



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DESCELULARIZACIÓN DE POLVO DE HUESO  
PORCINO PARA SU APLICACIÓN COMO RELLENO  
ÓSEO EN ODONTOLOGÍA.**

**T E S I N A**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

LUIS ARMANDO ESPINOSA AGUILAR

TUTORA: Dra. LAURA ESTHER VARGAS ULLOA

ASESORA: Dra. MARGARITA VICTORIA GARCÍA GARDUÑO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# *A mi padre...*

*Este trabajo y mi carrera en general se la dedico con todo cariño al Dr. Gumersindo Espinosa Carranza. Gracias padre por estar presente en el día a día, por haberme brindado la oportunidad de salir adelante, muchas veces a costa de tu propia salud.*

*Gracias por creer en mi capacidad y por darme todo lo que en tus posibilidades ha estado, forjando la persona que hoy en día soy.*

*Ahora concluye un ciclo de mi vida, que definitivamente te dedico con la alegría y emoción que siento.*

*Te amo papá.*

*De igual forma, quiero agradecer a mi hermana Beatriz Adriana Espinosa Aguilar por ser ese gran ejemplo de nobleza, humildad y fortaleza, así como de superación. Gracias por ser mi amiga y mi guía en cada etapa de mi vida.*

*A mis dos hermosas sobrinas Camila y Regina que amo infinitamente y por quienes velaré hasta el último de mis días.*

*Gracias a mi querida familia Espinosa.*

*Gracias a los pacientes que he atendido a lo largo de la carrera, quienes ciegamente me han brindado su confianza, de quienes aprendí que la Odontología no se limita a los dientes; que me enseñaron a ser más humano; que los recursos materiales no son necesarios para demostrar gratitud y que elegí una de las más hermosas profesiones.*

*Agradezco a los amigos que han estado a lo largo de mi vida dentro y fuera de la universidad, con quienes crecí, reí, lloré y con certeza he pasado los mejores momentos de mi vida. Por su apoyo, sus consejos, por todo aquello que me hace valorarlos a todos y cada uno de ustedes.*

*A las personas que me han acompañado y de quienes he aprendido a tomar lo bueno de todas y cada una de ellas. Por apoyarme, por impulsarme, por brindarme su amor, su compañía y formar parte de los bellos recuerdos que guardo para siempre.*

*¡Gracias!*

*Y por último, pero no por eso menos importante, dedico todo lo que soy y lo bueno que a mi vida ha llegado a la memoria de mi abuelo, el Dr. Pedro José Espinosa Vásquez, quien siempre me impulsó, quien me ha dado las más grandes lecciones de vida que hasta la fecha siguen tomando significado; que siempre me exigía dar lo mejor de mí en el camino de la*

*justicia y la honradez. Te amo abuelo, gracias por haber creído en mí hasta el último de tus días y dejarnos el legado de la familia Espinosa.*

*Agradezco a la vida misma por permitirme llegar hasta aquí colmado de bendiciones, rodeado de tanto amor y cariño. Deseo corresponderse a todos y cada uno de ustedes que me han acompañado.*

*Luis Armando Espinosa Aguilar*

*Dedicatoria.*

*Agradezco a la mayor casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), así como a la Facultad de Odontología por brindarnos esa oportunidad de crecer como profesionistas a nivel mundial.*

*Agradezco a mi Tutora, la Dra. Laura Esther Vargas Ulloa por ser una excelente guía. Gracias Dra. Por su comprensión, por su paciencia y por impulsarme en todo momento a concluir satisfactoriamente mi carrera con toda la experiencia y trayectoria que conserva y comparte para un avance científico importante.*

*A mi asesora, la Dra. Margarita Victoria García Garduño, quien con su experiencia y en conjunto a mi tutora, me apoyó firmemente en este proceso, siendo el mejor equipo que pude haber conocido, así como a la Dra. María Concepción Peña Juárez quien también revisó a detalle el trabajo y me orientó en las dudas que surgieron.*

*Agradezco al grupo multidisciplinar de Ingeniería de Tejidos y al departamento de biomateriales de la División de Estudios Superiores de Posgrado de Odontología.*

*“Por mi raza hablará el espíritu”*

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	8-9
OBJETIVO.....	10
CAPÍTULO 1: TEJIDO ÓSEO.....	11-13
1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS HUESOS.....	14-16
1.1.1. HUESO COMPACTO.....	16
1.1.2 HUESO ESPONJOSO.....	17
1.2 MATRIZ EXTRACELULAR ÓSEA.....	18
1.3 REPARACIÓN, CICATRIZACIÓN Y REGENERACIÓN ÓSEA.....	19-21
CAPÍTULO 2: INJERTOS.....	22
2.1 INJERTOS ÓSEOS.....	22-23
2.2 XENOINJERTOS ÓSEOS PORCINOS.....	24-25
2.2.1 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.....	26-27
2.2.2 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN CERDOS.....	27-30
2.2.3 CERDOS TRANSGÉNICOS.....	31-32
CAPÍTULO 3: INGENIERÍA DE TEJIDOS Y DESCELULARIZACIÓN.....	33-35
3.1 ANDAMIOS ÓSEOS.....	35-36
3.2 MÉTODOS DE DESCELULARIZACIÓN.....	36
3.2.1 TENSOACTIVOS.....	36-38
3.2.2 ÁCIDOS Y BASES.....	38
3.2.3 POR ACCIÓN ENZIMÁTICA.....	39-40
3.2.4 MEDIOS MECÁNICOS.....	40
3.2.4.1 TEMPERATURA.....	41
3.2.4.2 ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA.....	41

3.2.4.3 DIÓXIDO DE CARBONO	
SUPERCRÍTICO.....	41-42
3.2.5 MÉTODOS COMBINADOS.....	42
3.3 EVALUACIÓN DE LA DESCELULARIZACIÓN.....	43
3.3.1 PROPIEDADES MECÁNICAS.....	43-44
CAPÍTULO 4: TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA.....	45-46
CAPÍTULO 5: IMPRESIÓN 3D DE TEJIDOS Y ÓRGANOS.....	47-48
5.1 CLASIFICACIÓN DE LAS IMPRESIONES 3D.....	48
5.2 BIOMATERIALES.....	49
5.3 PROPIEDADES DE LOS ANDAMIOS EN GENERAL.....	49-50
5.3.1 HIDROXIAPATITA.....	50
5.4 IMPRESIÓN DE HUESO EN MÁQUINAS 2D Y 3D.....	50-52
CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54-65

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la práctica Odontológica, el profesional de la salud dental se ha encontrado con diferentes tipos de limitantes para devolver la salud y función en aquellos individuos que por factores ambientales o hereditarios han perdido el equilibrio en la relación de los tejidos que componen el sistema estomatognático. Los defectos óseos son uno de los principales problemas en los tejidos de sostén, por lo cual a través de la historia, se ha llegado al uso de autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos o injertos aloplásticos en áreas que van desde milímetros hasta centímetros que son reparables; cuando se hace la resección completa de la mandíbula, la restauración es diferente.

El autoinjerto no presenta complejidad al implantarse puesto que es reconocido por el sistema inmunitario del receptor; sin embargo, en defectos amplios algunas veces el tamaño de muestra es crítico y puede ser rechazado. Así mismo la obtención de los aloinjertos e injertos aloplásticos representan métodos más complejos a un costo muy elevado, sin contar la poca disponibilidad de donación y accesibilidad para la población.

En los xenoinjertos y xenotrasplantes, los problemas son diferentes en función a la proximidad filogenética entre la especie donante y la especie receptora del órgano, por lo que la clasificación del xenotrasplante concordante es entre especies relativamente cercanas como lo es el hombre y el chimpancé. Por otra parte, el xenotrasplante discordante que actúa en especies más alejadas filogenéticamente como el hombre y el cerdo.

El ganado porcino se ha convertido en uno de los mejores candidatos para el xenotrasplante debido a su eficiencia reproductiva, a un aceptable intervalo entre generaciones, ya que permite mantenerlo en

condiciones sanitarias estrictas y que presenta una relativa similitud anatómica y fisiológica con el humano.

La Ingeniería Tisular es el campo científico que pretende regenerar, reparar o reemplazar bioartificialmente tejidos y órganos funcionales del cuerpo humano que han sido dañados por distintos factores.

Existe una gran diversidad de necesidades Odontológicas en la que se requiere la utilización de injertos, especialmente el óseo. En México, algunas de las causas de pérdidas de hueso es por accidentes automovilísticos, donde el acceso a los trasplantes es muy limitado porque generalmente son pérdidas de gran tamaño.

Ante la necesidad de obtención de injertos óseos, como profesionistas nos encontramos con la baja accesibilidad a los métodos de obtención de los mismos.

Uno de los medios para lograr los objetivos de la Ingeniería Tisular, es la Descelularización que consiste en la eliminación celular de los tejidos mediante diversos factores hasta dejar la Matriz extracelular para su posterior recelularización en el huésped.

El método para descelularizar hueso porcino se describirá para que posteriormente pueda ser sometido al proceso de impresión 3D, lo que pudiera demarcar una nueva era en la regeneración tisular, pues se recuperarían estructuras óseas perdidas o dañadas y a su vez, tendría un grado de accesibilidad más razonable y personalizada según el caso para la población Mexicana.

## **OBJETIVO**

Describir bibliográficamente los métodos de descelularización de polvo de hueso porcino para su aplicación como relleno óseo en Odontología.

## **CAPÍTULO I**

### **TEJIDO ÓSEO**

La palabra hueso tiene dos significados: un tipo de tejido (el tejido óseo) o una estructura anatómica. El ser humano nace con más de 300 huesos y al crecer, algunos de estos se fusionan, por lo que en un adulto, el número disminuye a 206. Los huesos son ligeros, fuertes y escasamente flexibles. Los huesos están apilados de forma vertical en el esqueleto, unidos entre sí por ligamentos sumado al control preciso del cerebro sobre los músculos esqueléticos. El hueso es una forma especializada de tejido conjuntivo que se hace duradero gracias al depósito mineral dentro de su estructura, que además posee una elevada actividad metabólica.<sup>1</sup>

Es el resultado del trabajo conjunto de diferentes tejidos: tejido óseo, cartílago, tejido conectivo denso, epitelio, tejido adiposo, muscular y tejido nervioso. Por tal motivo, se considera que cada hueso es un órgano.<sup>2</sup>

Aproximadamente el 30% de la masa esquelética total está constituida por tejido osteoide, una matriz orgánica constituida principalmente por colágeno junto con el ácido hialurónico, sulfato de condroitina y una proteína dependiente de la vitamina K denominada osteocalcina, que es importante para fijar el calcio.<sup>3</sup>

Cabe mencionar que el resto es el componente mineral de cristales de fosfato de calcio o hidroxapatita, así como los componentes celulares donde tenemos los osteoblastos, los osteoclastos y los osteocitos.

Para aplicar la medicina regenerativa al hueso, debemos conocer los componentes anatómicos de los mismos:

Diáfisis: Es la porción larga y cilíndrica del hueso o también denominado cuerpo.

Epífisis: Son los extremos proximal y distal del hueso. Se identifica por ser la porción más ancha en cada extremo.<sup>3-4</sup>

Lámina epifisaria: Es la porción de un hueso maduro en la que la diáfisis se une a la epífisis identificándose como una línea remanente.

Cartílago articular: Es la capa delgada de cartílago hialino que cubre la epífisis para que un hueso se articule con otro.

Periostio: Es una vaina de tejido conectivo denso que protege al hueso, participa en la consolidación de fracturas, nutrición, inserción de ligamentos y tendones. Además une el hueso a otro mediante las fibras perforantes o de Sharpey que se extienden desde el periostio hasta la matriz extracelular del hueso.<sup>5</sup>

En el centro de los huesos hay un canal o espacio medular, que contiene médula ósea y está revestido de tejido osteogénico. Los espacios medulares de los huesos largos contienen, principalmente médula amarilla grasa<sup>3</sup> (Fig. 1)<sup>6</sup>.

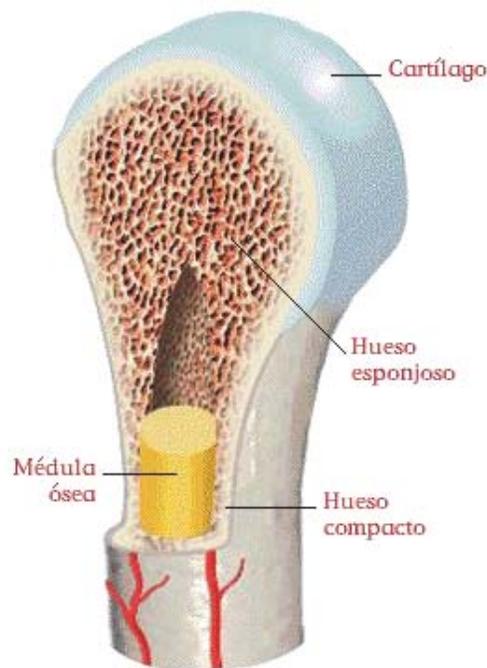


Fig. 1 Componentes anatómicos de los huesos largos<sup>6</sup>.

