



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

**CARACTERIZACIÓN DEL HUESO HOMÓLOGO ACELULAR
COMO ANDAMIO PARA INGENIERÍA TISULAR**

TESIS DE POSGRADO

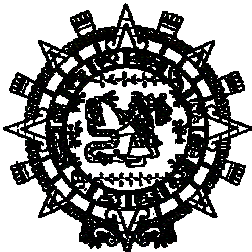
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
SUBESPECIALISTA EN CIRUGÍA PLÁSTICA
Y RECONSTRUCTIVA

PRESENTA:

DR. CRISTIÁN ANTONIO ERAZO CORTÉS

TUTOR:

DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA



MÉXICO D.F.

AGOSTO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DR. OCTAVIO SIERRA MARTÍNEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

DR. ALFONSO GALVAN MONTAÑA
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ Y ASESOR DE TESIS

DRA. RITA VALENZUELA ROMERO
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA Y POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

DEDICATORIAS

A mi esposa Ángela, el regalo más hermoso que este País me dio. Por su infinita capacidad de amar, la que se manifiesta en su comprensión, apoyo y dedicación hacia mí.

A mis padres León y Gloria, por el apoyo incondicional a nuestros sueños, sacrificándose siempre por darnos lo mejor.

A mi hermana Gisella, por brillar más fuerte y más alto que yo.

A mis Maestros y Profesores Mexicanos, por compartir generosamente sus conocimientos.

A mis Maestros y Profesores Chilenos, por creer en mí.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	8
MARCO TEÓRICO.....	8
OBJETIVOS.....	10
HIPÓTESIS.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	11
ALCANCE.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	18
CONCLUSIÓN.....	21
FIGURAS.....	22
BIBLIOGRAFIA.....	26

“Caracterización del Hueso Homólogo Acelular Como Andamio para Ingeniería Tisular”.

Resumen: La regeneración de tejido mediante ingeniería tisular requiere de andamios para que las células obtenidas en condiciones de laboratorio reproduzcan la estructura tridimensional del tejido in vivo restaurando forma y función. El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar biológicamente un nuevo andamio para ingeniería tisular ósea correspondiente a hueso homólogo, al cual se le despoja de sus células y proteínas de la matriz extracelular mediante calor húmedo. Para comprobar la acelularidad efectiva de este andamio se diseñó un estudio experimental en conejos. Seis conejos N. Zelanda adultos fueron incluidos en el estudio, a los cuales se les tomó dos muestras de hueso trabecular de cresta iliaca, una de las cuales fue expuesta a calor húmedo según nuestro protocolo. Se realizaron cultivos celulares de ambas muestras, los que se siguieron por 6 semanas, siendo negativos en la totalidad de las muestras sometidas a calor húmedo, con lo que se comprueba la acelularidad de nuestro andamio biológico. Por otra parte en nuestro andamio existiría una pequeña cantidad de colágena residual identificable por electroforesis de proteínas.

Palabras Clave: Hueso Acelular, Andamio, Ingeniería Tisular.

INTRODUCCIÓN.

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinario en el que se aplican principios de la ingeniería y de las ciencias naturales para desarrollar sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran tejidos¹. A la fecha, diversos tejidos han sido desarrollados en el laboratorio^{2,3} y de este modo la idea de contar algún día con órganos cultivados in vitro a comenzado a ser una realidad. En ingeniería tisular la estrategia más utilizada para producir estructuras vivas in vitro ha sido combinar células de diversos tejidos con matrices naturales o sintéticas en un biorreactor⁴. Ya que la reparación y regeneración efectiva de tejidos depende de un rápido reestablecimiento del flujo sanguíneo, estas matrices deben actuar como una estructura de soporte o andamio a través del cual las células migran y se establecen, restaurando forma y función. El éxito en ingeniería tisular depende de tres elementos claves: Una fuente de células saludables y expandibles, un birreactor óptimo y un andamio adecuado. Un andamio ideal debe ser: (1)biocompatible en estructura y forma degradada; (2)presentar propiedades mecánicas adecuadas, (3)ser poroso y permeable; (4)poseer una superficie adecuada estructural y químicamente para dar sostén y fijación a las células y (5)debe tener interconexión entre sus canales para la adecuada penetración de estas⁵. Una opción para lograr un andamio ideal es usar polímeros sintéticos biocompatitbles. Los andamios sintéticos son resistentes y algunos son fabricados para ser degradados luego de la implantación a una velocidad determinada. También pueden ser diseñados para simular las características materiales del tejido a reemplazar y pueden ser modelados a voluntad⁶. Su principal desventaja radica en el costo. Son ejemplos de estos materiales sintéticos los polímeros como: el Ac. Poliglicolico (PGA), el Ac. Poliláctico (PLA) y la Policaprolactona (CPL). También se usan como andamios

sintéticos materiales cerámicos, dentro de los que se encuentran los bioinertes (Aluminio y Zirconio), los de superficie bioactiva (Hidroxiapatita y vidrio bioactivo) y los bioabsorbibles (BiCaP, TriCaP y OctaCaP).

Otra opción, tal vez más adecuada para nuestro medio, es usar andamios biológicos. Éstos, se obtienen de distintos órganos y organismos, los que son sometidos a mínimos procesos para conservar al máximo sus características, removiendo sus células nativas para ser implantados en forma acelular. Son ejemplos de andamios biológicos: la mucosa de intestino delgado, la dermis acelular, la matriz acelular de vejiga, la fascia cadavérica y las membranas amnióticas⁷. El hueso acelular, no ha sido descrito en la literatura como andamio biológico, sin embargo, los materiales sintéticos utilizados para fabricar andamios en ingeniería tisular ósea están compuestos de derivados de fosfato de calcio, principal componente mineral del hueso. Los más efectivos en cuanto a proliferación celular son los que se asemejan estructuralmente a éste, simulando su grado de porosidad^{8,9}.

