



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR DE
ANDAMIOS DE ALGINATO EN TEJIDO SUBCUTÁNEO
DE RATA WISTAR, PARA SU POSIBLE USO EN
TRATAMIENTOS PREPROTÉSICOS.**

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:

JUAN ANTONIO SANTOS BAUTISTA

TUTORA: Dra. JANETH SERRANO BELLO

MÉXICO, Cd. Mx.

2018



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.



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.

**Gracias al apoyo del proyecto
UNAM- DGAPA-PAPIIT-IA205818
para poder realizar este trabajo.**

Le agradezco a mis padres Araceli Bautista Vanegas y Juan de Dios Santos González por formarme de valores, por enseñarme la importancia del trabajo, por darme el ejemplo que se puede salir adelante a pesar de las adversidades, por impulsarme a ser mejor cada día, por apoyarme en cada uno de mis triunfos, y en especial, a ti mamá por nunca dejarme derrotar y ser un ejemplo de fuerza, por darme las herramientas para ser y lograr lo que me he propuesto y apoyar mis decisiones. A mi hermano Brayan por ayudarme y soportarme en mis momentos difíciles.

A mis abuelos Gloria y Sergio por ser pilares en mi vida y fungir como padres cuando lo necesite, por todo su apoyo, cariño y comprensión.

A Belen por ser mi compañera y confidente durante toda esta etapa, me impulsas y me haces descubrir la mejor versión de mí.

A mis tíos y primos por apoyarme durante este proceso y servirme de ejemplo para construir mi camino.

A mis amigos por ser y estar a lo largo de los años, por regalarme momentos especiales, únicos y hacer que todo este proceso fuera más divertido.

A la Dra. Janeth Serrano Bello, por su paciencia y compromiso con este trabajo, por ser guía para que esto pudiera llevarse a cabo y un reconocimiento por su labor docente y por impulsar a los estudiantes hacia la investigación.

Agradezco las facilidades prestadas a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, UNAM, en especial al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, a la Unidad de Bioterio y al laboratorio de Patología Experimental.

A la Facultad de Odontología y a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formarme dentro de sus aulas y gozar del privilegio que resulta ser un egresado de esta institución.

Gracias a Dios por todo lo conseguido.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	7
2.1 Defecto óseo en prótesis dental	7
2.2 Tratamiento de defectos óseos	7
2.2.1 Clasificación de injertos	9
2.3 Bioingeniería de tejidos	11
2.4 Andamios.....	15
2.5 Alginato.....	17
2.6 Andamios entrecruzados	19
2.7 Aplicación biomédica de los andamios de alginato.....	20
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV. JUSTIFICACIÓN.....	24
V. HIPÓTESIS	25
VI. OBJETIVOS.....	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos específicos.....	26
VII. METODOLOGÍA	27
7.1 Tipo de estudio	30
7.2 Criterios de inclusión.....	31
7.3 Criterios de exclusión.....	31
7.4 Variables de estudio	31
7.5 Recursos (humanos, materiales y financieros)	32
VIII.RESULTADOS.....	33
IX. DISCUSIÓN	38
X. CONCLUSIONES	40
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad es común encontrar en la práctica odontológica pacientes con pérdida ósea, ya sea debido a un proceso natural de reabsorción tras la pérdida de dientes, asociado a alguna enfermedad sistémica, inflamatoria, genética o traumatismos.

Mantener la integridad y el contorno del reborde óseo es un aspecto relevante para la rehabilitación protésica, debido a eso, la pérdida de hueso dificulta la rehabilitación, y aunque existen diversos tratamientos, no existe ninguno que garantice recuperar el tejido, ya que los resultados que ofrecen son impredecibles o deficientes. Por este motivo se mantiene en constante búsqueda nuevas alternativas de tratamiento, buscando su biocompatibilidad, reabsorción e inducción para la recuperación de tejidos y lograr así una rehabilitación protésica exitosa.

Hoy en día la ingeniería de tejidos aplica principios de la medicina regenerativa combinando diversas especialidades médicas con el fin de restablecer la función de diferentes órganos, regenerar su estructura tridimensional original, los tipos celulares, los nutrientes de sostén y los factores de crecimiento, permitiendo el crecimiento, diferenciación y función celular.

Uno de los avances tecnológicos que han tomado importancia en la ingeniería de tejidos es la fabricación de andamios poliméricos utilizados como análogos de matriz extracelular, dichas estructuras deben cumplir con ciertos requisitos, es decir, deben ser tridimensionales, porosos, biocompatibles y biodegradables.

En el presente trabajo de investigación se analiza la respuesta histológica que se obtuvo posterior a la colocación de andamios de alginato y andamios de alginato entrecruzado en tejido celular subcutáneo de ratas Wistar, con la finalidad de analizar su biocompatibilidad para su posible uso en tratamiento preprotésicos.

II. ANTECEDENTES

2.1 Defecto óseo en prótesis dental

Un factor de importancia en el área odontológica es contar con un reborde alveolar de tamaño adecuado para lograr el éxito en la rehabilitación protésica tradicional o mediante implantes, de no ser así se tendría que recurrir a tratamientos quirúrgicos para corregir la ausencia de estos tejidos, aumentando el tiempo del tratamiento y el costo.¹

En odontología un defecto óseo es una alteración en las características morfológicas del hueso, que oscilan desde recesiones que miden milímetros hasta la resección completa de la mandíbula.

Una de las principales causas de pérdida ósea se debe a la periodontitis. Esta es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta al conjunto de tejidos que rodea a los dientes, es provocada por bacterias que se alojan en la placa dental, produciendo una respuesta inflamatoria. En individuos susceptibles inducirá a la destrucción del ligamento periodontal y del hueso circundante, produciendo la formación de bolsas periodontales o lesiones que pueden ir desde frenestraciones o dehiscencias hasta la pérdida por completo del soporte óseo, provocando la pérdida del órgano dentario. Su prevalencia aumenta gradualmente con la edad.²⁻⁴

2.2 Tratamiento de defectos óseos

La regeneración periodontal, tiene como objetivo reconstruir los tejidos periodontales que se han perdido por enfermedad, por tanto, primero se debe controlar la causa y la patogenia del proceso destructivo, obteniendo así una

situación clínica más favorable para que los tejidos del periodonto puedan regenerarse a su máximo potencial.

La cicatrización tras una cirugía en la mucosa oral, incluyen una serie de procesos biológicos controlados, comenzando con la quimioatracción de células y terminando con la formación y maduración de una nueva matriz extracelular. Esta matriz, se encargará de conectar los márgenes de la herida, aportando células, vascularización, y restaurando finalmente la zona.⁵

- **Terapias regenerativas periodontales**

Estudios tempranos observaron que el relleno óseo era posible con tratamiento de raspado y alisado radicular y un seguimiento muy estricto de la higiene.

Prichard en 1957 fue el primer autor que le dio importancia al tratamiento del defecto de una bolsa infraósea, y a la importancia de su cuidadoso desbridamiento. Describe qué si queda algún espacio vacío durante el desbridamiento, este se rellenará con células epiteliales y fibroblastos, generando un tejido fibroepitelial, el cual se adherirá a la superficie radicular. Por tanto, no permitirá que células óseas y del ligamento periodontal lleguen a ocupar un lugar dentro del defecto, por lo que este persistirá. Por último, menciona que la regeneración ósea tiene un objetivo claro y previsible del tratamiento, siempre y cuando se realice con una cuidadosa selección de los casos según la morfología ósea del defecto.⁵⁻⁷

- **Injertos y sustitutos óseos**

Durante muchos años la atención de los investigadores se centró en la regeneración ósea, pensaban que la formación de nuevo hueso induciría la formación de nuevo cemento y ligamento periodontal.

