Consideraciones Metodológicas en el Estudio Histomorfométrico del Hueso Interradicular de los Primeros Molares Inferiores de Ratas Wistar

Methodological Considerations in the Histomorphometric Study of the Interradicular Bone of the First Lower Molars of Wistar Rats

Recibido 01/10/2020
Aceptado 23/12/2020

Pulitano Manisagian GE, Nenda MM, Mandalunis PM

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Odontología
Cátedra de Histología y Embriología
Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el volumen óseo BV/TV (%) del hueso interradicular en ratas Wistar: A) en relación a la edad; B) en relación a la zona de estudio en animales de la misma edad. Se utilizó Grupo A) 15 ratas Wistar hembras de 6 (I), 10 (II) y 14 (III) semanas, Grupo B) 9 ratas Wistar macho de 8 semanas. Tras la eutanasia, se extrajeron los maxilares inferiores y se procesaron histológicamente para obtener cortes mesio-distales del primer molar inferior coloreados con H.E. Sobre microfotografías digitales se evaluó el BV/TV (%). El análisis estadístico se realizó en A) mediante ANOVA y Bonferroni test y en B) se calculó el rango (R). Los resultados en A) el BV/TV (%) aumenta significativamente con la edad de los animales; en B) se encontró que el BV/TV (%) varía hasta un 20% si se considera el volumen total y este rango disminuye a 8.3% al estudiar su mitad coronal. En conclusión, el BV/TV (%) del hueso interradicular del primer molar inferior de ratas Wistar varía considerablemente con la edad de los animales y en animales de una misma edad -según se considere evaluar todo el hueso interradicular del espacio alveolar o la mitad superior del mismo-. Los resultados de este trabajo recomiendan emplear animales de la misma edad y realizar mediciones histomorfométricas empleando la mitad coronal de dicho hueso, especialmente en los diseños de periodontitis experimental.

Palabras Clave: histomorfometría ósea, rata Wistar, hueso mandibular, hueso interradicular, primer molar inferior

ABSTRACT

The objective was to evaluate interradicular bone volume BV/TV (%) of Wistar rats: A) according to age; B) according to the studied region of interradicular bone in animals of the same age. Methods: Group A): Fifteen female Wistar rats aged 6 (I), 10 (II), and 14 (III) weeks; Group B) Nine male Wistar rats aged 8 weeks. Following euthanasia, the mandibles were resected and processed histologically; mesio-distally oriented sections of the first lower molar were obtained and

stained with H-E. Digital photomicrographs were used to evaluate BV/TV%. ANOVA and Bonferroni's test were used to statistically analyze results corresponding to Group A, and range (R) was calculated in Group B. The results in Group A: BV/TV% increased significantly with age; Group B: BV/TV (%) was found to vary up to 20% when considering the entire interradicular bone, and the range decreased to 8.3% when considering the coronal half. In conclusion, interradicular bone BV/TV (%) of the first lower molar of Wistar rats varies substantially with age and among animals of the same age depending on the portion of interradicular bone that is evaluated, i.e. the entire interradicular bone inside the alveolar space, or the coronal half. Based on the results of the present study, it is recommended that animals of the same age be used and histomorphometric determinations be performed on the coronal half of the interradicular bone, especially in rat models of experimental periodontitis.

Keywords: bone histomorphometry, Wistar rats, mandibular bone, interradicular bone, first lower molar.

INTRODUCCIÓN

Los modelos animales experimentales juegan un rol muy importante en el estudio de la etiología, fisiopatología y diagnóstico de un gran número de patologías óseas, así como en el desarrollo de medidas preventivas y tratamientos terapéuticos. Estos modelos permiten obtener información que, por otra parte, podría ser dificultosa o inviable de ser obtenida a través de estudios clínicos.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado en diferentes situaciones experimentales (tóxicos, osteoporosis, diabetes, bisfosfonatos) a los huesos largos, así como también al hueso interradicular como exponente de hueso cráneo facial. Este hueso también se ha estudiado en el modelo de periodontitis experimental, tanto relacionado a patologías sistémicas como su tratamiento con drogas en forma tópica (Pulitano Manisagian et al., 2018; Díaz et al., 2016; Rodríguez y Mandalunis, 2016; Nenda et al., 2016; Sánchez et al., 2016; Oyhanart et al., 2015; Rodríguez et al., 2012; Oyhanart et al., 2015; Goya et al., 2006; Villarino et al., 2011).