En un estudio reciente realizado en nuestra división¹⁰ se utilizó hueso acelular homólogo de conejo como andamio para ingeniería tisular ósea con el fin de rellenar defectos en hueso craneal, con excelentes resultados. Para obtener este hueso eventualmente acelular se utilizó calor húmedo a 121°C por 15 minutos. Nuestro andamio resultó tan efectivo que incluso luego de ser poblado por osteoblastos diferenciados a partir de células madre y cultivados in vitro, se logró reproducir por completo la estructura trilaminar del hueso de cráneo, situación no descrita hasta entonces en la literatura.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Es el hueso homólogo, esterilizado por calor húmedo según nuestro protocolo efectivamente acelular? y de ser así ¿Existen en la matriz mineral proteínas residuales que eventualmente puedan desencadenar una respuesta inmune en el huésped?

MARCO TEÓRICO.

El homoinjerto óseo ha sido usado en seres humanos por más de 120 años. Ya en 1950 se crea el primer banco de tejidos para uso médico, correspondiente al Banco de Tejidos de la Marina en Bethesda, institución que hasta la fecha rige las normas para la conservación de tejidos para uso médico¹¹. Desde 1980 existe un mejor control biológico de los tejidos preservados, por el riesgo de transmitir infecciones virales como HIV, VHB, VHC, etc. Ya en 1984 se reporta el primer caso de transmisión de HIV y en 1992 se reporta el segundo y último caso de ésta infección cuyo contagio ocurrió en 1985. A la fecha se han realizado más de 1 millón de homoinjerto óseos de Banco en USA durante los últimos 10 años, sin reportes de transmisión de HIV o Virus Hepatitis. En general, en todos los bancos de tejidos del mundo se conserva hueso desmineralizado (el opuesto a nuestro hueso mineral acelular), ya que para ser utilizado sólo como injerto se requiere que conserve todas sus cualidades osteoinductoras y osteoconductoras, las que van a estar determinadas por las proteínas de la matriz extracelular (ej. BPM, VGF, colágeno, etc), estimulando la ocupación de su matriz por células del huésped que migran desde la periferia del defecto. El hueso desmineralizado de banco, ampliamente usado en ortopedia, se esteriliza por crio conservación, con o sin métodos accesorios, a -80°C. A esta temperatura se produciría

lisis celular por cristalización de las membranas plasmáticas de las células eucarióticas y procarióticas, de este modo se eliminaría el contenido celular de éste y se mantienen sus propiedades de osteoinducción y osteoconducción, ya que no existe desnaturalización de proteínas. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que es posible extraer células viables de esta matriz criopreservada¹², lo que representa una posibilidad cierta de desencadenar una respuesta inmune en el huésped que termine en el rechazo del injerto.

El hueso homólogo acelular fue utilizado en un estudio anterior aún no publicado por nuestro grupo como andamio de osteoblastos cultivados a partir de células madres de médula ósea. Este se obtiene al esterilizar hueso trabecular por calor húmedo a 120 °C por 15 minutos. A esta temperatura se perdería sus propiedades osteoinductivas, ya que se produce junto con la pérdida de sus células la desnaturalización de las proteínas de la matriz¹³, quedando aparentemente sólo la estructura mineral de éste. Se conservaría sin embargo, sus propiedades osteoconductoras, ya que en éste estudio fue capaz de ser poblado de manera fisiológica por nuevos osteoblastos cultivados, los cuales sintetizaron nueva matriz proteica y mineral, reestableciendo la función y estructura del tejido reparado. Un trabajo reciente que utiliza una metodología similar a la empleada por nosotros en cuanto a la obtención y diferenciación de osteoblastos a partir de médula ósea autóloga, pero usa hidroxapatita como andamio (cerámico de PCa), logró resultados similares en cuanto a población de esta matriz, pero con una estructuración tridimensional más rudimentaria¹⁴. Otra característica importante del hueso homólogo acelular es que a pesar de presentar desnaturalización de su matriz colágena, fenómeno que se observa aproximadamente desde los 80°C, éste conserva las características biomecánicas del hueso por un período inicial de hasta 8 semanas¹⁵

y luego es degradado por el huésped a sustancias biocompatibles, situación que sumada a sus características ya descritas lo transforman en un andamio ideal, biodegradable y de bajo costo.

OBJETIVOS.

1. Determinar la acelularidad efectiva del hueso esponjoso esterilizado por calor húmedo.
2. Caracterizar biológicamente al hueso homólogo acelular esterilizado por calor húmedo con respecto a proteínas residuales de la matriz.

HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Si el hueso homólogo esterilizado por calor húmedo ha demostrado ser un buen andamio para ingeniería tisular ósea y la esterilización por calor húmedo destruye la totalidad de las células y proteínas biológicas de la matriz entonces el hueso esterilizado por calor húmedo es acelular e inmunológicamente no reactivo en el huésped, constituyendo una matriz mineral biodegradable ideal para ser usado como andamio biológico.

JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad existe una serie de patologías (congénitas, tumorales, post-traumáticas, etc.) que afectan al esqueleto óseo craneofacial, en las cuales se requiere sustituir o aportar nuevo tejido óseo. Hasta la fecha la manera tradicional de lograr esto con tejidos biológicos, ha sido la utilización de injertos óseos, principalmente homoinjertos, los cuales producen morbilidad estético-funcional del sitio donador. Otra manera de abordar el problema ha sido por medio de distracción osteogénica o transporte óseo, técnicas limitadas a algunos segmentos del esqueleto craneofacial y con un costo económico importante por el tipo de instrumentos utilizados. Con el advenimiento de la ingeniería tisular hoy somos capaces de producir hueso de novo en modelos experimentales, a partir de osteoblastos cultivados y diferenciados desde células madres obtenidas de médula ósea autóloga, técnica que reporta mínima morbilidad y a través de la cual es posible producir grandes cantidades de hueso. Sin embargo para que esta tecnología sea clínicamente aplicable algún día en nuestro medio, debemos contar con un andamio con características adecuadas y de bajo costo. El hueso homólogo acelular parece ser una alternativa viable para resolver este problema ya que cuenta con capacidades osteoconductoras probadas en estudios previos por este grupo de trabajo, sin embargo, es necesario caracterizar este nuevo andamio desde el punto de vista biológico e inmunológico para contar con los estándares de bioseguridad que requerirá su uso futuro en seres humanos.

ALCANCE.

Obtener un andamio biológico útil en el campo de la ingeniería tisular, de bajo costo de producción, biocompatible, seguro y de buena disponibilidad, nos permitirá mantener el desarrollo de nuevas tecnologías derivadas de células madres, sobre todo en lo que se refiere a la búsqueda de alternativas de tratamiento a las patologías que cursan con deformidades óseas craneofaciales. Los resultados de este estudio abrirán las puertas a un estudio similar en hueso homólogo humano, que permita la aplicación clínica protocolizada de esta biotecnología en el campo de la cirugía dentro de los próximos 10 años. Esto último revolucionará los procedimientos de toma y aplicación de injertos óseos que conocemos hasta ahora, sustituyéndolos por procedimientos menos invasivos, sin morbilidad asociada al sitio donante y sin limitantes con respecto a la cantidad de tejido óseo a utilizar, ya que lo estaremos produciendo in situ con células del propio individuo.

MATERIALES Y MÉTODO.

Diseñamos un estudio experimental prospectivo y longitudinal en conejos Nueva Zelanda adultos. Con un tamaño de muestra de 12 andamios; 6 casos y 6 controles, calculado con un nivel de significancia de 0.05 y una potencia de la prueba del 80%.

A continuación se detalla la metodología utilizada en cada etapa de la investigación:

- a. Obtención del andamio: Los andamios se obtuvieron de 6 conejos N. Zelanda adultos. Técnica: BAJO TÉCNICA ESTÉRIL, ANESTESIA GENERAL CON HIDROCLORATO DE XILACINA A UNA DOSIS DE 5 MG/KG, CLORHIDRATO

DE KETAMINA A UNA DOSIS DE 20 MG/KG Y PROFILAXIS CON CEFALOTINA 40 MG/KG POR 7 DÍAS, SE TOMA 1 MUESTRA DE 4 CC. (A) Y OTRA DE 1 CC. (B) DE TEJIDO ÓSEO TRABECULAR DE CRESTA ILIACA DE CONEJO N. ZELANDA POR ABORDAJE POSTERIOR (Fig 1.). CADA CONEJO ES SUTURADO Y CUIDADO DURANTE EL POST OPERATORIO CON ANALGESIA EN BASE A MEGLUMINA DE FLUNIXIL 1.1MG/KG IM C/24 HRS. POR 3 DIAS Y SE LES PROPORCIONARÁ ALIMENTO (LABORATORY RABBIT DIET, 5321 PMI) Y AGUA A LIBRE ACCESO, YA QUE SERÁ UTILIZADO EN UNA ETAPA POSTERIOR DE LA INVESTIGACIÓN. LAS MUESTRAS SON ROTULADAS DE ACUERDO AL CONEJO DEL CUAL PROVIENEN Y POSTERIORMENTE UNA DE ELLAS (A) SERÁ ENVIADA A PROTOCOLO DE ESTERILIZACIÓN CON CALOR HÚMEDO, LA OTRA (B) SE ALMACENA EN BUFFER SALINO DE FOSFATOS (PBS) ESTÉRIL FRÍO Y SE ENVÍA COMO CONTROL A CULTIVO CELULAR. NO HUBO MORBILIDAD NI MORTALIDAD PERIOPERATORIA Y LA TOTALIDAD DE LOS CONEJOS SE RECUPERARON FAVORABLEMENTE.

- b. Esterilización por calor húmedo: LA MUESTRA (A) DE CADA CONEJO ES SOMETIDA A UN CICLO DE ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO A 121°C X 15 MIN. FINALIZADO EL CICLO DE ESTERILIZACIÓN, BAJO TÉCNICA ESTÉRIL, DE CADA UNA DE LAS MUESTRAS SE TOMA 0,5 CC., Y SE PROCESAN PARA ELECTROFORESIS DE PROTEINAS, 0,5 CC. SE ENVÍAN AL PROCESO DE CULTIVO CELULAR Y 1 CC. SE GUARDA PARA SER

USADA COMO HOMOIJERTO ÓSEO EN UNA SEGUNDA FASE DE LA INVESTIGACIÓN.