Bajo esta premisa se han empleado diferentes tipos de injertos óseos y de otros materiales, que de acuerdo con su origen se han clasificado en autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos.^{5, 8}

2.2.1 Clasificación de injertos

Se han investigado diferentes técnicas para la restauración de los defectos óseos periodontales y se clasifican clasificado según el sitio de obtención. El material que se obtiene del mismo individuo se llama autoinjerto, el de un individuo diferente de la misma especie aloinjerto y de otras especies xenoinjerto.^{6,9}

Los materiales que se utilizan para injertos óseos se valoran de acuerdo con su potencial osteogénico, osteoinductivo y osteoconductor.⁶

- **Injertos óseos autógenos:**

Son injertos transferidos de una zona a otra dentro del mismo paciente. Este tipo de injertos puede ser de hueso cortical, hueso esponjoso y médula. Los sitios utilizados pueden ser extrabucales o intrabucales. Este tipo de injertos se caracterizan por que pueden conservar algunas células viables y las cuales promueven la cicatrización ósea a través de la osteogénesis y la osteoconducción. Otras de las ventajas es que se absorben de manera gradual y son reemplazados por hueso viable.

Entre las zonas más comunes dentro de boca de donde se obtiene el injerto se encuentran: zonas edéntulas de maxilares, área retromolar inferior, borde anterior de la rama de la mandíbula, tuberosidad del maxilar, torus, mentón y alvéolos postextracción.^{6,9,10}

En el caso específico de los defectos óseos el que más se utiliza es el injerto del hueso extraído de los alvéolos postextracción mezclándolo con sangre formando una masa que se pueda modelar y colocar más fácilmente sobre el defecto (figura 1).¹⁰



Figura 1 Se muestran partículas de hueso mezclando con sangre llamado coagulo óseo, listo para realizar el injerto.

- **Injertos óseos alógenos:**

Ante la necesidad de cubrir la mayor cantidad de defectos óseos o de gran tamaño y contar con suficiente hueso sin causar trauma quirúrgico en otra parte del cuerpo del paciente, se desarrollaron los injertos homólogos. Se trata de partículas de tejidos tomadas del hueso cortical, antes de transcurridas las 12 horas de muerte del donante. Estos ofrecen el mismo potencial de reparación que los autoinjertos. Sin embargo, al tratarse de cuerpos extraños pueden provocar una respuesta inmune. Es por eso que se han realizado intentos para suprimir el potencial antigénico de este tipo de injertos.^{6,10}

El hueso alogénico se trata de tres diferentes formas: pasteurizado, autoclavado y congelado. El injerto alogénico tiene rápida osteoinducción, formando puentes sobre el defecto óseo formando tejido nuevo.

- **Injertos heterógenos o xenoinjertos:**

Son materiales de relleno óseo derivados de una especie distinta. Actualmente hay dos formas de obtenerlos: el hueso de bovino y el coral natural, de ambos se obtiene un material similar al hueso que actúan como osteoconductivos.¹⁰

A pesar de que este tipo de injertos se emplean con cotidianidad, suelen presentar problemas y limitantes, por ejemplo, si se considera que este tipo de injertos son avasculares y dependientes de la lesión, el tamaño del defecto y la condición del lecho del huésped pueden limitar su aplicación. Además, el nuevo mantenimiento del volumen óseo resulta en ocasiones complicado debido a la resorción ósea impredecible. En defectos grandes, los injertos suelen ser reabsorbidos por el cuerpo antes de que se complete la osteogénesis.

Por tanto, además de ser procedimientos costosos, el uso de autoinjertos se relaciona con los escasos de donantes y la morbilidad del sitio donante, los aloinjertos y xenoinjertos tienen el riesgo de transmitir enfermedades dañinas pudiendo desencadenar respuestas autoinmunes indeseables.^{11,12}

Es por eso que hoy en día la investigación busca nuevas alternativas para desarrollar nuevos materiales con la finalidad de eliminar los inconvenientes antes mencionados.

2.3 Bioingeniería de tejidos

En la década de los 80s, cuando por diferentes causas existía pérdida de tejido ya sea parcial o total, se trataban con dispositivos metálicos y materiales de relleno con el objetivo de desarrollar sustitutos biológicos que restablezcan o mantengan la función de los tejidos dañados. Esto dio lugar a lo que se conoce en la actualidad como ingeniería de tejidos.¹³

El término de ingeniería de tejidos fue utilizado por primera vez durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias en 1987. Esta disciplina aplica principios de medicina regenerativa en conjunto con diversas especialidades médicas para restablecer la función de los órganos combinando células con

biomateriales, y es que a diferencia de la medicina regenerativa que induce el crecimiento de tejido *in vivo*, la Ingeniería tisular trabaja en el desarrollo de tejidos *in vitro*, permitiendo así contar con sistemas empleados en medicina fisiológicamente eficaces y mecánicamente funcionales. Debido a esto el objetivo primordial de la ingeniería de tejidos se enfoca en fabricar dispositivos que sean compatibles con las propiedades físicas y biológicas de los tejidos naturales para así regenerar, reparar o reemplazar de manera bioartificial tejidos y órganos del cuerpo humano, es decir, pretende regenerar la estructura tridimensional original de los órgano, los tipos de células, los nutrientes de sostén y factores de crecimiento, haciendo posible el crecimiento, diferenciación y función celular superando las limitaciones de tratamientos convencionales basados en el trasplante de órganos y los injertos ya mencionados.

Se basa en la tríada de ingeniería de tejidos, que se derivó de los tres componentes principales de los tejidos: células, matriz extracelular y un sistema de señalización (figura 2).^{2, 13-15}

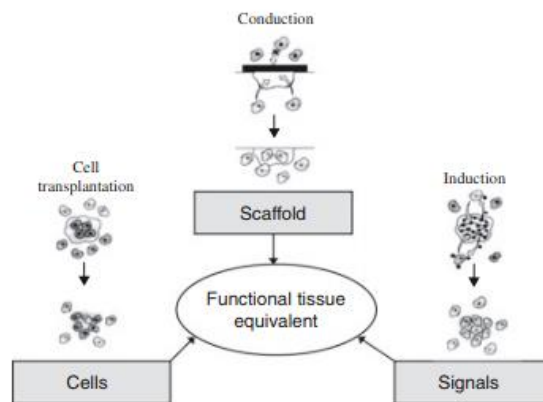


Figura 2 La tríada de ingeniería tisular. Los tres componentes principales del diseño en la ingeniería de tejidos se basan en los tres componentes principales de los tejidos: las células, su matriz extracelular (andamios) y un sistema de señalización.

- **Células:** Las células más cercanas a la lesión pueden restaurar el defecto por la posibilidad que tiene una célula de diferenciarse, es decir, perder sus características originales y adquirir nuevas propiedades. Por otra parte, las células que participan en la construcción de un nuevo tejido, deben ser aquellas células que tengan la capacidad de auto-renovarse y de originar células hijas destinadas a la diferenciación terminal. Una vez que se diferenciaron en el medio se disminuye la respuesta inmunológica.^{2,16}
- **Matriz extracelular:** La matriz extracelular se encuentra entre los espacios intercelulares proporcionando a las células un soporte de adhesión para poder crecer, diferenciarse y migrar. Debido a esto es necesario crear un sustrato ideal para el desarrollo y diferenciación celular, es decir, una matriz extracelular artificial para formar los nuevos tejidos con la estructura y función adecuada,^{2,13,17} en la figura 3 se puede observar cómo se da la interacción célula-matriz.

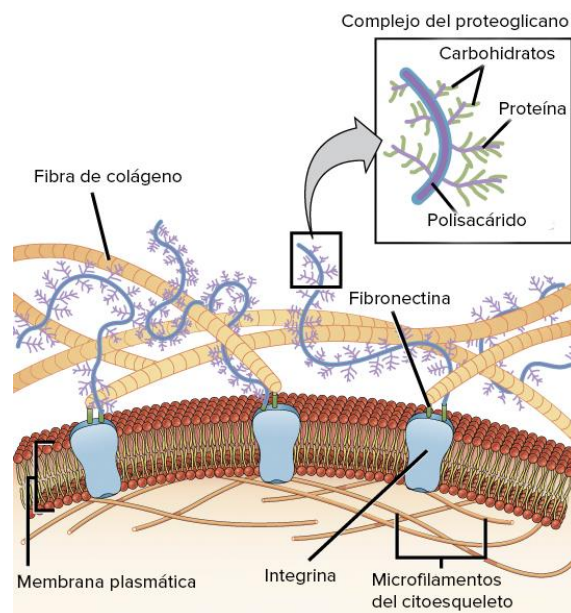


Figura 3 Interacción de la matriz celular. La matriz extracelular es una red tridimensional que se organiza en el exterior celular justamente por encima de la membrana plasmática de la célula. Está formada principalmente por colágeno, laminina, fibronectina e integrina.¹⁸