En el presente artículo se desarrollarán consideraciones metodológicas relacionadas al estudio histomorfométrico del hueso interradicular del primer molar inferior de ratas Wistar, a los efectos de lograr la difusión de las mismas, dentro de la comunidad científica, especialmente aquella que emplea el modelo de periodontitis experimental. Dichos aspectos metodológicos son muy importantes a la hora de validar los resultados experimentales obtenidos.

Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, el objetivo del presente trabajo consiste en demostrar histomorfométricamente las variaciones del volumen de hueso interradicular en ratas Wistar: A) en relación a la edad de los animales y B) en relación a la orientación y arquitectura de dicho hueso en animales de una misma edad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas Wistar. Todos los animales recibieron acceso a alimento balanceado y agua "ad libitum". Las condiciones de vivienda fueron los siguientes: jaulas de alambre galvanizado; seis animales por jaula; temperatura: 21 C a 24 C; humedad: 52 % a 56%; ciclos de luz / oscuridad: 12 horas /12 horas.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología (28/11/2012-38 y 012/2016 CICUAL-ODONTO-FOUBA) de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, y en concordancia con la guía de uso y cuidado de Animales de Laboratorio de National Institutes of Health (NIH).

GRUPOS EXPERIMENTALES:

Se trabajó con dos grupos de animales:

A) Para evaluar la variación en el volumen óseo en relación a la edad, se utilizaron 15 ratas Wistar hembras de 6, 10 y 14 semanas de edad.

B) Para evaluar la región de interés o zona de estudio más adecuada en el hueso interradicular, se utilizaron 9 ratas Wistar macho de la misma edad cronológica (8 semanas).

Los animales fueron eutanasiados a las edades mencionadas previamente. Se extrajeron los maxilares inferiores, los cuales fueron fijados en formol buffer 10 % (pH 7.4). Las muestras fueron prolijamente disecadas y luego descalcificadas en una solución de EDTA al 10%, pH 7.0 durante 25 días para su posterior inclusión en parafina y la obtención de cortes histológicos del 1er molar inferior, orientados bajo lupa estereoscópica (marca Nikon SMZ-1) en sentido mesio-distal, que se colorean con hematoxilina-eosina. Mediante microfotografías digitales con una magnificación de 40X, utilizando el Software Image Pro Plus, se evaluó el volumen óseo interradicular BV/TV (%) en cada grupo (A y B).

Mediciones del Volumen óseo BV/TV (%): El Volumen óseo interradicular, BV/TV % (Bone Volume/Total Volume) es definido como la fracción de tejido óseo interradicular en relación al volumen total. El volumen óseo (BV) corresponde a la sumatoria de las trabéculas óseas halladas en el área de estudio delimitada, mientras que el volumen total (TV) es considerado como el espacio interradicular ocupado por el tejido óseo, la médula ósea y el ligamento periodontal. El parámetro (BV/TV) se expresa en porcentaje (%).

-En el grupo A, se evaluó el BV/TV (%) total, para lo cual se delimitó un área que comprende al ligamento periodontal, médula ósea y hueso interradicular comprendido entre ambas raíces del primer molar inferior (Figura 1.1). Los resultados obtenidos se ana-

lizaron estadísticamente mediante ANOVA y Test de Bonferroni, considerando una p ≤ 0,05 como significativa.
-En el grupo B, se evalúo el BV/TV (%) total y también el BV/TV de la mitad superior (Figura 1.2). Una vez obtenidos ambos parámetros para cada preparado del grupo, se calculó el Rango (R). (Figura 2).

RESULTADOS

En el grupo A el BV/TV (%) total aumenta significativamente con la edad de los animales: 6 sem (I): 36±5.8, 10 sem (II): 45±6.5 y 14 sem (III): 50±6.0 (I vs II and III, p<0.05) (Figuras 3 y 4). En el grupo B se encontró que el volumen óseo varía hasta un 20% si se considera el volumen en todo el hueso interradicular (máx 51.4%, mín 31.2%, R: 20.2) y este rango disminuye a menos de un 10 % si se estudia la mitad superior de dicho hueso interradicular (máx 51.3%, mín 43.0%, R: 8.3) (Tabla 1). Al observar las microfotografías del hueso interradicular del primer molar inferior de dos ratas Wistar de la misma edad biológica (8 semanas), puede observarse en ellas cómo la distribución del tejido óseo es más constante en la mitad superior del área interradicular, mientras que, en la mitad inferior, aún con una óptima orientación del corte, puede observarse una gran variación en los espacios medulares (Figura 5).