- c. Cultivos celulares: BAJO TÉCNICA ESTÉRIL Y CAMPANA DE FLUJO LAMINAR CADA MUESTRA DE 0,5 CC DERIVADAS DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN Y 0,5 CC DE CADA UNA DE LAS MUESTRAS CONTROL (NO ESTERILIZADAS), ES PUESTA EN BUFFER FOSFATO FRÍO ESTÉRIL (BFE), HOMOGENIZADA A FRAGMENTOS DE 1 MM. APROX. Y LAVADA ABUNDANTE Y REPETIDAMENTE CON BFE. POSTERIORMENTE EL HOMOGENIZADO ES INCUBADO EN UNA SOLUCIÓN (2MG/ML BFE) CON COLAGENAZA (TIPO II, SIGMA. ST. LOUIS, MO, USA) A 37°C POR 2 HORAS A BAÑO MARÍA, LUEGO ES LAVADO CON UN MEDIO AL 10% DE SUERO FETAL BOVINO (SFB) Y ES PUESTO EN FRASCOS DE 25 CM² (NUNC, ROSKILDE, DINAMARCA) EN PROPORCIÓN DE 10 A 15 MG. POR CM² DE SUPERFICIE. LOS FRAGMENTOS ÓSEOS SON CULTIVADOS EN MEDIO DMEM (GIBCO), SUPLEMENTADO CON 100 U/ML DE PENICILINA, 50UG/ML DE SULFATO DE STREPTOMICINA, 50UG/ML DE GENTAMICINA, 1.25 UG/ML FUNGIZONA, 100 UG/ML DE ASCORBATO Y 10% DE SFB. EL MEDIO DE CULTIVO SE CAMBIA CUANDO SEA NECESARIO DURANTE 6 SEMANAS. EL MONITOREO DE LOS CULTIVOS SE HACE POR 6 SEMANAS MEDIANTE MICROSCOPIA INVERTIDA DE CONTRASTE DE FASES, CONSTATANDO CRECIMIENTO CELULAR, NÚMERO DE CÉLULAS Y TIPO.

- d. Determinación de proteínas en la matriz ósea: LA PRESENCIA DE FACTORES DE CRECIMIENTO ÓSEO (BMP, VGF) RESIDUALES Y PROTEÍNAS ESTRUCTURALES NO DESNATURALIZADAS LUEGO DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN ES DETERMINADA MEDIANTE DESMINERALIZACIÓN, LISIS Y POSTERIOR ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS. EL HUESO DESPUÉS DE ESTERILIZADO SE SOMETE A TRATAMIENTO CON ÁCIDO NÍTRICO AL 8% DURANTE 30 MIN PARA DESMINERALIZARLO. EL RESTO PROTEÍNICOS SE LIZA CON UN DETERGENTE SUAVE (TRITON 40) Y SE SOMETE A ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 12% EN CONDICIONES REDUCTORAS. EN PARALELO SE CORRIÓ UNA MUESTRA DE ANDAMIO PERSÉ, UNA MUESTRA DEL MISMO DESMINERALIZADO, OTRA DEL MEDIO DE DESMINERALIZACIÓN Y UN CONTROL DE COLÁGENA COMERCIAL. POSTERIORMENTE EL GEL SE TEÑE CON AZUL DE COOMASIE Y CON TINCIÓN DE PLATA.
- e. Análisis estadístico: EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO SE REALIZÓ MEDIANTE EL SOFTWARE SPSS 8.0, USANDO LA PRUEBA DE CHI CUADRADO PARA VARIABLES EN ESCALA NOMINAL.

Todos los procedimientos están de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud: Título séptimo. De la investigación que incluya la utilización de animales de experimentación. Capítulo único artículos 121-126.

El manejo y procedimiento experimental al que fueron sometidos los animales se realizó conforme a la NOM-062-200-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, D.D.F. 22-VIII-2001.

Este protocolo fue aprobado por el comité de ética e investigación de nuestro hospital en reunión del 14 de Diciembre de 2005 con folio INV/CLIN/185/2005.

RESULTADOS

Se procesaron un total de 12 muestras para cultivo celular, 6 controles y 6 tratadas según el protocolo de esterilización abreviada. Desde la primera y hasta la sexta semana se observó desarrollo y proliferación celular en todos los cultivos correspondientes a las muestras controles. El grupo celular predominante fue osteoblastos identificados inicialmente por morfología, y posteriormente ratificado por crecimiento en medio diferenciado para osteoblastos (Fig. 2) y por tinciones especiales como la de fosfatasa alcalina, con la cual característicamente el citoplasma del osteoblasto se tiñe azul morado como se muestra en la Figura 3. Por el contrario ninguno los cultivos de nuestro andamio desarrollo algún tipo de células desde la primera hasta la sexta semana. Únicamente se aprecian escasos restos minerales (Fig. 4), lo que significa que con el autoclave por 15 minutos se obtiene un andamio acelular.

La electroforesis de proteínas residuales fue muy interesante de analizar. La tinción del gel con azul de Coomassie (Fig. 5) muestra ausencia de proteínas en las columnas correspondientes a: extracto proteico pre decalcificación, extracto descalcificado y medio de decalcificación. La columna de la derecha es el control y corresponde a colágena de origen comercial mostrando una banda a nivel de los 150 KD correspondiente a la cadena pesada y dos bandas a nivel de los 75 KD correspondientes a las cadenas ligeras. Por otra parte la tinción de plata (Fig. 6), que es un método más sensible para evidenciar proteínas, mostró en la columna de extracto descalcificado tres bandas tenues análogas a la colágena de origen comercial.

DISCUSIÓN.

