



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MASTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

División de Estudios de Posgrado e Investigación

**“DESARROLLO DE UN ANDAMIO DESCELULARIZADO PARA
APLICACIÓN EN REGENERACIÓN DE ESTRUCTURAS
PALATINAS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS.

P R E S E N T A:

JIMENA MACOUZET GARDUÑO

Tutor:

Dr. David Mauricio Giraldo Gómez Facultad de Medicina

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO

ENERO 2022



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 las personas más importante en mi vida: mi mamá por todo su amor, apoyo, cariño, comprensión incondicional y sus enseñanzas. Te amo. A mi tía Tere; por su apoyo constante y cariño.

A mi More: por su apoyo y amor en todo momento. Te amo.

Agradecimientos

A la Dra. María Cristina Piña Barba, por su asesoría y consejos, por brindarme su apoyo y los recursos necesarios para realizar este proyecto, por su guía, confianza y paciencia.

Al Dr. David Mauricio Giraldo Gómez por su asesoría y apoyo, con su experiencia y recursos para realizar el proyecto, por su confianza y guía incondicional.

Al Dr. Marco Álvarez Pérez por su apoyo académico, confianza y guía.

A mis compañeros del laboratorio de Biomateriales del IIM de la UNAM: Ale e Israel por su amistad y su constante apoyo en el desarrollo del proyecto.

A los técnicos: por su gran trabajo y el apoyo que me brindaron siempre, sin ellos no hubiera sido posible este trabajo: A la Biol. Ivonne Sánchez, Biol. Irma López de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM, al rastro TIF #194 por su apoyo incondicional y aportaciones al proyecto. Al departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Y a todas las personas que colaboraron en algún momento en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la Dirección General de asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM a través de los proyectos con clave PAPIIT:100719 y TA200520

A la coordinación y al personal administrativo del Posgrado de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, por su apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Instituto de Investigaciones en Materiales y al Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, por darme una excelente educación profesional.

ÍNDICE GENERAL

<u>Agradecimientos</u>	3
1 <u>Abstract</u>	9
2 <u>Introducción</u>	10
3 <u>Objetivo y Metas.</u>	10
3.1 OBJETIVO	10
3.2 METAS.....	11
4 <u>Hipótesis</u>	11
5 <u>Justificación</u>	11
6 <u>Marco teórico</u>	12
6.1 TEJIDO MUSCULAR	12
6.2 MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	12
6.2.1 <i>Irrigación en el músculo esquelético.</i>	13
7 <u>Anatomía del paladar duro y velo del paladar.</u>	14
8 <u>Anatomía del paladar duro y velo del paladar.</u>	14
8.1 LABIO Y PALADAR HENDIDO	15
8.2 ETIOLOGÍA	16
8.2.1 <i>Tratamiento</i>	16
9 <u>Injertos musculares</u>	17
9.1 INGENIERÍA DE TEJIDOS.	18
9.2 MATRIZ EXTRACELULAR.....	18
9.3 COLÁGENA	20
9.4 ELASTINA.....	20
9.5 LAMININA	21
10 <u>Descelularización</u>	21
10.1 MÉTODOS DE DESCELULARIZACIÓN.	21
10.1.1 <i>Agentes físicos</i>	22
• <i>Perfusión</i>	22
10.1.2 <i>Agentes químicos</i>	23
10.1.3 <i>Agentes biológicos.</i>	23

•	<i>DNasa e hidrólisis enzimática</i>	23
11	<u>Metodología experimental</u>	24
11.1	PROCURACIÓN DE LAS MUESTRAS.	25
11.1.1	<i>Músculo recto abdominal porcino.</i>	25
11.2	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SU CARACTERIZACIÓN.	27
11.3	PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN.	27
11.4	CARACTERIZACIÓN DEL ANDAMIO DESCELULARIZADO.	29
11.4.1	<i>Histología</i>	30
11.4.2	<i>Hematoxilina y Eosina.</i>	32
11.4.3	<i>Tinción tricrómica de Masson.</i>	32
11.5	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	34
11.6	ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	35
11.7	AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE PULPA DENTAL HUMANA.37	
11.8	RECELULARIZACIÓN DEL ANDAMIO DESCELULARIZADO.	37
11.8.1	<i>Ensayo de viabilidad celular.</i>	38
12	<u>Resultados y discusión</u>	39
12.1	EFFECTIVIDAD DEL PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN.	39
12.2	PRESERVACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	43
12.3	TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON Y MICROSCOPIA DE BARRIDO	44
12.4	INMUNOHISTOQUÍMICA DE COLÁGENO TIPO I, LAMININA Y ELASTINA	46
12.5	RECELULARIZACIÓN DEL ANDAMIO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DESCELULARIZADO.	47
13	<u>Conclusiones</u>	49
14	<u>Perspectivas</u>	50
15	<u>Bibliografía</u>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MÚSCULOS ESQUELÉTICOS, SARCOLEMA, MIOFIBRILLA, NEURONA MOTORA, CAPILAR SANGUÍNEO, ENDOMISIO, FIBRA MUSCULAR (CÉLULA), FASCÍCULO, PERIMISIO, VASOS SANGUÍNEOS, EPIMISIO, TENDÓN, FASCIA PROFUNDA(12).	13
FIGURA 2. ESTÁ DIVIDIDO EN DOS PARTES, LA BÓVEDA PALATINA O PALADAR ÓSEO (A) EN SUS DOS TERCIOS ANTERIORES, Y EL PALADAR BLANDO O VELO DEL PALADAR (B) EN SU TERCIO POSTERIOR. EN EL CENTRO Y EN LA PARTE MÁS POSTERO INFERIOR DEL VELO DEL PALADAR CUELGA LA ÚVULA (C). EL PALADAR SEPARA LA CAVIDAD BUCAL DE LAS FOSAS NASALES (17).	14
FIGURA 3. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR(34).	19
FIGURA 4. AGENTES FÍSICOS, QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS PARA REALIZAR EL PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN(1).	24
FIGURA 5. EXTRACCIÓN DEL MÚSCULO RECTO ABDOMINAL. (A) SE REALIZA INCISIÓN TRANSVERSAL DEL PUNTO DIAFRAGMA A LA PELVIS PARA VISUALIZAR EL CAMPO QUIRÚRGICO. (B) SE PUEDE OBSERVAR LA EXTENSIÓN DEL MÚSCULO RECTO. (C)VAINA POSTERIOR DEL PERITONEO. (D) PRESENCIA DE LA VENA EPIGÁSTRICA (FLECHA AMARILLA)	26
FIGURA 6. PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN.	26
FIGURA 7. PROCESO E DESCELULARIZACIÓN(A) BOMBA PERISTÁLTICA FUNCIONANDO Y 1 MUESTRA DENTRO DE LA SUPERFICIE CÓNCAVA, SOMETIDA AL PROCESO (B) CANALIZACIÓN DE VENA Y ARTERIA PERFORANTES CON CATÉTER #19G. (C)FLUJO DE DISOLUCIONES DESCELULARIZANTES EN UN CIRCUITO CERRADO (MUESTRA SEÑALADA CON FLECHA ROJA).	28
FIGURA 8. PROCEDIMIENTO DE TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON Y HEMATOXILINA & EOSINA DE TEJIDO NATIVO Y DESCELULARIZADO.	34
FIGURA 9. OBSERVACIÓN DE MUESTRAS DE SEM (A) PREPARACIÓN DE MUESTRA NATIVA Y DESCELULARIZADA (DESHIDRATACIÓN). (B) OBSERVACIÓN DE MUESTRAS EN MICROSCOPIO EVO	35
FIGURA 10. PROCESO PARA ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO. (1) PREPARACIÓN DE MUESTRA Y CORTES EN FRÍO CON CRIÓSTATO. (2) ENSAYO INMUNOHISTOQUÍMICO. (3) OBSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS EN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.	36
FIGURA 11. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE PULPA DENTAL.	37
FIGURA 12. RECELULARIZACIÓN DEL ANDAMIO DESCELULARIZADO Y ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR.	39
FIGURA 13. MACROGRAFÍAS DE UN SEGMENTO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO NATIVO Y DESPUÉS DE SER SOMETIDO AL PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN. (A) MÚSCULO NATIVO. (B) MÚSCULO DESCELULARIZADO.	40
FIGURA 14. EFECTIVIDAD DEL PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO A TRAVÉS HISTOLOGÍA Y DAPI, (A): MÚSCULO NATIVO DONDE SE APRECIAN LOS NÚCLEOS DE LAS CÉLULAS TEÑIDOS CON H&E (MORADO) Y LAS FIBRAS MUSCULARES (ROSA). (B) MATRIZ DE MÚSCULO DESCELULARIZADO DONDE SE OBSERVA UN PORCENTAJE MENOR DE NÚCLEOS (C): MÚSCULO NATIVO TEÑIDO CON DAPI DÓNDE SE OBSERVAN LOS NÚCLEOS DE LA CÉLULA (AZUL), (D): MÚSCULO DESCELULARIZADO. (E, F) ESTADÍSTICA DE LA CUANTIFICACIÓN DE NÚCLEOS CON H&E Y DAPI	41
FIGURA 15. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DEL MÚSCULO NATIVO (A, B) Y DESCELULARIZADO (C, D). (D)SE OBSERVA LA RED ENDOMISIAL DE COLÁGENA ALREDEDOR DE LAS CAVIDADES DE LAS FIBRAS MUSCULARES DESCELULARIZADAS LAS CUALES SE CONSERVAN (FLECHA).	44
FIGURA 16. TRICRÓMICA DE MASSON EN MÚSCULO NATIVO (E, F). (G, H) MÚSCULO DESCELULARIZADO EL CUAL CONSERVA LAS FIBRAS DE COLÁGENO TIPO I (AZUL)	45
FIGURA 17. INMUNOFUORESCENCIA CONTRA (A, B) COLÁGENA TIPO I NATIVA Y DESCELULARIZADA. (C, D) ELASTINA NATIVA Y DESCELULARIZADA. (E, F) LAMININA NATIVA Y DESCELULARIZADA.	47
FIGURA 18. VIABILIDAD DEL MÚSCULO CON CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS OBTENIDAS A PARTIR DE PULPA DENTAL. (E Y F) CULTIVO DE LAS CÉLULAS SOBRE LA MATRIZ DEL MÚSCULO DESCELULARIZADA DESPUÉS DE 48 HORAS Y 30 DÍAS. (G) ESTADÍSTICA DEL PORCENTAJE DE VIABILIDAD QUE SE OBTUVO EN EL CONSTRUCTO.	49

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN APLICADO	29
TABLA 2. PROCESO DE DESHIDRATACIÓN DE TEJIDOS E INCLUSIÓN EN PARAFINA.....	30
TABLA 3. PROCESO DE DESHIDRATACIÓN DE TEJIDOS E INCLUSIÓN EN PARAFINA.....	31
TABLA 4. TINCIÓN H&E	32
TABLA 5. TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON	32
TABLA 6. PORCENTAJE DE DESCELULARIZACIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO, SEGÚN LA CUANTIFICACIÓN REALIZADA POR EL SOFTWARE IMAGE J.....	42

Resumen

Los procesos de descellularización tienen una gran ventaja sobre otro tipo de sustitutos, ya que se busca crear andamios descellularizados para su posterior aplicación en ingeniería de tejidos y como propuesta para investigaciones en el campo de la Medicina Regenerativa.

En la búsqueda de andamios para su aplicación en ingeniería de tejidos y como propuesta para investigaciones en el campo de la Medicina Regenerativa, los procesos de descellularización publicados tienen ventajas sobre otro tipo de procesos.

Los protocolos de descellularización son muy específicos para cada órgano y tejido. En este trabajo se aplica el protocolo de descellularización desarrollado en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM, al músculo esquelético, resultando efectivo para la utilización en la Ingeniería de Tejidos.

Se obtuvieron andamios descellularizados de músculo esquelético de cerdo joven, a las cuales se les realizó caracterización fisicoquímica, histológica y biológica de tejidos nativos y se compraron con los tejidos descellularizados.

Esto se propone como alternativa en el tratamiento de la malformación congénita de labio y paladar hendido; en la cual se deben realizar numerosas cirugías a lo largo de la vida del paciente para ofrecerle una mejor calidad de vida.

Una forma efectiva de resolver este problema es realizando xenoinjertos descellularizados, conservando componentes estructurales mediante el proceso de descellularización para obtener una mejor respuesta de la zona a rehabilitar.

Para medir la efectividad del proceso de descellularización, se realizó marcaje de núcleos utilizando la técnica histológica de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E), para comparar los resultados en los tejidos nativos con las muestras descellularizadas, cuantificando estos resultados con el software de procesamiento digital de imágenes Image J.

Para evaluar la morfología y la arquitectura de la MEC se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés), y la tinción tricrómica de Masson para evaluar la microestructura de la colágena.

Los resultados obtenidos en esta investigación se obtuvo una eficacia del 85.93% para la descellularización el músculo esquelético. Además, las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas mostraron la preservación de los componentes matriz extracelular (colágena tipo I, elastina y laminina).

1 Abstract

Decellularization processes have a great advantage over other types of substitutes, since it seeks to create decellularized scaffolds for subsequent application in tissue engineering and as a proposal for research in the field of Regenerative Medicine.

In the search for scaffolds for its application in tissue engineering and as a proposal for research in the field of Regenerative Medicine, the published decellularization processes have advantages over other types of processes.

Decellularization protocols are very specific for each organ and tissue. In this work, the decellularization protocol developed in the Biomaterials Laboratory of the UNAM Materials Research Institute is applied to skeletal muscle, resulting effective for use in Tissue Engineering.

Decellularized scaffolds of young pig skeletal muscle were obtained, which underwent physicochemical, histological and biological characterization of native tissues and were compared with the decellularized tissues.

This is proposed as an alternative in the treatment of congenital malformation of cleft lip and palate; in which numerous surgeries must be performed throughout the patient's life to offer a better quality of life.

An effective way to solve this problem is to perform decellularized xenografts, conserving structural components through the decellularization process to obtain a better response in the area to be rehabilitated.

To measure the effectiveness of the decellularization process, nuclei were labeled using the histological technique of Hematoxylin and Eosin (H&E) staining, to compare the results in native tissues with decellularized samples, quantifying these results with the digital processing software of images Image J.

To evaluate the morphology and architecture of the ECM, the scanning electron microscopy (SEM) technique was used, and Masson's trichrome staining was used to evaluate the microstructure of the collagen.

The results obtained in this investigation obtained an efficiency of 85.93% for the decellularization of skeletal muscle. In addition, histological and immunohistochemical techniques showed the preservation of the extracellular matrix components (type I collagen, elastin and laminin).

2 Introducción

El labio y paladar hendido es una de las malformaciones congénitas más comunes, la cual alcanza 2-3% de niños nacidos vivos. Es considerada la anomalía craneofacial más frecuente. El desarrollo craneofacial desde el punto de vista embrionario es bastante complejo y ocurre bajo un estrecho control genético, ambiental y factores teratogénicos el cual se presenta entre la cuarta semana y la décima semana (1). Esta malformación afecta el complejo craneofacial y es el resultado de la falta de unión entre los procesos frontonasal, maxilar, medial nasal, y lateral. El labio y paladar hendido (LPH) se puede encontrar de cuatro formas, principalmente: labio hendido. b. paladar hendido c. labio y paladar hendido unilaterales d. labio y paladar hendido bilateral (2,3)

Los pacientes que presentan esta malformación son sometidos a diversas cirugías a lo largo de su vida para lograr un cierre total de la fisura palatina y así devolver la función como es la deglución, fonación y respiración adecuada del paciente. Una de las consecuencias que se generan por las constantes cirugías es la formación de fístulas oroantrales las cuales constan de la apertura postoperatoria con la técnica de la palatoplastía. Las condiciones en las cuales se encuentra el tejido residual del paladar duro y blando son muy desfavorables ya que este es muy delgado, presenta dehiscencias muy amplias y la vascularidad se ve disminuida así como la capacidad de regeneración del tejido (4).