La médula ósea roja se localiza en los huesos pequeños, planos e irregulares del esqueleto, como el esternón, el íleon, las vértebras y en ella se producen las células de la sangre.<sup>2</sup> (Fig. 2)<sup>7</sup>

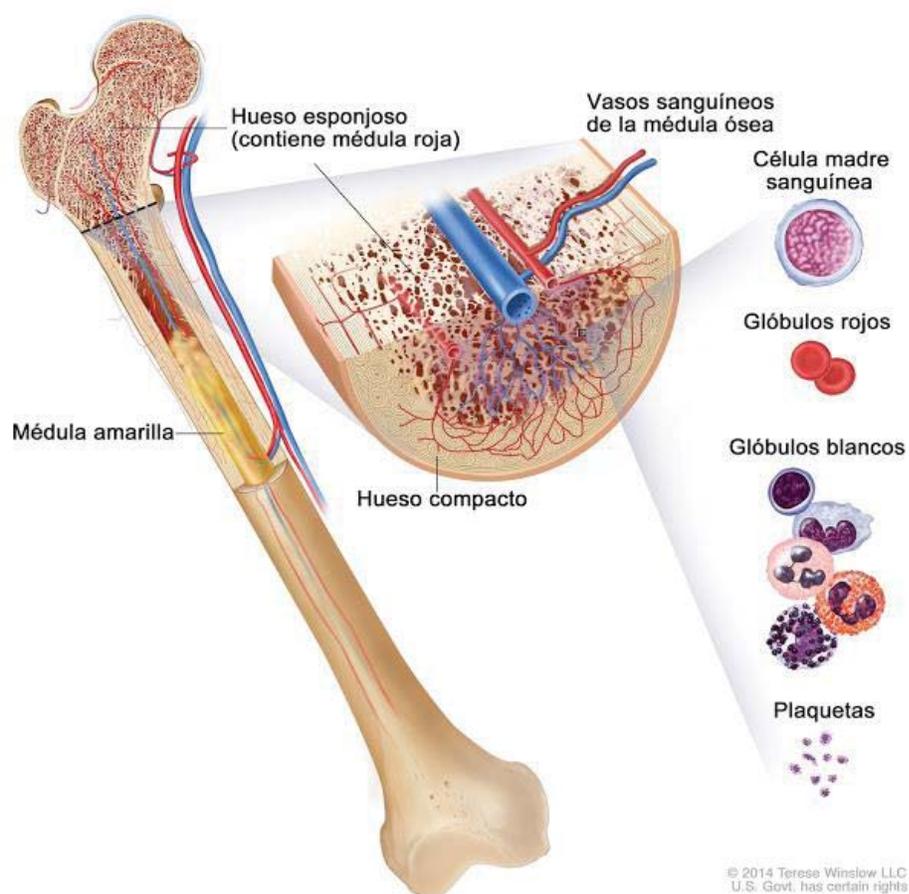


Fig. 2 Componentes del hueso<sup>7</sup>.

## 1.1 Clasificación de los huesos

Hay 5 tipos de huesos y cada uno de ellos contiene distintas proporciones de tejido óseo compacto y esponjoso:

- Los huesos largos tienen una longitud que los hace idóneos para actuar como palancas y soportar peso. Contienen una capa externa de hueso compacto y una interna de hueso esponjoso que rodea una cavidad donde se encuentra la médula ósea.
- Los huesos cortos son pequeños y de superficies planas por lo que son funcionales en las articulaciones complejas gracias a su capacidad de deslizarse fácilmente sobre otros en diferentes direcciones.
- Los huesos planos son delgados y planos; generalmente adoptan una curvatura para moldearse y proteger estructuras anatómicas vulnerables.
- Los huesos sesamoideos son aquellos que se forman entre los tendones o los ligamentos.
- Los huesos irregulares son todos los que no pueden clasificarse en las categorías ya mencionadas como los huesos de la pelvis y las vértebras.<sup>2</sup> (Fig. 3)<sup>8</sup>

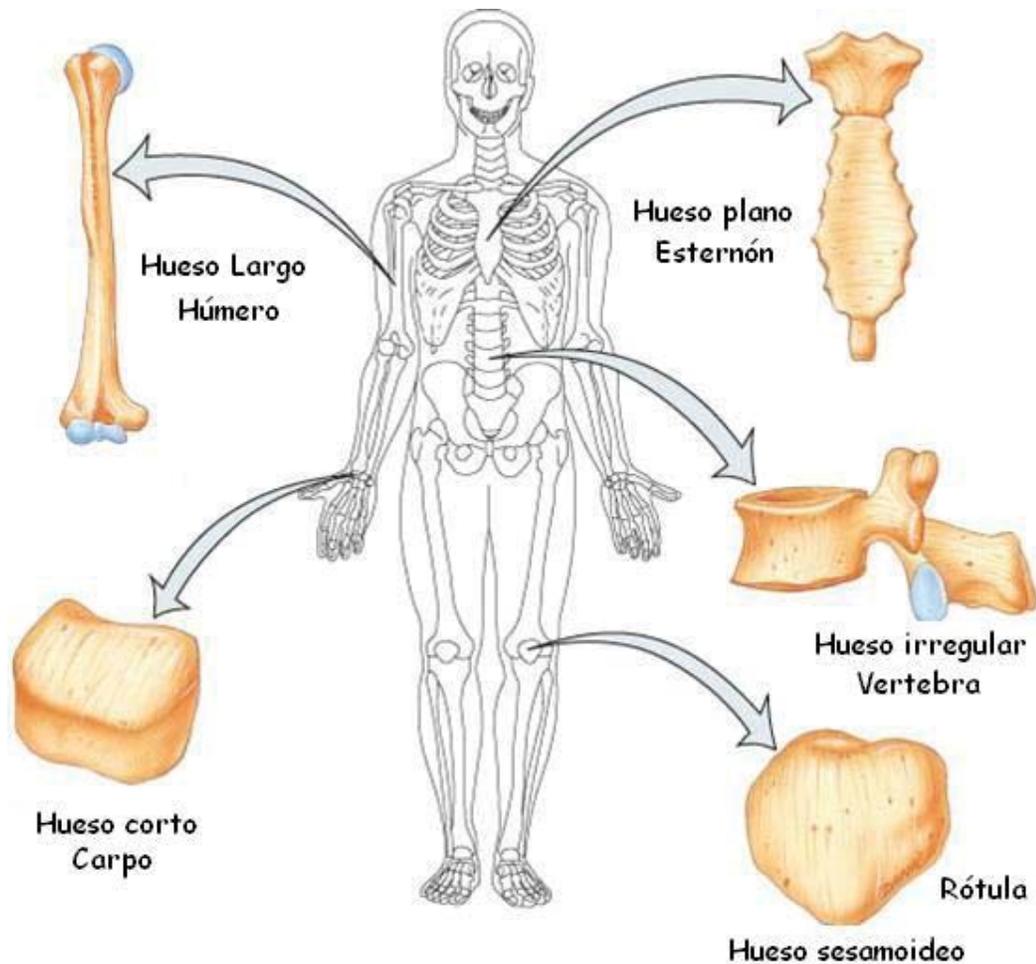


Fig. 3 Clasificación de los huesos<sup>8</sup>

El hueso se clasifica en compacto o denso y esponjoso o trabecular.

Está compuesto fundamentalmente por material orgánico, en su mayoría fibras de colágeno (34% en volumen) y material inorgánico, principalmente fosfato de calcio apatítico  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , otros componentes minerales, especialmente carbonato, los cuales se presentan como cristales de orden nanométrico (42% en volumen) y agua (24% en volumen). Se trata de un material biológico, organizado jerárquicamente en una arquitectura compleja en la cual se pueden distinguir varios niveles. Por ser un tejido vivo está en constante cambio

por procesos de remodelación y reparación, funciones realizadas por los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos. Los osteoclastos (OC) son células grandes, multinucleadas y ricas en anhidrasa carbónica y Fosfatasa Ácida Resistente al Tartrato (TRAP) y se localizan sobre las superficies óseas de manera aislada o en grupos poco numerosos.<sup>4,5</sup>

### 1.1.1 Hueso compacto

Este se caracteriza por tener pocos espacios en su interior, proporcionando soporte y protección principalmente en los huesos largos.<sup>1</sup>

Sus unidades funcionales son el Sistema de Havers u osteonas, constituidos por un canal central rodeado por anillos concéntricos de sustancia intercelular dura entre las cuales hay espacios denominados lagunas que contienen a las células maduras formadoras de hueso u osteocitos. <sup>2</sup>(Fig. 4)<sup>9</sup>

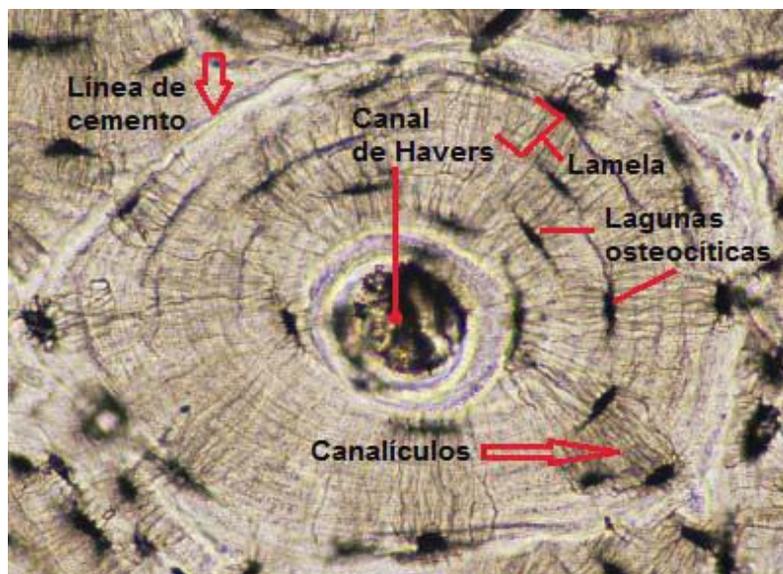


Fig. 4 Características microscópicas del hueso compacto.<sup>9</sup>

### 1.1.2 Hueso esponjoso

El hueso esponjoso no contiene osteonas verdaderas, sino que está formado por una trama irregular de láminas finas denominadas trabéculas entre las cuales hay poros amplios rellenos de médula ósea.<sup>1</sup>

Este tipo de hueso constituye la mayor parte de la masa de los huesos cortos, planos e irregulares, y está presente en las epífisis de los huesos largos y en las zonas de crecimiento.<sup>1,2</sup> (Fig. 5)<sup>10</sup>

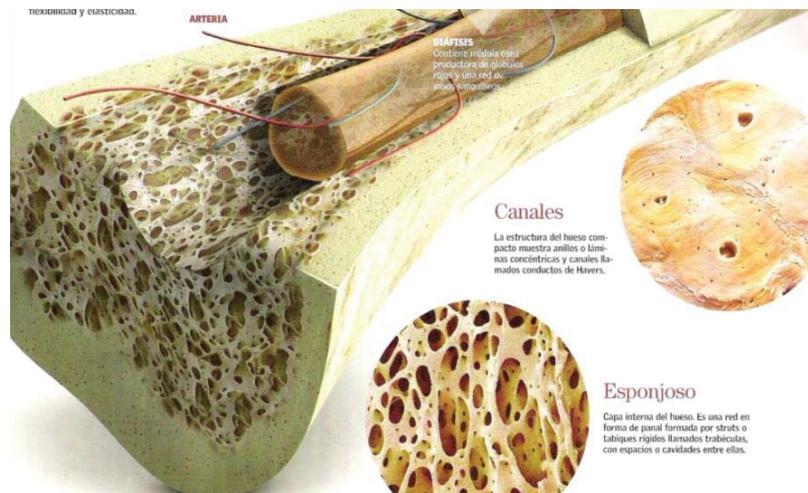


Fig 5. Trabeculado del hueso esponjoso.<sup>10</sup>

## 1.2 Matriz extracelular ósea

La matriz ósea se compone de compuestos orgánicos (aproximadamente el 20% del peso húmedo del hueso), compuestos inorgánicos (70-80% del peso húmedo del hueso) y agua (8-10% del peso húmedo del hueso).<sup>11</sup> Los componentes orgánicos contribuyen a la forma y capacidad de resistir la tensión. Los componentes inorgánicos rodean e impregnan las fibras de colágeno dotando al hueso de la capacidad de resistir cargas de compresión.<sup>12</sup> Los componentes orgánicos son predominantemente el colágeno tipo I con pequeñas cantidades de colágeno tipo V y XII, que juntos representan aproximadamente el 90% de la materia orgánica. El otro 10% está constituido por proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas de la matriz ósea como osteocalcina, osteonectina y sialoproteínas óseas.<sup>13</sup>

La Matriz Extracelular (ECM) es un producto de las células que funciona para mantener la estructura del tejido y del órgano, la organización y la función. Es una compleja red de proteínas y polisacáridos que forman una malla intrincada dentro del tejido que interactúa con las células residentes para regular su comportamiento, como la migración, la proliferación y la diferenciación. La técnica de descelularización elimina los remanentes celulares sin la destrucción de la arquitectura original del tejido ni la eliminación de los componentes de la ECM, manteniendo así las propiedades mecánicas de la ECM natural, pero en nuestro caso a futuro se obtendrán partículas descelularizadas para rehacer la estructura perdida lo más exacto posible con la utilización de tomografías computarizadas e impresión 3D.<sup>14</sup>

### 1.3 Reparación, cicatrización y regeneración ósea

Cuando los tejidos quedan diferenciados en etapa posterior a la adolescencia, el recambio de sus componentes y constante renovación depende de las funciones nerviosas y hormonales del organismo. Tal actividad depende de órganos como el riñón, el intestino y el hígado, así como la estimulación adecuada de los rayos ultravioleta del sol sobre la piel.<sup>15</sup>

La cicatrización ósea es un proceso estrictamente regulado que involucra diferentes tipos de células. Durante las primeras horas después de un trauma, se produce la formación de un hematoma y una respuesta inflamatoria aguda. Los leucocitos derivados de la sangre y los leucocitos de la médula ósea expresan citoquinas pro-inflamatorias e inician el proceso de reparación. Las células madre mesenquimales (MSC) migran del tejido circundante, luego se convierten en células osteoprogenitoras.<sup>16,17</sup>

La restauración de fracturas requiere una serie intrincada y bien organizada de eventos celulares y moleculares. Implica interacciones entre el hueso cortical, el periostio, el tejido facial indiferenciado que rodea la fractura y la médula ósea. El restablecimiento de la continuidad del hueso o la reparación de la fractura se divide en tres etapas: inflamación, reparación y remodelación.<sup>18</sup>

La invasión de células inflamatorias, fibroblastos, células mesenquimales y células osteoprogenitoras en el sitio de fractura forma tejido de granulación alrededor de los extremos de la fractura. Las fracturas que están anatómicamente alineadas con estabilidad absoluta, como aquellas reparadas quirúrgicamente con placas de compresión, experimentan una curación ósea primaria o remodelación de Havers, en la que existe una cicatrización osteonal directa dentro de la corteza por osificación intramembranosa<sup>19</sup>.

