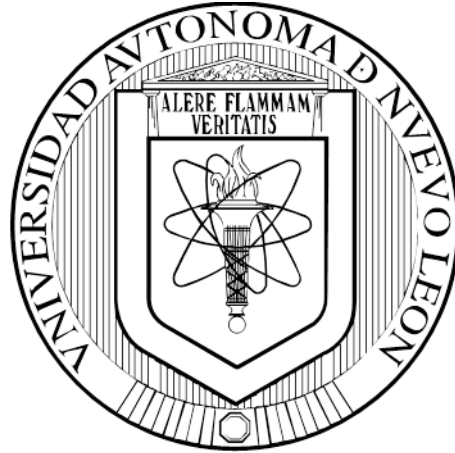


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA DESCELULARIZACIÓN DE
INJERTOS PORCINOS HUESO-TENDÓN-HUESO”**

POR

I.B.T. JORGE ARTURO SEPÚLVEDA GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

SEPTIEMBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**



**“COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA DESCELULARIZACIÓN DE
INJERTOS PORCINOS HUESO-TENDÓN-HUESO”**

POR

I.B.T. JORGE ARTURO SEPÚLVEDA GARCÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

SEPTIEMBRE, 2017

**“COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA DESCELULARIZACIÓN DE
INJERTOS PORCINOS HUESO-TENDÓN-HUESO”**

Aprobación de la tesis:



Dra. C. María de Jesús Loera Arias

Directora de tesis



Dr. Med. José Félix Vilchez Cavazos

Codirector de tesis



Dra. C. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo

Comisión de tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

Monterrey, Nuevo León

Septiembre del 2017

“COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA DESCELULARIZACIÓN DE INJERTOS PORCINOS HUESO-TENDÓN-HUESO”

Presentado por

IBT Jorge Arturo Sepúlveda García.

Este trabajo se desarrolló en el departamento de Histología, Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. en C. María de Jesús Loera Arias y la co-dirección del Dr. Med. José Félix Vilchez Cavazos



Dra. en C. María de Jesús Loera Arias

Director



Dr. Med. José Félix Vilchez Cavazos

Co- Director

Monterrey, Nuevo León

Agosto del 2017

RESUMEN

IBT. Jorge Arturo Sepúlveda García
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de titulación: Septiembre 2017

Título del Estudio: "COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS PARA DESCELULARIZACIÓN DE INJERTOS PORCINOS HUESO-TENDÓN-HUESO"

Páginas del estudio: 79

Área del estudio: Morfología

Candidato para el grado de Maestra en Ciencias
con Orientación en Morfología

Propósito y Método del estudio

Las lesiones de ruptura de ligamento cruzado anterior son frecuentes, las estrategias de reconstrucción mediante autoinjertos han dejado de ser el estándar de oro debido a que producen una lesión secundaria en el paciente. En su lugar la estrategia actual es el uso de aloinjertos de origen cadavérico. Sin embargo, debido a la poca disponibilidad de donadores hoy en día su uso se ve limitado. En un replanteamiento de las estrategias actuales disponibles se decidió optar por el uso de xenoinjertos de origen porcino ya que existe evidencia clínica que respalda su uso. Para emplear xenoinjertos en la clínica estos deben ser acondicionados para evitar el rechazo inmune. El procedimiento más ampliamente aceptado en la actualidad es la descclularización del tejido en cuestión. Para llevar a cabo este proyecto se evaluaron tres estrategias de descclularización que consisten en 1) aplicación de EDTA y el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS), 2) aplicación de sonicación, ácido peracético, EDTA y detergente y 3) ciclos de congelación y descongelación y entrecruzamiento con glutaraldehído. Los tejidos tratados se evaluaron histológicamente mediante la técnica de H&E, cuantificación de núcleos por DAPI; se llevaron a cabo las tinciones especiales de tricrómico de Masson para detectar colágeno y Verhoeff para fibras elásticas. Por último, se evaluó la preservación de las fibras de colágeno al cuantificar esta proteína por el método de oxidación de la hidroxiprolina y medición por colorimetría.

Conclusiones y contribuciones

Se estandarizó la técnica de obtención del xenoinjerto hueso-tendón-hueso a partir de tendones rotulianos porcinos. Se encontró que las técnicas más eficientes de descclularización fueron las de sonicación-ácido peracético y EDTA-SDS, siendo las más fácil de llevar a cabo la de EDTA-SDS. En todas las condiciones experimentales se preservan las fibras de colágeno.



Dra. en C. María de Jesús Loera Arias
Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco con todo mi corazón a mi familia por su incondicional apoyo a lo largo de toda mi vida. A mis padres, que siempre los llevo en el corazón, Georgina García González y Arturo Sepúlveda Lugo les agradezco su amor, dedicación y apoyo a mis metas y objetivos. A mis hermanos Moisés y Carlos les agradezco la solidaridad y hermandad, quiero que sepan que con afecto siempre les recuerdo. A mis tías y tíos que siempre han sido y serán motivo de retorno a mis tierras queridas por el amor que les tengo.