Actualmente no existe una solución completa y funcional, por lo que los pacientes deben someterse a múltiples cirugías con el riesgo que esto conlleva, por lo cual es necesario proponer una solución que trate de disminuir el número de procedimientos quirúrgicos a los cuales se deben ver enfrentados estos pacientes, para ello en este proyecto se propone el uso de andamios descelularizados con el objeto de promover la regeneración de los tejidos musculares que componen el paladar blando y de esta forma promover una regeneración guiada de las estructuras palatinas y disminuir la cantidad de procedimientos quirúrgicos(5,6)

3 Objetivo y Metas.

3.1 Objetivo

Obtener un protocolo de descelularización de músculo esquelético que pueda servir como potencial xenoinjerto para reconstrucción de estructuras palatinas.

3.2 Metas.

- Proponer un método de descelularización de músculo a partir de tejido porcino.
- Establecer la efectividad del protocolo de descelularización propuesto por medio de marcación de núcleos con DAPI, técnicas histológicas (tinción de H&E, Masson).
- Determinar las posibles alteraciones sobre la matriz extracelular del andamio obtenido mediante técnicas histológicas (Masson), inmunohistoquímicas (colágena I, elastina y laminina) y fisicoquímicas adecuadas para ello (microscopía electrónica de barrido)
- Determinar las capacidades de la matriz como andamio celular mediante pruebas biológicas de ensayos de viabilidad.

4 Hipótesis

Aplicar un protocolo de descelularización en músculo esquelético de cerdo, resultará adecuado para obtener un xenoinjerto que permite la regeneración de estructuras palatinas de origen muscular.

5 Justificación

El labio y paladar hendido sigue siendo un problema clínico crítico que debe abordarse, aunque hasta ahora se han considerado diferentes estrategias para el tratamiento de la reconstrucción temprana de la fístula oroantral y la falta de unión entre los músculos del velo del paladar. La capacidad regenerativa del músculo esquelético (MS) resulta inadecuada para defectos a gran escala y, en la actualidad, la reconstrucción de SM sigue siendo una tarea compleja y sin resolver. Para este objetivo, los músculos diseñados por ingeniería de tejidos deben proporcionar una alternativa de matriz extracelular biomimética (MEC) adecuada, caracterizada por una estructura alineada / microtopográfica y un microambiente miogénico, con el fin de promover la regeneración muscular. Como consecuencia, tanto los materiales como las técnicas de fabricación juegan un papel clave para planificar un enfoque terapéutico eficaz. La MEC descelularizada específica de tejido parece ser uno de los materiales más prometedores para apoyar la regeneración y reparación muscular(7).

Por otra parte, la necesidad de realizar un injerto que cumpla con características óptimas como buena vascularidad, biocompatible con la zona receptora, buena disponibilidad del tejido, reabsorbible y que permitan obtener mejores resultados estéticos y funcionales en el paladar.

Las limitaciones que existen en la reconstrucción temprana de la fisura palatina, la fístula oroantral que se presenta como la primera consecuencia de una palatoplastia primaria y las múltiples cirugías por las que debe de pasar el paciente son las justificaciones principales para realizar este estudio.

6 Marco teórico

6.1 Tejido muscular

El sistema musculoesquelético comprende uno de los principales sistemas de tejidos / órganos del cuerpo. Existen tres tipos principales de músculos que se encuentran en el cuerpo humano: cardíaco, liso y esquelético. Cada tipo de músculo tiene componentes celulares, fisiológicos y funcionales específicos (4,5). En este trabajo se hará uso del músculo esquelético.

6.2 Músculo esquelético

El músculo esquelético constituye aproximadamente el 40% del peso corporal total del ser humano el cual se adhiere al hueso mediante tendones y juntos producen todos los movimientos del cuerpo.

Su composición consiste en que está constituido de miles de fibras musculares envueltas entre sí por vainas de tejido conectivo. Los haces individuales de fibras musculares en un músculo esquelético se conocen como fascículos. La vaina de tejido conectivo más externa que rodea todo el músculo se conoce como epimisio. La vaina de tejido conectivo que cubre cada fascículo se conoce como perimisio, y la vaina más interna que rodea la fibra muscular individual se conoce como endomisio. Cada fibra muscular se compone de varias miofibrillas que contienen varios miofilamentos. Cuando se agrupan, todas las miofibrillas se organizan en un patrón estriado único formando sarcómeros que son la unidad contráctil fundamental de un músculo esquelético. Los dos miofilamentos más importantes son los filamentos de actina y miosina, que están dispuestos de forma distintiva para formar varias bandas en el músculo esquelético, esto le da al músculo esquelético un aspecto estriado(9–11)

Las funciones primarias del músculo esquelético tienen lugar a través de su proceso intrínseco de acoplamiento excitación-contracción. A medida que el músculo se une a los tendones óseos, la contracción del músculo conduce al movimiento de ese hueso que permite la realización de movimientos específicos. El músculo esquelético también proporciona soporte estructural y ayuda a mantener la postura del cuerpo. El músculo esquelético también actúa como una fuente de almacenamiento de

aminoácidos que pueden ser utilizados por diferentes órganos del cuerpo para sintetizar las proteínas específicas del órgano. El músculo esquelético también juega un papel central en el mantenimiento de la termostasis y actúa como fuente de energía durante la inanición (9).

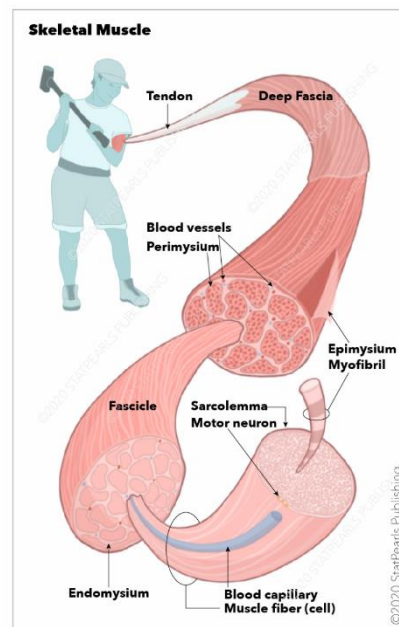


Figura 1. Músculos esqueléticos, sarcolema, miofibrilla, neurona motora, capilar sanguíneo, endomisio, fibra muscular (célula), fascículo, perimisio, vasos sanguíneos, epimisio, tendón, fascia profunda(12).

6.2.1 Irrigación en el músculo esquelético.

La arteria principal o la arteria primaria que suministra sangre al músculo esquelético discurre paralelamente al eje longitudinal de la fibra muscular (13) La arteria primaria emite afluentes que se conocen como arterias de alimentación, que son perpendiculares a la arteria primaria y avanzan hacia la vaina de tejido conectivo externo de la fibra muscular llamada perimio. (14) La arteria de alimentación se ramifica en arteriolas primarias que después de dos órdenes más de ramificación dan lugar a arteriolas transversales, que a su vez dan lugar a arteriolas terminales. (15) Las arteriolas terminales son las ramas vasculares finales, y perfunden los capilares que están presentes dentro del endomisio y viajan paralelos al eje longitudinal de la fibra muscular. La arteriola terminal junto con los capilares que irrigan se conoce como unidad microvascular y es la unidad más pequeña de todo el músculo esquelético donde se puede regular el flujo sanguíneo.

7 Anatomía del paladar duro y velo del paladar.

El paladar duro o bóveda palatina está formada por las apófisis palatinas de los maxilares y las láminas horizontales de los huesos palatinos (**figura 2**).

Constituye la pared superior o techo de la cavidad bucal, a la que separa de las fosas nasales. Las apófisis alveolares forman su límite anterior y los dos laterales en tanto que, hacia atrás, se corresponde con el comienzo del velo del paladar.

El paladar blando o velo palatino, es un repliegue músculo esquelético, de gran movilidad y activa participación en la deglución. Durante este proceso, los músculos permiten que se eleve y, de esa manera, se aísla las dos porciones de la faringe, bucofaringe y nasofaringe, a fin de impedir el reflujos de alimentos hacia la vía respiratoria (13).

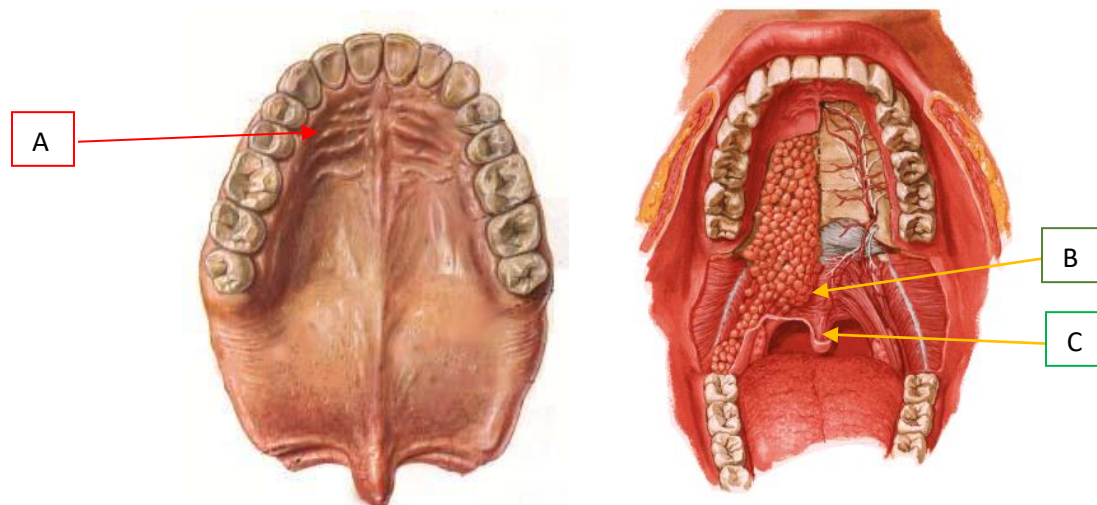


Figura 2. Está dividido en dos partes, la bóveda palatina o paladar óseo (**A**) en sus dos tercios anteriores, y el paladar blando o velo del paladar (**B**) en su tercio posterior. En el centro y en la parte más postero inferior del velo del paladar cuelga la úvula (**C**). El paladar separa la cavidad bucal de las fosas nasales (17).

8 Anatomía del paladar duro y velo del paladar.

Las malformaciones craneofaciales congénitas son un grupo de defectos causados por el crecimiento o el desarrollo anormal de las estructuras del tejido blando y/o de los huesos del cráneo y cara.

Diversas malformaciones craneofaciales (MCF) se deben al mal desarrollo del primero y segundo arcos braquial, de los que se forman los huesos faciales y los oídos durante

el segundo mes de gestación. Las causas incluyen varios síndromes genéticos, así como factores ambientales prenatales (p. ej., uso de vitamina A, ácido valproico).

Cada una de las anomalías congénitas se puede asociar con muchos síndromes genéticos diferentes (p. ej., el síndrome de Treacher Collins).

Algunas malformaciones craneales congénitas son:

- Labio y paladar hendido (LPH).
- Craneosinostosis.
- Malformaciones de la oreja.
- Anomalías oculares.
- Defectos de la mandíbula.
- Macrocefalia.
- Microcefalia.

En general, los niños con MCF deben ser evaluados para otras anomalías físicas asociadas y retrasos en el desarrollo que pueden requerir tratamiento.

Las anomalías craneofaciales y musculoesqueléticas son comunes en niños y lactantes en los cuales pueden nacer sin músculos individuales o estos pueden desarrollarse en forma incompleta. Las anomalías musculares pueden aparecer en forma aislada o como parte de un síndrome. Pueden implicar un solo sitio, específico (p. ej., labio y paladar hendido, defectos en el velo del paladar) o ser parte de un síndrome de anomalías congénitas múltiples (p. ej., el síndrome velocardiofacial, síndrome de Treacher Collins)(14).

Estas malformaciones congénitas son las más comunes en la zona craneofacial que involucran a las estructuras musculares.

La más relevante para este estudio es la LPH ya que es la alteración craneofacial que requiere mayores intervenciones durante la vida del paciente.

8.1 Labio y paladar hendido

El labio y paladar hendido (LPH) es una de las anomalías craneofaciales congénitas más comunes. Se caracteriza por el fracaso de la fusión normal del paladar y el labio en la línea media durante el desarrollo, lo que resulta en una deformidad clínicamente evidente del recién nacido. El labio y paladar hendido LPH y el paladar hendido solo (PH) tienen una morbilidad funcional significativa para el recién nacido sin un tratamiento adecuado. LPH afecta la capacidad del recién nacido para alimentarse,

incluido el aumento del reflujo nasal, la incapacidad para formar un agarre adecuado y un mayor trabajo de alimentación que conduce a la fatiga. Además, aunque LPH y PH aislados no son infrecuentes, estos defectos suelen formar parte de síndromes congénitos que deben reconocerse y pueden beneficiarse del tratamiento temprano (15).

8.2 Etiología

Es de etiología multifactorial asociada a varios factores de riesgo como son las malformaciones congénitas que son muy diversas y variadas, sin embargo, podemos reunirlos en 2 grandes grupos: genéticas y ambientales (16).

Ocupa el segundo lugar como defecto más común en el nacimiento, su prevalencia es de 0.8 a 1.6 casos por cada 1,000 nacidos vivos registrados, de acuerdo a estudios epidemiológicos, el 37% de los neonatos con labio y paladar hendido padecen una patología sistémica y el resto padece únicamente esta anomalía orofacial, se reporta que el 50% de las fisuras orales son combinadas con labio y paladar hendido, siendo el 25% de estas bilaterales (17).

8.2.1 Tratamiento

Los pacientes con labio y paladar hendido requieren un mínimo de 4 eventos quirúrgicos por caso. La reparación a menudo se realiza por etapas, con el labio tratado primero, seguido por el paladar (19).

Antes de la cirugía, para el paladar hendido asociado con el labio, el labio generalmente se tapa con cinta adhesiva desde aproximadamente una semana de vida hasta la cirugía. Esto ayuda a reducir el tamaño de la hendidura y mejorar la simetría. Una medida alternativa y más agresiva al vendaje labial es el moldeado nasoalveolar (NAM), que puede conducir a un mejor resultado estético y funcional después de la cirugía. NAM implica la colocación de una prótesis que se ajusta a partir de una impresión maxilar y se usa las 24 horas del día y se ajusta semanalmente o quincenalmente. La NAM puede dar como resultado una simetría nasal y una alineación alveolar muy mejoradas (14,15)

Teniendo en cuenta complicaciones por cada evento quirúrgico asociado como lo es la fístula palatina la cual puede complicarse por la dehiscencia de la herida y generar la formación de fístulas posterior a esta, ya que tiene como objetivo principal permitir un desarrollo correcto del habla y separar la cavidad oral de la nasal para evitar la regurgitación nasal (15,19). Esta complicación ocurre frecuentemente como consecuencia del cierre quirúrgico primario del paladar hendido; su corrección

requiere, en promedio, tres a cuatro intervenciones quirúrgicas (19). La palatoplastia para el paladar se realiza a los 9-15 meses de edad.

Cohen(21) clasifica las fístulas, por su tamaño, en pequeñas (1-2 mm), medianas (3-5 mm) y grandes (más de 5 mm). Por su localización, la clasificación de Pittsburgh las divide en: 1) uvulares, 2) del paladar blando, 3) de la unión entre el paladar blando y el duro, 4) del paladar duro, 5) de la unión entre el paladar primario y el secundario, 6) alveolar lingual, y 7) alveolar labial(22).

El cierre de fístulas palatinas se ha hecho tradicionalmente con el uso de colgajos mucoperiosticos locales; sin embargo, en uno por cada tres o cuatro pacientes ocurre recurrencia de la fístula. Una vez que falla el cierre del defecto primario, el riesgo de fístula recurrente aumenta. La fibrosis y la disminución de la vascularización que sobreviene con cada intervención podrían explicar el aumento del riesgo. A fin de disminuir la recurrencia, varios autores han reportado diferentes técnicas quirúrgicas para el cierre de fístulas nasopalatinas recurrentes, como el uso de colgajo lingual, colgajo bucal, injertos óseos, colgajo músculo mucoso bucal, colgajo de grasa bucal, cartílago, matriz dérmica acelular y colgajo turbinal (23,19).