En fracturas reducidas cerradas, la cicatrización secundaria del hueso ocurre con la formación de un callo suave de puente que consiste en el tejido del cartílago que conecta los extremos de la fractura. Con el tiempo, la formación ósea se produce bajo el periostio y la calcificación del cartílago da lugar a la formación de callo duro o hueso tejido por osificación endocondral. La fase de remodelación comienza durante la mitad de la fase de reparación y puede continuar hasta 7 años. Con el tiempo, el hueso se reemplaza por hueso lamelar y hay repoblación del espacio medular.<sup>20</sup>

Con el fin de mejorar o acelerar el proceso de cicatrización ósea, se ofrecen nuevas herramientas para producir andamios que actúan como portadores de factores de crecimiento con propiedades biológicas relacionadas con los huesos, tales como proteínas morfogenéticas óseas (BMPs). La capacidad de enriquecer un andamio con factores de crecimiento para aumentar su liberación en el sitio lesionado podría mejorar activamente la reparación ósea.<sup>21</sup> En particular, la capacidad de reparación del hueso se basa en el reclutamiento de células implicadas en el proceso de regeneración, como las células progenitoras, y en la neovascularización en el sitio de la lesión.<sup>22</sup> (Fig. 6)<sup>23</sup>

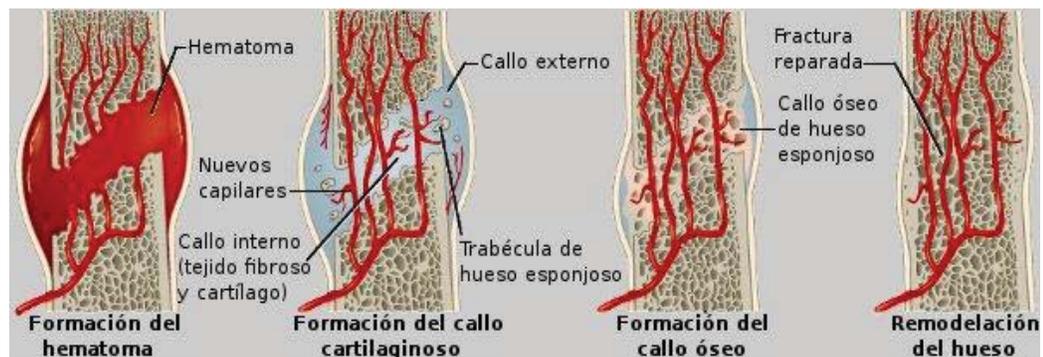


Fig. 6 Proceso de remodelado óseo.<sup>23</sup>

En el vasto panorama de los sustitutos óseos, los andamios derivados del porcino están mostrando grandes resultados en términos de

regeneración ósea humana, como lo confirman los resultados positivos de ensayos clínicos publicados por varios estudios. Felice et al.<sup>24, 25, 27</sup> Covani et al.<sup>26, 27</sup> Barone et al.<sup>29,30,31</sup> Calvo Guirado Crespi<sup>32</sup> y Scarano<sup>33</sup> han demostrado que el uso de sustitutos óseos por lo general ofrece mejores desempeños biomecánicos que el hueso regenerado espontáneamente en el mismo período. En todos los casos, una mayor densidad ósea, a menudo debido a un aumento significativo del número trabecular, parece garantizar una resistencia mejorada del defecto, un punto de partida favorable para el éxito del siguiente implante.<sup>34</sup>

## **CAPÍTULO 2**

### **INJERTOS**

Los injertos autólogos presentan un bajo riesgo de transmisión de enfermedades, buena histocompatibilidad y no son inmunogénicos. Desafortunadamente, hay un límite a la cantidad de tejido de injerto autólogo que puede ser cosechado antes de comprometer el sitio del donante. Aunque los aloinjertos pueden eliminar la morbilidad del sitio del donante y disminuir el tiempo de operación, están asociados con el riesgo de una respuesta inmune severa, transmisión de la enfermedad y una integración más lenta con el tejido nativo en comparación con los injertos autólogos.<sup>35</sup>

#### **2.1 Injertos óseos**

El trasplante de hueso es el segundo trasplante de tejido más común, con alrededor de 2,2 millones de cirugías de injerto óseo realizadas anualmente en todo el mundo.<sup>36</sup> Se considera que el hueso autólogo es el material de injerto óseo preferido, específicamente el hueso cortical y esponjoso autólogo cosechado de la cresta ilíaca, porque tiene propiedades osteoconductoras, osteoinductivas y osteogénicas.<sup>37,38</sup>

Sin embargo, ha sido ampliamente documentado en la literatura que el injerto óseo autólogo no está exento de complicaciones, que incluyen pero no se limitan a las infecciones, drenaje de heridas prolongado, un aumento del dolor post operatorio, grandes hematomas, lesiones neurovasculares y el aumento de la pérdida de sangre durante la cirugía.<sup>39,40</sup>

Alternativas a los injertos óseos autólogos incluyen aloinjerto óseo, cerámica, matriz ósea desmineralizada, médula ósea autóloga e injertos compuestos.<sup>41, 42</sup> (Fig. 7)<sup>43</sup>



Fig 7. Obtención de injerto óseo autólogo.<sup>43</sup>

Los materiales osteoconductores deben tener una porosidad que permita la vascularización y provea un área de adherencia a las células osteogénicas. El tamaño del poro óptimo para que esto ocurra es entre 100 y 500  $\mu\text{m}$ , con un volumen total de poros de 75 a 80%.<sup>44</sup>

A los materiales con potencial generador de hueso se les clasifica como:<sup>45</sup>

- Extensor óseo: Este material permite utilizar una menor cantidad de injerto óseo con el mismo resultado final o de la misma cantidad de injerto de modo que cubra la mayor parte de la superficie para obtener la misma tasa de fusión final.
- Potencial óseo: Sistema que en conjunto con el injerto óseo aumenta las tasas de fusión utilizando la misma o una menor cantidad de injerto.
- Sustituto óseo: Material que se puede emplear en lugar del injerto y que obtiene tasas de fusión iguales o mejores que el injerto óseo autólogo.

## 2.2 Xenoinjertos óseos porcinos

Un área de interés para la ingeniería, es el desarrollo de materiales que contribuyan en los procesos de regeneración ósea. Estos son necesarios pues las patologías de los huesos representan una porción importante de las causas de incapacidad física sin importar las condiciones de las personas.<sup>41</sup>

Las hidroxiapatitas sintéticas (HAP) que se obtienen a partir de fosfatos di y tricálcicos mediante procesos de síntesis relativamente simples, presentan resistencia mecánica pobre. La HAP o sus precursores, se pueden encontrar de igual forma en exoesqueletos como el de la estrella de mar *Mellita sp*, en los corales marinos, en esqueletos de vertebrados, en el esmalte y dentina de los dientes, en especies de bovinos y porcinos, etc.<sup>15</sup>

Un injerto óseo adecuado debe tener excelentes propiedades pro-osteogénesis y pro-angiogénesis para realizar rápidamente la regeneración ósea *in-vivo*.<sup>34</sup> El material óseo porcino (PBM) consiste en Hidroxiapatita (HA) y partículas de colágeno de 600-1000  $\mu\text{m}$  en promedio.<sup>46</sup>

Cuando hay una reacción negativa de rechazo por parte del receptor, se debe al sistema inmune que tiene como función proteger al organismo de sustancias potencialmente nocivas, o cuerpos extraños en sangre para desencadenar este proceso. Este fenómeno se debe al reconocimiento de antígenos presentes en las células o tejidos denominadas moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).<sup>47,48</sup>

Como segunda opción se ha tomado a los cerdos, ya que es un animal de fácil reproducción, no están en vía de extinción, sus órganos, por su forma y tamaño, son muy similares a los humanos, e implica menos inconvenientes éticos en su utilización como donadores de órganos.<sup>49</sup>

Por ello, es primordial analizar las ventajas y desventajas del uso de órganos provenientes del cerdo como solución a la escasez de órganos para trasplante humano, lo que permitirá, posiblemente en un futuro, facilitar estrategias de mejoramiento de la salud humana.<sup>48</sup>

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) es una región multigénica altamente polimórfica. Sus genes, ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, están estrechamente unidos y se heredan en bloque denominado haplotipo. Las moléculas que codifica el MHC son proteínas que actúan como receptores, se encuentran en las membranas de las células de nuestro organismo, son la parte fundamental de la respuesta inmunitaria en el reconocimiento de proteínas antigénicas y en el humano se denomina a este sistema HLA (Human leukocyte antigen).<sup>50-52</sup> (Fig. 8)<sup>53</sup>

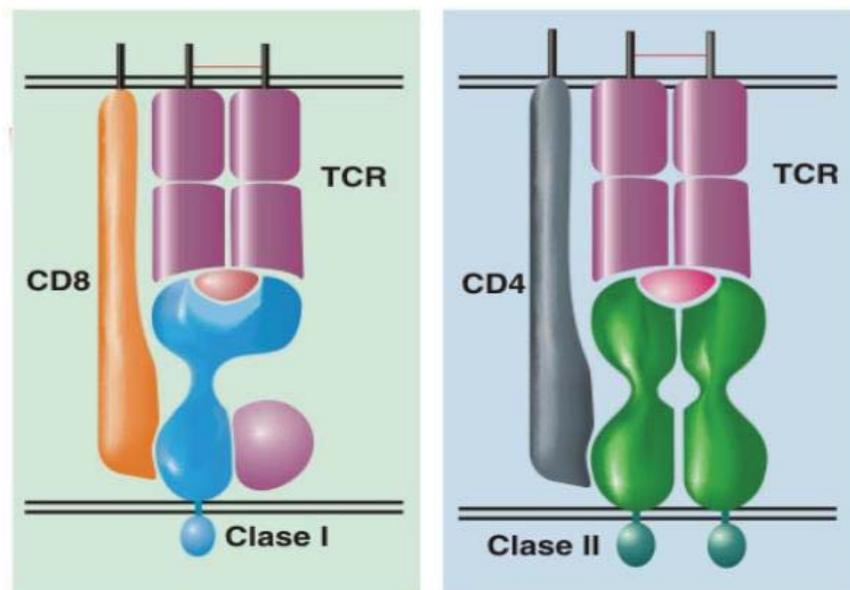


Fig. 8 Complejo Principal de Histocompatibilidad.<sup>53</sup>

## 2.2.1 Complejo Principal de Histocompatibilidad

Estas moléculas son necesarias para el reconocimiento inmunitario por parte de los linfocitos T, los cuales reconocen el antígeno para desencadenar respuesta inmune, siempre y cuando sean presentados por las moléculas del MHC. Las diversas clases del MHC originan la restricción de diversas clases de linfocitos T, es decir, los linfocitos T tienen en su superficie receptores CD8 que reconocen antígenos que son presentados por las moléculas Clase I, mientras que aquellos con receptores CD4 están restringidos por moléculas MHC Clase II. <sup>48,49</sup>

El procesamiento del antígeno por parte del MHC I consta de varias etapas:

- \_ Producción de proteínas en el citosol.
- \_ Degradación proteolítica de proteínas del citosol.
- \_ Transporte de péptidos desde el citosol al retículo endoplásmico por TAP 1 y 2.
- \_ Ensamblaje de complejos péptido-molécula de clase I en el retículo endoplásmico.
- \_ Expresión de complejos péptido-molécula clase I en la superficie celular

Otra de las funciones que cumple el MHC es el reconocimiento de los componentes del propio organismo, ya que ayuda a reconocer moléculas que no sean parte de su constitución fenotípica y genotípica, lo que permite inducir y regular la respuesta celular, siendo fundamental para el carácter genético y la diferencia, ya sea igual o de diferente especie. De este modo las especies animales también poseen MHC como sistema de reconocimiento.<sup>54</sup> (Fig. 9)<sup>55</sup>

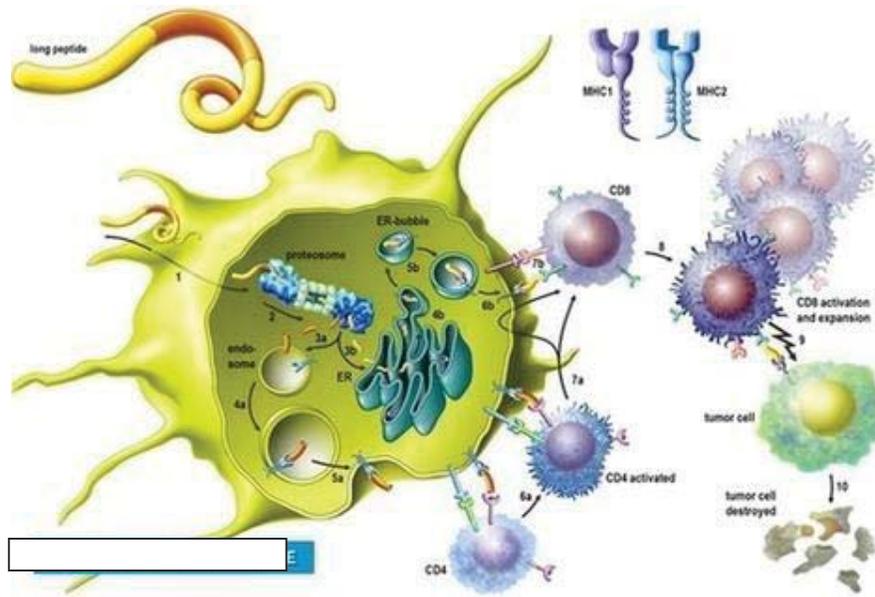


Fig. 9 Proceso del Complejo Principal de Histocompatibilidad.<sup>55</sup>

### 2.2.2 Complejo Principal de Histocompatibilidad en cerdos

El MHC en el cerdo se conoce como SLA (*Swine Leukocyte Antigen*) y en la actualidad se ha estudiado de manera comparativa con el HLA, ya que los órganos de estas dos especies cuentan con características similares como su estructura morfofisiológica y funcional, que hacen de esta especie un donador potencial en órganos xenogénicos para el ser humano.<sup>54,56</sup>