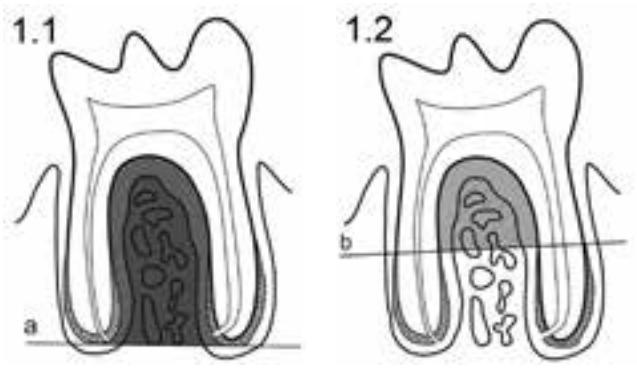


FIGURA 1. Esquematización de un molar de rata in situ y zona de medición de BV/TV.
1.1: Por encima de la línea a, la cual pasa por el punto más apical de ambas raíces, se encuentra el área utilizada para calcular el BV/TV (%) total.
1.2: Por encima de la línea b, trazada al inicio de la aparición del cemento celular, se muestra el área utilizada para realizar las mediciones histomorfométricas de BV/TV (%) de la porción superior.

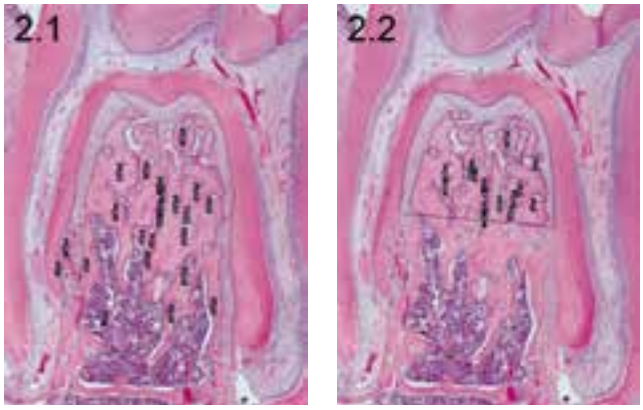


FIGURA 2. Microfotografías de campo claro. Técnica de descalcificación. Tinción H&E. Magnificación 20X. Cortes mesio-distales de primer molar inferior. En ambas, se observan las mediciones realizadas con Image Pro Plus.
2.1: Determinación del BV/TV total
2.2: Determinación del BV/TV de la porción superior

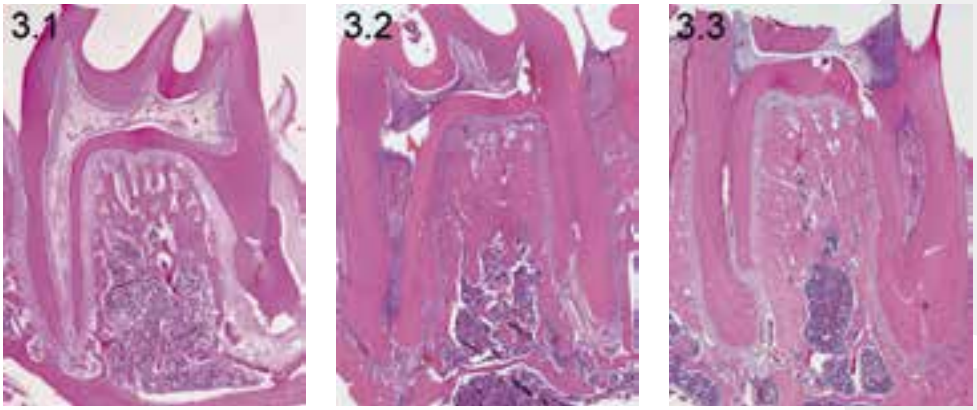


FIGURA 3. Microfotografías de campo claro. Técnica de descalcificación. Tinción H&E. Magnificación 20X. Cortes mesio-distales de primer molar inferior de ratas Wistar hembras. **3.1:** 6 semanas; **3.2:** 10 semanas; **3.3:** 14 semanas. Puede observarse en ellas el aumento progresivo del volumen óseo con la edad de los animales.

