MG, Socransky SS, Heeley JD. (1975). "Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a Gram-negative organism". Arch Oral Biol; 20:219-220.
29. Garant PR. (1976). "Light and electron microscopic observations of osteoclastic alveolar bone resorption in rats monoinfected with Actinomyces naeslundii". J Periodontol; 47:717-723.
30. Irving JT, Socransky SS, Tanner ACR. (1978). "Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfective with Gram-negative organism". J Periodont Res; 13:326-332.
31. Guggenheim B, Schroeder HE. (1974). "Reactions in the periodontium to continuous antigenic stimulation in sensitized gnotobiotic rat". Infect Immun; 10:565-577.
32. Irving JT, Socransky SS, Heeley JD. (1974). "Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters". J Periodont Res; 9:73-80.

33. Guggenheim B, Schroeder HE. (1974). "Reactions in the periodontium to continues antigenic stimulation in sensitized gnotobiotic rat. Infect Immun; 10: 565-577.

34. Garant PR, Paik K-S, Cho M-I. (1983). "The distribution of plasma cell in naturally occurring periodontitis lesions in rats. A light and electron microscopic study". J Periodontol; 54:227-235.

35. Garant PR, Paik K-S, Cho M-I. (1983). "Fibroblast cytotoxicity associate with plasma cells and lymphocytes in chronic periodontitis lesions in rats". J Periodontol; 54:551-556.

36. Heijl L, Wennström J, Lindhe J, Socransky SS. (1980). "Periodontal disease in gnotobiotic rats". J Periodont Res; 15:405-419.

37. Fitzgerald RJ, Jordan HV, Stanley HR. (1960). "Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat". J Dent Res; 39:923-935.

38. Klausen B, Hougen HP, Eriksen WH, Fiehn N-E. (1986). "Induction of periodontal bone loss in athymic (nude) rats monoinfected with *Streptococcus mutans*". *J Periodont Res*; 21:5-12.
39. Guggenheim B, Lutz F. "New rodent models for dentinal caries and periodontitis". In: Lehner T, Cimasoni G, Eds. *The Borderland between Caries and Periodontal Disease. III.* (1986). Genève: Editions Médecine et Hygiene; 113-127.
40. Taubman MA, Yoshie H, Ebersole JL, Smith DJ, Olson CL. (1984). "Host response in experimental periodontal disease". *J Dent Res*; 63:455-460.
41. Loe H. (1993). "Periodontal disease: The sixth complication of diabetes mellitus". *Diab Care*; 16: 329-334.
42. Lin J, Duffy J, Roginsky M. (1975). "Microcirculation in diabetes mellitus: A study of gingival biopsies". *Human Pathol*; 6:77-97.

43. Manouchehr- Pour M, Spagnuolo P, Rodman HM, Visada NF. (1981). "Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with mild and a severe periodontal disease". J Dent Res; 60:729-731.

44. Ramamurthy NS, Golub LM. (1983). "Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin". J Periodont Res; 18:23-30.

45. Worthington J. (1991). "Dental plaque in diabetic versus non-diabetic patients". J Dent Res; 70:1184-1185.

46. Benveniste R, Bixler D, Conneally PM. (1967). "Periodontal disease in diabetics". J periodontol; 38:271-279.

47. Hore KA, Stallard RE. (1970). "Diabetes and the periodontal patient". J Periodontol; 41:713-718.

48. Finestone AJ, Booruju SR. (1967). "Diabetes mellitus and periodontal disease". Diabetes; 16:336-340.

49. Seppala B, Ainamo J. (1992). "Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus". *J Clin Periodontol*; 19:24-29.
50. Grossi SG. (1993). "Microbiological risk indicators for periodontal disease". *J Dent Res*; 72: 206-210.
51. Tervonen T, Knuuttila M. (1986). "Relation of diabetes control to periodontal pocketing and alveolar bone level". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 61:346-349.
52. Miller LS. (1992). "The relationship between reduction in periodontal inflammation and diabetes control". *J Periodontol*; 63:843-848.
53. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martín TJ. (1999). "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families". *Endocrine Reviews*; 20:345-357.

54. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs L. (2000). "The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption". *J Bone and Min Res*; 16:2-12.

55. Roodman GD. (1996). "Advances in bone biology". *Endocrine Reviews*; 17:308-332.

56. Doxey DL, Cutler CW, Iacopino AM. (1998). "Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor-B and interleukin-1-beta in a rat model". *J. Periotontol*; 69:113-119.