Los genes del SLA se encuentran localizados en el cromosoma 7 con alrededor de 70 genes ya caracterizados, los cuales codifican la síntesis de proteínas integradas en la membrana celular. Los genes de la clase I y III se localizan en el brazo corto, mientras que los genes clase II se localizan en el brazo largo del mismo cromosoma. La región de las moléculas Clase I contienen en su interior doce genes, de los cuales 4

son funcionales; los genes tipo II codifican para las moléculas Clase II y los genes clase III codifican para factores de complemento, situación que es similar en el humano.<sup>47,57</sup>

A nivel molecular, en relación a los antígenos de histocompatibilidad, se pueden encontrar semejanzas y diferencias las cuales favorecen en alguna medida la posibilidad de trasplantar órganos de cerdo a hombre. De acuerdo con la Tabla 1<sup>58</sup>, el funcionamiento de estas moléculas es semejante entre cerdo y humano como en el caso de la presentación de antígenos donde participan en la activación de la respuesta inmune causante del rechazo de órganos.<sup>59</sup>

Tabla 1: Cuadro comparativo entre el sistema de Histocompatibilidad de humano (HLA) y cerdo (SLA).<sup>58</sup>

HLA Moléculas clase I	SLA Moléculas clase I
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Son heterodímeros formados por una cadena pesada de 45 kd y una cadena liviana de 12kd asociada no covalentemente denominada <math>\beta</math>-2 micro globulina.</li> <li>• Se localizan en un segmento de 2.000Kb de DNA en el extremo telomérico del cromosoma 6 humano.</li> <li>• Se expresa fenotípicamente los genes HLA-A, B, C, E, G siendo este último de gran importancia en el desarrollo y maduración fetal.</li> <li>• Se encuentra en todas las células nucleadas, excepto los eritrocitos.</li> <li>• Presenta los antígenos endógenos (virus, antígenos tumorales).</li> <li>• Activa linfocitos T citotóxicos CD8+</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Están formados por heterodímeros de dos cadenas: una cadena pesada <math>\alpha</math> de 45Kd polimórfica y codificada por genes SLA y una cadena ligera <math>\beta</math> de 12Kd no polimórfica.</li> <li>• Se localiza en un segmento de 70 genes en el cromosoma No 7.</li> <li>• El fenotipo del SLA expresa 2 o 3 loci clase I, denominados, SLA-A, SLA-B y SLA-C con 7 a 10 genes diferentes.</li> <li>• Está presente en todas las células con núcleo con excepción de las neuronas trofoblastos.</li> <li>• Presenta antígenos endógenos como virus o fagos.</li> <li>• Activa linfocitos CD8+ o LT citotóxico.</li> </ul>
Moléculas Clase II	Moléculas Clase II
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Compuestos por heterodímeros glicoproteicos <math>\alpha</math> de 33Kd y <math>\beta</math> de 27Kd.</li> <li>• Se expresa fenotípicamente el locus D para HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DO.</li> <li>• Sus moléculas se expresan en la superficie de membranas de células migratorias con función de ser células presentadoras de antígeno (CPA) como los linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células epiteliales, células de Lanherhans y otras como los espermatozoides y los linfocitos T CD4.</li> <li>• Presenta antígenos exógenos.</li> <li>• Activa los linfocitos T ayudadores por medio de las CPA.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Están formados por cadenas glicoproteicas <math>\alpha</math> de 35Kd y <math>\beta</math> de 29Kd.</li> <li>• Se expresan fenotípicamente SLA-DRA, SLA-DRB, SLA-DQA, SLA-DPA, SLA-DBP.</li> <li>• Se encuentran en los linfocitos B, las células presentadoras de antígenos (CPA) y en varias subpoblaciones de LT.</li> <li>• Presenta antígenos exógenos.</li> <li>• Activa los linfocitos CD4+ por presentación del péptido antigénico por medio de las CPA.</li> </ul>

Los mecanismos de rechazo de órganos entre individuos de una misma o de diferente especie son causados por la activación de linfocitos T, que reconocen las moléculas de histocompatibilidad. Este reconocimiento puede ser directo cuando interactúa con el antígeno del aloinjerto o indirecta a través de las células presentadoras de antígeno. Una vez que los linfocitos están activos, estos provocan destrucción del tejido a través de un efecto citotóxico por los Linfocitos T CD8+, la producción de citocinas proinflamatorias o la producción de anticuerpos a partir de células plasmáticas.<sup>60</sup>

El rechazo al órgano trasplantado puede ser de tres tipos:  
\_ Rechazo hiperagudo: se caracteriza por una oclusión trombótica en las vías sanguíneas del injerto que comienza a los pocos minutos u horas al restablecer el flujo sanguíneo entre el injerto y el receptor. La reacción está mediada por anticuerpos preexistentes y la acción del complemento que ocasiona lesiones endoteliales seguido de la activación de la cascada de coagulación.

\_ Rechazo agudo: se presenta semanas después del restablecimiento del flujo sanguíneo. Esta reacción es mediada por linfocitos T y B activos, produciendo daño parenquimatoso y vascular en el injerto. Esta respuesta está dada por la inmunidad adaptativa, la cual da inicio a los mecanismos efectoros para el rechazo.

\_ Rechazo crónico: se da en un periodo prolongado de tiempo, que generalmente son años después de la cirugía. Se caracteriza por fibrosis y alteraciones vasculares causadas por reacciones inmunitarias y la síntesis de citoquinas que estimulan los fibroblastos para rechazar el órgano.<sup>48,52,54,57</sup>

### 2.2.3 Cerdos transgénicos

Para la obtención de cerdos transgénicos, uno de los posibles métodos aplicables es la internalización de DNA en los espermatozoides porcinos por medio de un vector que transporte el material genético y pueda llegar a su núcleo. Una vez modificados son inseminados artificialmente en la madre porcina para que desarrolle el embrión y exprese la proteína en la célula endotelial porcina.<sup>61</sup>

Las Gal son moléculas de superficie celular que se encuentran comúnmente en la mayoría de las especies, excepto los seres humanos y los monos debido a las mutaciones en el gen  $\alpha 1,3$ -galactosil-transferasa. Como resultado de la falta de epítopos Gal (porción de una macromolécula que es reconocida por el sistema inmunitario), los seres humanos producen una gran cantidad de anticuerpos anti-Gal debido a la exposición constante a las bacterias intestinales que llevan epítopos Gal.<sup>42</sup>

Esto es particularmente importante cuando se crean andamios biológicos descellularizados utilizando xenoinjertos para la implantación humana. Gal epítopos se han encontrado en cartílago porcino,<sup>62</sup> SIS-ECM,<sup>63</sup> y válvulas cardíacas protésicas. Konakci et al. demostraron que los pacientes que reciben válvulas cardíacas bioprotésicas porcinas tienen una respuesta inmune específica del xenoinjerto con niveles elevados de anticuerpos IgM citotóxicos dirigidos contra  $\alpha$ -Gal. Los autores especulan que esto puede contribuir a la falla del tejido en algunos pacientes.<sup>64</sup>

Se ha demostrado que el tratamiento de tejidos xenogénicos con  $\alpha$ -galactosidasa para eliminar los epítopos Gal reduce las respuestas inmunes adversas a los andamios biológicos.<sup>41,42</sup>

Los andamios biológicos alogénicos y xenogénicos descelularizados se usan comúnmente en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Sin embargo, la investigación que mira la respuesta inmune del anfitrión hacia andamios biológicos es limitada y se necesitan más estudios para mejorar la seguridad y la eficacia de los andamios biológicos descelularizados.<sup>65</sup>

## CAPÍTULO 3

### INGENIERÍA DE TEJIDOS Y DESCELULARIZACIÓN.

La ingeniería de tejidos tiene por objeto reemplazar o regenerar los tejidos u órganos humanos con el fin de restaurar su función normal. La triada de ingeniería de tejidos consta de tres factores principales que son las células, las moléculas de señalización y el andamio; todos ellos se interrelacionan y dependen uno del otro.<sup>66</sup>

Además, ofrece un enfoque revolucionario para restaurar defectos de tamaño crítico y, tradicionalmente, esto ocurre mediante biomateriales, células y productos biológicos. Los biomateriales proporcionan un sustrato tridimensional (3D) con características específicas de ingeniería para que las células se adhieran y proliferen. Para mejorar la migración y la diferenciación en el tipo de tejido requerido, los factores de crecimiento proporcionan señales esenciales de señalización para este tipo de células.<sup>34</sup>

Debido a que muchos desafíos están asociados con la preparación de andamios sintéticos que recapitulan la complejidad del microambiente celular, ha habido un interés creciente en utilizar la matriz extracelular natural (MEC). Este andamio libera la MEC de células nativas y materiales genéticos, como el ADN, manteniendo sus señales estructurales, bioquímicas y biomecánicas.<sup>67,68</sup>

El éxito de las estrategias de ingeniería de tejidos depende de la capacidad de los vasos sanguíneos para formar dentro de los andamios y suministrar nutrientes a las células trasplantadas.<sup>33</sup>

Los métodos de descelularización se han utilizado en diferentes tipos de tejidos ya sea para examinar el tratamiento en un tejido menos complejo o para crear un andamio para aplicaciones más simples. Por ejemplo, MEC adiposa se ha utilizado en la prueba de cáncer de mama en tratamientos mediante la simulación de microambientes *in-vivo*.<sup>69</sup>

La reconstrucción ósea también se ha probado usando MEC derivado del hueso para facilitar la osteogénesis o la diferenciación de las células del estroma de la médula ósea en los osteoblastos.<sup>33</sup> Los avances en esta área tienen el potencial de reducir la necesidad de injertos óseos. Del mismo modo, la descelularización del tejido del cartílago se ha realizado, como se desea para los tratamientos relacionados con la degeneración de las articulaciones, como la artritis.<sup>70</sup> Cada una de estas aplicaciones destaca los beneficios de la descelularización tisular para crear entornos *in vitro* para la prueba de fármacos y complementar la regeneración *in vivo* de tejidos.<sup>71</sup>

La complejidad de la función del órgano requiere las técnicas de descelularización y reconstrucción más extensas, que requiriere en particular el mantenimiento de la ultraestructura y vasculatura del órgano. Una variedad de órganos han sido diseñados de esta manera y posteriormente han sido probados *in vivo* a nivel de animales pequeños. En un ejemplo, la vasculatura de matrices de vejiga porcina descelularizada, resurgió usando células progenitoras epiteliales. Estos andamios sirvieron de soporte al músculo liso de la vejiga y las células uroteliales; las vejigas resultantes se implantaron con éxito durante una a tres horas en cerdos.<sup>72</sup>

Las aplicaciones clínicas de MEC descelularizada son cada vez más frecuentes; sin embargo, se han limitado a tejidos menos complejos que funcionan principalmente en funciones estructurales o reconstructivas. Varios productos aprobados en el mercado, destinados a la regeneración y reemplazo de tejidos, se derivan de la MEC descelularizada xenogénica o alogénica.<sup>70</sup>

Mientras que los estudios clínicos a largo plazo que usan MEC descelularizada como andamios son mínimos, estos resultados muestran su promesa en el desarrollo de tratamientos más accesibles para una variedad de aplicaciones.<sup>65</sup>

Mediante la optimización del proceso de descelularización, pueden utilizarse tejidos y órganos derivados de seres humanos y animales, minimizando así la especificidad de donante-paciente necesaria para asegurar trasplantes compatibles.<sup>68</sup>

En la mayoría de los tejidos, las células están incrustadas dentro de una MEC densa lo que dificulta la eliminación completa del material celular. De hecho, el material de andamio más comercialmente disponibles descelularizado biológico, tal como Restaurar™, GRAFTJACKET™, y TissueMend™, contiene trazas de DNA remanente que están a menos de 300 pb de longitud.<sup>73,74</sup> Aunque la mayoría de los andamios biológicos comercialmente disponibles contienen restos de ADN, la eficacia clínica de estos andamios ha sido en gran medida positiva.<sup>75</sup> Por lo tanto, la pequeña cantidad de ADN que queda puede no ser suficiente para provocar una respuesta inmune o afectar negativamente al proceso de remodelación. Puede haber una cantidad de umbral de material celular que se requiera para desencadenar una respuesta inmune severa, y se necesitan estudios adicionales para determinar este umbral.<sup>74</sup>

### **3.1 Andamios óseos**

Los andamios obtenidos para la ingeniería tisular, deben imitar las características esenciales de la matriz extracelular tales como composición, porosidad adecuada, vasculatura que permita el flujo de nutrientes a las células y la residencia de proteínas de señalización.<sup>76</sup>