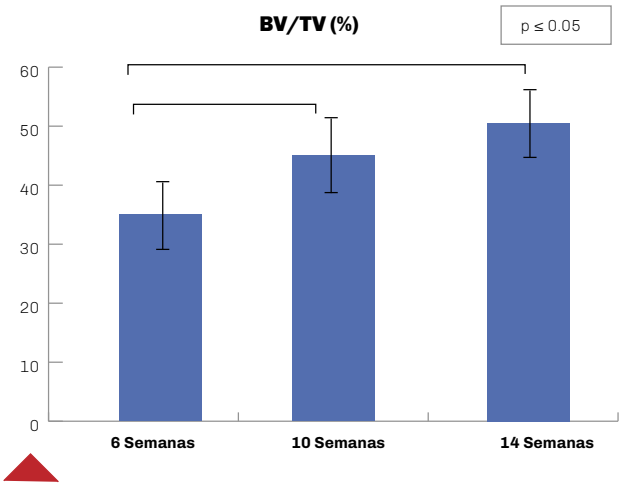


FIGURA 4. Volumen óseo interradicular total BV/TV (%) del primer molar inferior. Ratas Wistar hembra. Tiempos experimentales: 6, 10 y 14 semanas de edad.

BV/TV (%) TOTAL		
	Valor máximo	Valor mínimo
BV/TV	51.4	31.2
Rango	20.2	
BV/TV (%) MITAD SUPERIOR		
	Valor máximo	Valor mínimo
BV/TV	51.3	43
Rango	8.3	

TABLA 1. Determinación del Rango (R). Ratas Wistar macho. BV/TV (%) total. BV/TV (%) Mitad superior.

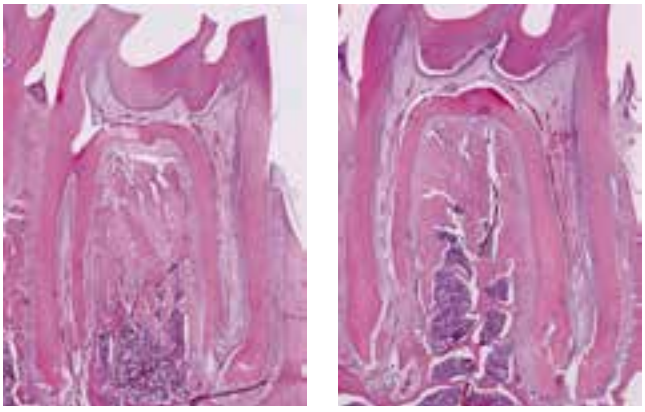


FIGURA 5. Microfotografías de campo claro. Técnica de descalcificación. Tinción H&E. Magnificación 20X. Cortes mesio-distales de primer molar inferior de ratas Wistar macho, ambos, 8 semanas

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran en el grupo A, donde se consideraron diferentes edades de los animales, que el BV/TV (%) total aumenta significativamente con la edad. En el grupo B, donde se incluyeron animales de la misma edad, el BV/TV (%) varía hasta un 20%, entre los animales del mismo grupo, si se considera el volumen en todo el hueso interradicular. Sin embargo, este rango disminuye a menos de un 10 % si se estudia la mitad superior (coronal) de dicho hueso interradicular en los mismos animales. En el estudio histomorfométrico del hueso interradicular del primer molar, deben considerarse los siguientes aspectos de importancia:

- En relación al animal experimental, considerar como principal factor de inclusión en el armado de los grupos experimentales la edad cronológica de los mismos (siendo su peso corporal un factor influyente en segundo término), ya que en este estudio se ha demostrado el aumento significativo del BV/TV (%) conforme aumenta la edad cronológica de los mismos. Es de destacar que este hallazgo es muy propio de los huesos maxilares, dado que en la mayoría de los huesos del sistema esquelético el volumen óseo disminuye con la edad (Nenda et al., 2016).
- En relación a la región de interés o zona de estudio, considerando los resultados obtenidos en ambos grupos experimentales, pero especialmente en el grupo B, la porción superior o coronal del hueso interradicular, se presenta como la más constante y estable en los cortes histológicos, y por lo tanto la más adecuada de ser tomada como referencia al evaluar el BV/TV (%), fundamentalmente en la pérdida ósea observada en el modelo de periodontitis experimental. Continuando con la descripción de dicha zona topográfica, se observa un amplio espacio medular en la zona basal del hueso interradicular, cuya presencia, según la profundidad del corte, se torna más o menos evidente. A pesar de esta particularidad, resulta ser el primer molar inferior la pieza dental elegida, ya que por su tamaño y disposición radicular permite obtener una buena orientación en los cortes histológicos.