La elección de una zona donante del colgajo debe de estar alejada de la fístula, una disección mucoperiostica poco extensa y un colgajo con vascularización segura que aporte tejido suficiente para evitar tensión en la línea de sutura, así como volumen adecuado para una reconstrucción de espesor completo. Además, es preferible realizar la reconstrucción en un solo tiempo quirúrgico y minimizar la morbilidad de la zona donante(24).

Por lo tanto, se han tomado en cuenta diversos injertos del mismo paciente (autólogos) como de origen animal (xenoinjerto), para obtener un tratamiento exitoso y así permitir disminuir el número de cirugías realizadas y obtener la calidad óptima de los tejidos adyacentes.

9 Injertos musculares

Los tipos de sustratos dérmicos utilizados más ampliamente son los derivados de la piel o los materiales a base de colágeno. Estos se preparan a partir de piel de donante de cadáver (aloinjertos) y el colágeno tipo I, en ocasiones complementado con componentes de la matriz extracelular como el colágeno tipo IV, la elastina o los glucosaminoglicanos, es la base de otro tipo de sustrato dérmico(21).

En la actualidad, los productos preparados por dermis descelularizada son bastante abundantes, entre los que se encuentran principalmente AlloDerm®, Axis™, AlloMax

™, AlloPatch, Axis dermis, Collamend ™, Epiflex®, DermaMatrix®, (22), por mencionar algunos ejemplos.

Los tejidos más utilizados en el tratamiento para labio y paladar hendido son la submucosa dérmica descelularizada, los cuales están compuestos principalmente de fibras de colágeno y fibras elásticas que ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento quirúrgico del paladar hendido y la fístula oroantral(23,24) . La desventaja que se presenta es que los injertos musculares son variables y se distinguen por ser de alto costo y difíciles de obtener.

Estudios en animales pequeños como en modelos de ratas y ratones; han tenido resultados los cuales provocaron la regeneración parcial del músculo esquelético tras el tratamiento de la pérdida de músculo volumétrico(22)

Por lo tanto, la necesidad de realizar un injerto que cumpla con características óptimas como buena vascularidad, biocompatible con la zona receptora, buena disponibilidad del tejido, reabsorbible y que permitan obtener mejores resultados estéticos y funcionales en el paladar.

9.1 Ingeniería de tejidos.

El campo de la ingeniería de tejidos tiene como objetivo restaurar la función o reemplazar los tejidos dañados o enfermos mediante la aplicación de principios de ingeniería y biológicos. Estos principios incluyen la selección y manipulación de células, el diseño de matrices de andamios, la identificación y el uso de moléculas de señalización biológica pertinentes. Por lo tanto, proponemos un enfoque de ingeniería de tejidos para el tejido blandos en el paladar.

9.2 Matriz extracelular

La MEC natural es un microambiente heterogéneo hecho de proteoglicanos, proteínas y moléculas de señalización, que proporciona rigidez estructural y soporte mecánico, forma conexiones intracelulares y modula los sitios de unión y la actividad de los factores de crecimiento (32,33).

La composición de MEC influye en la rigidez de la matriz (que afecta la diferenciación, migración y proliferación celular), la permeabilidad (que afecta la difusión de nutrientes a los tejidos y la función celular) y las interacciones célula-matriz (que afecta la adhesión y proliferación celular) (32). Como consecuencia, la MEC actúa como un microambiente estructural y de señalización para las células.

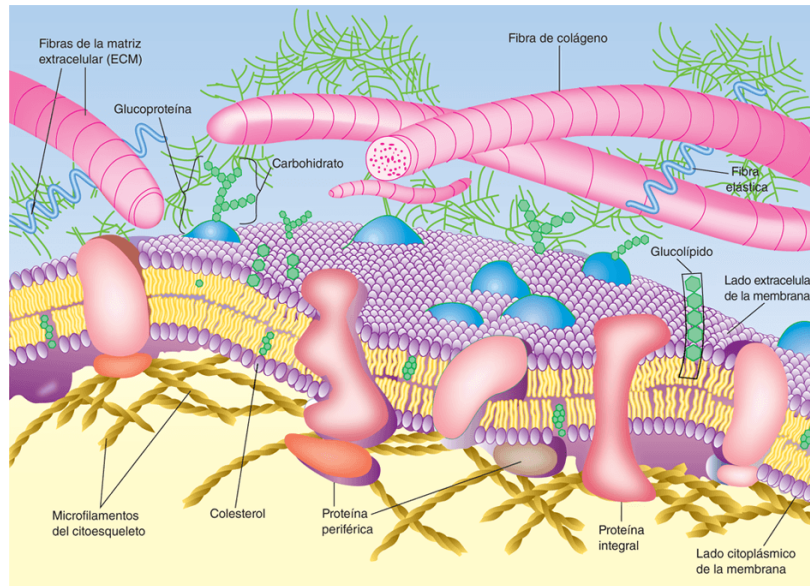


Figura 3. Componentes de la matriz extracelular(34).

Varios estudios demostraron que, a pesar de las mejoras realizadas hasta ahora, todavía falta la biomimética precisa de la estructura compleja MEC y la reproducción de un andamio capaz de simular tejidos complejos, como músculo esquelético (27).

La descellularización se ha utilizado ampliamente para el desarrollo de andamios basados en MEC, que conservan la arquitectura y la complejidad de los tejidos nativos, incluida la vascularidad de la MEC(33). Además, se ha sugerido que los andamios basados en MEC generan oligopéptidos de bajo peso molecular con la capacidad de reclutar e influir en las células progenitoras endógenas, desempeñando un papel en el proceso de remodelación constructiva y funcional, incluida la vascularidad y la formación de inervación (32).

Los modelos actuales de músculo esquelético han demostrado la capacidad de la MEC para estimular un grado de neomiogénesis, lo que confirma la prueba de concepto crítica para usar biomateriales compuestos de MEC para la regeneración muscular (33).

En diversos estudios se han desarrollado injertos musculares que han ayudado a la reconstrucción y restauración de lesiones de músculo esquelético, para las cuales se han desarrollado diferentes estrategias de ingeniería de tejidos; sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado una solución biomimética adecuada para obtener construcciones musculares funcionales (27).

9.3 Colágena

Las colágenas son moléculas de proteína formadas por aminoácidos. Proporciona soporte estructural al espacio extracelular de los tejidos conectivos, es la proteína más abundante en los mamíferos y representa aproximadamente un tercio de la proteína total en el cuerpo humano (25,34).

Se puede dividir en varios grupos según el tipo de estructuras que forman. Se han descubierto 28 tipos distintos de colágeno, pero los más comunes son los del I al IV, y el tipo I comprende más del 90% del colágeno del cuerpo humano.

La colágena está compuesta por 3 cadenas. Las cadenas se enrollan juntas para formar una triple hélice. Dado que la glicina es el más pequeño de todos los aminoácidos, permite que la cadena forme una configuración ajustada y puede resistir el estrés.

El proceso de síntesis de colágeno ocurre principalmente en las células de los fibroblastos que son células especializadas con la función principal de sintetizar colágeno y estroma. La síntesis de colágeno ocurre tanto intracelularmente como extracelularmente (34).

9.4 Elastina

La elastina es una proteína del tejido conjuntivo con funciones estructurales que, a diferencia del colágeno está formada de tropoelastina y microfibrillas (35) el cual es responsable de la extensibilidad reversible (propiedades de retroceso) del tejido, proporciona principalmente resistencia y confiere propiedades elasticidad a los tejidos. Se asocia con el colágeno y proporciona una función complementaria, principalmente como fibras elásticas (36).

Está formada por una cadena de aminoácidos con dos regiones: una hidrofóbica constituida por los aminoácidos apolares valina, prolina y glicina, y otra hidrofílica con los aminoácidos lisina y alanina. No posee una estructura secundaria regular. La región hidrofóbica es la que confiere la elasticidad característica a la elastina.

La elastina es particularmente abundante en tejidos y órganos que requieren elasticidad o experimentan ciclos de alargamiento y encogimiento, como los pulmones [3-7%, piel (2-3%), vasos sanguíneos (28-32%) y ligamentos elásticos (50%)] músculo esquelético (70%). Además, juega un papel clave en la funcionalidad de estos tejidos debido a su participación en muchos procesos de señalización celular (37)

9.5 Laminina

Las lamininas son una familia de glicoproteínas de alto peso molecular que funcionan como componentes de la matriz extracelular de la membrana basal estructural.

Las lamininas junto con otras proteínas están presentes en tejidos específicos como el músculo. Es dentro de esta matriz donde regulan predominantemente el crecimiento celular, la motilidad, la adhesión y la estabilidad estructural a través de interacciones proteína-proteína(38).

Son heterotrímeros compuestos por cadenas polipeptídicas homólogas alfa, beta y gamma. Individualmente, estas cadenas tienen una organización distinta de dominios estructurales y pueden exhibir actividades biológicas, incluido el autoensamblaje y la interacción de proteínas. Tiene un papel en la unión, migración y organización celular de los tejidos durante el desarrollo embrionario a través de interacciones con otros componentes de la matriz extracelular (39).

10 Descelularización

La descelularización es el proceso usado en ingeniería de tejidos para aislar la matriz extracelular (MEC) de las células que lo habitan, dejando un andamio de MEC del tejido original, que puede ser utilizado en órganos artificiales y regeneración tisular.

La descelularización se ha convertido en una técnica para transformar diferentes órganos, como la piel, el corazón, el hígado, los riñones, los músculos, la mucosa, los nervios, los tendones, los ligamentos y los vasos sanguíneos, en MEC-G bioactivo mediante el procesamiento físico y / o químico (40).

Uno de los beneficios del xenoinjerto muscular descellularizado son sus propiedades mecánicas (similares a la del músculo nativo), así como conservar la organización normal del colágeno y los canales vasculares acelulares.

Al descelularizar el xenoinjerto, se genera un implante biológico inmunológicamente inerte. El xenoinjerto descellularizado se utiliza para cerrar defectos amplios que afectan el paladar duro y blando (29,41).

10.1 Métodos de descelularización.

Los protocolos de descelularización pueden involucrar una mezcla de procesos físicos, químicos y biológicos los cuales remueven los componentes celulares sin afectar de forma agresiva la organización, composición e integridad mecánica de la

matriz extracelular. Primeramente, se busca realizar la lisis celular (pérdida de la continuidad de la membrana) de modo que se interrumpa la viabilidad celular (42).

Algunos trabajos mencionan un proceso de descelularización el cual se ha llevado con éxito en órganos como tráquea, venas, arterias y corazón. Sin embargo, los protocolos de descelularización son altamente sensibles e independientes a las características del tejido nativo, por lo que se debe realizar un protocolo para cada tejido u órgano específico y así obtener un proceso de descelularización efectivo. El xenoinjerto de origen porcino descelularizado resulta tener un mayor éxito en la aplicación clínica, debido a los componentes de la MEC y a la morfología que este posee (16,44).

En términos generales un protocolo de descelularización típico presenta los siguientes pasos: a) lisis de la membrana celular por medio de tratamientos físicos y soluciones iónicas. b) separación de los componentes celulares de la MEC usando tratamientos enzimáticos. c) solubilidad de los componentes citoplasmáticos y nucleares de las células a través de tratamientos con detergentes, d) lavado y remoción de los remanentes celulares de la MEC. Los pasos anteriores pueden ser repetidos las veces que se requiera para aumentar la efectividad del método (41).

Es importante conocer el principio activo de cada agente dentro del protocolo de descelularización, ya que la estrategia debe ser óptima en relación al tejido, tomando en cuenta duración, variables ambientales y concentración, valorando la efectividad del método y los efectos en la composición, funcionalidad y arquitectura de la MEC obtenida (40,41).

10.1.1 Agentes físicos

Los agentes físicos en el proceso de descelularización son: agitación, perfusión, gradientes de presión, descongelación y electroporación, la ventaja de estos métodos es la remoción de los restos de materia celular remanentes de la MEC (41).

- **Perfusión**

La perfusión es un método que ayuda a introducir de manera lenta y continua un líquido a un tejido u órgano, a través del lecho vascular(41,45). La posible desventaja puede presentar una excesiva presión de bombeo que pueda llegar a dañar la MEC.

Se deben utilizar disoluciones con agentes químicos que actúan sobre las células, para llevar a cabo la descelularización. Gracias a la presión del fluido, el agente descelularizante tiene un mayor alcance por difusión sobre todo el volumen del órgano o tejido y tiene la cualidad de arrastrar los restos resultados de la lisis celular (41).

10.1.2 Agentes químicos

Los métodos químicos implican el uso de una variedad de detergentes para romper los enlaces célula-célula y célula-matriz, que se han considerado como el método más extenso y robusto para la descellularización. Estos detergentes se pueden clasificar en cuatro categorías: iónicos (dodecilsulfato de sodio: SDS), no iónicos (Triton X-100), bipolares (CHAPS), alcalinos y ácidos. El mecanismo de estos detergentes para la descellularización incluye facilitar la lisis celular y solubilizar los componentes celulares liberados mediante la formación de micelas. La elección de los detergentes depende de las características del tejido, como la densidad celular, el contenido de lípidos y el grosor. La siguiente sección resumirá la receta óptima de agentes de descellularización para eliminar los componentes celulares de manera eficiente de todo el sistema de órganos (41).

10.1.3 Agentes biológicos.

La tecnología enzimática para la descellularización se utiliza con frecuencia para interrumpir las interacciones entre las células y la MEC, o para eliminar material antigénico para disminuir la inmunogenicidad (46). Generalmente, las proteasas (p. Ej., Tripsina, pepsina), nucleasas (p. Ej., DNasa, RNasa), lipasa, heparinasas y hialuronidasas son las enzimas proteolíticas más ampliamente aplicadas en protocolos de descellularización para una variedad de tejidos. Se ha demostrado que los métodos enzimáticos para la eliminación de desechos celulares son dirigidos específicamente a las proteínas para interrumpir las adherencias entre células y ECM (41,46).

- **DNasa e hidrólisis enzimática**

Las nucleasas, incluidas las ADNasas y las ARNasas, se utilizan para escindir secuencias de ácidos nucleicos después de la lisis celular en los tejidos. Hallazgos recientes han demostrado que los discos intervertebrales sometidos a tratamiento con 0,02 mg / ml de ADNasa y 20 mg / ml de ARNasa, no solo eliminan el ADN residual a niveles aceptables de menos de 50 ng / mg de peso seco, sino que también reducen notablemente el tiempo total de procesamiento de digestión MEC(44)

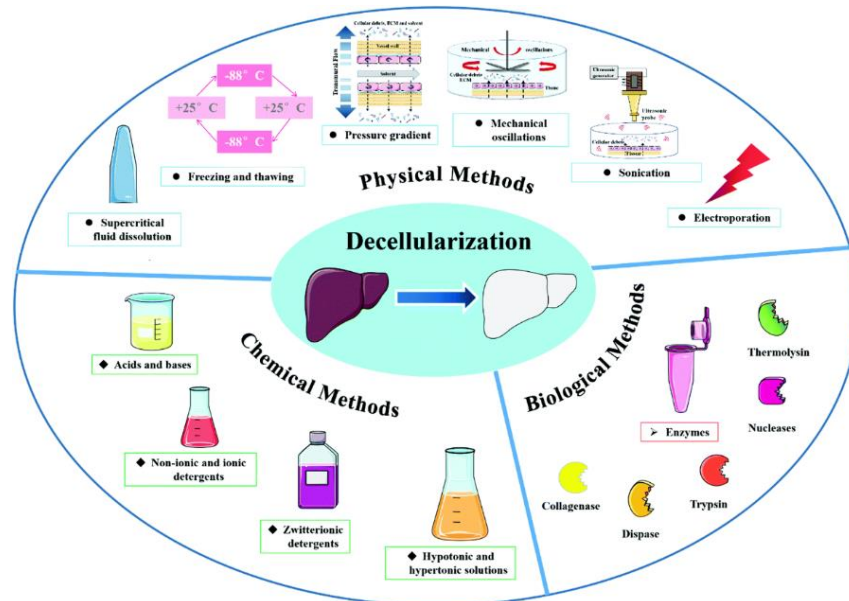


Figura 4. Agentes físicos, químicos y biológicos para realizar el proceso de descelularización(1).