- **Agente bioactivo:** Las señales bioactivas, como los péptidos de adhesión celular y factores de crecimiento, se pueden añadir junto con las células ayudando a regular la función. La implantación de dichos factores en un defecto óseo y la liberación controlada del factor, deberían promover la proliferación y la diferenciación de las células madre osteogénicas dentro de la herida, acelerando el proceso de reparación.^{2,20} Figura 4

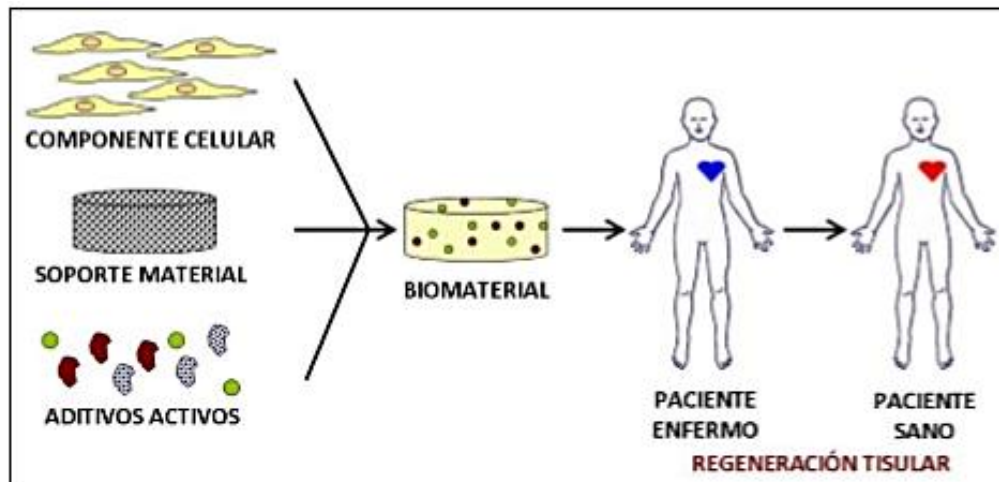


Figura 4 Esquema de los principales componentes en los que se basa la ingeniería tisular: Células, soporte y aditivos. “Mediante la combinación de un soporte las células pueden disponer de una base donde crecer y proliferar hasta la formación de un tejido gracias a la ayuda de aditivos complementarios que sustituyen las biomoléculas involucradas en el desarrollo tisular fisiológico.¹⁷

El uso adecuado de los principios de ingeniería de tejidos ofrece la posibilidad de regenerar o desarrollar tejidos orales y craneofaciales de nuevo. La tendencia en la actualidad para la regeneración de tejidos se enfoca en implantar andamios tridimensionales.⁴

Los biomateriales gracias a su tasa de degradación, porosidad, interconectividad, morfología y propiedades de manejo los han convertido en materiales atractivos para el desarrollo de una gran cantidad de "andamios" como análogos de matriz extracelular las cuales son capaces de soportar la

unión celular (conducción) y, en algunos casos, proporcionar las señales necesarias para el desarrollo controlado (inducción).^{20, 21}

Los biopolímeros tienen la capacidad de generar matrices extracelulares, especialmente los derivados de plantas debido a que la velocidad de degradación es más rápida y las aplicaciones mecánicas de pueden adaptar para la restauración funcional de los tejidos dañados.²²

2.4 Andamios

Los andamios en ingeniería de tejidos funcionan como estructuras tridimensionales que proporcionan un entorno temporal ayudando a la célula a infiltrarse, adherirse, proliferar y diferenciarse, actuando como sustituto de la matriz extracelular, controlando los estímulos mecánicos que reciben las células. Su empleo principal es estimular y dirigir el crecimiento celular ya sea sembrando células en su interior o con un biomaterial que estimule dicho crecimiento.^{1,15,23,24}

La osteoconducción es un efecto físico en que la matriz del injerto forma un andamio que favorece la penetración de células externas al injerto y a la formación de hueso nuevo. Los andamios celulares proporcionan un esqueleto inicial y retienen a las células en el área defectuosa, permitiendo así el crecimiento celular. Conforme va secretando matriz extracelular y la posterior formación del tejido, se produce simultáneamente la degradación del andamio. A largo plazo, se regenera una matriz extracelular funcional y tejido, los cuales se encuentran despojados de cualquier andamio residual. Además, se utilizan para liberar factores de crecimiento o antibióticos localmente y mejorar el crecimiento óseo tratando en defectos óseos e incluso ayudar a la curación de heridas.^{6,23,25,26}

La ventaja de este enfoque es la cantidad reducida de operaciones necesarias, lo que resulta en un tiempo de recuperación más corto para el paciente. Frente a un complejo sistema biológico y sensible como el cuerpo humano.²⁵

Un material para la fabricación de andamios requiere contar con ciertas propiedades dentro de las cuales se incluyen:

- Biocompatibilidad: el material no debe provocar una respuesta inflamatoria, ni demostrar inmunogenicidad o citotoxicidad.
- Sus propiedades mecánicas deben ser suficientes y no colapsar durante la manipulación y durante las actividades normales del paciente.
- Deben esterilizarse fácilmente para prevenir la infección.

Deben contar con una porosidad interconectada permitiendo el crecimiento de las células en la forma deseada y que soporten la vascularización del tejido. Se sabe que una porosidad típica del 90% así como un diámetro de poro de al menos 100 mm son obligatorios para la penetración celular y una adecuada vascularización del tejido.^{9,11,23,25}

Hay dos tipos de polímeros biodegradables: los materiales naturales, incluidos los polisacáridos (almidón, alginato, quitina/quitosano, derivados del ácido hialurónico, etc.) o las proteínas (soya, colágeno, geles de fibrina, seda, etc.).

²⁵

Los polímeros que se derivan de una fuente natural son biocompatibles y se conforman de una red polimérica que puede contener hasta un 99% o más de agua. Como resultado, se les ha denominado hidrogeles, y su capacidad de hinchamiento en agua les permite exhibir un ambiente que se asemeja al estado altamente hidratado de los tejidos naturales, es por eso que el alginato es un buen candidato para ser utilizado como un andamio en bioingeniería de tejidos.¹¹

2.5 Alginato

El alginato es un polisacárido aniónico e hidrofílico de origen natural, es el polímero marino más abundante en el mundo y se deriva principalmente de algas pardas y bacterias. Las principales fuentes de alginato se encuentran en las paredes celulares y en los espacios intracelulares de las algas pardas, proporcionando a la planta flexibilidad y resistencia.^{15,23}

Los primeros estudios científicos sobre la extracción de alginato de las algas pardas fueron realizados por el químico británico E.C. Stanford, quien descubrió que la sustancia extraída poseía distintas propiedades, incluyendo la capacidad de espesar soluciones, hacer geles o formar películas.¹⁵

La estructura química del alginato contiene bloques de ácido D-manurónico (M) unido a β - (1-4) y restos de ácido L-gulurónico (G) ligados a α (1-4), los cuales se asemejan en estructura a los glucosaminoglucanos (GAG), uno de los principales componentes de la matriz extracelular en el tejido humano. Se cree que los bloques G de alginato participan en la reticulación intermolecular con cationes divalentes (por ejemplo, Ca^{2+}) para formar hidrogeles, gracias a esto el alginato presenta una variedad de aplicaciones en la industria, incluidos los alimentos y productos farmacéuticos (figura 5).^{15,22,23,27}

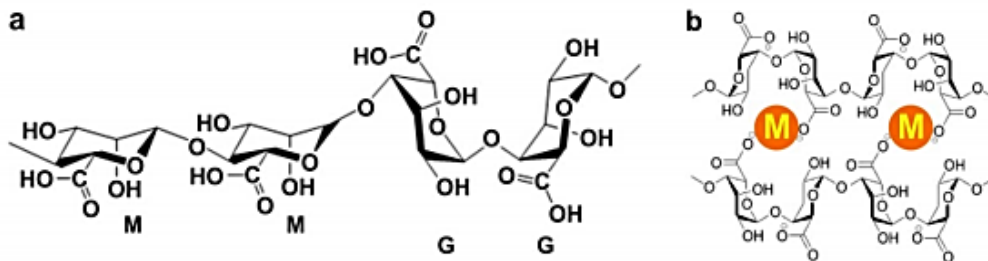


Figura 5 a) estructura química del alginato. b) mecanismo de interacción iónica entre el alginato y cationes divalentes.