Teniendo en cuenta los artículos científicos más actuales, en relación a modelos de periodontitis experimental puede observarse que la tendencia actual en el estudio del hueso de los maxilares consiste en el empleo del micro-CT (microtomografía computarizada) para la obtención de cortes y su posterior reconstrucción tridimensional (Chen et al., 2019; Araújo et al., 2017; Dai et al., 2016). En otros estudios realizados en modelos de periodontitis experimental y recientemente publicados, se utilizan técnicas macroscópicas, realizando mediciones lineales de la pérdida ósea alveolar, considerando las distancias en mm entre el límite amelocementario y la cresta ósea alveolar, en distintos lugares preestablecidos (O'Boyle et al., 2020, Corrêa et al; 2019, Ribeiro et al., 2017,

França et al.,2017). En una publicación de Lee et al., (2016), se considera a la pérdida ósea, empleando las mismas técnicas y los mismos reparos anatómicos pero, en este caso, considerando a la pérdida ósea como área de superficie radicular expuesta (en mm2). Se podría decir que existen diferentes técnicas en la evaluación del tejido óseo, en relación a modelos de periodontitis experimental:1) Macroscópicas; evalúan la pérdida ósea vertical, o bien la superficie radicular expuesta, en maxilares disecados; 2) Análisis con micro-CT: mediante la obtención de cortes orientados que nos permiten lograr la reconstrucción tridimensional del sector estudiado, aportando información respecto a la arquitectura ósea, sin detalles celulares. 3) Histomorfométricas: Emplea cortes histológicos en los cuales se miden distintos parámetros y nos permiten recabar información respecto a los aspectos celulares de los tejidos en estudio.
Cada una de estas técnicas de estudio ofrece información que es única y particular. Dado el advenimiento de nuevas tecnologías como el micro-CT, su uso resulta muy valioso. Aporta información que complementa, pero no sustituye a la información aportada por los estudios histomorfométricos convencionales. Es decir que, las técnicas histomorfométricas continúan siendo complementarias y necesarias para el estudio del hueso interradicular del primer molar inferior de rata.

CONCLUSIONES

Los resultados histomorfométricos demuestran que el volumen del hueso interradicular del primer molar inferior de ratas Wistar varía considerablemente no sólo con la edad de los animales sino también en animales de una misma edad (si se considera todo el hueso interradicular o bien la porción superior del mismo). Dada la relación directa observada entre el volumen óseo y la edad cronológica de los animales, se recomienda tener en cuenta emplear animales de la misma edad. Por otra parte, respecto al área de estudio, se observó que el sector del hueso interradicular más constante entre los animales es la mitad superior de dicho hueso, por lo que se sugiere realizar las determinaciones histomorfométricas en dicho sector. Esta consideración permitirá resultados y conclusiones fiables de ser comparados en diferentes diseños experimentales, especialmente en la periodontitis experimental.

REFERENCIAS

Araújo AA, Pereira ASBF, Medeiros CACX, Brito GAC, Leitão RFC, Araújo LS, Guedes PMM, Hiyari S, Pirih FQ y Araújo Júnior RF. (2017). Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. PLoS One, 12(8), e0183506. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183506

Chen S, Lei H, Luo Y, Jiang S, Zhang M, Lv H, Cai Z y Huang X. (2019). Micro-CT analysis of chronic apical periodontitis induced by several specific pathogens. Int Endod J, 52(7), 1028–1039. https://doi.org/10.1111/iej.13095

Corrêa MG, Absy S, Tenenbaum H, Ribeiro FV, Cirano FR, Casati MZ y Pimentel SP. (2019). Resveratrol attenuates oxidative stress during experimental periodontitis in rats exposed to cigarette smoke inhalation. J Periodontal Res, 54(3), 225–232. https://doi.org/10.1111/jre.12622