Gran parte de la investigación en ingeniería tisular ósea se enfoca en la búsqueda de un andamio ideal. Es frecuente el uso de andamios sintéticos cerámicos. El Bifosfato de calcio, Trifosfato de calcio y Octafosfato de calcio son caros, frágiles y de lenta reabsorción. Inclusive la Hidroxiapatita, cerámico de superficie bioactiva ampliamente utilizado, es irreabsorbible. Como alternativa biológica algunos grupos utilizan hueso homólogo de banco al que se le eliminan sus células nativas mediante crio preservación a -80 grados centígrados, temperatura a la cual se destruyen las células pero se conservan las proteínas de la matriz. Además, el hueso es sometido a un proceso de desmineralización, por lo que se le conoce como matriz ósea desmineralizada. Khuls¹⁶ y col. utilizaron esta matriz demineralizada para la reconstrucción de defectos mandibulares parciales con buenos resultados.

Heyligers¹² pone una voz de alerta frente al uso de homoinjertos crio preservados. Utilizando técnicas convencionales de cultivo celular, fue capaz de obtener células viables de una matriz ósea desmineralizada crio preservada y de comprobar que pertenecían al donante luego de realizar análisis de marcadores de DNA. Este hallazgo representa una posibilidad cierta de desencadenar una respuesta inmune celular en el huésped que termine con el rechazo del injerto u otras complicaciones graves.

Nuestros resultados nos permiten comprobar que la utilización de calor húmedo a 121 grados centígrados por 15 minutos elimina completamente las células del donante, como lo demostramos con un 100% de cultivos negativos hasta por 6 semanas versus un 100% de cultivos positivos para los controles. Al eliminar el

contenido celular disminuye la posibilidad de rechazo y se obtiene un nivel de bioseguridad adecuado para ser utilizado en otros individuos de la misma especie.

Como resultado del proceso térmico para la obtención nuestro hueso homólogo acelular (Fig. 7) se perdería su propiedad osteoinductiva, definida como la capacidad de un agente para inducir la producción de hueso normal en áreas en las cuales habitualmente no se produciría. Esto se explica porque junto con la pérdida de sus células, ahora comprobada efectivamente en el presente estudio, está descrito que se produce la desnaturalización de las proteínas de la matriz¹³, siendo algunas como las BMPs responsables de la osteoinducción, quedando de este modo aparentemente sólo la estructura mineral. Sin embargo, nuestros resultados nos permiten afirmar que no todas las proteínas se desnaturalizan con el proceso de esterilización. Comprobamos mediante electroforesis de proteínas que el hueso homólogo acelular sería básicamente una matriz biomineral compuesta de colágena calcificada. Esta fue la única proteína identificable por este método, exclusivamente luego de la descalcificación y sólo fue evidenciable con tinción de plata que es más sensible que el azul de Coomazie. Lo que significa que con la desmineralización se desnudan moléculas de colágena que inicialmente estaban cubiertas por la matriz mineral del andamio y que fueron protegidas por ésta de la desnaturalización calórica.

La presencia de colágena en nuestro andamio consideramos que es una ventaja desde el punto de vista biomecánico, otorgándole mayor resistencia que los cerámicos. Wang¹⁷ utilizando fémur humano sometido a temperaturas ascendentes, demuestra que el grado de resistencia del hueso es inversamente proporcional al porcentaje de desnaturalización de la colágena, con un punto de inflexión brusco alrededor del 60% de desnaturalización. Por su parte Shin¹⁵ demuestra que el hueso trabecular sometido

a 100°C conserva hasta un 80% de sus características biomecánicas por un período inicial de hasta 8 semanas para luego ser degradado. Esta última característica es deseable para nuestro propósito de utilizar el hueso homólogo acelular como andamio, ya que lo categorizaría como biológico y biodegradable, situación que actualmente estamos investigando en conjunto con la respuesta inmunológica del huésped al implantar estos andamios.

Por último podemos afirmar que el hueso homólogo acelular conserva su propiedad osteoconductiva, definida como la capacidad de un agente para servir de sostén y guiar la formación de nuevo hueso, ya que en nuestro estudio anterior fue capaz de ser poblado de manera fisiológica por nuevos osteoblastos cultivados, los cuales sintetizaron una nueva matriz proteica y mineral in vivo, reestableciendo la función y la estructura trilaminar de los defectos craneales de los conejos estudiados. Aún más, en este sentido también supera a la hidroxiapatita ya que Malarda¹⁴ quien utilizó una metodología similar a la nuestra en cuanto a la obtención y diferenciación de osteoblastos a partir de células madres de medula ósea autóloga, utilizó hidroxiapatita (cerámico de PCa) como andamio osteoconductivo, logrando población del andamio, pero una estructura tridimensional más rudimentaria que la nuestra a largo plazo.

CONCLUSION.

Del presente trabajo podemos concluir que:

- I. El Hueso Homologo de conejo sometido a esterilización por calor húmedo es efectivamente acelular.
- II. La esterilización elimina todas las proteínas de superficie del andamio.
- III. Mediante electroforesis, luego de la desmineralización del andamio aparece la colágena como la única proteína identificable, lo que le ofrece estructuralmente mayor resistencia.
- IV. Sin embargo futuros estudios de antigenicidad serán necesarios antes de pasar a la fase clínica.

Por lo expuesto proponemos al hueso homólogo acelular obtenido por nuestro procedimiento como un andamio con características ideales para ingeniería tisular ósea y con un bajo costo de producción, lo que lo hace adecuado para nuestro medio.



Figura 1. Abordaje posterior para obtención de hueso trabecular de cresta iliaca de conejo.