Debido a que posee excelentes propiedades en términos de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no antigenicidad y capacidad de quelación, el alginato es de fácil procesado para materiales de andamiaje tridimensionales como: hidrogeles, microesferas, microcápsulas, esponjas, espumas y fibras. Ha sido ampliamente utilizado en una variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo la regeneración de piel, cartílago, hueso, hígado, y tejido cardíaco. incluida la entrega de medicamentos y en algunas formulaciones previniendo el reflujo gástrico. ^{15,22,23,28,29}

La rigidez, es una propiedad de importancia para su aplicación en ingeniería de tejidos. En la mayoría de los casos, es preferible tener el material cerca del tejido diana para evitar posibles efectos contra el estrés y mantener suficiente soporte mecánico durante el crecimiento celular in vitro o in vivo y los procesos de remodelación tisular. ^{15,22,23}

La viscosidad aumenta a medida que el pH disminuye, y alcanza un máximo de pH 3-3.5, a medida que los grupos carboxilato en la cadena principal de alginato se protonan y forman enlaces de hidrógeno. El aumento del peso molecular del alginato puede mejorar las propiedades físicas de los geles. Sin embargo, una solución de alginato formada a partir de un polímero de alto peso molecular se vuelve muy viscosa, lo que a menudo es indeseable en el procesamiento. ^{22,29}

El alginato se puede modificar fácilmente a través de reacciones químicas y físicas para obtener derivados. es decir, varias estructuras, propiedades, funciones y aplicaciones. La estructura y propiedades tales como biodegradabilidad, resistencia mecánica, propiedad de gelificación y afinidad celular puede lograrse mediante la combinación con otros biomateriales, tales como péptidos y moléculas de azúcar o reticulación física o química.²¹

2.6 Andamios entrecruzados

Cada polímero natural tiene sus características, ventajas y desventajas. Liu y Ma (2004) mencionan que los materiales compuestos muestran un excelente equilibrio entre fortalezas y debilidades, logrando mejores resultados al unir dos o más polímeros en comparación si se utilizan de forma individual, reduciendo así la posibilidad de tener características no deseadas y haciendo más efectivo el uso de combinado de ellos.¹¹

Un concepto más general es crear un injerto compuesto en el que las células se siembren en un andamio favoreciendo la adhesión celular, proliferación, diferenciación y secreción de una matriz extracelular natural promoviendo la reparación y regeneración de tejidos.¹⁵

En caso de los andamios de alginato se utilizan con otro material más débil mejorando así las propiedades mecánicas.⁴

El alginato es un ejemplo de un polímero que puede ser reticulado por interacciones iónicas. En su composición cuenta con restos de ácido manurónico y glucurónico y puede ser entrecruzados por calcio. Se cree que los cationes divalentes se unen únicamente a los bloques de guluronato, ya que la estructura de los bloques de guluronato permite un alto grado de coordinación de los iones divalentes, dando como resultado una estructura de gel. El cloruro de calcio (CaCl_2) es uno de los agentes más utilizados para entrecruzar iónicamente el alginato, esto crea una construcción más estable.
11,28,30

La temperatura también influye en la velocidad de gelificación. A temperaturas más bajas, la reactividad (p. Ej., Ca^{2+}) se reduce volviéndose más lenta. La estructura resultante tiene un orden mayor, lo que lleva a propiedades mecánicas mejoradas. Además, las propiedades mecánicas de los geles de alginato entrecruzado iónicamente pueden variar significativamente dependiendo de la estructura química del alginato.²⁹

Una desventaja de los geles de alginato entrecruzados es la limitada estabilidad a largo plazo, debido a que estos geles se pueden disolver debido a la liberación de iones divalentes en los medios donde se encuentren debido a reacciones de intercambio con cationes monovalentes. Además, los iones de calcio liberados del gel pueden promover la hemostasia, mientras que el gel sirve como matriz para la agregación de plaquetas y eritrocitos.²⁹

Se puede llevar a cabo la reticulación entre la temperatura máxima y el pH fisiológico. Por lo tanto, los geles de alginato se utilizan con frecuencia como matriz para la encapsulación de células vivas y para la liberación de proteínas. Los geles de alginato tienen ventajas para la regeneración ósea y del cartílago, en comparación con otros materiales, debido a su capacidad para introducirse en el cuerpo de una manera mínimamente invasiva, su capacidad para rellenar defectos de forma irregular y la facilidad de modificación química con ligandos de adhesión.³⁰⁻³²

2.7 Aplicación biomédica de los andamios de alginato

Cuando el hueso de los maxilares no recibe estímulos mecánicos adecuados, se produce un colapso, debido a una reabsorción ósea tanto en sentido incisivo-apical (altura) y buco-lingual (ancho). Una de las opciones para solucionar este problema es la ingeniería de tejidos y el uso de andamios.

Específicamente en el caso de odontología, se requiere para la reparación de defectos óseos causado por traumatismos o lesiones, también para recuperar la integridad ósea causada por enfermedad periodontal, lo cual permitirá restaurar las dimensiones del hueso y después poder rehabilitar mediante una prótesis dento o mucosoportada o bien utilizando implantes, que es lo más recurrido actualmente.

Una estrategia deseable para reparar el tejido óseo es inducir la osteogénesis *in situ*. Como se explicó anteriormente el alginato es una de las opciones atractivas, en la bioingeniería de tejidos, principalmente debido a su parecido con la matriz extracelular, así como su diversidad química y rendimiento biológico. Es decir, el alginato se puede formular fácilmente en matrices de andamios porosos de las diversas formas (esferas, esponjas, espumas, fibras, varillas) para el cultivo celular y la respuesta, siendo propicio para aplicaciones de medicina regenerativa.²³

Otro de los aspectos relevantes en la correcta elección del biomaterial son el sitio de implantación. Cualquier material que se implante se someterá a diferentes cambios de pH que afectan las propiedades de degradación y las mecánicas, así como el comportamiento de hinchamiento. El alginato es muy estable a largo plazo, su peso molecular influye en la velocidad de degradación y en sus propiedades mecánicas.²²

La aplicación de materiales a base de alginato se ha estudiado extensamente debido a su compatibilidad y a la aplicación en ingeniería de tejidos, dentro de las cuales se incluyen la regeneración de diversos tejidos y órganos para reparación, incluyendo la regeneración de la piel, cartílago, hueso, hígado, y tejido cardíaco.^{22,23}

Los andamios de alginato para la regeneración de hueso deben tener una estructura altamente porosa e interconectada para garantizar un entorno biológico propicio para la unión y proliferación celular, sirven como un esqueleto temporal para acomodar y estimular el crecimiento de nuevos tejidos, además de proporcionar el paso del flujo de nutrientes. También deberán tener suficiente resistencia mecánica para soportar la regeneración del tejido óseo en el sitio de implantación y mantener una integridad suficiente durante el crecimiento celular tanto *in vitro* como *in vivo*.^{15,23}

Los andamios de alginato permiten la vascularización y poca respuesta inflamatoria, por tanto, este tipo de material proporciona propiedades apropiadas como potenciales portadores de células y fármacos para la regeneración tisular.²³

Los hidrogeles de alginato no modificados soportaron la diferenciación de osteoblastos mejor que los hidrogeles de Hidroxiapatita, lo que sugiere que los alginatos son adecuados para aplicaciones de biomateriales en el tejido óseo. El nivel de formación de hueso nuevo y la vascularización en los implantes de andamios de hueso se considera un factor crítico para la aplicación clínica.

Otra de las aplicaciones del alginato en la medicina es que funciona como vehículo de entrega de moléculas bioactivas.^{11,23}

Los alginatos ya no son solo productos de bajo costo para aplicaciones técnicas, sino que se han expandido rápidamente en el campo biomédico y se han agregado significativamente a la caja de herramientas de biomateriales y científicos de ingeniería de tejidos.¹⁵

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falla en tejidos u órganos humanos causados por defectos óseos, lesiones u otro tipo de daño, representan uno de los problemas más devastadores y costosos en la atención de la salud, añadiendo que los tejidos para injertos que existen en la actualidad no presentan todas las funciones del tejido nativo y pueden presentar complicaciones en el sitio donante, es por eso que se buscan nuevas técnicas que permitan recuperar la estructura y función de los tejidos. ³³

En prótesis dental es fundamental contar con un reborde alveolar adecuado para tener éxito en la rehabilitación protésica convencional o mediante implantes. En pacientes edéntulos se produce una pérdida progresiva de hueso, provocando cambios que conducen a la reabsorción casi total del hueso, lo cual dificulta o impide la colocación de implantes para la posterior rehabilitación protésica.