57. Reszka AA, Halasy-Nagy JM, Masarachia PJ, Rodan GA. (1999). "Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis: a link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of and apoptosis - promoting kinase". *J Biol Chem*; 274:34967-34973.

58. US Department of Health and Human Services, NIH. (Revised 1985). "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". Publication No. 86-23, Bethesda MD.

59. Taubman MA, Yoshie H, Ebersole JL, Smith DJ, Olson CL. (1984). "Host response in experimental periodontal disease". J Dent Res; 63:455-460.

60. Schroeder HE, Lindhe J. (1980). "Conditions and pathological features of rapidly destructive, experimental periodontitis in dogs". J. Periodontol; 51:6-19.

61. Prael JW, Steenrod WJ. (1965). "Production of alloxan diabetes and ketoacidosis in the laboratory rat". Diabetes; 14:289-294.

62. Locatto ME, Fernández MC, Abranzon H, Caferra D, Puche RC. (1990). "Calcium metabolism of rats of varying degrees of insulinopenia". Bone and Mineral; 8:119-130.

63. Snedecor GW, Cochran WH. "Statistical Methods". (1996). Iowa State University Press, Ames.

64. Locatto ME, Abranzon H, Caferra D, Fernandez MC, Aloatti R, Puche RC. (1993). "Growth and development of bone mass in untreated alloxan diabetic rats. Effects of collagen glycosylation and parathyroid activity on bone turnover". *Bone and Mineral*; 23:129-144.

65. Parks JR. "A Theory of feeding and growth of animals". Berlin: Springer Verlag, (1982).

66. Locatto ME, Abranzon H, Caferra D, Fernández MC, Alloati R, Puche RC. (1993). "Growth and development of bone mass in untreated alloxan diabetic rats. Effects of collagen glycosylation and parathyroid activity on bone turnover". *Bone and Mineral* 23:129-144.

67. Bernasconi A., Suiffet S.L. (1942). "Fisica". vol. I, 1ª. Ed., Rosario, Editorial FVD; página 46.

68. Weijs WH. (1980). "Biomechanical Models and the Análisis of Form: A Study of the Mammalian Masticatory Apparatus". *Amer Zool*; 20:707-719.

69. Ponder SW, McCormick D, Fawcett HD, Tran AND, Ogewlsky JW, Brouhard BH, Travis LB. (1992). "Bone mineral density of the lumbar vertebrae in children and adolescents with insulin dependent diabetes mellitus". J Pediatr; 120:541-545.

70. Locatto ME, Fernandez MC, Abranzon H., Caferra DA, Puche RC. (1990). "Calcium metabolism of rats with varying degrees of insulinopenia". Bone and Mineral; 8:119-130.

71. Canalis EM, Dietrich JW, Maina DM, Raisz LG. (1977). "Hormonal control of bone collagen synthesis in vitro. Effects of insulin and glucagon". Endocrinology; 100:668-674.

72. Canalis EM. (1980). "Effect of insulin-like growth factor I on DNA and protein synthesis in cultures rat calvarias". J clin Invest; 66:709-714.

73. Wettenhall REH, Schwartz PL, Bortein J. (1969). "Actions of insulin and growth hormone in collagen and chondroitinsulfate synthesis in bone organ cultures". Diabetes; 18:280-284.

74. Locatto ME, Abranzon H., Caferra D, Fernández MC, Alloatti R, Puche RC. (1993). "Growth and development of bone mass in untreated alloxan diabetic rats. Effects of collagen glycosylation and parathyroid activity on bone turnover". *Bone and Mineral*; 23:129-133.
75. Hough S, Avioli LV, Bergfeld MA, Fallon MD, Slatopolsky E, Teitelbaum SJ. (1981). "Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy". *Endocrinology*; 108:2228.
76. Goodman W., Hori M. (1984). "Diminished bone formation in experimental diabetes. Relationship to osteoid maturation and mineralization". *Diabetes*; 33:825-831.
77. Dixit PK, Stern AMK. (1979). "Effect of insulin on the incorporation in citrate and calcium into the bones of alloxan diabetic rats". *Calcif Tissue Int.*; 27:227-232.