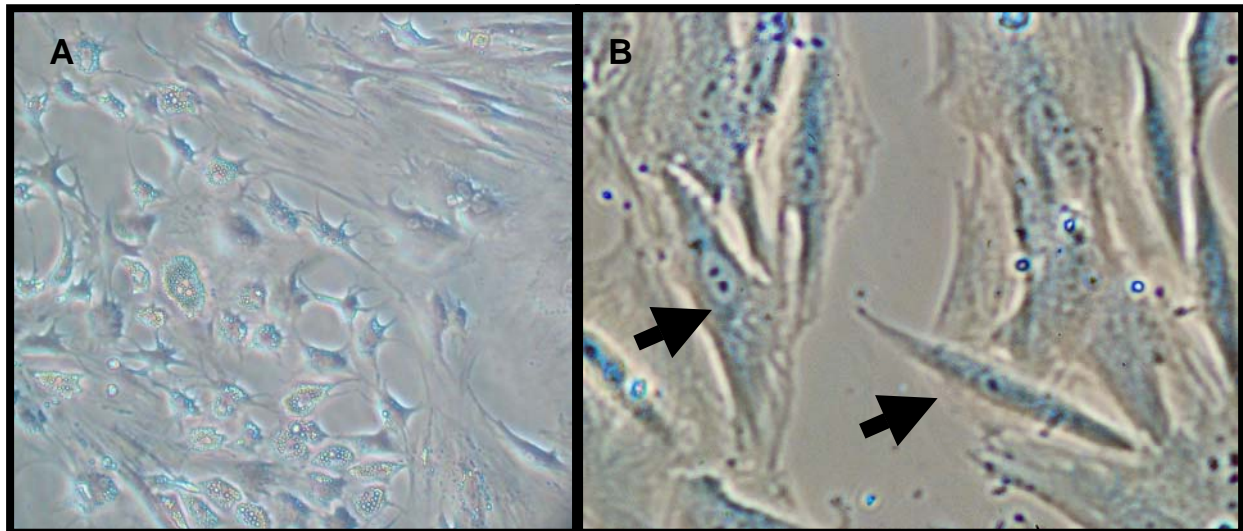


Figura 2. (A) Cultivos controles positivos para osteoblastos bajo microscopio de contraste de fases 40X. (B) Morfología correspondiente a osteoblastos en microscopio de contraste de fases 400X.

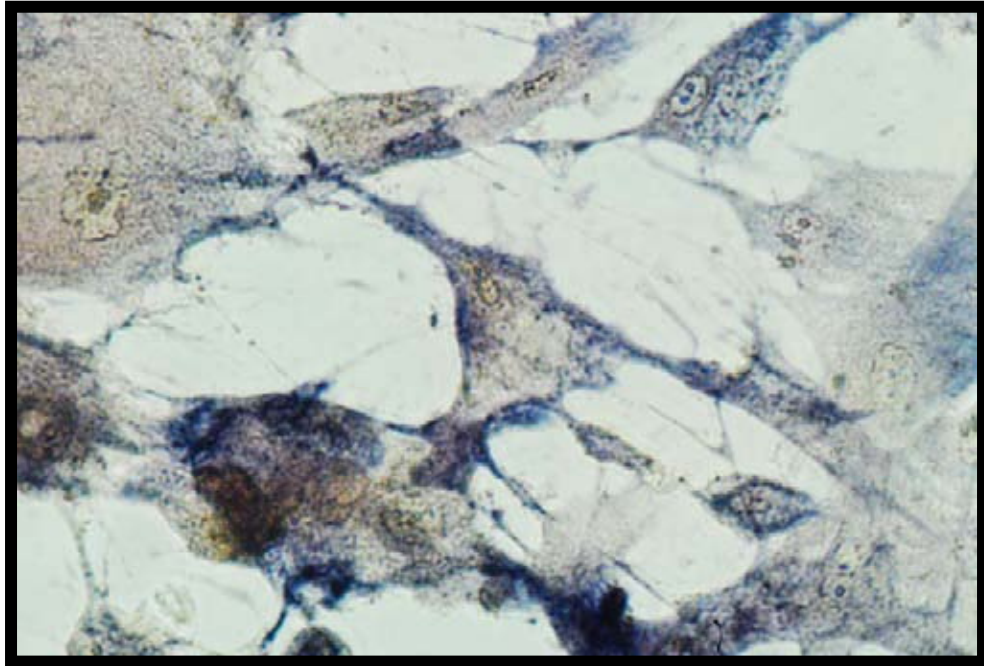


Figura 3. Tinción positiva para fosfatasa alcalina intracelular.



Figura 4. Cultivos negativos de muestras esterilizadas por calor húmedo al ser observadas bajo microscopio de contraste de fases a 400X. Se aprecian restos de la matriz mineral (flecha) y ausencia de células.