IV. JUSTIFICACIÓN

La comunidad científica en su interés por resolver este tipo de problemas junto con otras disciplinas ha logrado impulsar el campo de la ingeniería de tejidos. La ingeniería de tejidos aplica principios de la medicina regenerativa, y surge como una alternativa a los enfoques quirúrgicos clásicos, utilizando matriz extracelular, biomateriales, andamios celulares y factores de señalización, para el desarrollo de estructuras biológicas, con el propósito de regenerar grandes defectos óseos con replicación exacta de los contornos normales del tejido.

En el área de la odontología, no se ha logrado obtener un biomaterial con el cual se garantice la regeneración estructural y funcional del tejido óseo, por tal motivo es de suma importancia buscar nuevas estrategias de tratamiento, en la implementación de biomateriales los cuales cumplan con las características de biocompatibilidad, biodegradables y osteoconductividad.

V. HIPÓTESIS

Los andamios de alginato son biocompatibles en tejido celular subcutáneo de ratas *Wistar*.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Evaluar la biocompatibilidad de andamios de alginato en tejido subcutáneo de ratas *Wistar*.

6.2 Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta inflamatoria de andamios de alginato en tejido subcutáneo de ratas *Wistar* a diferentes tiempos (4, 21 y 30 días).
- Evaluar la respuesta inflamatoria de andamios de alginato entrecruzados con cloruro de calcio, en tejido subcutáneo de ratas *Wistar* a diferentes tiempos (4, 21 y 30 días).

VII. METODOLOGÍA

- **Preparación de las muestras**

Los andamios de alginato se sintetizaron en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM.

Los andamios se recortaron de manera circular con un sacabocados de 9 mm de diámetro y se esterilizaron por medio de radiación gamma en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Posteriormente para no perder la esterilidad, en una campana de flujo laminar se cortaron los andamios a la mitad, con la finalidad de entrecruzar con cloruro de calcio (CaCl_2) una de ellas de la siguiente manera:

- 1.- Preparación del CaCl_2 (1.1% peso/volumen) en agua bidestilada.
- 2.- Colocar los andamios en una caja de 24 pozos, a los cuales se les coloca el CaCl_2 hasta cubrir completamente el andamio y se deja en incubación por 7 días.
- 3.- Cambiar los andamios de caja y dejar secar en la campana de flujo laminar.

- **Modelo animal**

Para evaluar la biocompatibilidad de los andamios de alginato, se utilizaron 9 ratas macho de la cepa *Wistar*, de 250 g, las cuales se dividieron aleatoriamente en 3 grupos para su evaluación a diferentes tiempos (4, 21 y 30 días).

Los procedimientos quirúrgicos y los cuidados post operatorios de las ratas, se realizaron dentro de la Unidad de Bioterio de la División de estudios de posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología UNAM, con un

fotoperiodo de 12 horas y humedad relativa al 65% y se siguieron los parámetros del comité de ética de la Facultad de Odontología.

La alimentación y agua fue *ad libitum*.

- **Procedimiento quirúrgico**

Se seda y tranquiliza a las ratas con Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10mg/kg), por vía intramuscular, posteriormente se rasura el lomo de la rata y se coloca sobre la mesa de mayo para comenzar la cirugía. Se realiza la antisepsia sobre la piel de la rata con Yodopovidona, a continuación, se realiza una incisión de primera intención sobre la piel del animal hasta llegar a el tejido subcutáneo, con la ayuda de unas pinzas de mosco se realiza un colgajo en forma de sobre, uno del lado derecho donde se coloca la muestra de alginato puro (ALG) y otro de lado izquierdo donde se coloca la muestra de alginato entrecruzado (ALG-E). Se colocaron las muestras lo más alejadas del sitio quirúrgico para no interferir con el proceso de inflamación propio de la incisión, se afronta el colgajo con VICRYL™ 3-0 mediante puntos simples (figura 7).

Se realizo un seguimiento post quirúrgico de los animales para observar estado general, así como el aspecto de la herida.

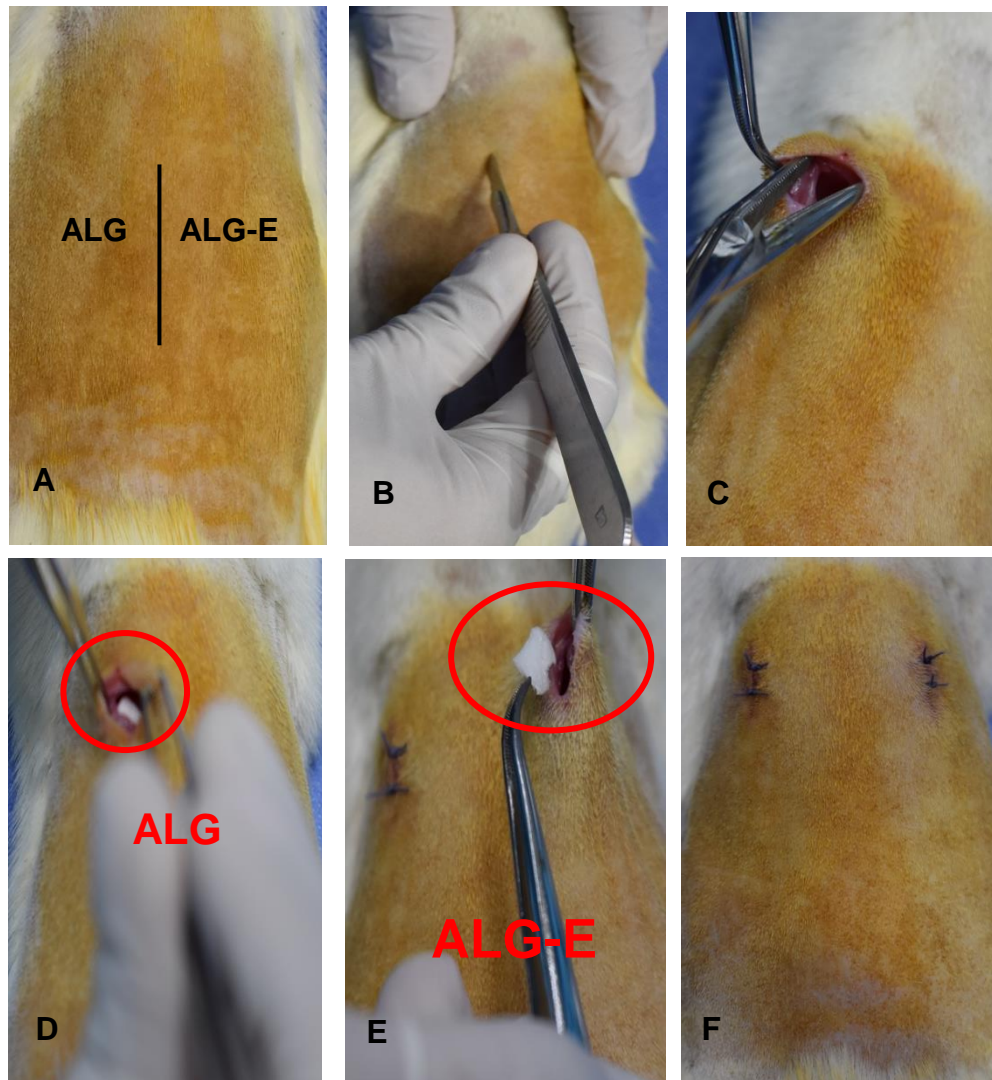


Figura 7 Procedimiento quirúrgico en ratas *Wistar*. A) Antisepsia de la zona quirúrgica y planeación de las zonas donde se colocarán los andamios. B) Incisión lineal sobre el lomo del espécimen. C) Colgajo tipo sobre donde se colocarán las muestras. D) Colocación de la muestra de ALG en tejido subcutáneo. E) Se inserta la muestra de ALG-E en tejido subcutáneo. F) El tejido se afronta con VICRYL 3-0. ^{F.D.}

- **Sacrificio de los animales**

Una vez terminados los tiempos establecidos (4, 21 y 30 días), las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de cloroformo para ocasionarles un paro respiratorio. Seguido de esto se realizó una incisión y se extrajeron las zonas donde se encontraba la muestra tanto de lado derecho como del izquierdo (figura 8). Las muestras se colocaron en una maya con su respectivo nombre y se fijaron en formol al 10% durante 24 horas.