78. Levy J., Teitelbaum SL, Gavin JR, Fausto A, Kurose H, Avioli L. (1985). "Bone calcification and calcium homeostasis in rats with non insulin dependent diabetes induced by streptozotocin". *Diabetes*; 34:365-372.
79. Locatto ME, Fernandez MC, Caferra DA, Puche RC. (1983). "The long term effects of pancreatectomy on the Ca metabolism of the rat". *Acta diabet let*; 20: 297-302.
80. Riggs BL, Jowsey J, Kelly PJ. (1986). "Quantitative microradiographic study of bone remodeling in Cushing's syndrome". *Metabolism*; 15:773.
81. Dominguez AE, Chieri RA, Foglia VG. (1969). "Adrenal corticosterone content and adrenal vein blood corticosterone level in experimental diabetes". *Acta physiol lat. amer.*; 19:36.
82. Fleisch H. "Bisphosphonates in bone disease". Parthenon, New York, (1995).

83. Clark RAF, Henson PM. "The molecular and cellular biology of wound repair". Plenum Press, New York, (1988):1-36.
84. Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ. "Wound healing: biochemical and clinical aspects". WB Saunders, Philadelphia, (1992):55-72.
85. Kiritsy CP, Lynch AB, Lynch SE. (1993). "Role of growth factors in cutaneous wound healing: A review". Crit Rev Oral Biol Med; 4:729-760.
86. Martin P, Hopkinson-Woolley J, McCluskey J. (1992). "Growth factors and cutaneous wound repair". Prog Growth factor Res; 4:25-44.
87. Iacopino AM. (1995). "Diabetic periodontitis: Possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function". Oral Diseases; 1:214-229.
88. Mashimo PA, Yamamoto Y, Slots J, Park BH, Genco RJ. (1983). "The periodontal microflora of juvenile diabetes". J Periodontol; 54:420-429.

89. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. (1988). "Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus". *J Periodontol*; 59:23-31.

90. Willershausen ZB. (1991). "The periodontal findings and microflora in insulin-dependent diabetics". *Schweiz Monatsschr Zahnmed*; 101:1399-1404.

91. Worthington J. (1991). "Dental plaque in diabetic versus non-diabetic patients". *J Dent Res*; 70:1184-1185.

92. Cutler CW, Eke P, Arnold RR, Van Dyke TE. (1991). "Defective neutrophil function in insulin-dependent diabetes mellitus patients: A case report". *J Periodontol*; 62:394-401.

93. Van Dyke TE, Horoszewics HU, Cianciola LJ, Genco RJ. (1980). "Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis". *Infect Immun*; 27:124-130.

94. Mc Mullen JA, Van Dyke TE, Horoszewics HU, Genco RJ. (1981). "Neutrophil chemotaxis in individuals with advanced periodontal disease and a genetic predisposition to diabetes mellitus". J Periodontol; 52:167-173.

95. Bosenbloom A, Lezotte D, Weber F, Gudat H, Heller D, Weber L, Klein S, Kennedy D. (1977). "Diminution of bone mass in childhood". Diabetes; 26:1052-1055.

96. Levin ME, Boisseau VC, Avioli LV. (1976). "Effect of diabetes mellitus in bone mass of juvenile and adult onset diabetes". N Engl J Med; 29:241-245.

97. McNair P, Masbad S, Christiansen C, Faber OK, Transbol I, Binder C. (1979). "Bone loss in diabetes. Effect of metabolic state". Diabetologia; 17:283-286.

98. Shore RM, Cheney RW, Mazess RB, Rose PG, Bargman GJ. (1981). "Osteopenia in juvenile diabetes". Calcif Tissue Int.; 33:455-457.

99. Wiske PS, Wenterworth SM, Norton Ja Jr, Epstein S, Johnston C Jr. (1982). "Evaluation of bone mass and growth in young diabetes". *Metabolism*; 31:848-954.

100. McNair P. (1988). "Bone mineral metabolism in human type I (insulin dependent) diabetes mellitus". *Dan Med Bull.*; 35:109-121.

101. Roginsky MS, Sulimovici S, Cohn SH. (1979). "Is there metabolic bone disease in diabetes mellitus?". *Calcif Tiss Int*; 27(Suppl.) A39.

102. Geddes AD, D'Souza SM, Ebetino FH, Ibbotson KJ. En: *Bone and Mineral Research/8*. JNM Heersche, JA Kanis (eds) Elsevier Science, Amsterdam. (1994), 265-306.

103. Van Beek E, Löwik C, Van der Pluijm G, Papapoulos S. (1999). "The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates". *J Bone Miner Res*; 4(5):722-729.