A mi compañera de vida, la luz que llevo en mis ojos y pilar que sostiene mi amor, Bianka Dianey Camacho Zamora: Al redactar estas palabras mis sentimientos afloran y no puedo evitar sentir el amor y aprecio que te tengo.

A la Dra. María de Jesús Loera Arias mi mentora y amiga, a quien siempre le tendré gran respeto, afecto y admiración, con quien compartí los mejores momentos de mi maestría y brindó el consejo y conocimiento que atesoraré con cariño.

Al Dr. José Félix Vilchez Cavazos quien me dio la oportunidad y confianza de llevar a cabo este proyecto. Le agradezco honestamente esta oportunidad que me permitió crecer a nivel profesional y como persona.

A la Dra. Raquel Guadalupe Ballesteros Elizondo a quien le estoy muy agradecido por compartirme su experiencia de manera incondicional, por los consejos y apoyo para que este camino rindiera el presente fruto de conocimiento.

A mis compañeros, que con el paso del tiempo se han vuelto mis amigos y los llevo siempre en mis más valudos recuerdos: A Norma Estefanía Ramirez Ávila y Daniel Matta Yee Chig que se han convertido en unos amigos incondicionales y solidarios. A Ana Patricia Duarte Jurado una amiga honesta y solidaria. A David Hernan Martinez Puente, José Juan Perez Trujillo, Daniel Salas Treviño, Olivia Abigail Robles Rodriguez por brindarme su amistad, consejo y apoyo, con ellos compartí los mejores momentos de este camino.

AGRADECIMIENTO AL CONACyT

Hago extensivo mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría y por el apoyo económico otorgado a un servidor, registrado con el número de beca 708162. “¡Salve CONACyT!” principal pilar del desarrollo científico y modernización tecnológica de México.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES.....	14
INJERTOS DE TENDÓN.....	14
DESCELULARIZACIÓN DE TENDÓN	15
CONSIDERACIONES PATOLÓGICAS	18
MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN DEL TENDÓN.....	19
TÉCNICAS PARA DESCELULARIZACIÓN DE TENDÓN.....	21
TÉCNICAS DE RECELULARIZACIÓN	25
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVO GENERAL.....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
MATERIAL Y EQUIPO.....	29
REACTIVOS	29
SOLUCIONES	29
EQUIPO.....	29
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.....	30
PREPARACIÓN DEL INJERTO	31
DESCELULARIZACIÓN DE TENDÓN	34
SONICACIÓN.....	34
TRATAMIENTO CON DETERGENTE.....	34
TRATAMIENTO POR CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN	35
ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....	35
CONTEO CELULAR.....	36
CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENO	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
CONSIDERACIONES ÉTICAS	37
4. RESULTADOS.....	38
OBTENCIÓN DE LOS INJERTOS HUESO-TENDÓN-HUESO	38
REMOCIÓN DEL CONTENIDO CELULAR.....	38
ANÁLISIS DE LA REMOCIÓN DE CONTENIDO CELULAR	39
ANÁLISIS DE LA PRESERVACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	47
CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENO	59

5.	<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>60</u>
6.	<u>CONCLUSIONES.....</u>	<u>66</u>
7.	<u>PERSPECTIVAS.....</u>	<u>67</u>
8.	<u>LITERATURA CITADA</u>	<u>68</u>
9.	<u>ANEXO DE TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.....</u>	<u>75</u>

Índice de figuras, tablas y gráficas

Figura 1. Dibujo esquemático de la estructura de la matriz extracelular del tendón.	20
Figura 2. Dibujo esquemático de la estructura básica del tendón.	21
Figura 3. Esquema representativo de las dimensiones del injerto.	32
Figura 4. Injerto hueso-tendón-hueso.	38
Figura 5. Micrografías representativas de los tendones del grupo control teñidas con H&E.	411
Figura 6. Micrografías representativas de los tendones del grupo de congelación teñidas con H&E.	422
Figura 7. Micrografías representativas de los tendones del grupo de sonicación teñidas con H&E.	433
Figura 8. Micrografías representativas de los tendones del grupo de SDS teñidas con H&E.	444
Figura 9. Micrografías representativas del análisis con DAPI.	46
Figura 10. Micrografías representativas de los tendones del grupo control teñidas con tricrómico de Masson.	49
Figura 11. Micrografías representativas de los tendones del grupo de congelación teñidas con tricrómico de Masson.	50
Figura 12. Micrografías representativas de los tendones del grupo de sonicación teñidas con tricrómico de Masson.	51
Figura 13. Micrografías representativas de los tendones del grupo de SDS teñidas con tricrómico de Masson.	52
Figura 14. Micrografías representativas de los tendones del grupo control teñidas con Verhoeff.	555
Figura 15. Micrografías representativas de los tendones del grupo de congelación teñidas con Verhoeff.	566
Figura 16. Micrografías representativas de los tendones del grupo de sonicación teñidas con Verhoeff.	577
Figura 17. Micrografías representativas de los tendones del grupo de SDS teñidas con Verhoeff.	588