Figura 8 Corte de tejido de piel, donde se encuentra la muestra. F.D.

- **Procesamiento histológico**

Las muestras se fijaron en formol al 10% durante 24 horas, posteriormente fueron procesadas en el Laboratorio de Patología Experimental (DEPeI) Facultad de Odontología UNAM.

Se realizaron cortes de 5 micras de grosor y tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para su evaluación en el microscopio óptico.

7.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio fue experimental, prospectivo y longitudinal.

7.2 Criterios de inclusión

- Andamios de Alginato sintetizados y cortados bajo las mismas condiciones.
- Andamios de alginato entrecruzados con cloruro de calcio.
- Ratas Macho sanas, cepa *Wistar* de 250 g.

7.3 Criterios de exclusión

- Muestras que no sean sintetizadas bajo la misma técnica y no cumplan con el tamaño establecido.
- Ratas enfermas, que no cumplan con el peso, que no sean de la cepa establecida y hembras.

7.4 Variables de estudio

- **Variable dependiente**
 - Respuesta histológica en los diferentes tiempos.
- **Variable independiente**
 - Andamios de alginato
 - Andamios de alginato entrecruzados con cloruro de calcio.

7.5 Recursos

- **Recursos humanos**
 - Juan Antonio Santos Bautista (Alumno).
 - Dra. Janeth Serrano Bello (Tutora de la tesina).
 - Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez (Asesor en técnicas de procesamiento de andamio).
- **Recursos materiales e Infraestructura**
 - Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología UNAM.
 - Unidad de Bioterio, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología UNAM.
 - Laboratorio de Patología Experimental División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Odontología UNAM.
- **Recursos financieros**
 - Proyecto UNAM PAPIIT DEGAPA IA205818
 - Responsable Dra. Janeth Serrano Bello.

VIII. RESULTADOS

▪ Respuesta histológica a los 4 días

Posterior a los 4 días de implantación de los andamios, se observa a diferentes aumentos en los cortes histológicos teñidos con HE que en la zona correspondiente a ALG rodeado por escaso infiltrado inflamatorio linfocitario, el material forma espacios vacíos rodeados por escasos linfocitos y no es posible identificar macrófagos o células gigantes de tipo cuerpo extraño a mayor aumento (HE X 400).

En contraste con el ALG-E, se observan tejidos blandos y músculo estriado con espacios claros o vacíos rodeados por células inflamatorias, en su mayoría mononucleares y macrófagos de citoplasma espumoso con fagocitosis de material acelular basófilo que forma algunas estructuras membranosas, se observa además escasos linfocitos (He x 200) (figura 9).

▪ Respuesta histológica a los 21 días

Posterior a los 21 días de implantación del alginato en tejido celular subcutáneo, donde se colocó únicamente ALG se observa en la zona una lesión bien delimitada constituida por infiltrado inflamatorio en su mayoría por macrófagos de citoplasma amplio espumoso que rodean una zona central ópticamente vacía (HE original x 100). A mayor detalle, se pueden observar los macrófagos, algunos de ellos formando células gigantes de tipo cuerpo extraño (HE, original x200), a mayor detalle se observa la fagocitosis del material acelular basófilo con algunos linfocitos de aspecto maduro.

En comparación con las muestras donde se les colocó el ALG-E, se observan las mismas características de infiltrado inflamatorio que con el ALG, de igual

manera se observa la fagocitosis del material acelular basófilo con algunos linfocitos de aspecto maduro (figura 10).

Respuesta histológica a los 4 días

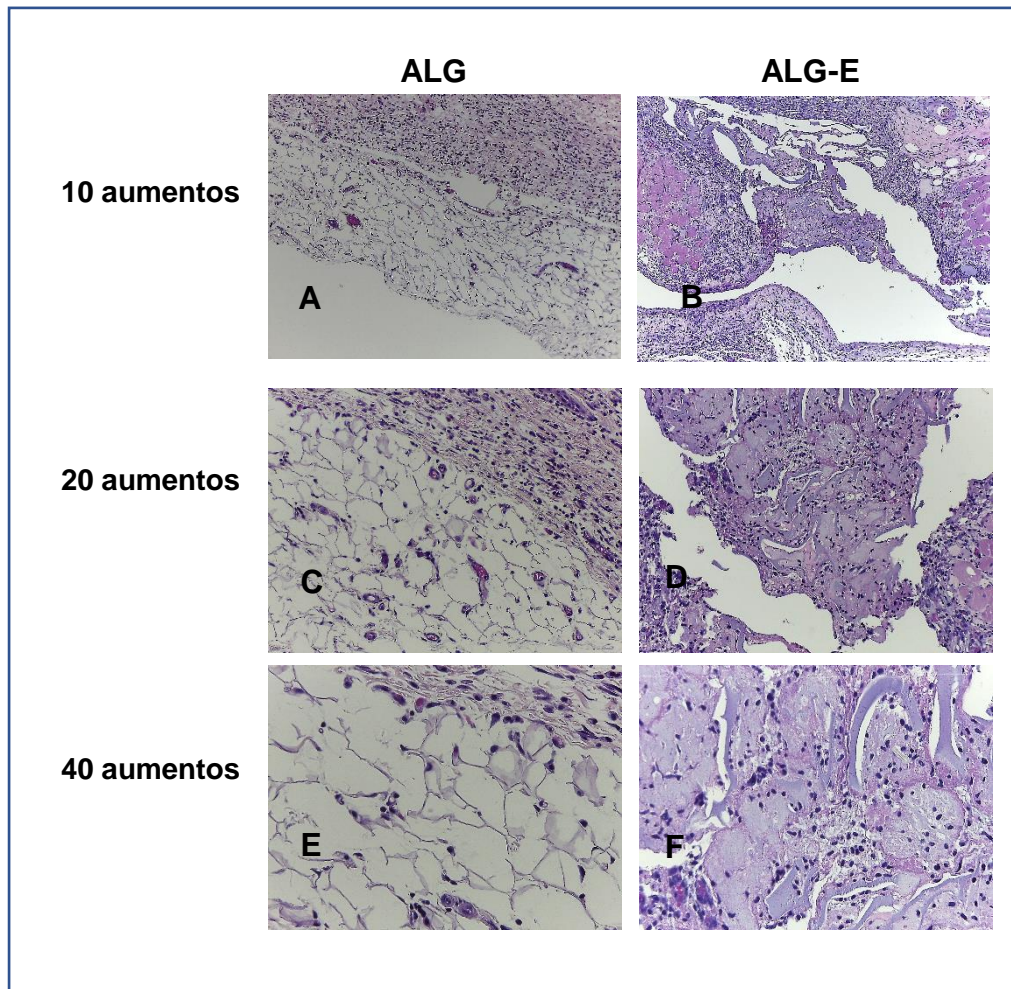


Figura 9 Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de ALG (A, C, E) y ALG-E (B, D, F), a los 4 días de implantación en el modelo animal. ^{F.D.}