104. Ericsson J, Runquist M, Thelin A, Andersson M, Chojnacki T, Dallner G. (1993). "Distribution of prenyltransferases in rat tissues. Evidence for a cytosolic all - trans- geranylgeranyl diphosphate synthase". *J. Biol. Chem.*; 268:832-838.

105. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russel RGG, Rogers MJ. (1998). "Nitrogen - containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post - translational prenylation of GTP - binding proteins, including Ras". *J. Bone Miner Res*; 13:581-589.

106. Russell RG, Rogers MJ; Frith JC. (1999). "The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action". *J Bone Miner Res.*; 14: 53-65.

107. Soolari AS, Champagne C, Punzi JS, Amar S, Van Dyke TE. (1999). "FERUM modulation of neutrophil response to Porphyromonas gingivalis LPS in periodontal disease". J Int Acad Priodontol; 1:109-111.

108. Delima AJ, Karatzas S, Amar S, Graves DT. (2002). "Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists". J Infect Dis; 186:511-516.

109. Chiang CY, Fu E, Shen EC. (2002). "The role of interleukin-1-beta in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced bone resorption". Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei); 65:225-230.

110. Chae P, Im M, Gibson F, Jiang Y, Graves DT. (2002). "Mice lacking monocyte chemoattractant protein 1 have enhanced susceptibility to a n interstitial polymicrobial infection due to impaired monocyte recruitment". Infect Immun; 70:3164-3169.

111. Kesavalu L, Chandrasekar B, Ebersole JL. (2002). "In vivo induction of proinflammatory cytokines in Mouse tissue y Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans". Oral Microbial Immunol; 17:177-180.
112. Abbas A, Lichtman AH. "Tolerancia inmunológica". En Inmunología celular y molecular, 5° edición. Ed Elsevier España. (2004). Cap 10: 216-239.
113. Fortshuber T, Yip HC, Lehman PV. (1996). "Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice". Science; 271:1728-1730.
114. Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. (1996). "Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus". Science; 271:1726-1728.
115. Rowe J, Macaubas C, Monger TM. (2000). "Antigen-specific responses to diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine in human infants are initially Th2 polarized". Infect Immun; 68:3873-3877.

116. Pascutti MF, Bottasso OA, Hourquescos MC, Wietzerbin J, Revelli S. (2003). "Age related increase in resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats is associated with an appropriate antibody response". Scandivanian Journal of Immunology; 58:173-179.

117. Nowack RM. "Walker's Mammals of the World: Vol. 2". 5ª Ed. The Johns Hopkins Press, (1991); página 1629.

118. Feldhamer GA, Vessey SH, Merritt JF. "Mammalogy". New York, WCB, McGraw Hill, (1999); página 563.

119. Romer AS. "Vertebrate paleontology". 3º Ed. Chicago, Univ Chicago Press, (1966); página 468.

120. Vaughan TA, Ryan JM, Czaplewski NJ. "Mammalogy". 4ª Ed. New York, Saunders Coll Publ, (2000); página 565.

121. Hiiemae K, Ardran GM. (1968). "A cinefluorographic study of mandibular movement during feeding in the rat (*Rattus norvegicus*)". *J. Zool, Lond*; 154:139-154.

122. Smith JM, Savaje RJG. (1959). "The mechanics of mammalian jaws". *Sch Sci Rev*; 40:289-301.

123. Moller E. (1966). "The chewing apparatus. An elecromyograph study of the muscles of mastication and its correlation with facial morphology". *Acta Physiol Scand.*; 69:1-280.

124. Hiiemae K, Houston WJB. (1971). "The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.). I. Their anatomy and internal architecture". *Zool J Linn Soc*; 50:75-99.

125. Hiiemae K. (1971). "The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.). II. Their fibre type and composition". *Zool J Linn Soc*; 50:101-109.

126. Hiiemae K. (1971). "The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.). III. The mechanics of the muscles". *Zool J Linn Soc*; 50:111-132.
127. Weijs WA. (1980). "Biomechanical models and the analysis of form: A study of the mammalian masticatory apparatus". *Amer Zool*; 20:707-719.
128. Butler PM. (1972). "Some functional aspects of molar evolution". *Evolution*; 26:474-483.
129. Cope EW. (1873). "The method of creation of organic forms". *Proc Amer Phil Soc*; 12:229-263.
130. Ryder JA. (1878). "On the mechanical genesis of tooth-forms". *Proc Nat Acad Sci*; 45-80.
131. Cope EW. (1889). "The mechanical causes of the development of the hard parts of the Mammalia". *J Morphol*; 3:137-277.
132. Stones HH.. "Oral and dental diseases". E. and S. Livingstone, Edimburgh. (1948).