En el andamio, el conjunto de moléculas de señalización integradas, proporciona señales estructurales, bioquímicas y biomecánicas para guiar y regular el comportamiento celular y el desarrollo de los tejidos. Los andamios pueden ser generados a través de diversos métodos y materiales; ya sean sintéticos o naturales. Los andamios sintéticos tienen la cualidad de que sus propiedades mecánicas como la rigidez de la

matriz y topografía clave en la diferenciación celular pueden manipularse y controlarse con el fin de reproducir un entorno óptimo para la célula o el conjunto de ellas.<sup>77</sup> Estos andamios pretenden sustituir la MEC, la cual es secretada por las células, por lo cual deberán permitir la migración, proliferación y la diferenciación celular.<sup>77,78.</sup>

## **3.2 Métodos de descelularización**

La descelularización se ha llevado a cabo mediante métodos químicos, físicos o combinados. Se han utilizado varios tipos de productos químicos en la descelularización como los tensoactivos, ácidos y bases. Los tensoactivos son los agentes más comunes para llevar a cabo el proceso de descelularización; causan la lisis celular desorganizando la membrana fosfolipídica.<sup>78</sup>

### **3.2.1 Tensoactivos**

El dodecilsulfato sódico (SDS), surfactante ampliamente utilizado ha tenido éxito en su aplicación para la descelularización gracias a su capacidad por eliminar eficazmente las células y el material genético. Algunos tratamientos con SDS, han cumplido con los requisitos estándar de eliminación celular completa y por lo menos el 90% del ADN del huésped en diversos tejidos y órganos, incluyendo la córnea porcina<sup>79</sup>, el miocardio porcino<sup>80</sup> válvula cardíaca porcina,<sup>81</sup> Intestino delgado porcino,<sup>82</sup> vena humana<sup>83</sup> y corazón humano.<sup>84</sup>

Aunque el SDS puede eliminar con éxito los componentes nativos no deseados del tejido, puede dañar las proteínas estructurales y de señalización. Por ejemplo, el colágeno en las válvulas cardíacas tratadas con SDS se compactó.<sup>85</sup> y la MEC descelularizada de los pulmones humanos y porcinos apareció más fibroso que la estructura del tejido nativo liso.<sup>86</sup> También se han presentado estructuras fibrosas de los

corazones humanos descelularizados usando SDS; sin embargo, no se vió afectada, las propiedades anisotrópicas que asemejaban a las del miocardio nativo.<sup>87</sup>

Las proteínas y componentes estructurales dañinos, no sólo pueden impedir que las células habiten en el tejido como antes, sino que también impide la retención completa de sus propiedades mecánicas. Este resultado es particularmente prevalente en tejidos más delgados y en láminas celulares. Después de tratarse con una solución de SDS al 0,5% en peso, las láminas de células de fibroblastos mostraron una disminución del 80% del módulo de elasticidad.<sup>88</sup> A medida que aumentaba la concentración de SDS, los módulos elásticos y viscosos disminuían, lo que indicaba la naturaleza dañina de la SDS. En el caso del miocardio porcino descelularizado, el tejido se volvió más rígido, ya que la resistencia a la tracción fue veinte veces mayor que el tejido nativo.<sup>89</sup>

Sin embargo, debido a que el colágeno tipo IV se mantuvo, el tejido mostró extensibilidad, una propiedad crítica para su función deseada como parche cardíaco. El Duodecil sulfato de sodio (SDS) es también citotóxico; por lo tanto, es imprescindible que el tejido se lave a fondo para asegurar la viabilidad de las células.<sup>90</sup>

Mientras que la mayoría de los tejidos tratados con surfactante se deben lavar típicamente con soluciones como solución salina tamponada con fosfato (PBS), el SDS es más difícil de eliminar debido a su naturaleza iónica. El procedimiento de lavado extensivo requerido después del tratamiento es otra desventaja de la SDS como un agente descelularizante.<sup>91,92</sup>

El tensoactivo no iónico Triton X-100 se utiliza frecuentemente para eliminar el SDS remanente. Esta práctica ha sido especialmente prevalente en la descelularización de perfusión de órganos enteros<sup>93-96</sup>

No sólo Triton X-100 es beneficioso en el proceso de lavado, sino que también se utiliza comúnmente como agente descelularizante solo. Como es no iónico, es menos duro que el SDS y, en última instancia, menos perjudicial para la integridad estructural del tejido. Conjuntamente con el hidróxido de amonio, se eliminó completamente todo el ADN y mantuvo una mayor cantidad de colágeno I en comparación con los tratamientos con SDS.<sup>97</sup> Además, la ultraestructura del tejido y las propiedades mecánicas se conservaron bien después del proceso de descelularización.<sup>98</sup>

El desoxicolato de sodio (DS) es otro tensoactivo iónico que funciona mediante la solubilización de la membrana celular. A diferencia del SDS, DS producía andamios que eran altamente biocompatibles, ya que las células sembradas en las matrices descelularizadas DS exhibían mayor actividad metabólica en comparación con las descelularizadas vía SDS.<sup>99</sup>

### **3.2.2 Ácidos y bases**

Los protocolos que contienen ácido y base utilizan agentes como el ácido peracético y técnicas como la “hinchazón alcalina reversible”. El ácido peracético es un oxidante altamente corrosivo y fuerte usado a menudo para la desinfección en la industria alimenticia. Los tejidos más delgados, como la submucosa del intestino delgado (SIS)<sup>99</sup> y la vejiga urinaria<sup>100</sup> han sido tratados con ácido peracético como agente descelularizante. Aunque se demostró que el SIS era biocompatible después del tratamiento, las células no se eliminaron por completo.<sup>99</sup>

### 3.2.3 Por acción enzimática

Al igual que el uso de la DNasa I para prevenir la aglutinación del ADN en los tratamientos DS, se han utilizado otros tipos de enzimas en los protocolos de descelularización para complementar las propiedades de los productos químicos. Por ejemplo, Triton X-100 y DS se utilizaron en combinación con DNasa en la descelularización de pulmones humanos normales y enfisematosos<sup>97</sup> y válvulas cardíacas porcinas<sup>100</sup> con el fin de romper los fragmentos de ADN remanentes con el fin de limitar la inmunogenicidad potencial *in-vivo*. Se utilizó un abordaje de perfusión e inmersión en el tratamiento pulmonar.<sup>97</sup> Se mantuvieron los colágenos tipo I y IV, fibronectina y laminina; sin embargo, el contenido de GAG fue significativamente menor después del tratamiento.<sup>99</sup>

Otro tratamiento detergente-enzimático que implica el uso de una solución SDS / DS y endonucleasa para la descelularización de la arteria carótida equina destacó las posibles complicaciones que pueden surgir con andamios xenogénicos. Aunque no se observaron núcleos visibles y el ADN se redujo significativamente después del tratamiento, permanecieron varias proteínas activadoras de anticuerpos. La presencia de estos factores distintivos indicaba que no se reducía la inmunogenicidad del andamio y, por tanto, se producía una matriz mayormente compatible.<sup>97</sup>

Otro protocolo multietapa utilizó tripsina / ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), SDS, Triton X-100, ácido peracético / etanol, y DNasa para descelularizar el músculo recto del abdomen porcino.<sup>99</sup> Las células y el ADN se eliminaron suficientemente y se mantuvo la laminina, colágeno tipo IV y fibronectina después del tratamiento. Además, el músculo descelularizado mostró fuerza mecánica similar al músculo nativo. La ultraestructura, la vasculatura y los canales neurales también estaban intactos.<sup>97</sup>

La tripsina es una enzima comúnmente usada con EDTA que trabaja rompiendo las adherencias de la matriz de la célula. Utilizado en el tratamiento de las válvulas pulmonares porcinas, se observó remoción completa de células y material genético después de 24 horas.<sup>98</sup> A tiempos de tratamiento más cortos, particularmente a las ocho horas, la eliminación celular fue incompleta. Sin embargo, un tiempo de tratamiento más prolongado condujo a una disminución del contenido de GAG, colágeno y elastina, posteriormente, resistencia mecánica. Además, debido a las propiedades de la tripsina / EDTA, los colágenos solubles en sal y ácido se conservaron mal.<sup>100</sup>

### **3.2.4 Medios mecánicos**

Aunque los enfoques químicos y enzimáticos son los métodos de descelularización más ampliamente aplicados, existen preocupaciones con respecto a la posible toxicidad de los productos químicos y la destrucción de las proteínas ECM. Por lo tanto, se están desarrollando otros métodos que pueden descelularizar físicamente o mecánicamente los MECs. Estos métodos incluyen tratamientos de temperatura y presión que trabajan para eliminar las células a través de una combinación de lisar las células y destruir las proteínas adhesivas de la matriz celular. En particular, los tratamientos físicos incluyen el uso de congelación-descongelación, alta presión hidrostática, o dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>) para eliminar completamente las células constituyentes de un tejido y los materiales genéticos. Aunque cada método específico es único, cada protocolo de descelularización mecánica implica un proceso de lavado para eliminar cualquier desecho celular que pueda quedar. En muchos casos, la etapa de lavado es crítica para determinar la eficacia del procedimiento.<sup>97,98,100</sup>

### **3.2.4.1 Temperatura**

La congelación y descongelación de tejidos lisa, y posteriormente elimina, las células para producir una matriz descelularizada. Los procedimientos de congelación-descongelación implican a menudo alternar entre temperaturas de congelación alrededor de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y temperaturas biológicas alrededor de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los procedimientos de congelación-descongelación son beneficiosos en su retención de componentes bioquímicos y propiedades biomecánicas, pueden conducir potencialmente a la generación de respuestas inmunitarias indeseables debido a la eliminación insuficiente de materiales genéticos.<sup>97,98,100</sup>

### **3.2.4.2 Alta presión hidrostática**

La alta presión hidrostática (HHP) se ha convertido en un método cada vez más frecuente que aplica presiones mayores de 600 MPa para destruir las membranas celulares. En un estudio, las córneas porcinas se descelularizaron utilizando HHP a 980 MPa durante 10 minutos a 10 o  $30^{\circ}\text{C}$ . El mismo procedimiento también se llevó a cabo en los vasos sanguíneos porcinos. En ambos tejidos, el tratamiento a alta presión destruyó las células, pero dejó restos de ADN. Además, se demostró que la alta presión desnaturalizaba las proteínas MEC, como se observa en la deformación de las fibras de colágeno y elastina en los vasos sanguíneos descelularizados y, en consecuencia, la disminución de la resistencia a la tracción final en aproximadamente el 50%<sup>72,97</sup>

### **3.2.4.3 Dióxido de carbono supercrítico**

Con las propiedades de transporte únicas, es decir, una densidad líquida y una difusividad similar a un gas, los fluidos supercríticos se han utilizado en aplicaciones de extracción en la industria.<sup>74</sup> En particular,  $\text{CO}_2$  supercrítico tiene una temperatura de  $31.1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y una presión crítica de

7,40 MPa, biológicamente permisivo. Por lo tanto, CO<sub>2</sub> supercrítico se ha utilizado en la descelularización de tejido aórtico, donde el tejido se trató a 15 MPa y 37 ° C.<sup>62</sup> Además, debido a la difusividad de CO<sub>2</sub>, el disolvente puede liberarse rápidamente y no permanece dentro del tejido, que impide la necesidad de procedimientos de lavado extensos usualmente requeridos para los procesos que implican tensoactivos. Debido a que el CO<sub>2</sub> es no polar, se añadió etanol como agente de arrastre para eliminar las membranas celulares de fosfolípidos polares. Esta adición resultó eficaz, ya que ni el núcleo celular ni la membrana permanecieron en el tejido después del tratamiento.<sup>101</sup>

### **3.2.5 Métodos combinados**

Debido a que cada técnica mencionada tiene sus ventajas y desventajas, se han combinado varias técnicas para complementarse entre sí con el objetivo de retener las características deseadas en el tejido manipulado. Por ejemplo, los métodos mecánicos son típicamente menos dañinos para la estructura del tejido; sin embargo, no cumplen con los requisitos de inmunogenicidad. Por otra parte, los tensoactivos a bajas concentraciones o enzimas utilizados solos no pueden eliminar completamente todos los desechos celulares.<sup>65,71</sup>

Sin embargo también se ha encontrado que los beneficios obtenidos de los tejidos y órganos que han sido sometidos a la combinación de métodos de descelularización, especialmente los que tienen mayor grosor, presentan alteraciones en su estructura; ya que al hacerlos más porosos para un repoblamiento celular más eficaz, estructuralmente las fibras de colágeno quedan menos resistentes en comparación a las fibras obtenidas en la estructura de métodos por separado. Sus componentes celulares y de ADN son removidos más eficazmente, pero esto es una contraparte de lo que representa estructuralmente el tejido.<sup>65</sup>

### **3.3 Evaluación de la descelularización**

La reducción de la inmunogenicidad del andamio es uno de los requisitos más críticos de la descelularización. Este aspecto particular ha sido crucial en la prevención del uso de MEC descelularizada como andamios en aplicaciones clínicas. Alternativas que pueden utilizarse son los andamios xenogénicos, ya que son muy abundantes y por lo tanto tienen el potencial de ser fabricados. Si su inmunogenicidad no está suficientemente reducida, pueden ser rechazadas *in-vivo*, dando lugar a un fallo funcional y a la necesidad de reemplazo o eliminación inmediatos. Los dos componentes capaces de inducir una respuesta inmunogénica incluyen materiales genéticos remanentes tales como ADN y ARN y antígenos.