Dai J, Ma Y, Shi M, Cao Z, Zhang Y y Miron RJ. (2016). Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. Clin Oral Investig, 20(3), 581–588. https://doi.org/10.1007/s00784-015-1531-3

Díaz DH, Rodas JA, Bozzini CE, Mandalunis PM y Escudero ND. (2016). Sequential administration of alendronate and strontium ranelate: histomorphometry and bone biomechanics in ovariectomized animals. Acta Odontol Latinoam, 29(2), 168–177. http://www.scielo.org.ar/pdf/aol/v29n2/v29n2a10.pdf

França LFC, Vasconcelos ACCG, da Silva FRP, Alves EHP, Carvalho JS, Lenardo DD, de Souza LKM, Barbosa ALR, Medeiros JR, de Oliveira JS y Vasconcelos DFP. (2017). Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. J Clin Periodontol, 44(6), 568–576. https://doi.org/10.1111/jcpe.12729

Goya JA, Paez HA y Mandalunis PM. (2006). Effect of topical administration of monosodium olpadronate on experimental periodontitis in rats. J Periodontol, 77(1), 1–6. https://doi.org/10.1902/jop.2006.77.1.1

Lee CT, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, Brito LC, Paster BJ y Van Dyke TE. (2016). Resolvin E1 reverses experimental periodontitis and dysbiosis. J Immunol, 197(7), 2796–2806. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600859

Nenda MM, Lewicki M y Mandalunis PM. (2016). Histomorphometry of the tibia and mandible of healthy female Wistar rats at different stages of growth. Exp Anim, 65(2), 109–116. https://doi.org/10.1538/expanim.15-0069

O'Boyle C, Haley MJ, Lemarchand E, Smith CJ, Allan SM, Konkel JE y Lawrence CB. (2020). Ligature-induced periodontitis induces systemic inflammation but does not alter acute outcome after stroke in mice. Int J Stroke, 15(2), 175–187. https://doi.org/10.1177/1747493019834191

Oyhanart SR, Escudero ND y Mandalunis PM. (2015). Effect of alendronate on the mandible and long bones: an experimental study in vivo. Pediatr Res, 78(6), 618–625. https://doi.org/10.1038/pr.2015.163

Pulitano Manisagian GE, Benedí D, Goya JA y Mandalunis PM. (2018). Study of epithelial rests of Malassez in an experimental periodontitis model. Acta Odontol Latinoam, 31(3), 131–137. http://www.scielo.org.ar/pdf/aol/v31n3/v31n3a02.pdf

Ribeiro FV, Pino DS, Franck FC, Benatti BB, Tenenbaum H, Davies JE, Pimentel SP, Casarin RC, Cirano FR y Casati MZ. (2017). Resveratrol inhibits periodontitis-related bone loss in rats subjected to cigarette smoke inhalation. J Periodontol, 88(8), 788–798. https://doi.org/10.1902/jop.2017.170025

Rodríguez J, Escudero ND y Mandalunis PM. (2012). Effect of strontium ranelate on bone remodeling. Acta Odontol Latinoam, 25(2), 208–213. http://www.scielo.org.ar/pdf/aol/v25n2/v25n2a09.pdf

Rodríguez J y Mandalunis PM. (2016). Effect of cadmium on bone tissue in growing animals. Exp Toxicol Pathol, 68(7), 391–397. https://doi.org/10.1016/j.etp.2016.06.001

Sánchez LM, De Lucca RC, Lewicki M y Ubios ÁM. (2016). Long term bone alterations in aged rats suffering type 1 diabetes. Exp Gerontol, 85, 9–12. https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.09.004

Villarino ME, Lewicki M y Ubios AM. (2011). Bone response to orthodontic forces in diabetic Wistar rats. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 139(4Suppl), s76–s82. https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.06.021

AGRADECIMIENTOS

A la Od. Sharon Oyhanart por su colaboración en la edición de las imágenes y al Od. Milton Nervegna por su colaboración con el trabajo. Histotecnólogas: Ivana Sanchez Rojas, Mariela Lacave. Paula Rocha. Bioteristas: Carlos Barcenas y Marianela Lewicki.
Subsidios: 200201201100190BA - 20020160100034BA

Dirección para correspondencia
Cátedra de Histología y Embriología
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires
Marcelo T. de Alvear 2142, Piso 1 ° A
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1122AAH
giselapulitano@gmail.com