11 Metodología experimental.

Este trabajo se basa en la Hipótesis de que un andamio que presenta diversas ramificaciones arteriales para su irrigación como lo es el músculo recto abdominal de cerdo (RA) (42), puede ser obtenido mediante la misma metodología de descelularización. Enfocado en demostrar la efectividad del proceso sobre el andamio natural sin afectar significativamente la configuración de la Matriz Extracelular (MEC).

En el presente capítulo se describe la metodología para obtener un protocolo de descelularización de músculo recto abdominal de cerdo (RA).

La efectividad del proceso de descelularización se evaluó comparando la muestra descelularizada con el tejido nativo. Se cuantificaron núcleos celulares visibles gracias a las tinciones histológicas hematoxilina y eosina (H&E) en conjunto con DAPI, con software de procesamiento digital.

Para evaluar la preservación de la MEC se utilizaron diversas técnicas de caracterización: en histología se utilizó Tricrómica de Masson, y las muestras se observaron con la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), que también puede dar una estimación de la descelularización, ya que las microfotografías a más de 500X permiten ver algunas células en las muestras nativas, que no se presentan en las muestras descelularizadas.

11.1 Procuración de las muestras.

11.1.1 Músculo recto abdominal porcino.

Todos los experimentos con animales se trabajaron cumpliendo con la norma oficial NOM-062-ZOO-1999.

Se trabajó con cerdos raza Landrance se obtuvieron 9 muestras (n=5) de músculo recto abdominal, de entre 20 cm a 23 cm de largo y 6 cm a 8 cm de ancho. Todos de machos jóvenes de entre 100 a 110 kg y de 6 meses de edad. En condiciones estériles en el rastro TIF # 194 (certificación tipo Inspección Federal) se realizó la extracción del músculo recto abdominal (MRA) (**figura 5**).

El certificado tipo Inspección Federal (TIF) es un reconocimiento que otorga la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), a las empresas dedicadas al sacrificio y procesamiento de carne, en México, se les da esta certificación a los establecimientos que tienen instalaciones adecuadas y cumplen con la norma de higiene e inocuidad de los productos cárnicos.

Las muestras se mantuvieron en una disolución amortiguadora e isotónica de buffer de fosfatos, PBS (MERCK) concentrada al 1x (se prepararon 2 sobres de 1g en 2L de agua desionizada estéril) y mantenidas a 4°C para su traslado inmediato al Laboratorio de biomateriales del Instituto de Investigación de Materiales de la UNAM (**figura 6**).

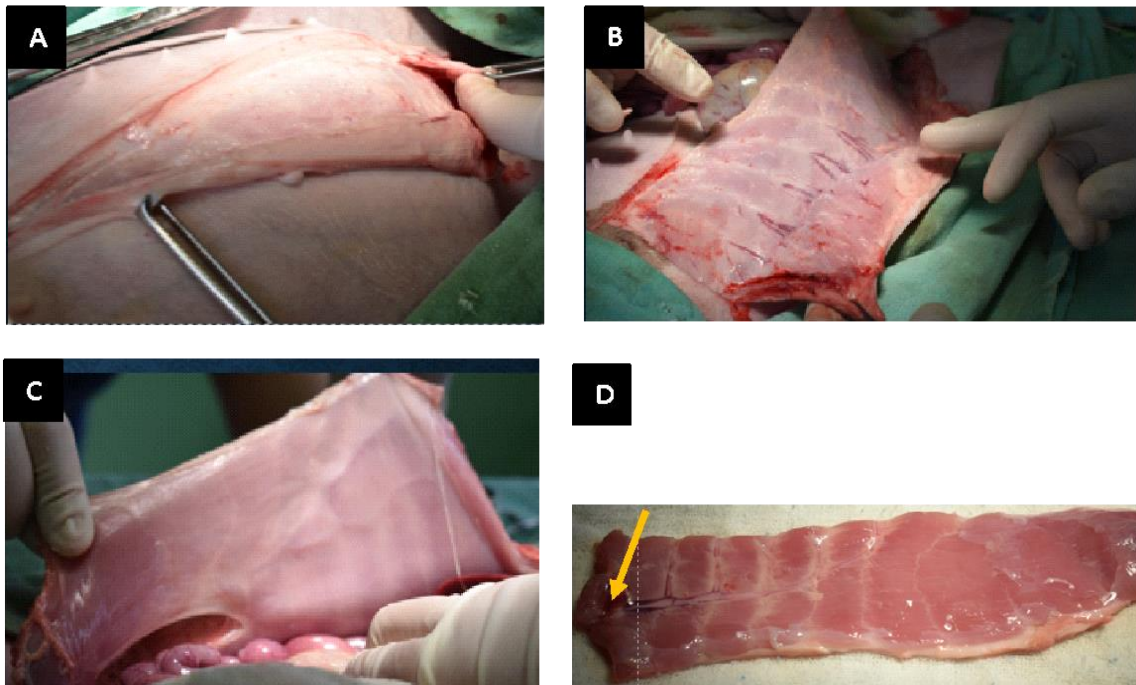


Figura 5. Extracción del músculo recto abdominal. **(A)** se realiza incisión transversal del punto diafragma a la pelvis para visualizar el campo quirúrgico. **(B)** Se puede observar la extensión del músculo recto. **(C)** Vaina posterior del peritoneo. **(D)** Presencia de la vena epigástrica (flecha amarilla)

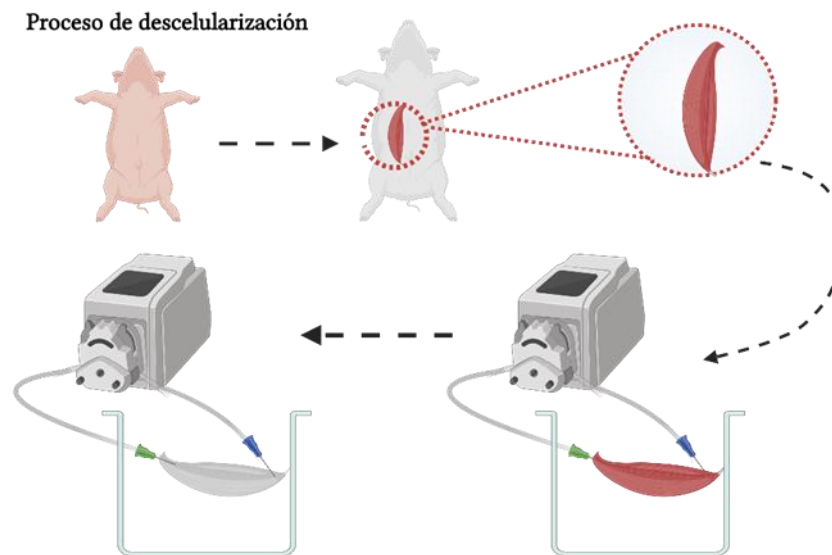


Figura 6. Proceso de descelularización.

11.2 Preparación de la muestra para su caracterización.

La toma de muestras para su posterior caracterización se llevó de igual manera en las muestras nativas y descelularizadas. Una vez que se obtuvieron las muestras en el Laboratorio de Biomateriales, dentro de la campana de flujo laminar y con ambiente e instrumental estéril se procedió a hacer 3 cortes de cada una para su posterior caracterización:

- 1.1. *Muestra control para histología:* se fija 1cm³ de muestra en PFA(MACRON) a 4% (toda la noche y se hace cambio a PBS 1X (Sigma-Aldrich), se mantiene en PBS hasta que se lleve a cabo la técnica histológica para inclusión de la muestra.
- 1.2. *Muestra control para inmunohistoquímica:* se incluye 1cm³ en Tissue-Tek y se mantiene en congelación (a -40°C).
- 1.3. *Muestra control para SEM:* se fija en una solución de 2.5% de glutaraldehído (EMS) y se procesa según el protocolo indicado para secado de muestras biológicas por punto crítico para ser observadas por SEM.

11.3 Protocolo de descelularización.

El protocolo de descelularización se llevó a cabo en condiciones estériles, dentro de la campana de flujo laminar.

El músculo recto abdominal se conectó a un catéter #18G (ETHICON) para la vena y arteria epigástrica por su porción mesial y #19G (ETHICON) para venas y arterias perforantes por la vena y arteria epigástrica en su porción distal, los cuales se fijaron usando un punto de sutura simple de polipropileno 2/0. Las 2 porciones se unieron mediante un adaptador (Masterflex) a una manguera (Masterflex #16), por donde circularon las diferentes disoluciones descelularizantes.

La muestra se colocó en un sistema cerrado, dentro de una superficie cóncava de vidrio estéril con capacidad de 1000 mL de la disolución de descelularización en turno (**tabla 1**), el extremo suelto de la manguera se sumergió en los mismos 1000 mL de disolución descelularizante, de tal forma que la parte media de la manguera se colocó dentro de una bomba peristáltica de rodillos (Masterflex, easy-load), haciendo fluir las disoluciones descelularizantes con una velocidad de flujo 40mL/min (**figura 7 (C)**).

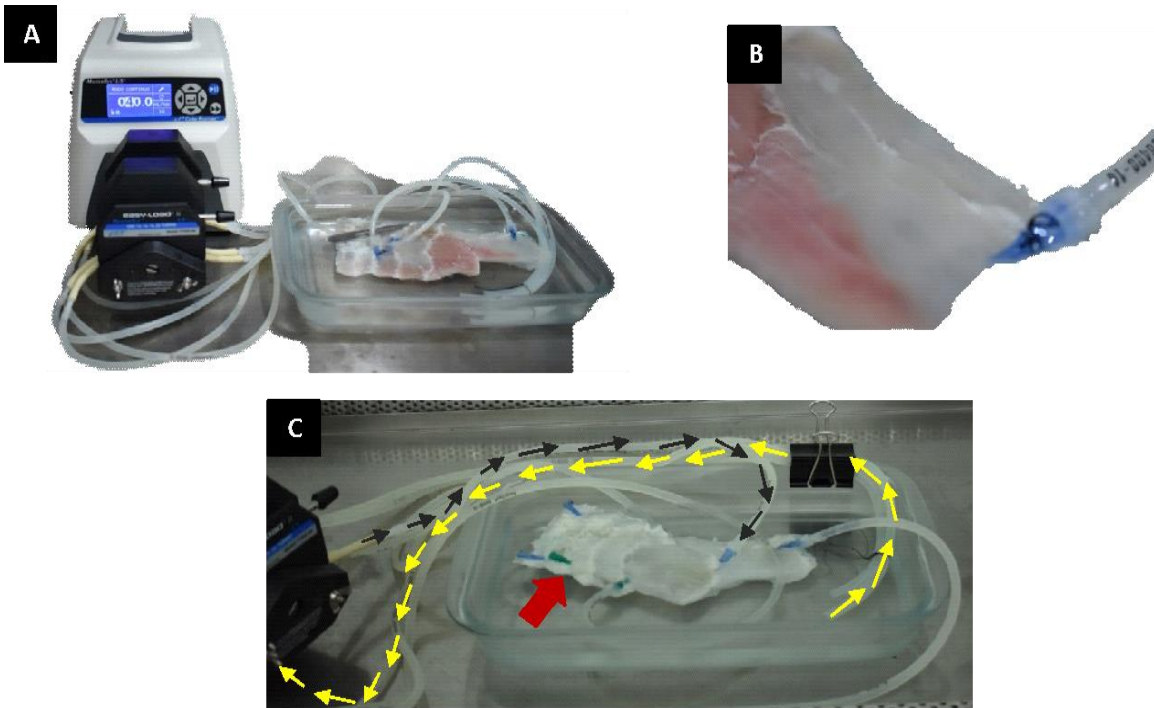


Figura 7. Proceso e descelerización(A)Bomba peristáltica funcionando y 1 muestra dentro de la superficie cóncava, sometida al proceso (B) Canalización de vena y arteria perforantes con catéter #19G. (C)Flujo de disoluciones descelerizantes en un circuito cerrado (muestra señalada con flecha roja).

La bomba peristáltica tiene 2 cabezales, lo que permite trabajar con 4 puntos diferentes al mismo tiempo de manera independiente, estos puntos se rotaron en dirección a las manecillas del reloj cada 24 horas (**figura 7A**). En el arreglo utilizado para el proceso de descelerización, el flujo de las disoluciones descelerizantes impulsado por la bomba peristáltica se hace pasar por dentro de las venas y arterias epigástricas y perforantes y su retorno hacia la bomba (**figura 7C**).

Durante el proceso de descelerización, el músculo recto abdominal se expuso a diversas disoluciones en distintos tiempos de exposición, el protocolo total tiene una duración de 25 días, a temperatura ambiente, dentro de la campana de flujo laminar. El protocolo de descelerización utilizado en esta investigación se describe a continuación (**Tabla 1**):

El flujo de las disoluciones se hizo pasar en dirección mesial a distal. Los cambios de disoluciones se realizaron cada 24 horas, previo a 3 lavados con 1000 mL de PBS 1x (Sigma-Aldrich) en las mismas condiciones de perfusión.

- 1) Se introdujo en una disolución de dodecil sulfato de sodio, SDS (Sigma) al 1% (1% de peso en agua desionizada estéril). Se perfundió por un lapso de 528 horas, haciendo cambios de disolución cada 24 horas.
- 2) En las mismas condiciones, se cambió de disolución por buffer fosfato salino, PBS (Sigma-Aldrich) 1X y se mantuvo durante 24 horas.
- 3) Se dejó perfundiendo por 24 horas una disolución de DNasa-1 (Roche) a una concentración de 0.001 mg/mL en solución salina tamponada con PBS 1x (Sigma-Aldrich).
- 4) Finalmente, en las mismas condiciones de perfusión, se hizo el cambio de disolución a 1000 mL de PBS (Sigma-Aldrich) durante 24 horas.

Tabla 1. Protocolo de descelularización aplicado

Disoluciones.	Tiempo total.
SDS 1% de peso en agua desionizada estéril.	22 horas.
PBS 1% de peso en agua desionizada estéril.	1 día.
DNasa-1 0.001 mg/mL.	1 día.
PBS 1% de peso en agua desionizada estéril.	1 día.

11.4 Caracterización del andamio descelularizado.

Las técnicas de caracterización utilizadas en este trabajo buscan comprobar la efectividad del proceso de descelularización y la preservación de la MEC del tejido muscular esquelético.

Los agentes usados para realizar un protocolo de descelularización exitoso conllevan a eliminar el componente celular de un órgano y/o tejido para mantener intacta la MEC. Es importante elegir los agentes adecuados para no dañar la MEC (proteínas) y eliminar el mayor componente celular posible para no generar una respuesta inmune en el receptor.

En el presente trabajo se pretende conservar una MEC del tejido descelularizado, para lo cual se sometieron las muestras del MRA a diferentes técnicas de caracterización, comparando los tejidos antes y después de ser sometidos al proceso de descelularización.

La tinción tricrómica de Masson donde se pueden observar las fibras de colágena, microscopía electrónica de barrido (SEM) para visualizar los cambios estructurales del tejido, inmunohistoquímica para observar la presencia de proteínas que componen la MEC como son colágena tipo I, laminina y elastina, así como la viabilidad celular en el cual se analizará si el constructo es citotóxico.

11.4.1 Histología

La caracterización histológica se realizó de la misma manera para todas las tinciones utilizadas en este trabajo de investigación, asegurando así un proceso uniforme para todas las muestras. Los procesos de deshidratación y de inclusión se realizaron en el Departamento de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Las muestras destinadas a esta técnica de caracterización, como se mencionó anteriormente en este trabajo, se encontraban preservadas en PBS 1X a 4 °C.

Todas las muestras se sometieron a un proceso de deshidratación, con agitación constante dentro de 10 ml en diferentes disoluciones de etanol, por cada 30 min cada una, posteriormente a la deshidratación, se aclaró la muestra con Xilol con el mismo sistema de agitación (**tabla 2**). Las muestras deshidratadas y aclaradas con Xilol se sumergieron en parafina, dicho proceso se llevó a cabo en 2 pasos, colocando cada corte en un frasco con 5 mL de parafina, dentro de la estufa a 50°C antes de la inclusión.