133. Keane BE, Splieger G, Davis R. (1959). "Quantitative Evaluation of Bone Mineral by a Radiographic Method". Brit J Radio; 32:162-167.
134. Krolner B, Pors Nelson SP. (1980). "Measurement of bone mineral content (BMC) of the lumbar spine: I. Theory and application of a new two - dimensional dual- photon attenuation methods". Scand J Clin Lab Invest; 40:653-663.
135. Seeman E, Wahner HW, Offord KP, Kumar R, Jonson WJ, Riggs BL. (1982). "Differential effects of endocrine dysfunction on the axial and the appendicular skeleton". J Clin Invest; 69:1302-1309.
136. Dunn WL, Whaner HW, Riggs BL. (1980). "Measurement of bone mineral content in human vertebrae and hip by dual photon absorptiometry". Radiology; 136:485-487.
137. American College of Physicians. (1984). "Radiologic methods to evaluate bone mineral content. Position Paper". Ann Intern Med; 100:909-911.

138. Colbert C, Bachtell RS. "Radiographic Absorptiometry". En: Cohn SH. "Noninvasive Measurements of Bone Mass and Their Clinical Application". Boca Raton, Florida: CRC Press. (1981); páginas 51-84.
139. Jowsey J. (1960). "Age Changes in Human Bone". Clin Orthop; 17:210-218.
140. Arnold JS. (1960). "Quantitation of Mineralization of Bone as an Organ and Tissue in Osteoporosis". Clin Orthop; 17:167-175.
141. Doyle FH. (1961). "Radiological Assessment of Bone Density. III. Ulnar Bone Mineral Concentration in Metabolic Bone Diseases". Brit J Radiol; 34:698-712.
142. Spiers FW. (1946). "Effective Atomic Number and Energy Absorption in Tissues". Brit J Radiol; 19:52-63.
143. Jackson H. (1951). "Problems in the Measurement of Bone Density". Brit J Radiol; 24:613-616.

144. Baker PT, Schraer H, Yalman RG. (1958). "The accuracy of human bone composition determination from roentgenograms". Photogrammetric Engineering; 455-460.

145. Jonhston CC(Jr), Epstein S. (1981). "Clinical, Biochemical, Radiographic, Epidemiologic, and Economic features of osteoporosis". Orthop Clin North Am; 12:559-569.

146. Aubert PP, Milhaud D. "Methode de mesure des principales voies du metabolisme calcique chez l'homme". Biochim Biophys Acta; 39:122-139.

9. TRABAJOS PUBLICADOS

9. TRABAJOS PUBLICADOS

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de Tesis fueron publicados en revistas y presentados en reuniones científicas que se describen a continuación.

PUBLICACIONES

- ♦ García MF, Moreno H, Puche RC. "Crecimiento de la mandíbula y desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea (EPE) de la rata. Efecto del estado diabético". Medicina Buenos Aires, 62 (5), 2002; 460.

- ♦ García MF, Moreno H, Puche RC. "Effects of alloxan diabetes on the development of spontaneous periodontal disease in rats". Biocell, 27 (2), 2003; 233.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- ◆ "Desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea en la rata". García MF, Moreno H, Puche RC. Jornadas Odontológicas Internacionales 43° Aniversario. Facultad de Odontología. Julio 2002. Rosario. Argentina.

- ◆ "Desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea (EPE) en la rata". García MF, Moreno H, Puche RC. XIX Reunión Anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Agosto 2002. Buenos Aires. Argentina.

- ◆ "Crecimiento de la mandíbula y desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea (EPE) de la rata. Efecto del estado diabético". García MF, Moreno H, Puche RC. XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Noviembre 2002. Mar del Plata. Argentina.

- ◆ "Efecto del estado diabético sobre el desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea de la rata". García MF, Moreno H, Puche RC. Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Diciembre 2002. Rosario. Argentina.

- ◆ "Efecto del tratamiento con bisfosfonatos sobre el desarrollo de la enfermedad periodontal espontánea y el metabolismo cálcico de ratas". García MF, Moreno H, Puche RC. XX Reunión anual de la Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Septiembre 2003. Mendoza. Argentina.