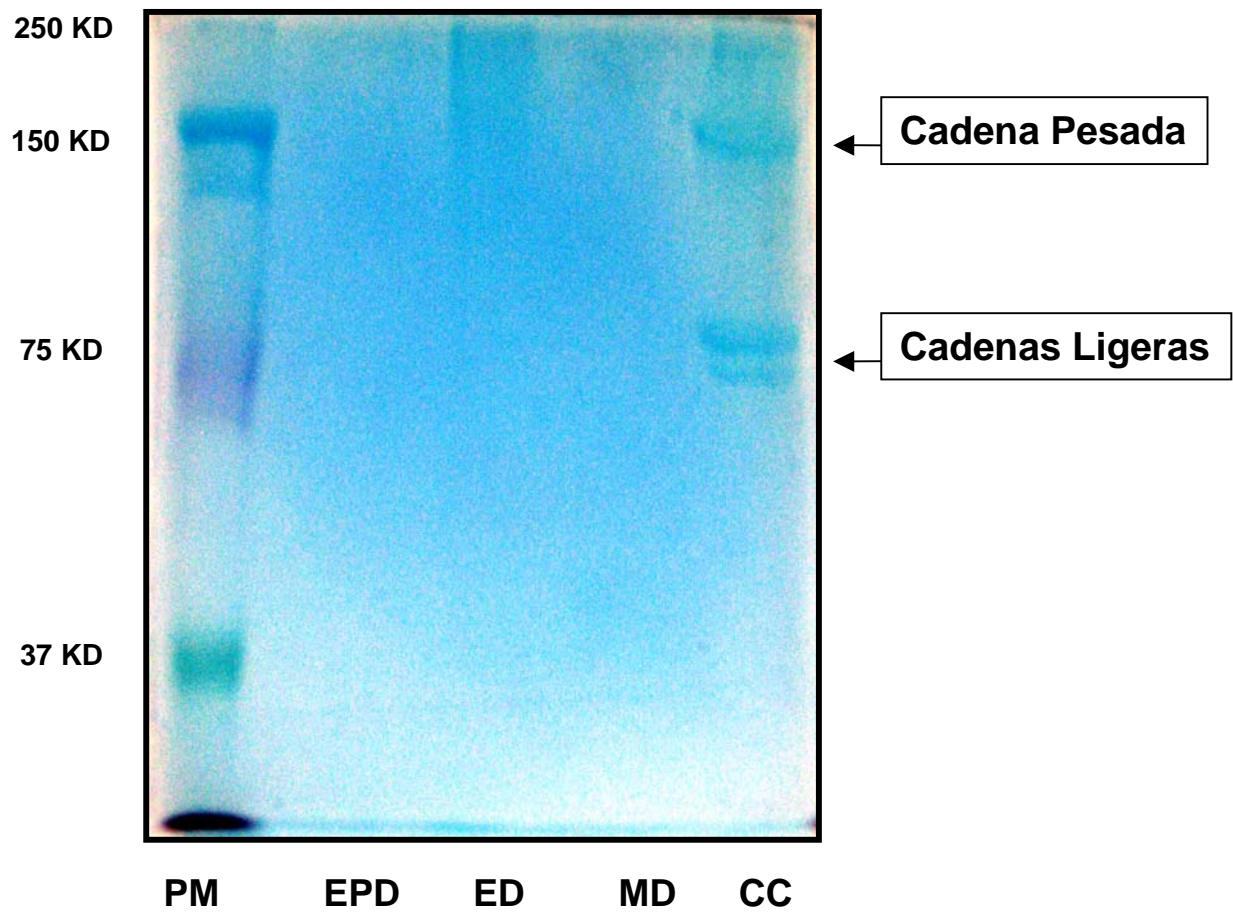


Figura 5. Electroforesis de proteínas. Gel teñido con Azul de Coomasie. Columnas: PM (peso molecular), EPD (extracto pre descalcificación), ED (extracto descalcificado), MD (medio de descalcificación), CC (colágena comercial). Sólo se aprecian las 3 bandas correspondientes a la colágena comercial.

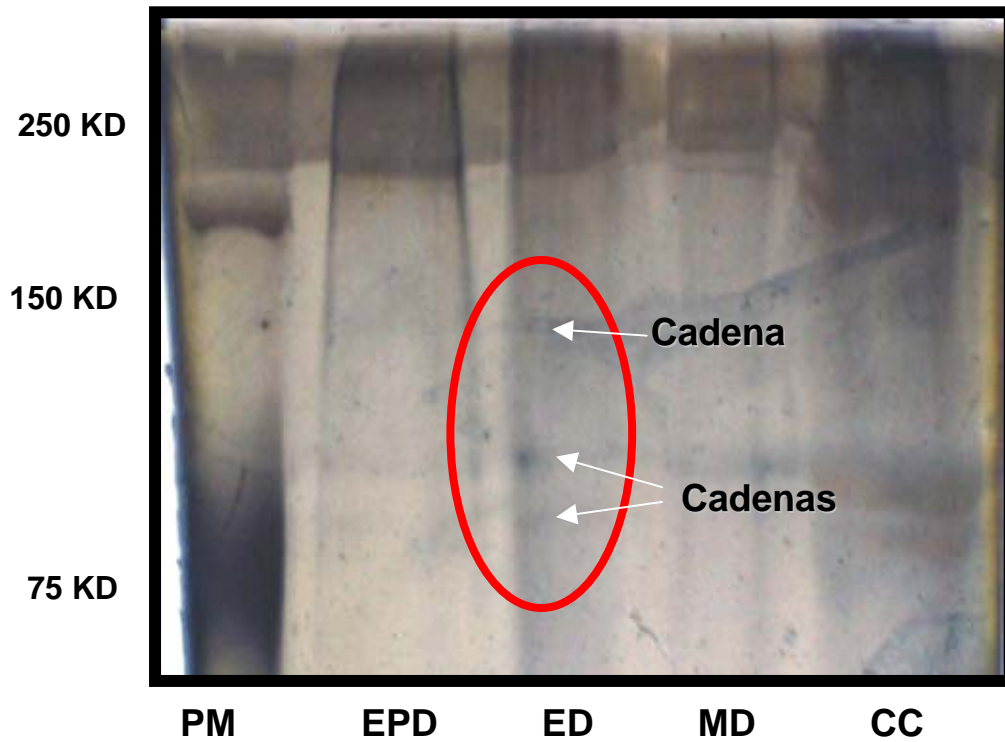


Figura. 6 Electroforesis de proteínas. Gel teñido con tinción de plata. Columnas: PM (peso molecular), EPD (extracto pre descalcificación), ED (extracto descalcificado), MD (medio de descalcificación), CC (colágena comercial). En la columna ED se aprecian bandas análogas a la colágena comercial.