Gráficas

Gráfica 1. Conteo de núcleos mediante fluorescencia.	46
Gráfica 2. Cuantificación del contenido de colágeno en el tejido.	599

Lista de abreviaturas

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µm	Micrómetro
A.C.	Agitación constante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
cm	Centímetro
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMAB	4-(Dimetilamino) benzaldehido
DMB	1,9 dimetilmetileno azul glucosaminoglicano
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> “y otros” ó “Y colaboradores”
GAG	Glucosaminoglicanos
H&E	Hematoxilina y eosina
LCA	Ligamento cruzado anterior

M	Molar
mg	Miligramo
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad I
ml	Mililitro
mm	Milímetro
n	Número o tamaño de la muestra
nm	Nanómetro
PAA	Ácido peracético
PBS	Buffer de fosfato salino (phospate buffered saline)
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Dodecilsulfato de sodio
T.A.	Temperatura ambiente
TBP	Tributil fosfato
TIF	Tipo Inspección Federal

Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
W/s	Watt por segundo
Z α	Valor Z correspondiente al riesgo deseado
Z β	Valor Z correspondiente al poder deseado asociado al riesgo escogido
α -gal	Galactosa-alfa-1,3-galactosa

1. Introducción

Las lesiones en rodilla son frecuentes, algunas de estas llegan a requerir un reemplazo del tejido para recuperar en cierta medida la función original. Para la reconstrucción de ligamento cruzado anterior (LCA) se han registrado alrededor de 100,000 cirugías al año en los Estados Unidos (Evans, Shaginaw, & Bartolozzi, 2014; Gianotti, Marshall, Hume, & Bunt, 2009). En la mayoría de los casos se emplea un autoinjerto con la intención de evitar el rechazo inmune y sus complicaciones. Mediante la extracción de una porción del tendón rotuliano de la rodilla sana del paciente se genera el autoinjerto. Ya que este método genera una segunda lesión al paciente, es necesaria una alternativa de reemplazo como es el uso de aloinjertos o xenoinjertos. La principal limitación que presentan es la inmunogenicidad o la posibilidad de estar contaminados con antígenos patógenos, por lo que es necesario realizar un tratamiento previo hacerlos más seguros de uso (Getgood & Bollen, 2010).

El uso constante de aloinjertos en la clínica se complica debido su poca disponibilidad. Por lo que nuestro equipo de trabajo propone en este estudio el empleo de xenoinjertos acondicionados para su uso en la clínica.

La descelerización es una estrategia para el tratamiento de los tejidos que puede reducir la reacción inmune manteniendo la matriz extracelular.

En este estudio se aborda el uso de xenoinjertos de origen porcino con el propósito de crear un reemplazo para el ligamento cruzado anterior con las características necesarias para su uso en la clínica. Para esto nos hemos planteado la comparación de tres técnicas

de descelularización ya reportadas cuyos resultados son prometedores. Nuestro propósito es establecer una metodología apropiada para obtener un xenoinjerto de origen porcino que pueda reemplazar un ligamento cruzado anterior humano, que muestre las mismas ventajas que un autoinjerto o aloinjerto, pero con una mayor disponibilidad clínica.

2. Antecedentes

Injertos de tendón

En estos últimos años se han realizado investigaciones dirigidas a la producción de tendones y ligamentos como posibles alternativas terapéuticas al autoinjerto. Estas terapias abarcan factores de crecimiento, células madre, biomateriales y terapia génica. En la última década, las estrategias para desarrollar terapias se enfocan principalmente en emplear factores de crecimiento, células madre y biomateriales (Docheva, Müller, Majewski, & Evans, 2015). En el ámbito de biomateriales se incluyen andamios de matriz extracelular procedente de aloinjertos, xenoinjertos o incluso fabricados a partir de colágeno, fibrina, ácido hialurónico entre otros (Hogan *et al.*, 2011). La fabricación de injertos de tejido conectivo debe contemplar la biocompatibilidad, ausencia de respuesta inflamatoria, interacción adecuada con los fibroblastos y otras células propias del tejido y la conservación de las propiedades mecánicas (Chen, Xu, Wang, & Zheng, 2009).