Los antígenos nativos también deben ser reducidos en los andamios para prevenir la respuesta inmune. El rechazo hiperagudo de los andamios, que ocurre poco después de la implantación y causado por los anticuerpos circulantes dentro del huésped, y el rechazo inmune agudo, que ocurren días a semanas después de la implantación, son de particular preocupación.<sup>71</sup>

#### **3.3.1 Propiedades mecánicas**

Las propiedades primarias de interés incluyen el módulo de elasticidad, el módulo viscoso, la resistencia a la tracción y la elasticidad; sin embargo, las propiedades más importantes dependen en última instancia de la naturaleza de la función deseada del tejido u órgano. Estas propiedades se rigen principalmente por las proteínas estructurales MEC, colágeno, laminina, fibronectina y elastina.<sup>71</sup>

La cantidad de tiempo que el tejido se expone al agente descelularizante también juega un papel importante en dañar las proteínas estructurales. En particular, las válvulas pulmonares porcinas tratadas con

EDTA y tripsina mostraron una disminución de la resistencia mecánica a tiempos de tratamiento más largos, que eran necesarios para la eliminación completa de células.<sup>101</sup> Este efecto es probablemente un resultado de los cambios en el contenido de colágeno y la orientación de las fibras, como EDTA se ha demostrado que disminuyen sal y ácido soluble en colágenos.<sup>74, 101</sup>

## CAPÍTULO 4

### TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA

La tomografía es un método de diagnóstico radiográfico por medio de imágenes que nos otorga la obtención de las mismas en planos transversales del cuerpo, brindando planos y secciones de tejidos y órganos principalmente. La técnica tomográfica busca dar la información que comúnmente analizamos en la radiografía convencional, además de poder distinguir tejidos blandos, eliminar interferencias en el análisis por la superposición de estructuras y cuantificar la densidad de los tejidos.<sup>102</sup> (Fig.10)<sup>103</sup>

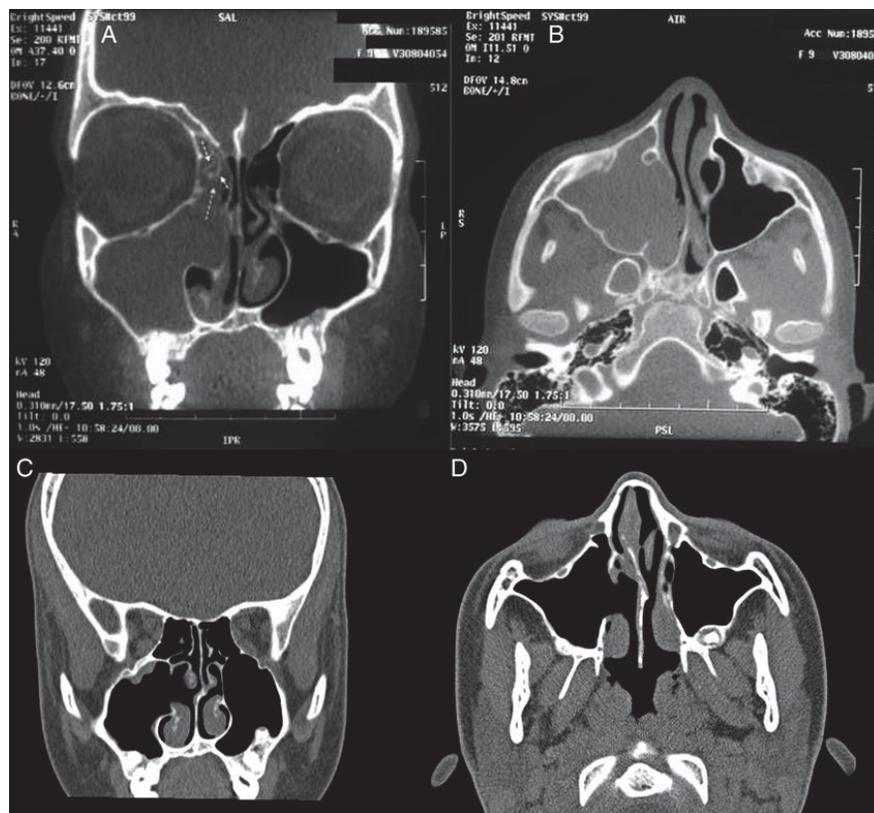


Fig. 10 Tomografía computarizada coronal y axial<sup>103</sup>

La adquisición de imágenes a mayor velocidad, y por ende con mejor resolución temporal, ha sido una de las motivaciones más significativas que ha guiado el progreso de la tomografía computarizada. Esto se refleja no sólo con el desarrollo de la tomografía helicoidal y la rápida aceptación que esta técnica tuvo, sino también con la tomografía de múltiples detectores MDCT.<sup>104</sup>

La tomografía computarizada de rayos X ha tenido un refloreCIMIENTO en los últimos años, evidenciado en múltiples avances científicos y tecnológicos. Resulta interesante notar que los avances de esta técnica, han estado marcados por cuatro parámetros comunes: la constante búsqueda de una mayor velocidad de adquisición (resolución temporal), aumentar la resolución espacial, mejorar la calidad de la imagen, y minimizar las dosis de radiación ionizante. Mejoras en cada uno de los componentes del escáner (p. ej. detectores o fuentes de rayos X), cambios novedosos en su geometría, o la utilización de elaboradas técnicas de reconstrucción de la imagen, aportan significativamente a la mejora de cada uno de los parámetros expuestos, si bien estos siempre guardan un compromiso con las dosis de radiación.<sup>102,104.</sup>

La radiación ionizante es el parámetro clave que limita el uso de la tomografía computarizada; y, dado el riesgo que genera, es de suma importancia un uso responsable de la misma. Especial cuidado debe tenerse en pacientes pediátricos, para evitar exposiciones altas e innecesarias, lo que implica que las instituciones prestadoras de servicios de salud están obligadas a implementar protocolos de adquisición específicos para estos pacientes. Es deseable utilizar técnicas complementarias (p. ej. ultrasonido o resonancia magnética) cuando éstas estén disponibles y puedan brindar un diagnóstico idéntico para una medicina personalizada.<sup>105</sup>

## CAPÍTULO 5

### IMPRESIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS

Uno de las tecnologías recientes en el diseño es la impresión 3D para materializar diseños virtuales creados a través de un programa de CAD (Computer-Aided Design).

El uso de las impresoras 3D en diversos campos ha traído consigo una gran importancia y utilidad; uno de estos campos es la medicina, ya que en todo el mundo hay más de mil millones de personas que conviven con alguna deficiencia. Entre estas, cerca de 200 millones presentan problemas funcionales por lo cual se busca compensar dichas ausencias o disfunciones. En busca de tales problemáticas se plantean prototipos que a su vez, servirán de apoyo en el área de la medicina con la ayuda de métodos quirúrgicos o la fabricación de prótesis.<sup>106</sup>

Las tecnologías de impresión 3D están basadas en denominadas “Tecnologías de procesos aditivos”, lo cual se refiere a la creación de un objeto mediante la secuencia de diversas capas.<sup>107</sup>

Una impresora 3D es un dispositivo que es capaz de generar un objeto sólido tridimensional mediante la adición de un material previo. Los métodos de producción tradicionales son sustitutivos, ya que se generan formas deseadas a través de la eliminación de excedentes de material con un modelo digital previo cargado en el software de lo que se desea obtener siempre y cuando se cuente con la cantidad necesaria de material para el tamaño y forma que se desea materializar. La bioimpresión 3D está siendo aplicada en la medicina regenerativa para hacer frente a la necesidad de tejidos y órganos para trasplante. En comparación con la impresión no biológica, la bioimpresión 3D implica complejidades adicionales, tales como la elección de materiales, tipos de células, factores de crecimiento y diferenciación, y desafíos técnicos relacionados con la sensibilidad de las células vivas y la construcción de tejidos.<sup>108</sup>

Esto ya se ha llevado a cabo, pues médicos del Hospital Universitario de Utrecht, en Holanda, implantaron por primera vez en el mundo, un cráneo completo realizado mediante impresión en 3 dimensiones a una mujer de 22 años, quien padecía de una enfermedad de los huesos que comprimía su cerebro.<sup>109</sup>

## 5.1 Clasificación de las impresiones 3D

Actualmente la impresión 3D tiene 3 tipos de variantes que se mencionan a continuación:

- Por compactación, en la cual se compacta una masa de polvo con algún medio como hidrogeles para crear estratos.
- Por adición o inyección de polímeros, en la que el propio material se va añadiendo en capas (Fig. 11).<sup>110</sup>
- Por estereolitografía en donde un láser ultravioleta solidifica una resina líquida fotosensible por estratos en un patrón tomográfico.<sup>107</sup>

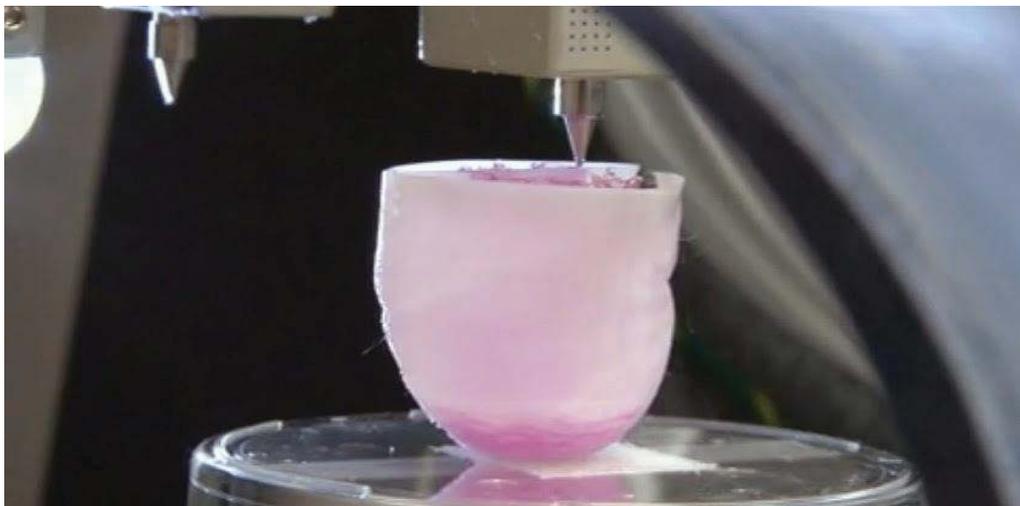


Fig. 11 Impresión 3D por adición<sup>110</sup>

## **5.2 Biomateriales**

Se entiende por biomaterial como “Un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” según la Segunda conferencia para el consenso de definiciones de biomateriales, que tuvo lugar en el Reino Unido en 1992 (Gil 2008).

Existen distintos tipos de biomateriales; de origen orgánico, cerámicos, polímeros, metálicos, compuestos, entre otros.<sup>104</sup>

## **5.3 Propiedades de los andamios en general**

Los biomateriales requieren de ciertas características para considerarse idóneos en su interacción con el ser vivo receptor como:

**Biocompatibilidad:** Los materiales deben integrarse al organismo del hospedero sin que haya efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune.

**Resistencia y compatibilidad mecánica:** Los materiales deben resistir las fuerzas de compresión y cargas mecánicas según la posición del tejido que reemplaza. Deberá poseer módulo de elasticidad óptimo, resistencia a la tracción, fractura y fatiga, porcentaje de elongación, etc.

**Biodegradabilidad:** Los materiales deben degradarse (mediante hidrólisis) a tasas que sean lo más cercanas posibles a las tasas de formación de nuevo hueso; esto para evitar que haya productos de degradación tóxicos para el organismo receptor.

**Osteoconductividad:** Los materiales deben actuar como un soporte estructural ante la formación y crecimiento de nuevo hueso. Dicha propiedad entra en conjunto con la biodegradabilidad pues el material colocado debe ser reabsorbido para dar espacio al nuevo tejido que inicialmente ayudó a soportar.

Osteoinductividad: Los materiales deben promover la fijación de células específicas del tejido óseo. Esto se consigue al reclutar células madre mesenquimales y osteoprogenitoras para que posteriormente proliferen y se diferencien hasta la línea osteogénica.

Radiolucidez: Los materiales deben poseer radiopacidad para diferenciarse del tejido donde se colocó.<sup>111</sup>

### **5.3.1 Hidroxiapatita**

La hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  es un biocristal formado por iones calcio, fosfato e hidroxilo.<sup>15</sup> Contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales forman parte crucial en la función remodeladora del hueso.<sup>112</sup>

La obtención de hueso para injerto ya sea del propio paciente o de cadáver o de animal para la sustitución de hueso perdido o enfermo, implica diversas problemáticas de orden médicos, técnicos y legales, por lo que el surgimiento de HAP sintética ha sido favorable ante estas problemáticas; Sin embargo debemos considerar la reabsorción del material y el elevado costo en su producción.<sup>111,112</sup>

### **5.4 Impresión de polvo de hueso en máquinas 2D y 3D**

La técnica para llevar a cabo la impresión de polvo, como se menciona anteriormente, es la compactación, que a su vez se divide en tres tipos:

a) Impresoras 3D de Láser: El láser transfiere energía al polvo haciendo que este se polimerice; posteriormente se sumerge en un líquido que hace que las zonas polimerizadas se solidifiquen. Una vez impresas todas las capas sólo hay que sacar la pieza. Se eliminan los excedentes del polvo, que podrá utilizarse en futuras impresiones.

b) Impresoras 3D de Tinta: Siguiendo el mismo proceso de la impresión con láser, el polvo composite utilizado puede ser a base de escayola o celulosa. El resultado es sumamente frágil, por lo que conviene sumergir la pieza a una base de cianocrilato o pexis para darle la dureza necesaria. La ventaja es que éste método es el más rápido y económico, sin embargo las piezas obtenidas son más frágiles.

c) Impresión por adición: En este sistema, se crean los objetos suponiendo capas de abajo hacia arriba. Para cada capa, la impresora va desplazándose sobre el plano para soltar el plástico sobre las coordenadas adecuadas, dado así la figura tridimensional.