Respuesta histológica a los 21 días

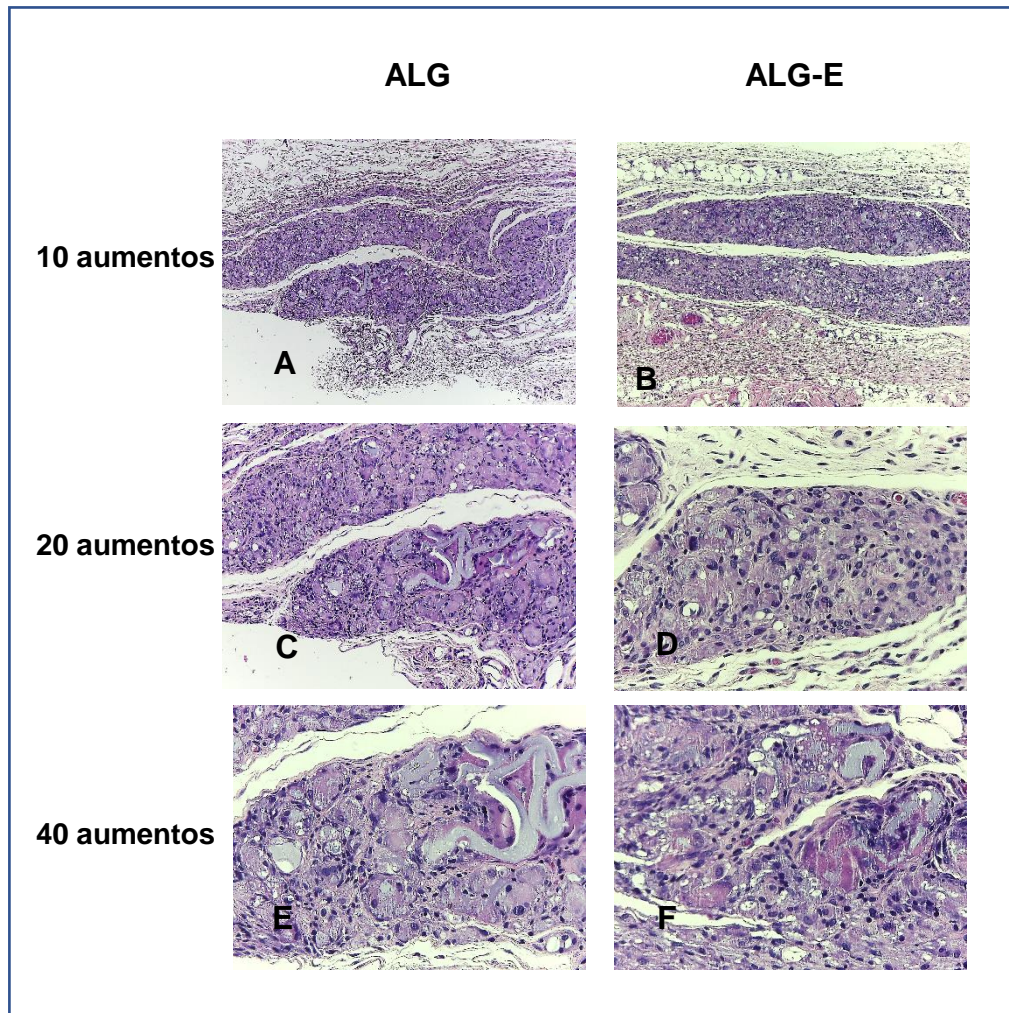


Figura 10 Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de ALG (A, C, E) y ALG-E (B, D, F), a los 21 días de implantación en el modelo animal. ^{F.D.}

- **Respuesta histológica a los 30 días**

Posterior a los 30 días de implantación de las muestras, se puede observar en los cortes histológicos teñidos con HE a diferentes aumentos en la zona que corresponde a ALG espacios vacíos indicando que hay una reabsorción del material. Alrededor del material se observa una formación de tejido conjuntivo fibroso. No se observa infiltrado inflamatorio ni células gigantes de tipo cuerpo extraño.

En las imágenes correspondientes a ALG-E se observa infiltrado inflamatorio crónico con células gigantes de tipo cuerpo extraño de manera moderada, las cuales se observa que están fagocitando el material. Alrededor de la muestra se observa la formación de una ligera capa de tejido conjuntivo (figura 11).

Respuesta histológica a los 30 días

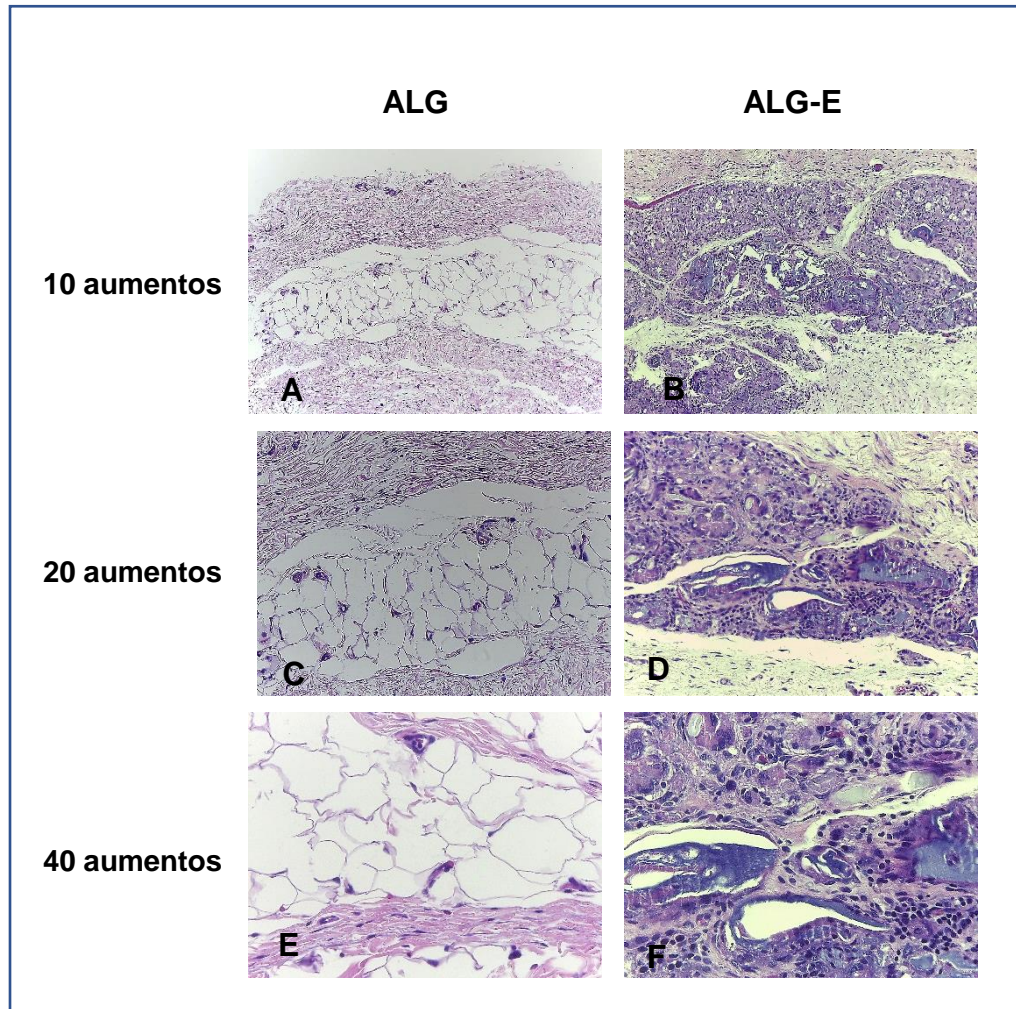


Figura 11 Fotomicrografías de muestras histológicas teñidas con HE de los andamios de ALG (A, C, E) y ALG-E (B, D, F), a los 30 días de implantación en el modelo animal. ^{F.D.}

IX. DISCUSIÓN

En el área Odontológica, no se cuenta aún con un material que garantice la regeneración estructural y funcional del tejido óseo, lo cual es de vital importancia para la rehabilitación protésica cuando se requiere restaurar algún tipo de defecto óseo o para el aumento del tejido mismo.

Debido a esto la bioingeniería de tejidos surge como una alternativa a los enfoques quirúrgicos clásicos, utilizando biomateriales que cumplan con las características de biocompatibilidad, biodegradabilidad y osteoconductividad para desarrollar estructuras biológicas que formen una matriz extracelular, con el propósito de regenerar grandes defectos óseos con replicación exacta de los contornos normales del tejido.

En el presente proyecto se implantaron en tejido celular subcutáneo andamios de alginato (ALG) y alginato entrecruzado con cloruro de calcio (ALG-E), este último siendo más resistente debido al entrecruzamiento. Con el objetivo de evaluar su biocompatibilidad, así como su degradación para aplicarlos en un futuro en lesiones de tejido óseo.