Las investigaciones en el desarrollo de andamios útiles para la reconstrucción de tejidos sugieren que el camino más prometedor es aprovechar las matrices extracelulares de tejidos alógenos o xenógenos, ya que conservan las propiedades útiles originales del tejido, como señales físicas y bioquímicas que permiten una eficiente repoblación celular (Lutolf & Hubbell, 2005). El uso de andamios de matriz extracelular procedentes de tejido cadavérico o donadores podría preservar las características fisiológicas y mecánicas, así como proteínas importantes para la adhesión, migración y proliferación de nuevas células (Gilbert, Sellaro, & Badylak, 2006). Además la implantación de andamios naturales de

matriz extracelular evita en gran medida la inmunogenicidad y conserva las estructuras histológicas (Hudson *et al.*, 2004). Se ha observado que en las reparaciones de músculo esquelético no existe rechazo inmune considerable al usar aloinjertos después de un tratamiento por congelación (Hinsenkamp *et al.*, 2012), tampoco al realizar reparaciones de tejido conjuntivo como ligamento cruzado anterior (Nín, Leyes, & Schweitzer, 1996). Por otro lado, los xenoinjertos se pueden encontrar con mayor facilidad, por lo que es importante desarrollar estrategias para la descelularización de estos tejidos que permitan a futuro una aplicación clínica.

El uso de aloinjertos descelularizados no estimula la reacción inmune debido a que el contenido de proteínas de matriz extracelular pertenece a la misma especie (Minami, Ishii, Ogino, Oikawa, & Kobayashi, 1982), entre ellas el colágeno, la elastina y los proteoglicanos, que son importantes para su funcionamiento (Subramanian & Schilling, 2015). Por lo que es importante descelularizar los aloinjertos con la finalidad de disminuir la probabilidad de un rechazo inmune o la formación de cicatrices fibrosas en la reparación convencional de tendones en general (Farnebo *et al.*, 2014).

Descelularización de tendón

El microambiente que proporciona un andamio de matriz extracelular derivado de un tejido preexistente representa una ventaja esencial para generar un injerto de uso clínico. Un método eficiente para generar un injerto a partir de un tejido existente es la remoción del material celular. Existen diversas metodologías para lograr la descelularización de tejidos animales que involucran tratamientos físico, químico o enzimático o en conjunto;

la eficiencia puede variar dependiendo de las condiciones del tratamiento y del tejido: tiempo de exposición, concentración, composición bioquímica y morfológica del tejido (Gilbert *et al.*, 2006). Hoy en día aún existe controversia acerca de cuál método es el más eficiente para lograr una descelularización adecuada para tendones. Arianna B. Lovati y Marta Bottagisio en 2016 examinan a detalle las publicaciones relacionadas con descelularización de tendón de origen animal durante el periodo del 2000 a abril del 2015 y determinan que utilizando los detergentes SDS y TBP se puede retirar la mayor cantidad de material celular conservando, en gran medida, las propiedades mecánicas originales del tendón, pero aun así se requiere implementar un tratamiento que permita soportar la carga fisiológica requerida para ser empleados como injertos clínicos de tendones y ligamentos. Aunque esta revisión extensiva sugiere que el uso de tendones y ligamentos equinos promete conservar las características óptimas para su uso clínico, las opciones comerciales comúnmente son de material porcino (“Aperion Biologics, Inc.: Private Company Information - Businessweek,” 2015).

Entre los métodos empleados para lograr una buena penetración de los detergentes se aplican pretratamientos con ácidos como el ácido peracético, hidrociorhídrico, y sulfúrico entre otros (Whitlock, Smith, Poehling, Shilt, & Van Dyke, 2007; Pridgen *et al.*, 2011) o enzimas que digieran parcialmente la matriz como tripsina o colagenasa tipo I para aumentar la porosidad de la estructura (Chong *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013). Otra sustancia importante para las técnicas de descelularización es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un agente quelante, ya que usándolo como solución hipertónica o hipotónica en conjunto con un tratamiento físico o químico ayuda a lisar las

células y previene que se dañe la matriz por digestión de enzimas intracelulares al capturar los cofactores indispensables para el funcionamiento de éstas (Bronstein *et al.*, 2013; Bronstein *et al.*, 2013; Woon *et al.*, 2011). Así mismo el EDTA cumple otra función importante como postratamiento al ser empleado como solución de limpieza tanto de detergentes como remanentes celulares que quedan adheridos a la matriz debido a las cargas de iones metálicos (Gilbert *et al.*, 2006). Es importante retirar la mayor cantidad de material genético posible para prevenir una respuesta inmune, por lo que es común el uso de nucleasas como postratamiento (Martinello *et al.*, 2014a; Whitlock, Smith, Poehling, Shilt, & Van Dyke, 2007b; Xing *et al.*, 2014). Para su uso clínico resulta vital retirar los remanentes del MHC I incrustados en la estructura de la matriz ya que pueden despertar una respuesta inmune humoral en el receptor del injerto (Farnebo *et al.*, 2014). Teóricamente, el hecho de que los componentes de la matriz extracelular, principalmente el colágeno, sean evolutivamente similares entre especies debería disminuir la probabilidad de una respuesta inmune una vez retirado el material celular ajeno al donador, sin embargo, en las especies no-primates las glicoproteínas y proteoglicanos de la matriz contienen epítomos α -gal los cuales son considerados la principal barrera inmunológica que impide la implantación de xenoinjertos. El epítomo α -gal es una estructura de carbohidrato ausente en humanos, pero presente en mamíferos no-primates como cerdos y vacas. Esta barrera puede ser evitada mediante un tratamiento con α -galactosidasa que elimine los epítomos (Galili, 2015a). También se ha logrado solucionar la reacción inmune producida por α -gal mediante la digestión enzimática de ésta (Zaffagnini *et al.*, 2015).