La impresora es básicamente una máquina de control numérico (CNC) de tres ejes y un extruder. El extruder es el componente que calienta y presiona el cable de plástico (lo que se identificaría como la tinta) para que salga en forma de hilo fino y quede con la forma deseada.

El tipo de tinta en estas impresoras, generalmente es plástico. Hay varios tipos de materiales que se pueden emplear; en realidad cualquiera que conserve su estructura sólida a temperatura ambiente pero que se pueda extruir con relativa facilidad a temperaturas no muy altas para utilizarse como tinta en estas impresiones. (Fig.12)<sup>113</sup>

El hueso descelularizado ha sido ampliamente utilizado como un andamio para la ingeniería del tejido óseo debido a su estructura tridimensional (3D) y su similitud con la matriz ósea nativa, así como sus propiedades osteoinductivas y biomecánicas. Varios andamios 3D hechos de polímeros sintéticos, metales y cerámica han demostrado promover la diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimatosas (MSC) y las células madre embrionarias (ESC) <sup>114, 115</sup>.



Fig. 12 Impresión 3D<sup>113</sup>

## CONCLUSIONES

1. Las técnicas de descelularización nos ofrecen la innovación para la medicina restaurativa actual y futura, ya que se pueden manipular o eliminar los componentes celulares y genéticos del donador para lograr la regeneración y repoblación del tejido óseo dañado o perdido.
2. La Medicina Regenerativa ha interpretado la forma de conducir células indiferenciadas a diferenciadas para obtener los tejidos u órganos a sustituir. Tal es el caso del sistema óseo.
3. La Ingeniería de Tejidos es un área multidisciplinaria cuyo propósito es la restauración, el mantener, mejorar y sustituir los tejidos dañados o perdidos que incluye la formación total o parcial de los órganos.
4. Tanto las técnicas de descelularización como la Ingeniería de Tejidos ofrecen a la ciencia biomédica restaurativa aplicaciones que pueden significar la base de sustitución de trasplantes heterólogos.
5. El ganado porcino comparte características inmunológicas con el ser humano. Estos animales son de fácil crianza, se pueden someter a investigaciones prácticas y rigurosas para obtener xenoinjertos funcionales óseos en los que puedan aplicarse las técnicas de descelularización.
6. La descelularización realizada en los tejidos u órganos del ganado porcino brindan opciones de obtención de sustitutos que puedan ser aplicados en el ser humano a partir de estos animales.
7. La impresión 3D ofrece perspectivas que resultarían en andamios de configuración y tamaño exactos, auxiliado mediante la Tomografía Computarizada para su uso como sustitutos en el ser humano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McConnell Thomas H., L. Hull Kerry. El cuerpo humano, forma y función. Fundamentos de Anatomía y Fisiología. 1ª ed. Wolters Kluwer Editorial. Barcelona 2012. P.p 166-180.
2. Tórtora Gerard J. Derrickson Bryan. Principios de Anatomía y Fisiología. 13ª ed. Editorial Médica Panamericana. 2013. P.p. 182-201
3. Pocock Gillian, Richards Christopher D. Fisiología Humana. La base de la Medicina. 2a ed. Editorial MASSON. Londres 2005. P.p. 556-560
4. Lafita J. Fisiología y Fisiopatología Ósea. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2003;26 (3):7-15.
5. Riancho J. Factores Reguladores de la Resorción Ósea. Revista Metabolismo Óseo y Mineral. 2003. P.p. 51-60.
6. Fig. 1 Componentes anatómicos de los huesos largos:  
<https://www.emaze.com/@ALWOICOC/tejidooseo>
7. Fig. 2 Componentes del hueso.  
<http://cicatrizulisesflores.blogspot.mx/2015/09/cicatrizacion-de-tejidos-blandos-y.html>.
8. Fig 3. Clasificación de los huesos:  
<http://gavetasdemiescritorio.blogspot.mx/2013/03/clasificacion-de-los-huesos-del.html>.
9. Fig 4. Características microscópicas del hueso compacto:  
<https://retalesdeciencia.wordpress.com/2013/10/28/que-son-las-osteonas/>
10. Fig 5. Trabeculado del hueso esponjoso:  
<https://sites.google.com/site/diagradiologico/densitometria-osea>.
11. Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE Composición de la matriz y mecánica de los andamios pulmonares descelularizados. *Células Tejidos Órganos* . 2012; P.p. 222 - 231. doi: 10.1159 / 000324896. [ PubMed ].
12. Ott HC, Matthiesen TS, Goh S.K., et al. Perfusión-matriz decelularizada: utilizando la plataforma de la naturaleza para diseñar un corazón bioartificial. *Naturaleza Medicina* . 2008; 14 (2): 213 - 221. doi: 10.1038 / nm1684. [ PubMed ].
13. Robertson MJ, Dries-Devlin JL, Kren SM, Burchfield JS, Taylor DA Optimización de la recelularización de la matriz extracelular del corazón

- descelularizado entero. *PLoS UNO* . 2014; 9 (2) doi: 10.1371 / journal.pone.0090406. e90406 [ PubMed ]
14. W. Cheng Christina, Solorio Loran D. Alsberg Eben. Decellularized Tissue and Cell-Derived Extracellular Matrices as Scaffolds for Orthopaedic Tissue Engineering. *Biotechnol Adv.* 2014 Mar-Apr; 32 (2): 462-484.
  15. García-Garduño, Margarita Victoria, Reyes-Gasga, José, La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas [en línea]* 2006, 9 (Diciembre-Sin mes)
  16. Zavan, B, Giorgi, C., Bagnara G., Vindigni, V., Abatangelo, G., Cortivo, R. Diferenciación osteogénica y condrogénica: Comparación de células madre mesenquimales de médula ósea humana y de rata cultivadas en andamios poliméricos. *EUR. J. Histochem.* 2007 , 51 , 1-8. [ PubMed ]
  17. Ceradini, DJ; Gurtner, GC Haciendo referencia a la hipoxia: HIF-1 como mediador del reclutamiento de células progenitoras en el tejido lesionado. *Tendencias Cardiovasc. Medicina.* 2005, 15, 57-63[ CrossRef ] [PubMed]
  18. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.* 1978; 150–162. [PubMed]
  19. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury.* 2005;36(Suppl):S5–S7. [PubMed]
  20. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005;19(Suppl):S4–S6. [PubMed]
  21. Bressan, E., Carraro, A., Ferroni, L., Gardin, C., Sbricoli, L., Guazzo, R., Stellini, E., Roman, M., Pinton, P., Sivoletta, S., et al. Nanotecnología para impulsar el compromiso de las células madre. *Nanomedicine* 2013 , 8 , 469 - 488[ PubMed ].
  22. Sivoletta, S .; Brunello, G .; Ferroni, L .; Berengo, M .; Meneghello, R .; Savio, G .; Piattelli, A .; Gardin, C .; Zavan, B. Una nueva técnica in vitro para evaluar la osteointegración de implantes dentales. *Tejido Eng. Parte C Métodos* 2015 [ PubMed ]
  23. Fig. 6 Proceso de remodelado óseo.  
<http://cicatrizulisesflores.blogspot.mx/2015/09/cicatrizacion-de-tejidos-blandos-y.html>

24. Felice, P.; Barausse, C.; Barone, A.; Zucchelli, G.; Piattelli, M.; Pistilli, R.; Ippolito, DR; Simion, M. Técnica de aumento interposicional en el tratamiento de las atrofas mandibulares posteriores: estudio retrospectivo que comparó 129 bloques óseos autógenos y heterólogos con seguimiento de 2 a 7 años. *Int. J. Restaurador de Periodoncia. Mella.* 2017 , 37 , 469 - 480. [ PubMed ]
25. Felice, P.; Zucchelli, G.; Cannizzaro, G.; Barausse, C.; Diazi, M.; Trullenque-Eriksson, A.; Esposito, M. Implantes simples posteriores a la extracción inmediata, de retraso inmediato (6 semanas) y tardía (4 meses): datos de 4 meses después de la carga de un ensayo controlado aleatorio. *EUR. J. Oral Implantol.* 2016 , 9 , 233 - 247.
26. Felice, P.; Pistilli, R.; Piattelli, M.; Soardi, E.; Corvino, V.; Esposito, M. Mandíbulas atróficas posteriores rehabilitadas con prótesis soportadas por implantes de 5 × 5 mm con una nueva superficie de titanio incorporada al calcio nanoestructurada o por implantes más largos en hueso aumentado. Resultados preliminares de un ensayo controlado aleatorio. *EUR. J. Oral Implantol.* 2017 , 5 , 149 - 161.
27. Covani, U.; Marconcini, S.; Crespi, R.; Barone, A. Colocación inmediata del implante después de la extracción de un implante fallido: Un caso clínico e histológico. *J. Oral Implantol.* 2009 , 35 , 189 - 195. [ PubMed ]
28. Covani, U.; Cornelini, R.; Barone, A. Aumento óseo bucal alrededor de implantes inmediatos con y sin elevación de colgajo: Un enfoque modificado. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2008. 841 – 846. [ PubMed ]
29. Barone, A; Menchini Fabris, GB; Derchi, G.; Marconcini, S.; Covani, U. Extra digitalización oral digital y superposición de imágenes para el análisis de volumen de remodelado óseo después de la extracción dental con y sin dos tipos de inserción de minerales porcinos en partículas: Un ensayo controlado aleatorio. *Clin. Implante Dent. Relat. Res.* 2017 , 19 , 750 - 759.
30. Barone, A.; Marconcini, S.; Derchi, G.; Marchionni, S.; Covani, U. Resultado estético de implantes colocados en tomas de extracción frescas por clínicos con o sin experiencia: Una evaluación retrospectiva de mediano plazo. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 2016. 1397 - 1406. [ PubMed ].

31. Barone, A.; Dar propina.; Menchini Fabris, GB; Marchionni, S.; Covani, U. Cambios volumétricos tempranos después del aumento vertical de la mandíbula atrófica posterior con injerto de bloque interposicional versus injerto óseo onlay: Estudio radiológico retrospectivo. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* 2017 , 9 , 1438 – 1447. [ PubMed ]
32. Crespi, R.; Capparé, P.; Gherlone, E. Implantes dentales colocados en sitios de extracción injertados con diferentes sustitutos óseos: Evaluación radiográfica a los 24 meses. *J. Periodontol.* 2009, 1616 - 1621. [PubMed]
33. Scarano, A.; Piattelli, A.; Assenza, B. El hueso porcino utilizado en procedimientos de aumento de senos: Una evaluación clínica retrospectiva de 5 años. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2010 , 68 , 1869-1873. [ PubMed ].
34. Mijiritsky Eitan, Ferroni Letizia, Gardin Chiara, Bressan Eriberto. Porcine Bone Scaffolds Adsorb Growth Factors Secreted by MSCs and Improve Bone Tissue Repair. *Materials* 2017, 10 (9), 1054.
35. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995;3:1–8.[PubMed]
36. Canción JJ, Guyette JP, Gilpin SE, González G., Vacanti JP, Ott HC Regeneración y trasplante ortotópico experimental de un riñón bioingeniería. *Naturaleza Medicina* . 2013; 19 (5): 646 - 651. doi: 10.1038 / nm.3154. [ PubMed ]
37. Drury JL, Mooney DJ Hydrogels para ingeniería de tejidos: variables de diseño de andamios y aplicaciones. *Biomateriales* . 2003; 24 (24): 4337 - 4351. doi: 10.1016 / s0142-9612 (03) 00340-5. [ PubMed ].
38. Mazza G., Rombouts K., Rennie Hall A., et al. Hígado humano decelularizado como un andamio tridimensional natural para la bioingeniería y el trasplante de hígado. *Informes Científicos* . 2015; 5 doi: 10.1038 / srep13079. 13079 [ PubMed ].
39. Soto-Gutiérrez A., Zhang L., Medberry C., et al. Un enfoque de medicina regenerativa de todo el órgano para el reemplazo hepático. *Tissue Engineering Parte C: Métodos* . 2011; 17 (6): 677 - 686. doi: 10.1089 / ten.tec.2010.0698. [ PMC artículo libre ] [ PubMed ] [ Cross Ref
40. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G., Rodríguez SR, Atala A., Soker S. El uso de la decelularización del órgano entero para la generación de un

- organoide hepático vascularizado. *Hepatología* . 2011; 53 (2): 604 - 617. doi: 10.1002 / hep.24067. [ PubMed ]
41. Kedokteran Gigi M. Compressive strength and porosity tests on bovine hydroxyapatite-gelatin-chitosan scaffolds. *Dental Journal* 2017; 49(3) 153-157 DOI. Indonesia.
  42. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*. 2008;20:109–116. [PubMed]
  43. Fig 7. Obtención de injerto óseo autólogo:  
[https://healthia.es/professionals/all\\_treatments/693/2862/55](https://healthia.es/professionals/all_treatments/693/2862/55)
  44. Aburto Morales José Salvador, Romero Méndez Josefina. Evolución de los trasplantes y donaciones de órganos y tejidos en México, Breve reseña histórica. P.p 12-28
  45. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications *J Am Acad Orthoped Surg*1995;3:1-8.
  46. Ramírez Fernández M.P. Gehrke S. Mazón P., Calvo José L. Estabilidad del Implante de Hidroxiapatitas Biológicas utilizadas en Odontología. *Materiales (Basilea)*. 1017 Jun: 10(6): 644
  47. Abbas, A. *Cellular and Molecular Immunology*. 3a. Ed Philadelphia: Saunders Company, 2004.
  48. Pérez R, Fresnedo G, Rodríguez M. Rechazo de trasplantes. *Medicine, Doyma*. 2000; 8(26): 1342 - 1350.
  49. Calne R. The future of organ transplantation: from the laboratory to the clinic. *The Royal Society Lond*. 2001; 767-761.
  50. Rojas W. *Inmunología*. 13ava. Ed. Corporación para las investigaciones Biológicas. Colombia.2004.
  51. Guedes M, Monitor T. ¿Son los cerdos la mejor opción para el xenotrasplante? *Internacional Pigletter*. 2002;22(8):45-48.
  52. Costa C, Zhao L, Burton W, Bondioli K, Williams B. Expression of the human 1,2-fucosyltransferase in transgenic pigs modifies the cell surface carbohydrate phenotype and confers resistance to human serum-mediated cytotoxicity. *The FASEB Journal*. 1999; 13:1762-1773.
  53. Fig 8. Complejo Principal de Histocompatibilidad:  
[https://es.slideshare.net/OswaldoAngeles/procesamiento-de-antigenos-parte-i?next\\_slideshow=1](https://es.slideshare.net/OswaldoAngeles/procesamiento-de-antigenos-parte-i?next_slideshow=1)