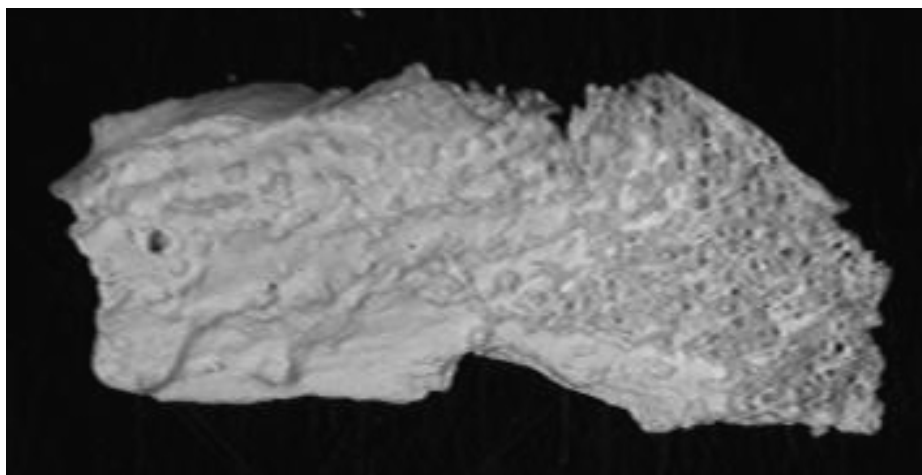


Figura 7. Fotografía del andamio. Hueso homólogo acelular obtenido luego del proceso de esterilización.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Knight, M., Evans, G. Tissue Engineering: Progress and Challenges. *Plast. Reconstr. Surg.* 114: 26e, 2004.
- ² Wu, W., Chen, F., Feng, X., Liu, Y., Mao, T., Engineering Cartilage Tissues with the Shape of Human Nasal Alar by Using Chondrocyte Macroaggregate—Experiment study in rabbit model, *J. Biotechnol.* (2007), doi:10.1016/j.jbiotec.2007.02.029 (electronic)
- ³ Wu, W., Feng, X., Mao, T., Feng, X., Ouyang, H., Zhao, G., Chen, F., Engineering of Human Tracheal Tissue with Collagen-Enforced Poly-Lactic-Glycolic Acid Non-Woven Mesh: A Preliminary Study in Nude Mice, *Br J Oral Maxillofac Surg* (2006), doi:10.1016/j.bjoms.2006.09.004 (electronic)
- ⁴ Shieh, S., Vacanti, J. State-of-the-art tissue engineering: From Tissue Engineering to Organ Building. *Surgery* 137: 1-7, 2005
- ⁵ Yang, S., Leona, K., Du, Z., Chua C. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Eng.* 7, 679, 2001
- ⁶ Buasaina, D., Hunt, E., Boland, T. Rapid Prototyping of Tissue-Engineering Constructs, Using Photopolymerizable Hydrogels and Stereolithography. *Tissue Eng.* 10, 1316, 2004.
- ⁷ Hodde, J. Naturally Occurring Scaffolds for Soft Tissue Repair and Regeneration. *Tissue Eng.* 8, 295, 2002.
- ⁸ Grim, M., Williams, J. Measurements of Permeability in Human Calcaneal Trabecular Bone. *J. Biomechan.* 7, 743, 1997.
- ⁹ Shihong Li, Joost R. de Winji, Jiaping Li, Pierre Layrolle and Klaas de Groot. Macroporous Biphasic Calcium Phosphate Scaffold with High Permeability/Porosity Ratio. *Tissue Eng.* 9, 3, 2003.
- ¹⁰ León D. Bioingeniería ósea en defectos craneales en el modelo animal: un estudio experimental. Tesis para obtener el título de Subespecialista en Cirugía Plástica y Reconstructiva. UNAM 2004
- ¹¹ Kostiac, P. The evolution of quality systems in human bone banking: The U.S. experience. *Cell and Tissue Banking* 1, 155, 2000.
- ¹² Heyligers, I., Klein-Nulend, J. Detection of living cells in non-processed but deep-frozen bone allografts. *Cell and Tissue Banking.* 6, 25, 2005.
- ¹³ Shimizu, k., Masumi, S., Yano, H., Fukunaga, T., Ikebe, S., Shin, S. Revascularization and new bone formation in heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg.* 119, 57, 1999.

-
- ¹⁴ Malarda, O., Guicheux, J., Boulera J., et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. *Bone* 36, 323, 2005.
- ¹⁵ Shin, S., Yano, H., Fukunaga, T., Ikebe, S., Shimizu, K., Kaku, N., Nagatomi, H., Masumi, S. Biomechanical properties of heat-treated bone grafts. *Arch Orthop Trauma Surg.* 125, 1, 2005.
- ¹⁶ Kuhls, R., Werner-Rustner, M., Kuchler I., Soost, F. Human demineralised bone matrix as a bone substitute for reconstruction of cystic defects of the lower jaw. *Cell and Tissue Banking* 2: 143–153, 2001.
- ¹⁷ Wang, X., Bank, R., Tekoppele, J., Agrawal, M. The roll of collagen in determining bone mechanical properties. *Journal of Orthopedic Research* 19: 1021-1026, 2001.