Consideraciones patológicas

La elección del animal de procedencia se basa en la incidencia del espécimen a ser portador de enfermedades transmisibles al ser humano. Por ejemplo, las enfermedades priónicas como la encefalopatía bovina espongiiforme; aun cuando se han registrado pocos casos clínicos (Holman *et al.*, 2010). Estos inconvenientes pudieran limitar el empleo de ciertas especies animales (Kurt & Sigurdson, 2016). No obstante, se ha reportado que la especie porcina puede ser infectada por priones y transmitirse entre especies bajo condiciones controladas (Holman *et al.*, 2010), aun así, existe controversia acerca de la posible infección no controlada en criaderos de cerdos que no cumplan con las normas adecuadas. Por este motivo, el tejido debe de proceder de especímenes que han sido manejados bajo los estándares de calidad y salubridad que garanticen la seguridad que la clínica requiere y estar disponible en todo momento.

Evitar la respuesta inmune es uno de los primeros factores que deben ser tomados en cuenta cuando se trata de generar un injerto de tendón o de ligamento humano, de igual manera el proceso de recuperación también representa un punto crítico. En este paso las propiedades biomecánicas del tejido toman un papel importante, así como la correcta recelularización del andamio por parte de las células del receptor. El objetivo principal es recuperar en mayor medida la funcionalidad motriz del individuo y garantizar una solución a largo plazo para su lesión.

Hoy en día las cicatrices fibrosas que se generan en la zona de inserción del tendón al hueso representan uno de los principales problemas para reparar de manera exitosa una lesión de este tipo. La tasa de éxito en la recuperación de ligamento cruzado anterior es

muy baja debido al desprendimiento del tendón (Thomopoulos, Genin, & Galatz, 2010). De igual manera, los fracasos de los casos de lesiones en hombros en el manguito de los rotadores se deben principalmente a esta falla, por lo que para resolver esta problemática es indispensable comprender las características bioquímicas y morfológicas propias de esta zona (Valencia Mora *et al.*, 2015). En los últimos años se ha incursionado en estrategias para fortalecer y recuperar el estado original de la transición tendón-hueso, las cuales abarcan biomateriales, células madre y factores de crecimiento las cuales pueden ser trasladadas al ligamento cruzado anterior (Derwin *et al.*, 2009; Dines, Grande, & Dines; Murray *et al.*; Rodeo).

Morfología y composición del tendón

El tendón es un tejido conjuntivo denso regular, por esto se debe tomar en cuenta la dificultad de acceso de líquidos a su interior al diseñar un protocolo de descelularización. La matriz del tejido se compone principalmente de colágeno tipo I (95% del colágeno total) y una pequeña porción de elastina embebida en proteoglicanos hidratados, hialuronano, glicoproteínas estructurales entre otras moléculas. El colágeno tipo III es el siguiente más abundante y en menor cantidad se pueden encontrar los tipos V, VI, XII, XIV y XV (Figura 1). El agua proporciona el 60-80% del peso mientras que los proteoglicanos solo el 1-2%.