54. Cotran K, Collins R. Patología Estructural y Funcional. 6 ed. Editorial McGraw Hill interamericana. 2004.
55. Fig. 9 Proceso del Complejo Principal de Histocompatibilidad: <http://www.scoop.it/t/vemurafenib-plx-4032-roche-melanoma-fda-review-approval/p/4037652187/2015/02/20/fda-priority-review-for-cobimetinib-vemurafenib-roche-exelixis-nda-for-braf-v600-positive-advanced-melanoma>.
56. Pereyra L, Neblina F. Xenotransplantation: A View to the Past and an Unrealized Promise to the Future. Experimental and clinical transplantation. 2003; 1(1).
57. Niebert M, Tonjes R. Evolutionary Spread and Recombination of Porcine Endogenous Retroviruses in the Suiformes. Journal of virology. 2005; 79: 649–654.
58. Tabla 1: Cuadro comparativo entre el sistema de Histocompatibilidad de humano (HLA) y cerdo (SLA):
- <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/7145>
59. Weir D, Stewart J. Inmunología. 3a. Ed. Editorial Manual Moderno, México. 1999. 4. Spice B. Are pigs the future of transplants? Health, Science and Environment. 2004 en post-gazette.com
60. Cozzi E, Bhatti F, Schmoeckel M. et al. Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts, Transplantation 2000; 70:15-21.
61. Castañeda M. Trasplantes celulares: De terapia celular a células autólogas personalizadas. Acta médica grupo ángeles. 2005;3(2).
62. Stone KR, Ayala G, Goldstein J, Hurst R, Walgenbach A, Galili U. Porcine cartilage transplants in the cynomolgus monkey. III. Transplantation of alpha-galactosidase-treated porcine cartilage. Transplantation. 1998;65:1577–1583. [PubMed]
63. McPherson TB, Liang H, Record RD, Badylak SF. Galalpha(1,3)Gal epitope in porcine small intestinal submucosa. Tissue Eng. 2000;6:233–239.[PubMed]
64. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B, Boltz-Nitulescu G, Gorlitzer M, Klepetko W, Wolner E, Ankersmit HJ.

- Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest*. 2005;35:17–23. [PubMed]
65. Gilpigy Anna, Yang Yong. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int*. 2017; 98315334. Apr. 2017.
66. Mason C., Dunnill P. Una breve definición de la medicina regenerativa. *Medicina Regenerativa*. 2008; 3(1): 1-5. doi: 10.2217 / 17460751.3.1.1. [ PubMed ],
67. Funamoto S., Nam K., Kimura T., et al. El uso de un tratamiento de alta presión hidrostática para decelularizar los vasos sanguíneos. *Biomateriales*. 2010; 31 (13): 3590 - 3595. doi: 10.1016 / j.biomaterials.2010.01.073. [PubMed].
68. Shimizu K., Ito A., Arinobe M., et al. Técnica eficaz de siembra de células utilizando nanopartículas de magnetita y fuerza magnética sobre los vasos sanguíneos decelularizados para la ingeniería de tejidos vasculares. *Revista de Biociencias y Bioingeniería*. 2007; 103 (5): 472 - 478. doi: 10.1263 / jbb.103.472. [PubMed].
69. Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE Composición de la matriz y mecánica de los andamios pulmonares descelularizados. *Células Tejidos Órganos*. 2012; 195 (3): 222 - 231. doi: 10.1159 / 000324896. [ PMC artículo libre ] [PubMed]
70. Luo L., R. Eswaramoorthy, Mulhall KJ, Kelly DJ Decelularización de explantes de cartílago articular porcino y su posterior repoblación con células condroprogenitoras humanas. *Revista de Comportamiento Mecánico de Materiales Biomédicos*. 2015; 55 : 21-31. doi: 10.1016 / j.jmbbm.2015.10.002. [ PubMed ].
71. Wong ML, Griffiths LG Inmunogenicidad en la generación de cadenas xenogénicas: eliminación de antígenos versus decelularización. *Acta Biomaterialia*. 2014; [ PubMed ].
72. Pellegata AF, Asnaghi MA, Stefani I., et al. Decelularización detergente-enzimática de los vasos sanguíneos de los cerdos: visión de las propiedades mecánicas para la ingeniería de los tejidos vasculares. *BioMed Research International*. 2013 [ PubMed ].
73. Zheng MH, Chen J, Kirilak Y, Willers C, Xu J, Wood D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and

- contains porcine DNA: possible implications in human implantation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;73:61–67. [PubMed]
74. Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res*. 2009;152:135–139. [PubMed]
75. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol*. 2008;20:109–116. [PMC free article] [PubMed]
76. Uematsu K., Hattori K., Ishimoto Y., et al. Regeneración del cartílago usando células madre mesenquimales y un andamio tridimensional de ácido poliláctico-glicólico (PLGA). *Biomateriales*. 2005; 26 (20): 4273 - 4297. doi: 10.1016 / j.biomaterials.2004.10.037. [PubMed].
77. Wu Y.-C., Shaw S.-Y., Lin H.-R., Lee T.-M., Yang C.-Y. Evaluación de la ingeniería del tejido óseo basada en células del estroma de la calvaria de rata cultivadas en andamios modificados de PLGA. *Biomateriales* . 2006; 27 (6): 896 - 904. doi: 10.1016 / j.biomaterials.2005.07.002. [PubMed]
78. Nazari M., Kurdi M., Heerklotz H. Clasificación de tensioactivos con respecto a su efecto sobre el orden de las membranas lipídicas. *Biophysical Journal* . 2012; 102 (3): 498 - 506. doi: 10.1016 / j.bpj.2011.12.029. [PubMed]
79. K. Pang, L. Du, and X. Wu, “A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 28, pp. 7257–7265, 2010. View at Publisher. View at Scopus
80. B. Wang, A. Borazjani, M. Tahai et al., “Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells,” *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1100–1110, 2010. View at Scopus
81. J. Zhou, O. Fritze, M. Schleicher et al., “Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 9, pp. 2549–2554, 2010. View at Scopus
82. O. Syed, N. J. Walters, R. M. Day, H.-W. Kim, and J. C. Knowles, “Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue

- engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5043–5054, 2014. View at Scopus
83. P. J. Schaner, N. D. Martin, T. N. Tulenko et al., "Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 40, no. 1, pp. 146–153, 2004. View at Scopus,
84. J. P. Guyette, J. M. Charest, R. W. Mills et al., "Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix," *Circulation Research*, vol. 118, no. 1, pp. 56–72, 2016. View at Scopus
85. J. Zhou, O. Fritze, M. Schleicher et al., "Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity," *Biomaterials*, vol. 31, no. 9, pp. 2549–2554, 2010. View at Scopus
86. J. D. O'Neill, R. Anfang, A. Anandappa et al., "Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering," *Annals of Thoracic Surgery*, vol. 96, no. 3, pp. 1046–1055, 2013. View at Scopus
87. J. P. Guyette, J. M. Charest, R. W. Mills et al., "Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix," *Circulation Research*, vol. 118, no. 1, pp. 56–72, 2016. View at Scopus.
88. Q. Xing, K. Yates, M. Tahtinen, E. Shearier, Z. Qian, and F. Zhao, "Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation," *Tissue Engineering—Part C: Methods*, vol. 21, no. 1, pp. 77–87, 2015. View at Scopus
89. B. Wang, A. Borazjani, M. Tahai et al., "Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells," *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1100–1110, 2010. View at Scopus
90. O. Syed, N. J. Walters, R. M. Day, H.-W. Kim, and J. C. Knowles, "Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5043–5054, 2014. View at Scopus.
91. B. E. Uygun, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi et al., "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix," *Nature Medicine*, vol. 16, no. 7, pp. 814–820, 2010. View at Scopus

92. S. E. Gilpin, J. P. Guyette, G. Gonzalez et al., "Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale," *Journal of Heart and Lung Transplantation*, vol. 33, no. 3, pp. 298–308, 2014. View at Scopus
93. H. C. Ott, T. S. Matthiesen, S.-K. Goh et al., "Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart," *Nature Medicine*, vol. 14, no. 2, pp. 213–221, 2008. View at Scopus.
94. O. Syed, N. J. Walters, R. M. Day, H.-W. Kim, and J. C. Knowles, "Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5043–5054, 2014. View at Scopus.
95. B. J. Jank, L. Xiong, P. T. Moser et al., "Engineered composite tissue as a bioartificial limb graft," *Biomaterials*, vol. 61, pp. 246–256, 2015.
96. J. P. Guyette, J. M. Charest, R. W. Mills et al., "Bioengineering human myocardium on native extracellular matrix," *Circulation Research*, vol. 118, no. 1, pp. 56–72, 2016. View at Scopus
97. D. C. Sullivan, S.-H. Mirmalek-Sani, D. B. Deegan et al., "Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system," *Biomaterials*, vol. 33, no. 31, pp. 7756–7764, 2012. View at Scopus.
98. B. Mendoza-Novelo, E. E. Avila, J. V. Cauich-Rodríguez et al., "Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 3, pp. 1241–1248, 2011. View at Scopus
99. O. Syed, N. J. Walters, R. M. Day, H.-W. Kim, and J. C. Knowles, "Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 12, pp. 5043–5054, 2014. View at Scopus
100. T. W. Gilbert, S. Wognum, E. M. Joyce, D. O. Freytes, M. S. Sacks, and S. F. Badylak, "Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix," *Biomaterials*, vol. 29, no. 36, pp. 4775–4782, 2008. View at Scopus

101. Sawada K., Terada D., Yamaoka T., Kitamura S., Fujisato T. Eliminación de células con dióxido de carbono supercrítico para tejido artificial acelular. *Revista de Tecnología Química y Biotecnología* . 2008; 83 (6): 943 - 949. doi: 10.1002 / jctb.1899.
102. Hounsfield G.N. Computed medical imaging. *Science*, 210, 22-28,
103. Fig. 10 Tomografía computarizada coronal y axial:  
[https://www.researchgate.net/figure/308711890\\_fig1\\_Figura-1-A-y-B-Tomografia-computarizada-coronal-y-axial-preoperatoria-de-senos](https://www.researchgate.net/figure/308711890_fig1_Figura-1-A-y-B-Tomografia-computarizada-coronal-y-axial-preoperatoria-de-senos).
104. Kalender W.A., Seissler W., Klotz E., Vock P. Spiral volumetric CT with single-breath-hold technique, continuous transport, and continuous scanner rotation. *Radiology*, 176, 181-3, 1990.
105. Ramírez Giraldo Juan Carlos, Arboleda Clavijo Carolina, McCollough Cynthia H. Tomografía computarizada por rayos X: Fundamentos y actualidad. *Rev. ing. biomed.* [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 Oct 07]; 54-66. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-97622008000200008&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-97622008000200008&lng=en).
106. Ribeiro Cunha Jorge, Freita Gomes Gabriela, Monteiro de Andrade Marcelino. Mechanical test in thermoplastic elastomers used in 3D printers for the construction of hand prosthesis. *IEEE Stanford CFP1418G-ART*, April 2014.
107. Ortiz Chimbo Karla, Luna Avelga Herry, Medina Moreira José. Los beneficios de las impresoras 3 D como herramienta de innovación en la medicina. *Revista caribeña de Ciencias Sociales ISSN 2254-7630*. Junio 2016.
108. Murphy A. S. Atala. 3D Bioprinting of tissues and organs. *Nature biotechnology* Vol. 1. 876 pp. 1-2. April 2014.
109. Ballarino F. "Las impresoras 3D ya se usan en el país para crear prótesis a medida. *Fortuna* Vol. 876 pp1-2. April 2014.
110. Fig. 11 Impresión 3D por adición:  
<http://omicrono.elespanol.com/2016/04/organos-impresos-en-3d/>
111. N. Christo Susan. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or foes. *BioMed Research International*. ISSN 2314-6133. 2015

112. Tresguerres J. A. F. Fisiología Humana. Editorial McGrawHill Interamericana, 2003. 2ª ed. P.p. 983-1020.
113. Fig. 12 Impresión 3D: <https://www.digitaltrends.com/cool-tech/3d-printed-titanium-jaw-allows-83-year-old-to-bypass-risky-reconstructive-surgery/>
114. Mendoza-Novelo B., Ávila EE, Cauch-Rodríguez JV, et al. Decelularización del tejido pericárdico y su impacto sobre la viscoelasticidad a la tracción y el contenido de glicosaminoglicanos. *Acta Biomaterialia*. 2011; 7 (3): 1241 - 1248. doi: 10.1016 / j.actbio.2010.11.017. [ PubMed ]
115. Meezan E., Hjelle JT, Brendel K., Carlson EC Un método simple, versátil, no disruptivo para el aislamiento de membranas basales morfológicamente y químicamente puras de varios tejidos. *Ciencias de la vida*. 1975; 17 (11): 1721 - 1732. doi: 10.1016 / 0024-3205 (75) 90119-8. [ PubMed ]