Las muestras se incluyeron en parafina, dentro de un casset de inclusión en el Departamento de Microscopía de la Facultad de Medicina, a los que se les realizaron cortes de 5 µm y un ángulo de 5° en el microtomo (ZEISS). Los cortes se colocaron en baño María a 35°C para colocarlo en portaobjetos, secarse y desparafinar.

Tabla 2. Proceso de deshidratación de tejidos e inclusión en parafina

Disolución.	Tiempo (min).
ETOH 70%	30
ETOH 80%	30
ETOH 96% (1)	60
ETOH 96% (2)	60
ETOH 100% (1)	60
ETOH 100% (2)	30

ETOH 100% (3)	30
Xilol (1)	30
Xilol (2)	30
Parafina (1)	60
Parafina (2)	60

Para teñir los cortes histológicos, los portaobjetos se introdujeron a la estufa a una temperatura de 60°C para retirar los restos de parafina, durante 25 minutos. Previo a este paso se sometieron las laminillas a un proceso de rehidratación, sumergiendo los portaobjetos en las distintas soluciones del proceso de rehidratación (tabla 3). Finalmente, las muestras se tiñeron con 2 técnicas: Hematoxilina y Eosina (H&E) y Tricrómica de Masson, dependiendo de las características a estudiar.

Tabla 3. Proceso de deshidratación de tejidos e inclusión en parafina.

Disolución.	Tiempo.
Xilol (1)	5 min
Xilol (2)	2 min
ETOH 100% (1)	2 min
ETOH 100% (2)	2 min
ETOH 96% (1)	2 min
ETOH 96% (2)	30 s
ETOH 80%	30 s
ETOH 70%	30 s
ETOH 60%	30 s
ETOH 50%	30 s
H ₂ O bidestilada.	30 s
H ₂ O bidestilada.	5 min

11.4.2 Hematoxilina y Eosina.

Para realizar la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) se verificó la efectividad de los diferentes pasos del proceso observando al microscopio óptico. Se sumergieron los portaobjetos en las diferentes soluciones bajo los tiempos establecidos (tabla 4) (figura 8). Con dicha tinción se evaluará la efectividad de la descelerización en las muestras sometidas, así como localizar estructuras basófilas, como núcleos celulares en tono azul (hematoxilina) y estructuras acidófilas de color rosa (eosina)(45).

Tabla 4. Tinción H&E

Disolución.	Tiempo.
Hematoxilina de Harris.	5 min
Agua corriente a flujo constante.	2 min
Disolución saturada de carbonato de litio.	30 s
Agua corriente a flujo constante.	2 min
Eosina solución de trabajo.	30 s
ETOH 96% (1) tinción.	30 s
ETOH 96% (2) tinción.	30 s

11.4.3 Tinción tricrómica de Masson.

La tinción tricrómica de Masson está compuesta de 3 colorantes (Hematoxilina Férrica, azul de anilina y Fuscina Escarlata) estos se encargan de teñir los elementos acidófilos como el músculo, citoplasma, y queratina (rojo) núcleos celulares (negro) y colágena (azul) (**tabla 5**) (**figura 8**).

Tabla 5. Tinción Tricrómica de Masson

Disolución.	Tiempo.
Solución de Bouin.	1 hora a 56°C.
Agua destilada.	Hasta retirar la disolución de Bouin.
Hematoxilina Férrica.	10 min.
Agua destilada.	2 min
Fuscina Escarlata de Brebich.	15 min

Agua destilada.	2 min
Disolución ácida fosfotúngstico-fosfomolibdico.	10 min
Agua destilada.	2 min
Disolución de azul de anilina	3 min
Agua destilada.	2 min
Ácido acético al 1%	30 s
ETOH 96% (1) tinción.	30 s
ETOH 96% (2) tinción.	30 s

Terminando el proceso de las tinciones se procede al proceso de rehidratación de laminillas (**tabla 3**), las cuales se fijaron con resina y se dejaron secar 24 horas, antes de proceder a la observación en el microscopio Axiozoom de Microscopía de la Facultad de Medicina UNAM.

Los cortes histológicos se observaron en el microscopio Axiozoom V16 de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM, a diferente aumento para localizar las diferentes estructuras celulares de las muestras.

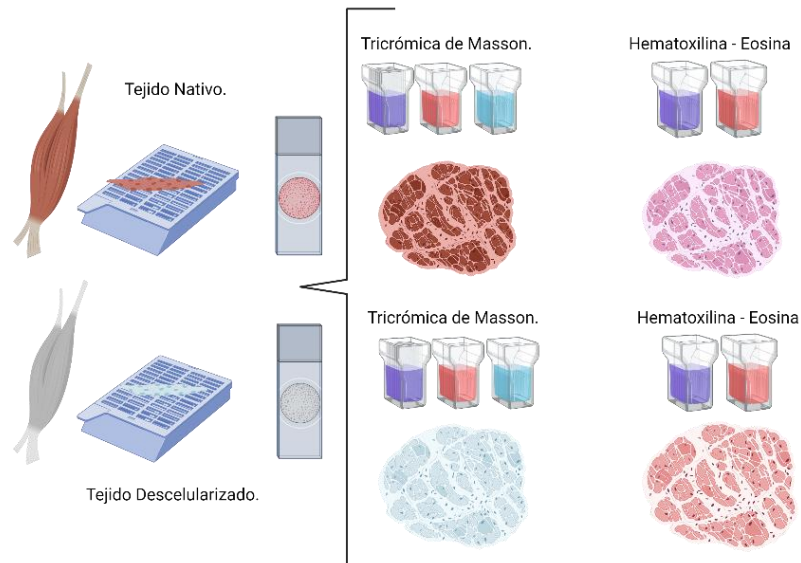


Figura 8. Procedimiento de tinción tricrómica de Masson y Hematoxilina & Eosina de tejido nativo y descellularizado.

11.5 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope), forma parte de la caracterización la cual nos permite evaluar la estructura de las MEC, la cual produce imágenes de alta resolución y gran amplificación.

A los cortes destinados para SEM se les preservó en una disolución de 2.5% de glutaraldehído durante 24 horas. Se le realizaron 3 lavados en agitación, con 2 ml una solución de buffer de cacodilato de sodio a 0.1, a 4°C. Finalmente se deshidrataron las muestras (**tabla 2**) y se secaron en una cámara de CO₂ por punto crítico y se recubrieron con oro por sputtering por 4 minutos.

Las muestras se observaron a diversos aumentos (45X, 59X, 141 X, 287X), con un voltaje de 20 kV.

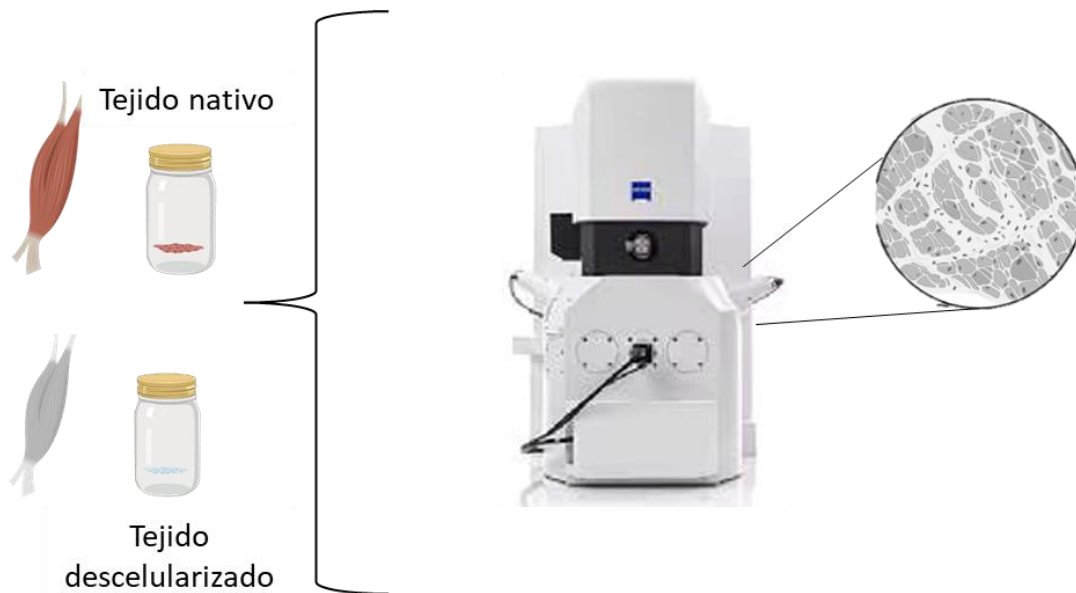


Figura 9. Observación de muestras de SEM (A) Preparación de muestra nativa y descelularizada (deshidratación). (B) Observación de muestras en microscopio EVO

11.6 Análisis inmunohistoquímico

Se tomaron fragmentos de 1 cm³ de muestra nativa y descelularizada, las cuales se colocaron en moldes de aluminio y se incluyeron en medio de montaje Tissue-tek, se congelaron a -30°C. Las muestras que se encontraban en Tissue-Tek se les realizó cortes de espesor de 25 µm en frío utilizando el crióstato (Zeiss), las cuales se montaron en portaobjetos de vidrio (SuperFrostPlus).

Las muestras se descongelaron en PBS durante 10 minutos antes de cada ensayo.

Se utilizó como buffer de trabajo Tris (TBS) -HCL 0.5 M, el cual tiene una capacidad amortiguadora de un pH de 7.6, posterior a esto se realizó una solución de bloqueo con albúmina al 1%, Tris-HCL y Tritón x100.

Para la preparación de muestras se realizaron 2 lavados de 5 minutos a las laminillas para eliminar el medio de montaje (tissue-tek) con PBS. Posterior a esto se retiraron las laminillas del PBS y se secaron perfectamente para construir la barrera hidrofóbica alrededor del tejido. Se aplicó en las muestras, la solución de bloqueo con 0.4 mL de suero normal de cabra durante 1 hora a 37°C, transcurrido el tiempo se decantó la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario monoclonal. Se realizaron 3 lavamos con TrisHCL durante 5 minutos para después incubar el anticuerpo secundario. Finalmente se hicieron 3 lavados con TriHCL durante 5 minutos (**figura 10**).

El efecto del proceso de descelularización sobre la colágena tipo I, laminina y elastina fue evaluada mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo primario monoclonal para **colágena tipo I** [Col-1] (ab6308, Abcam), **elastina** [BA-4] (ab9519, Abcam) y **laminina** (ab11575, Abcam) 1µg/mL a una dilución 1:200. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo para IgG de ratón y conejo a una dilución de 1:500.

En cada uno de los experimentos de inmunofluorescencia descritos anteriormente se llevó a cabo bloqueo para evitar una unión inespecífica usando suero normal de cabra (SIGMA). La incubación con cada uno de los anticuerpos primarios se realizó a 4°C durante 24 horas a oscuridad. La tinción de los núcleos se realizó usando medio de montaje 4',6'-diamidine-dihydrochloride (DAPI) a una concentración de 1mg/mL. En el caso de los anticuerpos secundarios estos fueron incubados durante 2 horas a 37°C. Las micrografías se obtuvieron con microscopio Axiozoom de la Unidad de Microscopía en la Facultad de Medicina de la UNAM.

Con la ayuda del programa Image J, se tomaron 5 campos en 5 segmentos de músculo esquelético diferentes que fueron sometidos a descelularización y el mismo número para segmentos musculares nativos. Con el promedio de los datos obtenidos y a través del programa GraphPad (San Diego).

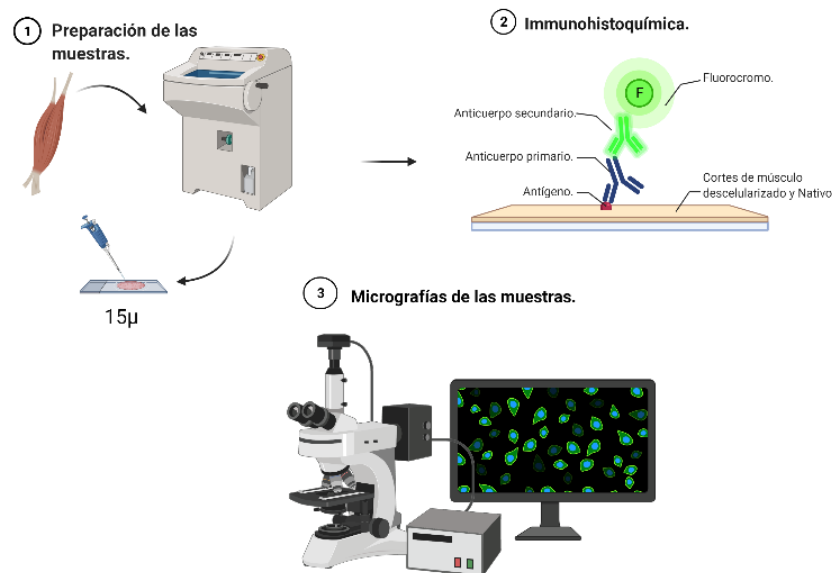


Figura 10. Proceso para análisis inmunohistoquímico. (1) Preparación de muestra y cortes en frío con criostato. (2) Ensayo inmunohistoquímico. (3) Observación de las muestras en microscopio de fluorescencia.

11.7 Aislamiento y cultivo de células mesenquimales derivadas de pulpa dental humana.

Se obtuvieron las células mesenquimales derivadas de pulpa dental del Posgrado de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Las células se filtraron a través de un separador celular (BD Falcon) de 70 μ m y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min, posteriormente, se sembraron en frascos de cultivo (BD Falcon) a una densidad de 50,000 células/cm³. Después de 24 horas, se cambió el medio y las células adheridas se dejaron expandir hasta obtener una confluencia del 90%. Las células se mantuvieron con medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco).

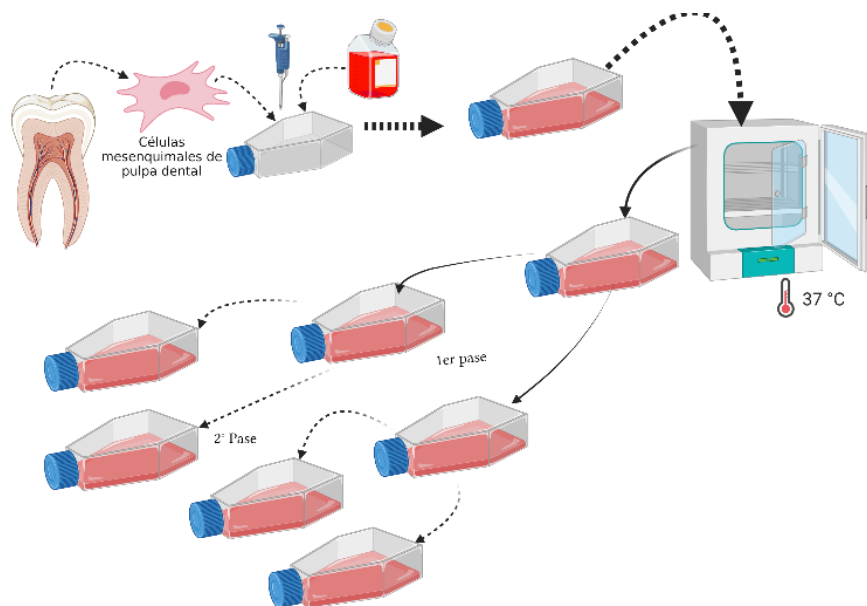


Figura 11. Aislamiento y cultivo de células mesenquimales derivadas de pulpa dental.

11.8 Recelularización del andamio descelularizado.

El andamio de músculo esquelético descelularizado se esterilizó previo a los ensayos biológicos incubándolos en una solución de 10% de antibiótico-antimicótico en PBS durante 24 horas a 4°C, y después se irradió con UV durante 30 min.