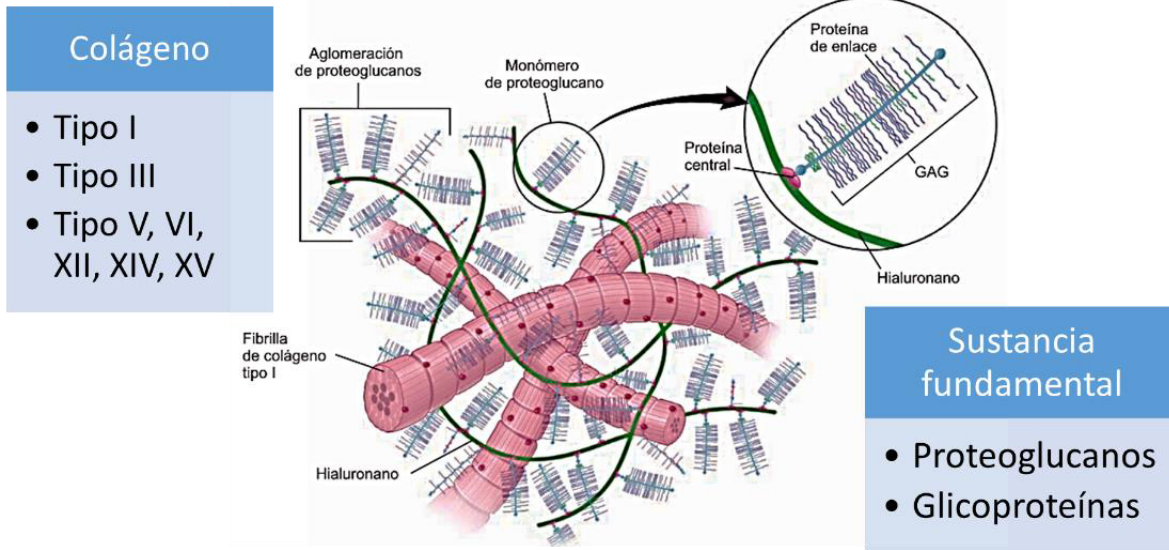


Figura 1. Dibujo esquemático de la estructura de la matriz extracelular del tendón. En esta imagen se ilustran los componentes moleculares del tendón, siendo el principal componente el colágeno tipo I representando el 60% del peso seco y el 95% de los colágenos totales.

La unidad estructural más pequeña del tendón es la molécula de colágeno, la cual se agrega de manera paralela para formar fibrillas, que posteriormente se agrupan paralelamente para formar fibras y estas a su vez se agrupan para formar un haz de fibras.

Las fibras se organizan en paquetes denominados fascículos rodeados por una capa delgada de tejido conectivo laxo denominada endotendón, existen varios fascículos por tendón, los cuales a su vez están recubiertos en su capa externa por la vaina tendinosa compuesta por el epitendón y el paratendón. Los fibroblastos son las células propias del tendón, el cual sintetiza todos los componentes del tejido y le da mantenimiento. En la estructura interna también se encuentran pequeños vasos sanguíneos y nervios (Figura 2) (Docheva et al., 2015).

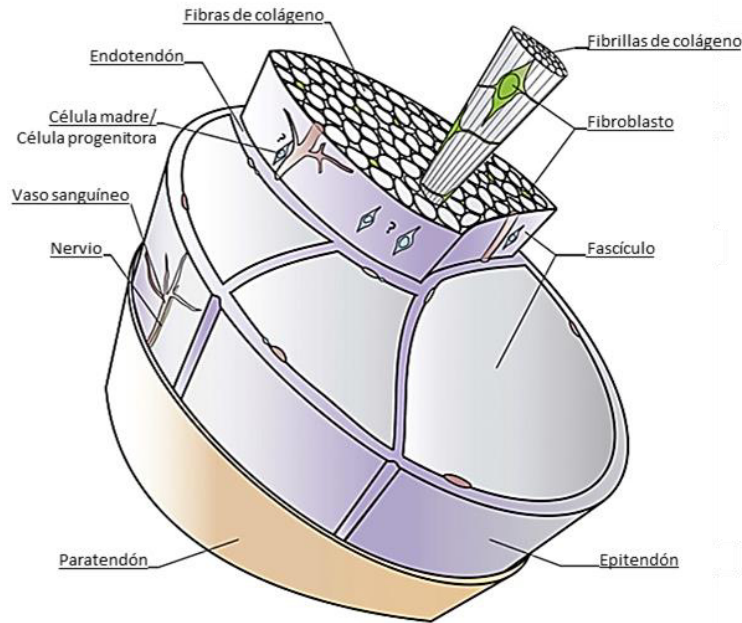


Figura 2. Dibujo esquemático de la estructura básica del tendón. En este esquema se señalan los componentes generales de un tendón o ligamento desde el aspecto microscópico hasta el macroscópico.

La entesis es la inserción de las fibras al hueso. Esta zona de inserción es una estructura transicional compuesta por fibras de tendón o ligamento, fibrocartílago no-calcificado, cartílago calcificado y hueso. Estas cuatro zonas conforman un gradiente de rigidez que evita el daño que pudiera producir el estrés mecánico en la interface (Benjamin *et al.*, 2002).

Técnicas para descelularización de tendón

El objetivo principal al diseñar una técnica de descelularización es la remoción del material celular sin comprometer los componentes de la matriz extracelular. Hoy en día existen gran cantidad de métodos adaptados para lograr este objetivo. Chong *et al.* emplearon Tripsina, EDTA y Tritón X-100. Los resultados obtenidos indican una preservación de las

propiedades biomecánicas. También observaron una mejora de las propiedades biomecánicas al recelularizar la matriz extracelular (Chong *et al.*, 2009). Al comparar un aloinjerto de tendón de Aquiles de rata sin tratamiento contra uno descelularizado, se observó una mayor resistencia al usar un injerto descelularizado a las 2 y 4 semanas igualándose con el grupo de injertos no descelularizados a las 12 semanas (Farnebo *et al.*, 2014). Al evaluar la resistencia de un tendón de mano descelularizado con SDS y EDTA en un modelo de brazo cadavérico se observó una conservación de la resistencia (Fox *et al.*, 2013). Esto nos indica que en condiciones experimentales tanto en modelos animales como humanos la descelularización no afecta las propiedades biomecánicas del injerto de tendón.