Posterior a los 4 días de implantación de los andamios la respuesta inflamatoria obtenida fue la esperada, ya que al implantar dicho material el organismo en este caso de la rata desencadena una respuesta inflamatoria. A pesar de que el alginato es considerado inmunogénico²⁹. Kuen Young Lee menciona que existe una formación de tejido de granulación alrededor del material que él utilizó y esto se pudo presentar ya que el alginato al ser de origen natural puede presentar algunas impurezas durante su fabricación como metales pesados, endotoxinas, proteínas y compuestos polifenólicos. Por otro lado, Dong Yang et al, menciona que el alginato desencadena una respuesta inflamatoria similar a la que se desencadena con el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas.³⁶

Contrastando lo anterior con nuestro trabajo el alginato que se implanto no desencadeno una respuesta inflamatoria exacerbada, a los 30 días el ALG se había degradado y únicamente se encontró evidencias de tejido cicatrizal. El ALG-E aumento la respuesta inflamatoria debido a que se encontraba entrecruzado con cloruro de calcio, haciendo al alginato más resistente. Lo que probablemente desencadeno una mayor respuesta concordando con lo que dice Jinche Sun et al, que dependiendo de las modificaciones físicas o químicas que se le haga el alginato será el tipo de respuesta²³, por lo que se sugiere probar el ALG-E en tejido óseo ya que el hueso es más resistente al igual este material.

Es importante continuar con la investigación de nuevos materiales para la regeneración de tejidos, en el caso del alginato es un material prometedor para utilizarlo en tejidos mineralizados.

X. CONCLUSIONES

Al realizar el análisis de las microfotografías se concluye que:

- El ALG se puede considerar biocompatible ya que desarrollo una ligera respuesta inflamatoria.
- El ALG es un material bioabsorbible a los 30 días ya que no se encontró evidencia del material.
- Los andamios de ALG-E se pueden considerar biocompatibles ya que va disminuyendo su respuesta inflamatoria con el tiempo.
- El ALG- E se puede considerar bioabsorbible con respecto al tiempo.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morales Navarro D. Regenerative Medicine applied in the treatment of bone defects craniofacial complex [Medicina regenerativa aplicada en el tratamiento de defectos óseos del macizo craneofacial]. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2015;52(1):63–78. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84931090297&partnerID=40&md5=ad468b947956c4e5cc70c1b24c56ca79>
2. Rosales Ibañez R, Alvarado Estrada KN, MCFO-G. Ingeniería Tisular en Odontología. Rev Adm. 2012;VOL. LXIX(4):164–7.
3. Lopez M. “ Defectos Óseos : Diagnóstico Radiográfico .” :1–12. Available from: http://www.emagister.com/uploads_courses/Comunidad_Emagister_68945_68945.pdf
4. Vargas Casillas AP, Yáñez Ocampo BR, Monteagudo Arrieta CA. Periodontología e Implantología. México, D.F.: Médica Panamericana; 2016. 199-202 p.
5. Alpiste Illueca FM, Vera PB, De Grado Cabanilles P, Fernandez VF, José F, Loscos G, et al. Regeneración periodontal en la practica clínica. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11:382–92.
6. Newman Michael G., Carranza Fermín A. THH. Carranza Periodontología Clínica. Décima Edi. McGraw-Hill Interamericana; 2010. 976-986 p.
7. Arturo CMS. Evaluación de la degradación in vitro de fibras hiladas de (PLA) y la respuesta inflamatoria en ratas Wistar, para su posible uso en regeneracion de tejidos. UNAM; 2017.
8. Pérez Borrego A, Domínguez Rodríguez L IOZ. De la terapia celular a la regeneracion periodontal. Rev haban méd La Habana. 2009;VII(4):1–12.
9. Peña-brambila FJ De, Miranda-díaz AG. Alternativas de reconstrucción de los defectos óseos mandibulares. 2016;12:99–106.

10. Romanelli H, Adams E SG. 1001 Tips en Periodoncia: Del fundamento biológico a la práctica clínica. Paso a paso. Amolca; 2012. 110-113 p.
11. Ko H-F, Sfeir C, Kumta PN. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* [Internet]. 2010;368(1917):1981–97. Available from: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2010.0009>
12. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2347–59.
13. Saucedo Acuña RA, Galicia García M, Ríos Arana JV, Reyes López SY. Corrección de defectos óseos en el área de Ingeniería tisular. *Acta Univ Univ ed Guanajuato*. 2012;22(8):26–32.
14. Atala A. 92 e Ingeniería de tejidos. 2015;1–3. capítulo electrónico
15. Venkatesan J, Nithya R, Sudha PN, Kim SK. Role of alginate in bone tissue engineering [Internet]. 1st ed. Vol. 73, *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Inc.; 2014. 45-57 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00004-4>
16. Falke G, Anthony A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch argent pediatr*. 2000;98(2):103–15.
17. Fernández BM, Máster TF De, Ndice Í. Tratamiento de defectos óseos mediante técnicas de ingeniería tisular. 2016;
18. Fernández BM, Máster TF De, Ndice Í, Atala A, Alpiste Illueca FM, Vera PB, et al. Tratamiento de defectos óseos mediante técnica de ingeniería tisular. *Biomaterials* [Internet]. 1st ed. 2012;64(4):164–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>
19. Khanacademy. La matriz extracelular y la pared celular [Internet]. [cited 2018 Mar 25]. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a->

cell/cytoskeleton-junctions-and-extracellular-structures/a/the-extracellular-matrix-and-cell-wall

20. Kretlow JD, Young S, Klouda L, Wong M, Mikos AG. Injectable Biomaterials for Regenerating Complex Craniofacial Tissues. *Current*. 2009;21(5):3368–93.
21. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: State of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil*. 2009;36(5):368–89.
22. Bhattarai N, Li Z, Edmondson D, Zhang M. Alginate-Based Nanofibrous Scaffolds: Structural, Mechanical, and Biological Properties. *Adv Mater* [Internet]. 2006;18(11):1463–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200502537>
23. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials (Basel)*. 2013;6(4):1285–309.
24. Marcos Sabino, Loaiza Marielys, Dernowsek Janaína, Rezende Rodrigo JDS. Técnicas Para La Fabricación De Andamios Poliméricos Con Aplicaciones En Ingeniería De tejidos. *Rev Lat Met*. 2017;37(2):120–46.
25. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(18):3413–31.
26. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*. 2004;25(7–8):1279–87.
27. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*. 2001;22(6):511–21.
28. Roldan Vasco, Sebastian et al. Ingeniería de tejidos y aplicaciones. [Internet]. 1st ed. Medellin: Fondo Editorial; 2016. 105-106 p. Available from: https://books.google.com.mx/books?id=e8Y3DwAAQBAJ&pg=PA105&lpg=PA105&dq=cloruro+de+calcio+alginato+andamios&source=bl&ots=3eF_ElDcBh

- &sig=JEmm1u_DydklhZ1aGk9JACmid54&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj95_VwYjaAhUF1oMKHV_BB5oQ6AEIODAG#v=onepage&q=cloruro de calcio&f=f
29. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* [Internet]. 2012;37(1):106–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
 30. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64(SUPPL.):223–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>
 31. Gacesa P. Alginates. *Carbohydr Polym*. 1988;8(3):161–82.
 32. Balakrishnan B, Joshi N, Jayakrishnan A, Banerjee R. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration [Internet]. Vol. 10, *Acta Biomaterialia*. Acta Materialia Inc.; 2014. 3650-3663 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.04.031>
 33. Orive G, Hernández RM, Garcón A, Igartúa M, Pedráz M. Ingeniería tisular: retos y realidades. *Vitae* [Internet]. 2003;10:46–51. Available from: [https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa_0.pdf](https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingeniería%20de%20Tejidos%20y%20Medicina%20Regenerativa_0.pdf)
 34. Ivanovski S, Vaquette C, Gronthos S, Hutmacher DW, Bartold PM. Multiphasic scaffolds for periodontal tissue engineering. *J Dent Res*. 2014;93(12):1212–21.
 35. INBIB. Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa. Nih [Internet]. 2013; Available from: [https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa_0.pdf](https://www.nibib.nih.gov/sites/default/files/Ingeniería%20de%20Tejidos%20y%20Medicina%20Regenerativa_0.pdf)
 36. Yang D, Jones KS. Effect of alginate on innate immune activation of macrophages. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2009;90(2):411–8.