Se cortaron 15 películas de 25 μm en frío, las cuales se colocaron en placas de 24 pozos (Fila A, 3 andamios, 1 por pozo). Se rotularon cada caja de 24 pozos con los periodos: 48 horas y 30 días. Se dejó espacios entre cada periodo para evitar contaminación durante la manipulación de las muestras.

Las células mesenquimales aisladas, se sembraron sobre el tejido muscular descelularizado. Se resuspendieron 50,000 células/ cm^3 en 10 μl y estas se sembraron sobre los andamios estériles y secos durante 1 hora (50,000 células/ cm^3). Después de este periodo, los constructos se cultivaron con medio DMEM (Gibco) a 37°C y 90% de humedad relativa durante el tiempo que duró el ensayo.

11.8.1 Ensayo de viabilidad celular.

En pozos separados se colocó un control positivo que consiste en sembrar aproximadamente 25,000 células/ cm^3 sobre un cubreobjetos de vidrio estéril e incubado durante 1 h y un control negativo que va a incluir células previamente tratadas con un agente citotóxico (etanol al 70% durante 30 min)

Se colocaron 50,000 células/pozo y se incubaron los constructos a 37 °C durante 48 horas y 30 días. Transcurridas las primeras 48 horas, con cambios de medio de cultivo DMEM (Gibco), cada 24 horas en campana de flujo laminar.

Se retiró el medio de cultivo y a continuación se realizaron 3 lavados (2 con PBS) (1 con DPBS) a excepción del control negativo, para incubar a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, se añadió 300 μl del homodímero de etidio y calceína a los constructos, se taparon las cajas de cultivo con aluminio y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Finalmente se retiró el homodímero de etidio y la caseína, y se tomaron las micrografías en la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM, utilizando las longitudes de onda de excitación de los fluorocromos las cuales fueron 494 μm para la calceína y 528 μm para el homodímero de etidio, respectivamente. Posteriormente, los recuentos celulares se efectuaron con ayuda del software Image J.

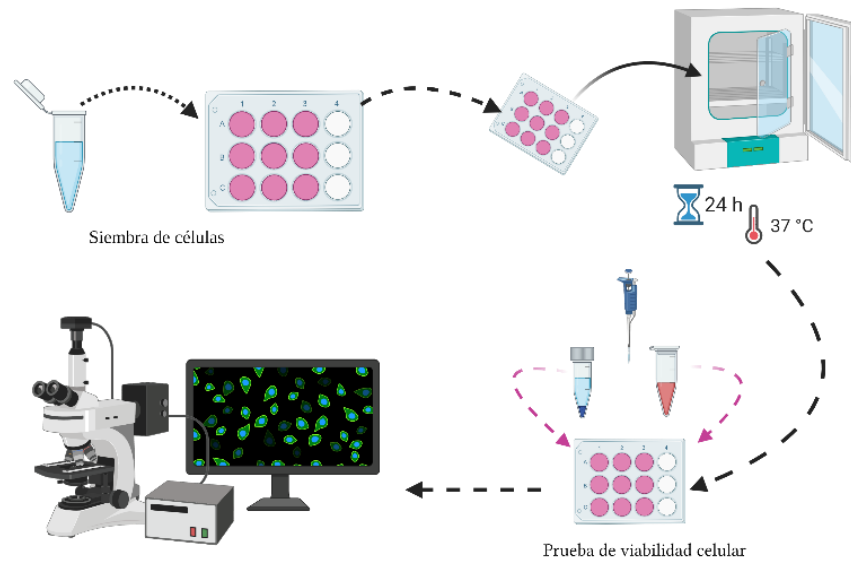


Figura 12. Recelularización del andamio descelularizado y ensayo de viabilidad celular.

12 Resultados y discusión

12.1 Efectividad del proceso de descelularización.

En este trabajo se muestra la caracterización y evaluación de la matriz descelularizada. El músculo esquelético de cerdo que se sometió al protocolo de descelularización antes mencionado, para retirar el mayor componente celular. Macroscópicamente se observó el cambio gradual de color a lo largo del proceso de descelularización por perfusión, generando un andamio completamente blanco, conservando su estructura macroscópica (**figura 13**).

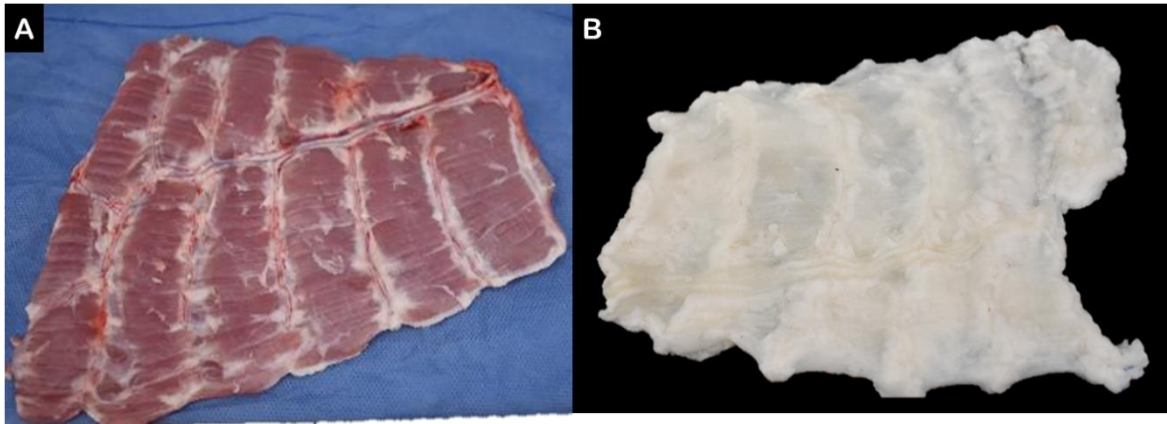


Figura 13. Macrográficas de un segmento de músculo esquelético nativo y después de ser sometido al proceso de descelularización. **(A)** Músculo Nativo. **(B)** Músculo descelularizado.

Un protocolo de descelularización óptimo remueve todos los componentes celulares y deja los componentes de la matriz extracelular (MEC) intactos (29). El marcaje de los núcleos con DAPI muestra la disminución del material celular después de someter las muestras de músculo esquelético al proceso de descelularización. De igual forma la tinción de H&E mostró la remoción del componente nuclear (**figura 14 (E, F)**). Posterior a la tinción de H&E y DAPI, se midió la efectividad del proceso de descelularización en el músculo esquelético utilizando el software de análisis de imagen. Se tomó en cuenta la medida mínima de los núcleos celulares que pueden encontrarse en el tejido $5\mu\text{m}^2$ y su equivalencia en pixeles aumento de la imagen de 112 x.

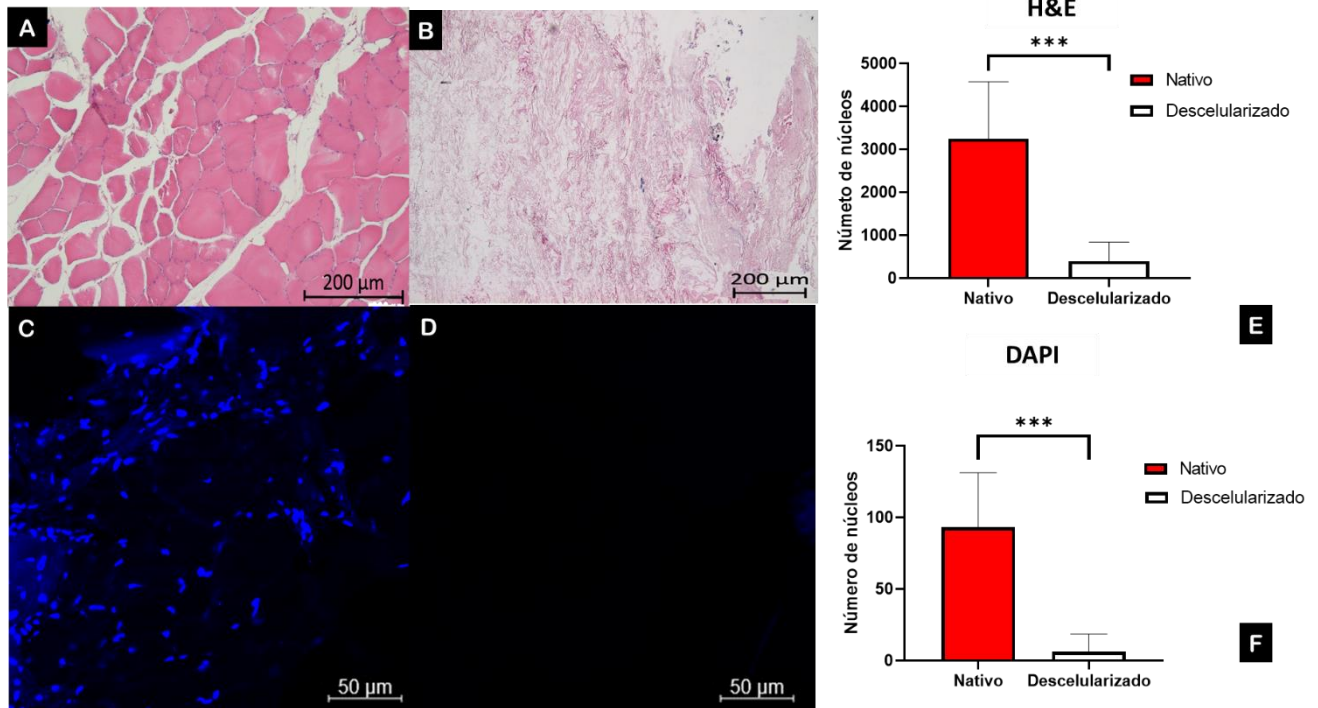


Figura 14. Efectividad del proceso de descelularización del músculo esquelético a través histología y DAPI, (A): músculo nativo donde se aprecian los núcleos de las células teñidos con H&E (morado) y las fibras musculares (rosa). (B) matriz de músculo descelularizado donde se observa un porcentaje menor de núcleos (C): Músculo nativo teñido con DAPI dónde se observan los núcleos de la célula (azul), (D): Músculo descelularizado. (E, F) Estadística de la cuantificación de núcleos con H&E y DAPI.

Para el análisis de imagen con Image J se tomaron dichos aumentos a las micrográficas de tal forma que los núcleos celulares pueden ser captados por el software. Con los resultados de la cuantificación de 5 muestras de músculo esquelético y su contraparte descelularizadas se mostró una diferencia significativa de la cantidad de núcleos celulares presentes ($p < 0.5$) (figura 14 E y F). (46)

Para conocer la efectividad del protocolo de descelularización, se calculó el promedio de descelularización de los cortes histológicos del músculo esquelético, los resultados concuerdan con la literatura, que menciona que el porcentaje de mínimo para aprovechar los andamios en las aplicaciones de Ingeniería de Tejidos debe ser entre 70% y 80%. El músculo esquelético se encuentra por encima de este rango. (21,74)

Tabla 6. Porcentaje de descelularización del músculo esquelético, según la cuantificación realizada por el software Image J.

Tejido	Porcentaje de descelularización	Desviación estándar
Músculo esquelético	85.93%	±13.26%

Los protocolos de descelularización más efectivos incluyen una combinación de enfoques físicos, químicos y enzimáticos. Un protocolo de descelularización generalmente comienza con la lisis de la membrana celular mediante tratamientos físicos o soluciones iónicas, seguida de la separación de los componentes celulares del MEC mediante tratamientos enzimáticos, la solubilización de los componentes celulares nucleares y citoplasmáticos con detergentes y finalmente, la eliminación de los restos celulares del tejido. (47) Por otra parte, diversos autores han desarrollado protocolos de descelularización para una gran variedad de tejidos, pero en específico para el músculo esquelético se utilizó una concentración relativamente baja de agentes de descelularización (tripsina/EGTA, SDS, Triton X-100, PAA, ETOH y DNasa/galactasa) durante 153.5 horas para lograr la descelularización en comparación con las concentraciones informadas para la descelularización por perfusión de órganos sólidos, como el corazón, el hígado y el riñón(48,49). “En el caso de nuestro estudio el tiempo de exposición fue mayor debido al tamaño del tejido muscular esquelético que fue de 22 cm”. Se menciona que para obtener un protocolo exitoso se requiere la preservación y disponibilidad de la microcirculación interna, técnicas asépticas y libres de pirógenos y perfusión secuencial a 40 mL/min por arteria y/o vena, así como agentes físicos, químicos y enzimáticos adecuados en un tiempo de exposición controlado.(46). Se han utilizado diversos agentes para el proceso de descelularización como: ácido peracético (PAA) el cual puede alterar eficazmente la membrana celular y los orgánulos intracelulares (47). Otros estudios demostraron que Tritón X-100 no fue eficaz para eliminar completamente el material celular de un vaso sanguíneo, tendón y ligamento después de la exposición hasta por 4 días (47) Se encontró que el tratamiento con Tritón X-100 alteraba severamente el tendón con respecto a la resistencia a la tracción de las fibras de colágeno aisladas, así como la microestructura de la MEC por una exposición prolongada. (50) Una variedad de tejidos porcinos, incluido el SIS (intestino delgado) y las capas de la vejiga urinaria, se han descelularizado utilizando PAA. Este tratamiento es muy eficaz para eliminar el material celular de estas estructuras delgadas de MEC y, al mismo tiempo, desinfecta el material al introducir microorganismos y oxidar enzimas microbianas(51,52) El

método de digestión detergente-enzimática es una mejor técnica para la descelularización, ya que permite tanto la descelularización completa como la preservación de la estructura del andamio muscular (MEC) (53) . Los resultados de la efectividad de la descelularización indica que el protocolo propuesto resultó efectivo para obtener un andamio de músculo esquelético descelularizado debido a que los agentes tanto físicos (perfusión), químicos (SDS) y enzimático (DNasa) presentan características eficientes para la eliminación de los componentes nucleares y citoplasmáticos así como la distribución de las disoluciones utilizadas en el tejido muscular esquelético (perfusión) y por lo tanto la conservación de la estructura de la MEC.

12.2 Preservación de la matriz extracelular

La preservación de la arquitectura y las características fisicoquímicas de la MEC, posterior a la aplicación del proceso de descelularización, es una de las cualidades que debe de tener un andamio descelularizado que se pretenda utilizar en la Ingeniería de Tejidos y en especial como tratamiento para la reconstrucción de estructuras palatinas.

En el caso de la tinción histológica de tricrómica de Masson se busca demostrar que el protocolo de descelularización que se aplicó en este trabajo logra elimina el citoplasma celular de los tejidos nativos, manteniendo la morfología y densidad de las fibras de colágena de la MEC.

Con la microscopía electrónica de Barrido (SEM) se pudo observar la morfología superficial de las muestras, además de la microarquitectura del tejido. Utilizando esta caracterización comparándolas muestras nativas con las descelularizadas, (Figura 15).

Para la inmunohistoquímica se evaluó de forma cuantitativa el proceso de descelularización mediante el marcaje de colágena tipo I, laminina y elastina, las cuales son proteínas estructurales y funcionales de la MEC, las cuales le van a dar las funciones específicas que presenta esta.

La caracterización biológica se llevó a cabo mediante ensayos de viabilidad celular, con el objetivo de establecer si las características del andamio descelularizado generan citotoxicidad, así como un medio apto para el crecimiento celular, se utilizaron células mesenquimales de pulpa dental para este estudio.

12.3 Tinción tricrómica de Masson y microscopía de barrido

Las micrografías de tinción de Masson y SEM nos permiten analizar la preservación de la MEC, comparando los resultados de las muestras nativas con las descelularizadas (**figura 15**).

La tinción de Masson nos permite observar las fibras de colágeno en color azul mientras que las fibras musculares, el citoplasma y las estructuras oxidadas en color rojo y en lila o marrón el núcleo celular(54), en el caso de las muestras descelularizadas se observa una pérdida del material celular casi en su totalidad, mientras que en las fibras de colágena de la MEC se mantienen con la morfología y densidad de las muestras nativas (**figura 15 (G, H)**). En el caso de las micrografías con mayor aumento se observa que las fibras de colágeno se conservan en su totalidad. **Zhang y col** (46,55) evaluaron las fibras de colágeno mediante la tinción de tricrómica de Masson en la cual concluyeron el éxito de la descelularización por perfusión en la cual se presentó una retención compleja de la arquitectura tridimensional del tejido inicial nativo en comparación con el descelularizado.