Con el objetivo de mejorar las técnicas de descelularización se han llevado a cabo combinaciones de estrategias que emplean tratamientos físicos, químicos y enzimáticos, sin dejar de lado la conservación de las propiedades biomecánicas. Al realizar la descelularización utilizando ultrasonificación previo al uso de ácido peracético, EDTA y SDS, se observó la preservación de las propiedades mecánicas y una mejora en la remoción del contenido celular. El ultrasonido permite que la solución de lavado penetre profundo en el tejido y remueva contenido celular que se encuentra a mayor profundidad, logrando así una mejora significativa al proceso (Bronstein *et al.*, 2013).

Otra estrategia de interrupción física en aloinjertos de ligamentos cruzado anterior consiste en realizar ciclos de congelación y descongelación con crioprotectores como glicerol (Suhodolčan *et al.*, 2013). También se ha utilizado dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotector el cual promueve la angiogénesis y la disminución de la reacción inmune

(Wingenfeld, Egli, Hempfing, Ganz, & Leunig, 2002). La gran desventaja de estos tratamientos fue la baja eficiencia en la remoción de células.

Se han comparado diferentes detergentes para la descelularización de tendones flexores de la mano. Se observó mejor resultado al tratar con 0.1 % SDS ya que se redujo significativamente el contenido de ADN y se preservó mejor la estructura del andamio. Al analizar las propiedades biomecánicas de elasticidad y estrés último de tensión, se observó una preservación de las propiedades originales. Por otra parte, al llevar a cabo una recelularización con fibroblastos humanos se observó poca penetración al interior de la estructura (Pridgen *et al.*, 2011).

Al evaluar la inmunogenicidad de tendones descelularizados en un modelo animal en ratas con tendones flexores humanos de mano, se observa de manera cualitativa menor infiltración de macrófagos y de células inflamatorias al emplear técnicas que disminuyan la cantidad de moléculas de MHC-I presentes en el injerto. Se observó que las propiedades biomecánicas mejoraron en el tejido descelularizado, presentando un mayor módulo de elasticidad, así como un mayor estrés último de ruptura, lo que podría ayudar a una rehabilitación más rápida (Raghavan *et al.*, 2012).

Al evaluar la descelularización de ligamentos cruzado anterior de cerdos Yorkshire utilizando un pretratamiento enzimático, detergente SDS y endonucleasas se observó de manera cuantitativa una preservación del contenido de proteínas colágeno y glucosaminoglicanos. También se observó gran viabilidad de recelularización con fibroblastos (Vavken, Joshi, & Murray, 2009).

En una comparación de metodologías en tendones diafragmáticos porcinos se observó que la técnica más eficiente es aplicar 1% TBP (Deeken *et al.*, 2011).

Al evaluar la remoción de los epítomos α -gal en ligamento cruzado anterior bovino mediante la digestión enzimática con α -galactosidasa posterior a un tratamiento con Tritón-X se observó una reducción significativa de los epítomos α -gal respecto al control, pero no hubo diferencia entre el tratamiento sin digestión enzimática. Lo cual indica una baja eficiencia de la enzima para remover estos epítomos. Se espera que al eliminar los epítomos inmunógenos este injerto se puede utilizar en la clínica (Yoshida, Vavken, & Murray, 2012).

Al realizar un estudio *in vivo* de la reconstrucción de ligamento cruzado anterior en mono Rhesus con un xenoinjerto porcino tratado con α -galactosidasa se observó una recuperación significativa a corto y largo plazo (Kevin R Stone, Walgenbach, et al., 2007).

Al realizar un reemplazo en humanos del ligamento cruzado anterior con un xenoinjerto tratado con α -galactosidasa se observó la funcionalidad a largo plazo durante 2 años. Se observó que los epítomos remanentes en el xenoinjerto permiten la migración de células pro inflamatorias que promueven la repoblación del tejido con fibroblastos que remodelan la matriz extracelular (Kevin R Stone, Abdel-Motal, Walgenbach, Turek, & Galili, 2007).

Técnicas de recelularización

La recelularización de los injertos pudiera indicar un reacondicionamiento que permita una regeneración más rápida en los pacientes. A pesar de ser una estrategia poco explorada los esfuerzos de varios autores se hacen presentes. Se ha evaluado el aumento de la porosidad del andamio con ácido peracético y recelularizar con fibroblastos, con este método se observó una preservación de las propiedades biomecánicas (Lomas, Jennings, Fisher, & Kearney, 2004; Whitlock, Smith, Poehling, Shilt, & Van Dyke, 2007c). Al reducir la concentración de ADN presente en el injerto y sembrando células vivas por 5 días se ha observado un aumento en el módulo de elasticidad y en el estrés máximo de ruptura. Un tratamiento con ácido peracético y su posterior recelularización es un método apto para la aplicación clínica al poder promover la movilización celular de manera más rápida para una mejor recuperación (Woon *et al.*, 2011).