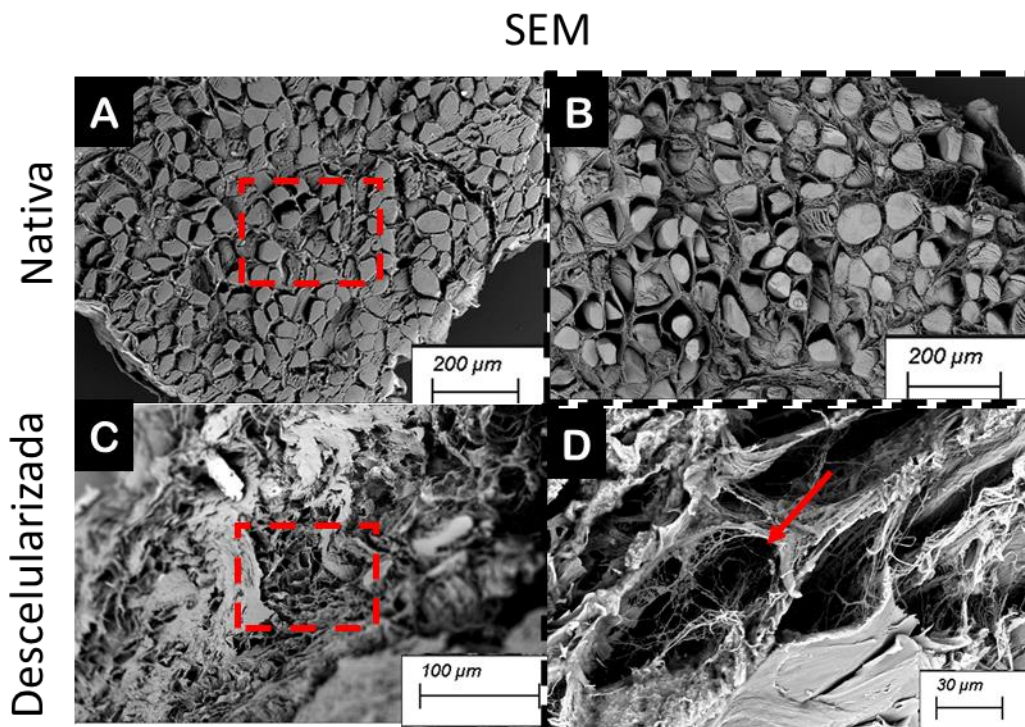


Figura 15. Micrografía electrónica de barrido del músculo nativo (**A, B**) y descelularizado (**C, D**). (**D**) Se observa la red endomisial de colágena alrededor de las cavidades de las fibras musculares descelularizadas las cuales se conservan (flecha).

Tricrómica de Masson

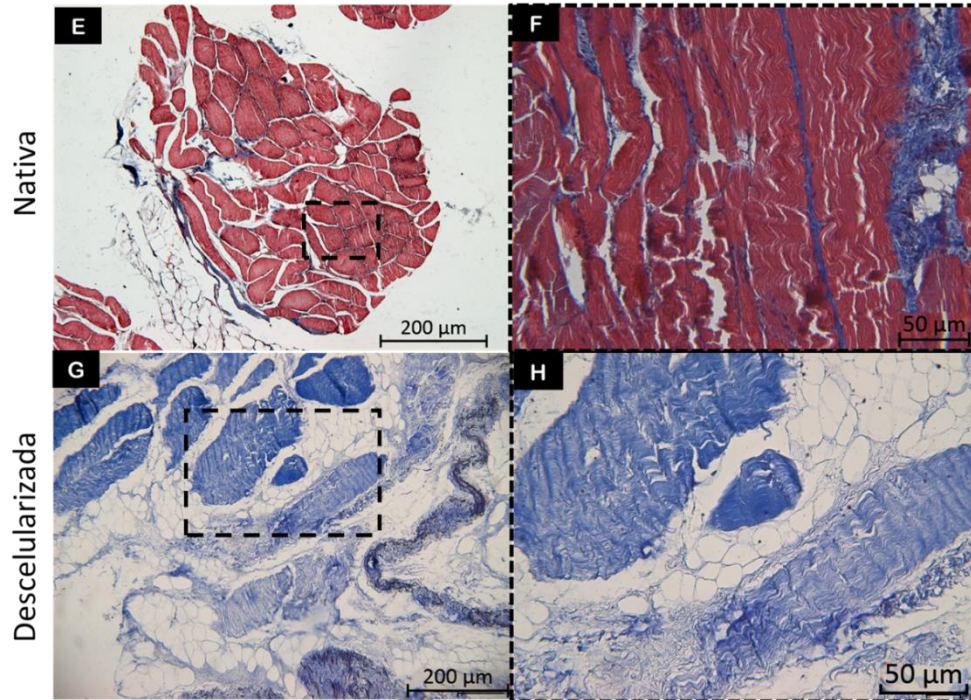


Figura 16. Tricrómica de Masson en músculo nativo (E, F). (G, H) Músculo descelularizado el cual conserva las fibras de colágeno tipo I (azul)

En el caso de las microfotografías de SEM, la morfología superficial de las muestras nativas es muy parecida a las muestras descelularizadas (**figura 15 (A, B, C, D)**) se notan las fibras de la MEC con apariencia similar a las muestras nativas (**figura 15 (D)**) y después del protocolo de descelularización (**figura 15 (G, H)**).

Zhang y col (46,55) por otra parte también analizaron la arquitectura del músculo esquelético nativo observando tubos endomisiales residuales, límites claros de miofibras con elementos microfibrilares densamente empaquetados dentro de la fibra muscular. En el caso del tejido descelularizado se pudo observar que únicamente quedó el epimisio, perimisio y endomisio rodeados de tejido conectivo. En el caso del endomisio reveló una serie de 'tubos' con una disposición jerárquica nativa y periódicamente paralela creada después de la descelularización de las fibras musculares, así como un área engrosada que rodea las redes endomisiales que es el perimisio.

12.4 Inmunohistoquímica de colágeno tipo I, laminina y elastina

La evaluación de los componentes de la MEC se llevó a cabo con inmunohistoquímica por inmunofluorescencia contra colágena tipo I, laminina y elastina.

Para establecer una medida cuantitativa de efectividad de la descelularización con los resultados obtenidos de las imágenes de inmunohistoquímica contra colágena tipo I, laminina y elastina se llevó a cabo la cuantificación del área positiva al marcaje.

Los resultados mostraron que la colágena se modificó en un 17% con relación a la muestra nativa, la elastina se modificó en un 26.8% y la laminina en un 9.4% (**figura 16**). Este resultado sugiere que entre las muestras nativas y descelularizadas se presentó una disminución en la cantidad de las proteínas estudiadas, sin embargo, el proceso de descelularización no alteró la estructura ni la composición de estas. (**figura 16**).

Zhang y col (46,55) mostraron evidencia de retención de las proteínas de la MEC, como es laminina, colágeno tipo I, fibronectina y elastina. Tanto en el músculo nativo como en el descelularizado, hubo una clara localización de estas en el endomisio y el epimisio que rodea las fibras musculares tanto en cortes transversales como longitudinales. La composición, organización y rigidez de la matriz extracelular (MEC) es importante para la homeostasis tisular, ensamblaje y remodelan de esta durante los eventos de reorganización tisular dinámica. Por lo tanto, los resultados que obtuvieron los autores nos mencionan que al evaluar las proteínas antes mencionadas se conservaron, pero no dan un análisis preciso del porcentaje de pérdida. Por otra parte, comparamos los resultados obtenidos en nuestro estudio en el cual se analizó cada proteína y su porcentaje de pérdida, así como la conservación de la morfología de cada una de ellas. También es importante comparar el protocolo realizado por los autores y el de nuestro estudio. En nuestro caso los agentes tanto físicos, químicos y enzimáticos no alteraron la MEC ni sus componentes principales de manera significativa como lo son las proteínas estudiadas. En el caso de los autores se llevó a cabo un proceso de descelularización utilizando agentes químicos como el Tritón X-100 el cual genera una mayor alteración de los componentes de la MEC, así como el uso de enzimas combinadas como la tripsina y la galactasa. Por otra parte, el tiempo de exposición al que fue sometido el tejido muscular es un factor importante para la preservación del colágeno tipo I, laminina, elastina y fibronectina.

Otro resultado que obtuvieron fue la presencia similar de colágeno y fibras elásticas en el perimisio descelularizado. La elastina se distribuyó en una dirección perpendicular al eje longitudinal de la vaina de miofibras.

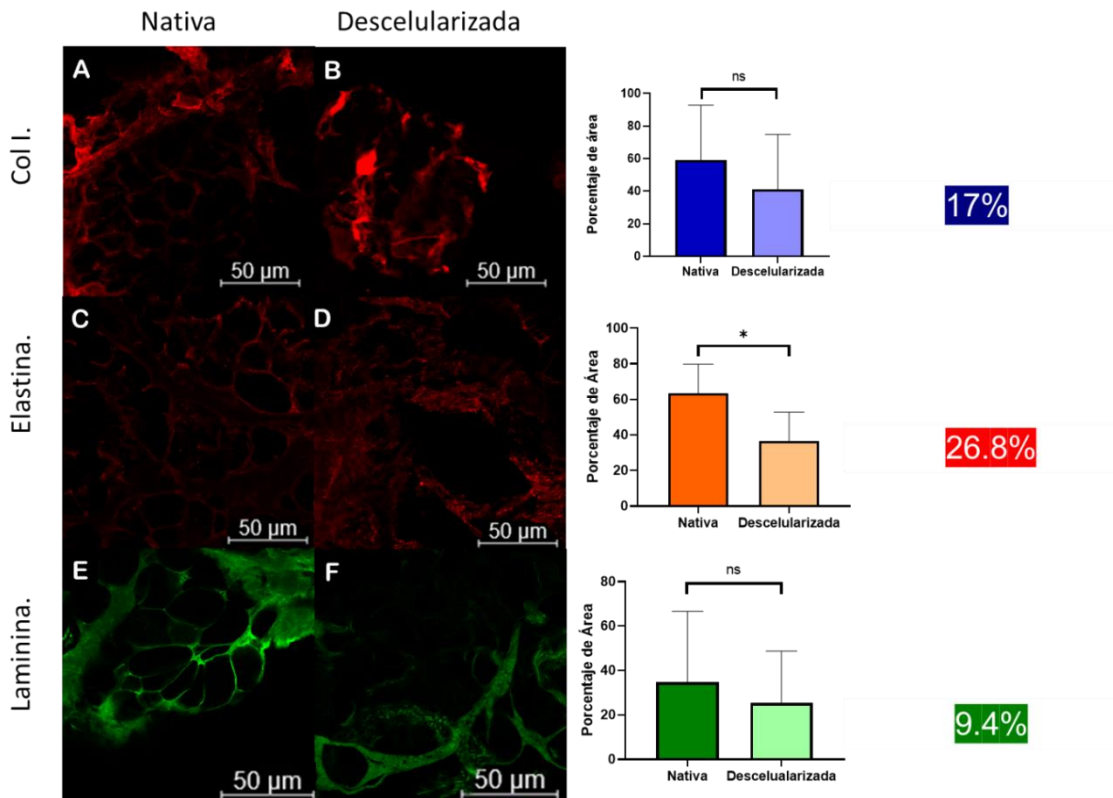


Figura 17. Inmunofluorescencia contra (A, B) colágena tipo I nativa y descelularizada. (C, D) Elastina nativa y descelularizada. (E, F) Laminina nativa y descelularizada.

12.5 Recelularización del andamio de músculo esquelético descelularizado.

El cultivo primario de células mesenquimales de pulpa dental (**DPSC**) mostró un crecimiento de tipo fibroblástico a partir de los primeros días. El crecimiento se evidenció entre las 48 y 72 horas de cultivo. Se ha demostrado que las DPSC exhiben una mayor tasa de proliferación y viabilidad en los primeros pasajes en comparación con otros grupos de células troncales mesenquimales (56). Ha habido reportes sobre el potencial de estas células de la pulpa dental para diferenciarse del linaje adiposo, óseo, cartilaginoso, muscular e incluso precursores neurales (57,58)

Los constructos evaluados se les realizó ensayo de viabilidad después de 48 horas y 30 días de acuerdo con el procedimiento descrito. La determinación de la viabilidad se realizó mediante la técnica de LIVE/DEAD la cual nos permite realizar un ensayo

funcional, de acuerdo con la integridad de la membrana plasmática, así como el estado metabólicamente activo de las células.

Los resultados del ensayo de LIVE/DEAD realizados en las células en cultivo mostraron siempre un porcentaje de viabilidad superior al 90%. Para las células cultivadas durante 48 horas, presentaron un porcentaje de viabilidad de 92% y para células cultivadas durante 30 días la viabilidad obtenida fue del 78% (Fig. 17 2a y 2b). Los resultados del ensayo LIVE/DEAD en los constructos tisulares (células más las matrices descelularizadas) mostraron un porcentaje de viabilidad del 92% y del 78% para los constructos cultivados durante 48 horas y 30 días respectivamente. Diversos autores evaluaron la viabilidad celular la cual mostró que a las 48 horas fue superior al 85% sobre matrices descelularizadas (57–59). Además, en las condiciones de cultivo definidas las DPSC tiene como principal característica una capacidad proliferativa hasta los 60 días, por lo tanto, en nuestro estudio las células demostraron una alta vitalidad y capacidad para la proliferación a las 48 horas continuando así a los 30 días, por este motivo las células se encontraron en un espacio muy reducido dentro del pozo lo que contribuyó a decrecer la viabilidad.

En este estudio hace referencia al uso de tejido de matriz extracelular (MEC) alogénico o xenogénico para grandes defectos de tejido nativo. Los injertos de MEC presentan baja inmunogenicidad y, lo que es importante para la integridad estructural. Existen varios injertos con componentes de la MEC las cuales se derivan de la duramadre, el pericardio, dermis y la submucosa del intestino delgado (SIS) por mencionar algunos ejemplos. Las cuales son utilizadas para la reconstrucción después de quemaduras, reparaciones de hernias y como tratamiento para el labio y paladar hendido. Los primeros datos sugieren que las matrices descelularizadas muestra propiedades favorables adicionales para la cicatrización de heridas y la cirugía reconstructiva, como la neovascularización (60).

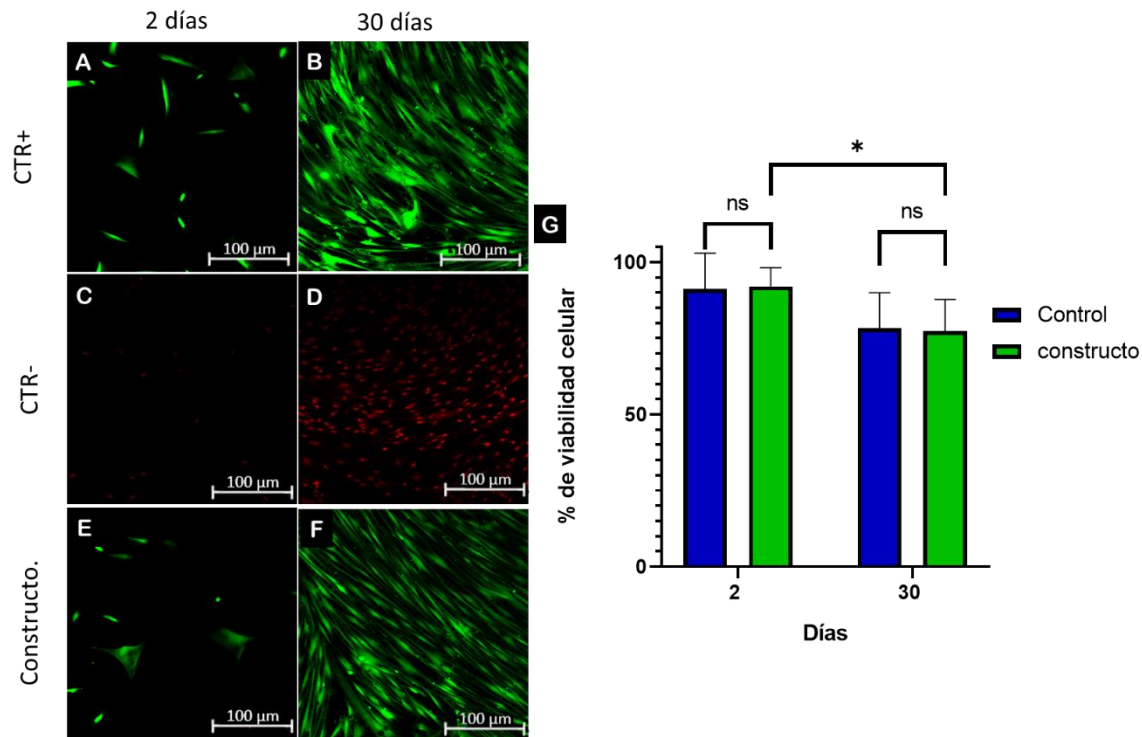


Figura 18. Viabilidad del músculo con células mesenquimales humanas obtenidas a partir de pulpa dental. (E y F) cultivo de las células sobre la matriz del músculo desceldularizado después de 48 horas y 30 días. (G) Estadística del porcentaje de viabilidad que se obtuvo en el constructo.

13 Conclusiones

Se realizó un protocolo de desceldularización de músculo esquelético de cerdo, el cual fue exitoso esto se evaluó a través de la caracterización fisicoquímica e histológica obteniéndose un porcentaje de desceldularización del 85.93%

Se analizó la MEC resultante de la desceldularización de músculo esquelético, así como la composición de proteínas estructurales como la colágena tipo I, laminina y elastina, las cuales disminuyeron en cantidad, sin embargo conservaron su morfología y densidad encontrando que el proceso de desceldularización es efectivo ya que se utilizó agentes que ayudaron a mantener la integridad de dichas proteínas de la MEC, así como ser un andamio viable para la proliferación celular. Por otra parte, se realizaron pruebas de viabilidad celular las cuales reportan que el andamio no es citotóxico.

Se puede asegurar que se obtuvieron andamios de músculo esquelético de origen porcino desceldularizado para su posible aplicación en la regeneración de estructuras palatinas de origen muscular.

14 Perspectivas

En el protocolo de descelularización se pueden observar cambios de consistencia del músculo esquelético. Por lo que se podría utilizar en forma de membranas, o como una biotinta lo que no fue objeto de esta investigación. Sin embargo, se plantea para trabajos posteriores la caracterización mecánica de dichos biomateriales.

Para trabajos futuros, se plantea la posibilidad de realizar pruebas biomecánicas y aplicarlo con terapia génica en un modelo in-vivo y realizar las pruebas pertinentes para su valoración.

15 Bibliografía

1. RUIZ ESCOLANO MG. EL MOLDEAMIENTO NASOALVEOLAR EN EL NIÑO CON FISURA LABIOPALATINA [Internet]. [cited 2019 Mar 28]. Available from: <http://www.doctorado.us.es/tesis-doctoral/repositorio-tesis/details/2/5974>
2. Rodríguez Gómez MJ. Labio y/o paladar hendido: una revisión. The effect of probiotic containing yogurt on salivary Mutans streptococci counts: A randomized clinical controlled trial View project [Internet]. 2009. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/260290042>
3. Alarcón-Almanza JM. Labio y paladar hendido. Revista Mexicana de Anestesiología. 2010;33(SUPPL. 1):76–8.
4. Alarcón J. Labio y paladar hendido. Revista Mexicana de Anestesiología. 2010;33(SUPPL. 1):105–7.
5. Moreau JL, Caccamese JF, Coletti DP, Sauk JJ, Fisher JP. Tissue Engineering Solutions for Cleft Palates. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. 2007;65(12):2503–11.
6. Sharif F, Ur Rehman I, Muhammad N, MacNeil S. Dental materials for cleft palate repair. Materials Science and Engineering C [Internet]. 2016;61:1018–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.019>
7. Baiguera S, del Gaudio C, di Nardo P, Manzari V, Carotenuto F, Teodori L. 3D Printing Decellularized Extracellular Matrix to Design Biomimetic Scaffolds for Skeletal Muscle Tissue Engineering. BioMed research international [Internet]. 2020 [cited 2021 Nov 9];2020. Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/33282941/>
8. RE N, L L, MA E. Physiology, Muscle. 2021 [cited 2021 Aug 10]; Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/30335291/>
9. Dave HD, Shook M, Varacallo M. Anatomy, Skeletal Muscle. StatPearls [Internet]. 2020 Sep 22 [cited 2021 Jul 5]; Available from: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/books/NBK537236/>

10. Hafen BB, Shook M, Burns B. Anatomy, Smooth Muscle. StatPearls [Internet]. 2020 Aug 15 [cited 2021 Aug 10]; Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/books/NBK532857/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pbidi.unam.mx:2443/books/NBK532857/)
11. Sweeney HL, Hammers DW. Muscle Contraction. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/>
12. Wewer UM, Engvall E. Merosin/laminin-2 and muscular dystrophy. Neuromuscular disorders : NMD [Internet]. 1996 Dec [cited 2021 Nov 8];6(6):409–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/9027848/>
13. P B, SS S. Regulation of blood flow in the microcirculation: role of conducted vasodilation. Acta physiological (Oxford, England) [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 12];202(3):271–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/21199397/>
14. SS S. Integration of blood flow control to skeletal muscle: key role of feed arteries. Acta physiological Scandinavica [Internet]. 2000 [cited 2021 Aug 12];168(4):511–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/10759588/>
15. LR D, PC J. Diameter changes in arteriolar networks of contracting skeletal muscle. The American journal of physiology [Internet]. 1991 [cited 2021 Aug 12];260(3 Pt 2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/2000963/>
16. Guía de Anatomía Oral y Dental [Internet]. [cited 2019 Feb 25]. Available from: www.silverti.com
17. Norton NS, Netter FH. Netter, Anatomía de cabeza y cuello para odontólogos / Neil S. Norton ; ilustraciones de Frank H. Netter ; ilustradores colaboradores, Carlos A.G. Machado ... [et al. ; traducción, Elsevier España]. 2018 [cited 2021 Aug 10]; Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat00574a&AN=cbzara.b2000801&site=eds-live>
18. Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [cited 2021 Aug 10]. Available from: <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional>
19. Phalke N, Goldman JJ. Cleft Palate. StatPearls [Internet]. 2021 Feb 21 [cited 2021 Aug 10]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.pbidi.unam.mx:2443/books/NBK563128/>
20. Rodríguez MTC, Torres MEM. Labio y paladar fisurados. Aspectos generales que se deben conocer en la atención primaria de salud. Revista Cubana de Medicina General Integral. 2001;17(4):379–85.
21. Trigos Micoló I, Guzmán y López Figueroa ME. Análisis de la incidencia, prevalencia y atención del labio y paladar hendido en México. Cirugía Plástica [Internet]. 2003;13(1):35–9. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cplast/cp-2003/cp031h.pdf>
22. Manuel Velázquez Vázquez J, Estrada Meraz H, Álvarez Ledezma J, Alejandra Flores Paredes D, Alejandra Solís D, Plástico Director C, et al. Tratamiento actual de la fisura labial Trabajo de divulgación CIRUGIA PLASTICA.

23. Jiménez Barragán K, Glicerio González Sánchez J, Ernesto Sahagún Flores J, Karina Jiménez Barragán Soledad Orozco D, el Capullo colonia. Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas Volumen 16, Núm. 2, abril-junio [Internet]. Vol. 16, Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas. 2011 [cited 2019 Mar 24]. Available from: www.nietoeditores.com.mx
24. Cohen SR, Kalinowski J, LaRossa D, Randall P. Cleft palate fistulas: a multivariate statistical analysis of prevalence, etiology, and surgical management. Plastic and reconstructive surgery [Internet]. 1991 Jun [cited 2019 Mar 28];87(6):1041–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2034725>
25. Smith DM, Vecchione L, Jiang S, Ford M, Deleyiannis FWB, Ann Haralam M, et al. The Pittsburgh Fistula Classification System: A Standardized Scheme for the Description of Palatal Fistulas. The Cleft Palate-Craniofacial Journal [Internet]. 2007 Nov 15 [cited 2019 Mar 28];44(6):590–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177198>
26. Penna V, Bannasch H, Stark GB. The Turbinate Flap for Oronasal Fistula Closure. Annals of Plastic Surgery [Internet]. 2007 Dec [cited 2019 Mar 28];59(6):679–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046152>
27. C CI IR RU UG GÍ ÍA A P PL LÁ ÁS ST TI IC CA A I IB BE ER RO O-L LA AT TI IN NO OA AM ME ER RI IC CA AN NA A [Internet]. [cited 2019 Mar 24]. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/cpil/v40n3/articulo4.pdf>
28. Patil VA, Masters KS. Engineered Collagen Matrices. Bioengineering 2020, Vol 7, Page 163 [Internet]. 2020 Dec 16 [cited 2021 Oct 24];7(4):163. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-5354/7/4/163/htm>
29. Baiguera S, del Gaudio C, di Nardo P, Manzari V, Carotenuto F, Teodori L. 3D Printing Decellularized Extracellular Matrix to Design Biomimetic Scaffolds for Skeletal Muscle Tissue Engineering. BioMed Research International. 2020;2020.
30. Porzionato A, Sfriso MM, Pontini A, Macchi V, Petrelli L, Pavan PG, et al. Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery. International Journal of Molecular Sciences 2015, Vol 16, Pages 14808-14831 [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Aug 12];16(7):14808–31. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/7/14808/htm>
31. Liao J, Xu B, Zhang R, Fan Y, Xie H, Li X. Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives. Journal of Materials Chemistry B [Internet]. 2020 Nov 18 [cited 2021 Aug 12];8(44):10023–49. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/tb/d0tb01534b>
32. Baiguera S, del Gaudio C, di Nardo P, Manzari V, Carotenuto F, Teodori L. 3D Printing Decellularized Extracellular Matrix to Design Biomimetic Scaffolds for Skeletal Muscle Tissue Engineering. BioMed Research International. 2020;2020.

33. Urciuolo A, Coppi P de. Decellularized Tissue for Muscle Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol 19, Page 2392 [Internet]. 2018 Aug 14 [cited 2021 Oct 24];19(8):2392. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/8/2392/htm>
34. Teodori L, Costa A, Marzio R, Perniconi B, Coletti D, Adamo S, et al. Native extracellular matrix: a new scaffolding platform for repair of damaged muscle. *Frontiers in Physiology*. 2014;0:218.
35. Sarrafian TL, Bodine SC, Murphy B, Grayson JK, Stover SM. Extracellular matrix scaffolds for treatment of large volume muscle injuries: A review. *Veterinary Surgery* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Oct 24];47(4):524–35. Available from: <https://onlinelibrary-wiley-com.pbidi.unam.mx:2443/doi/full/10.1111/vsu.12787>
36. Wu M, Cronin K, Crane JS. Biochemistry, Collagen Synthesis. *StatPearls* [Internet]. 2021 Sep 13 [cited 2021 Oct 24]; Available from: <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/books/NBK507709/>
37. Wise SG, Weiss AS. Tropoelastin. *The international journal of biochemistry & cell biology* [Internet]. 2009 Mar [cited 2021 Nov 8];41(3):494–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18468477/>
38. Rodríguez-Cabello JC, Gonzalez De Torre I, González-Pérez M, González-Pérez F, Montequi I. Fibrous Scaffolds From Elastin-Based Materials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021 Jul 16;9:621.
39. Almine JF, Bax D v., Mithieux SM, Smith LN, Rnjak J, Waterhouse A, et al. Elastin-based materials. *Chemical Society Reviews* [Internet]. 2010 Aug 18 [cited 2021 Nov 8];39(9):3371–9. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/cs/b919452p>
40. Witek J, Flores JL. Biochemistry, Merosin. *StatPearls* [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 8]; Available from: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/31751041/>
41. Jiang Y, Li R, Han C, Huang L. Extracellular matrix grafts: From preparation to application (Review). *International Journal of Molecular Medicine* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2021 Nov 9];47(2):463–74. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2020.4818/abstract>
42. Zhang J, Hu ZQ, Turner NJ, Teng SF, Cheng WY, Zhou HY, et al. Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template. *Biomaterials*. 2016 May 1;89:114–26.
43. Serifis N, Matheson R, Cloonan D, Rickert CG, Markmann JF, Coe TM. Machine Perfusion of the Liver: A Review of Clinical Trials. *Frontiers in Surgery*. 2021 Mar 26;8:64.
44. Gamba PG, Conconi MT, lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatric surgery international* [Internet]. 2002 Sep [cited 2021 Nov 9];18(5–6):327–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12415348/>

45. Junqueira LCU. Histología básica. Texto & atlas. 12th ed. Español. Panamericana M, editor. 2015;367–84.
46. Zhang J, Cheng WY, Hu ZQ, Turner NJ, Zhang L, Wang Q, et al. A panel data set on harvest and perfusion decellularization of porcine rectus abdominis. *Data in Brief*. 2016 Jun 1;7:1375–82.
47. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul 1;27(19):3675–83.
48. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*. 2011 Feb;53(2):604–17.
49. Ott H, Matthiesen T, Goh S, Black L, Kren S. Matriz descellularizada por perfusión: uso de la plataforma de la naturaleza para diseñar un corazón bioartificial. *Medicina natural [Internet]*. 2008 [cited 2022 Jan 1]; Available from: https://idp.nature.com/authorize/casa?redirect_uri=https://www.nature.com/articles/nm1684&casa_token=fObt7g9p0KsAAAAA:JC8ZrsXNaZ4ndfdYjbWJQ47PViP24UAbuxNrqZk1A2YiGaUGMQYbzTj8BV-pr4q0mAfroDD3gpvdpHBxmw
50. Jiang Y, Li R, Han C, Huang L. Extracellular matrix grafts: From preparation to application (Review). *International Journal of Molecular Medicine [Internet]*. 2021 Feb 1 [cited 2021 Dec 14];47(2):463–74. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2020.4818/abstract>
51. Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: Evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002 Jul 20;79(2):211–6.
52. Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, Versen R von, biológicos GP-P, 1999 undefined. Seguridad viral de los trasplantes de tejido óseo avital: evaluación de los pasos de esterilización de cuboides esponjosos utilizando una mezcla de ácido peracético y metanol. Elsevier [Internet]. [cited 2022 Jan 1]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104510569990177X>
53. VeDepo MC, Detamore MS, Hopkins RA, Converse GL. Recellularization of decellularized heart valves: Progress toward the tissue-engineered heart valve. *Journal of tissue engineering [Internet]*. 2017 Jan 1 [cited 2021 Dec 14];8:2041731417726327. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28890780>
54. Texto de histología - 5ta edición [Internet]. [cited 2021 Nov 7]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/texto-de-histologia/gartner/978-84-9113-807-5>
55. Zhang J, Hu ZQ, Turner NJ, Teng SF, Cheng WY, Zhou HY, et al. Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template. *Biomaterials*. 2016 May 1;89:114–26.

56. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Sanchez-Quevedo MC, Campos A, et al. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 2013 Apr 1;15(4):507–18.
57. Yang X, Zhang W, van den Dolder J, Frank Walboomers X, Bian Z, Fan M, et al. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2007;1(2):128–35.
58. Karaöz E, Demircan PC, Saflam Ö, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochemistry and Cell Biology*. 2011 Oct;136(4):455–73.
59. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Células madre de la pulpa dental humana posnatal (DPSC) in vitro e in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. [Internet]. 2000 [cited 2022 Jan 1]; Available from: <https://www.pnas.org/content/97/25/13625.short>
60. Haney NM, Huang MM, Liu JL, Hawksworth DJ, Burnett AL. Acellular Dermal Matrix Tissues in Genitourinary Reconstructive Surgery: A Review of the Literature and Case Discussions. *Sexual Medicine Reviews*. 2021 Jul 1;9(3):488–97.