Se han usado células madre derivadas de adipocitos humanos en lugar de fibroblastos para recelularizar tendones humanos descelularizados con EDTA y SDS. Al realizar ligeras incisiones para permitir mayor ingreso de células. Se observó una repoblación de la estructura interna del injerto. También se preservaron las propiedades biomecánicas al realizar la recelularización (Schmitt *et al.*, 2013).

Se ha observado que las propiedades del tejido se mantienen cuando los andamios se recelularizan, aunque es difícil que se logre una recelularización interna del andamio (Chong *et al.*, 2009). Al realizar una inyección de células madre mesenquimales derivadas de adipocitos y gel de colágeno (Martinello *et al.*, 2014b). Se ha observado una mayor resistencia biomecánica tendones recelularizados y una menor reacción inmune al tejido

(Raghavan *et al.*, 2012). Al realizar una recelularización del ligamento colateral proximal de la articulación interfalángica de la mano se realizaron pruebas biomecánicas en las que observaron una preservación de sus propiedades y una ausencia de respuesta inmune (Endress *et al.*, 2012). En base a estos estudios se puede esperar que una recelularización puede ser benéfica para la pronta recuperación del injerto. Pero la principal desventaja es el hecho de que el uso de células madre no han sido bien caracterizado en la clínica.

Justificación

La incidencia en la ruptura del ligamento cruzado anterior es muy alta, por lo que se requiere el desarrollo de reemplazos para este ligamento y evitar el uso de un autoinjerto que derive en una segunda lesión al paciente.

Los xenoinjertos de tendón rotuliano de origen porcino son aptos para el reemplazo del ligamento cruzado anterior y representan un recurso ampliamente disponible y económico.

Objetivo General

Comparar tres técnicas para descelularización de injertos porcinos Hueso-Tendón-Hueso.

Objetivos Específicos

1. Obtener el injerto Hueso-Tendón-Hueso a partir del tendón rotuliano porcino.
2. Remover el contenido celular del tendón rotuliano porcino.
3. Analizar la presencia de material celular remanente.
4. Analizar la preservación de la matriz extracelular.
5. Analizar la conservación de colágeno.

3. Materiales y métodos

Material y equipo

Reactivos

Ácido clorhídrico concentrado

Paraformaldehído (PFA)

Dodecilsulfato de sodio (SIGMA)

Cloruro de sodio (SIGMA)

EDTA (SIGMA)

Glutaraldehído (SIGMA)

Soluciones

PBS 1X pH 7.4

PBS con 5% ácido peracético (pH 7)

Alcohol isopropílico 70%

Solución isotónica de cloruro de sodio 0.9%

Glicina 0.05M

Equipo

Micropipetas de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l y 2 μ l

Vortex (Daigger)

Bascula Analítica (AND)

Incubadora Orbital SHAKER (Mrc) 37°C y 4°C

Lector de placas de ELISA (Bio-Rad, i Mark Microplate Reader)

Ultra refrigerador (-80°C) (Thermo)

Congelador (-20°C)

Microscopio de Fluorescencia (Leica)

Cámara Infinity

Sierra eléctrica, (MARCA Chicago Electric Power Tools MODELO Oscillating Multifunction

Power Tool 21,000 OPM 120V / 1.6 A)

Prensa mecánica de banco (CRAFTSMAN)

Kit de microcirugía

Frascos de cristal de 250 ml

Equipo de sonicación Transsonic T420 (Elma)

Bolsas herméticas (Ziploc)

Obtención de la muestra

Se obtuvieron 40 rodillas traseras frescas de cerdo Yorkshire de 14-18 meses, género indistinto, peso de 40 a 60 kg, sin patología previa existente o anomalías evidentes a

la inspección macroscópica. Siguiendo los criterios de inclusión de Vavken, Joshi, & Murray, 2009 los especímenes fueron sacrificados de manera rutinaria para comercialización en la industria alimenticia. Las muestras obtenidas procedieron de una carnicería que cumple con las normativas sanitarias TIF (SAGARPA).

Preparación del Injerto

Se realizó la disección fina del tendón rotuliano porcino conservando en cada extremo una porción de hueso generando así el injerto Hueso-Tendón-Hueso. Mediante osteotomía y el uso de una sierra eléctrica, (MARCA Chicago Electric Power Tools MODELO Oscillating Multifunction Power Tool 21,000 OPM 120V / 1.6 A), se modeló el tendón porcino con las dimensiones que normalmente se usan en un injerto de ligamento cruzado anterior para uso en humanos tomando como referencia los injertos comerciales del Banco de Hueso y Tejidos del Hospital Universitario de la U.A.N.L (Figura 3).

El injerto presentó las siguientes dimensiones:

- Ligamento rotuliano: 5 cm x 1.5 cm x 3 mm (largo, ancho y altura).
- Pastillas de Hueso: 3 x 1.5 x 1.6 cm (largo, ancho y altura).

- Totalidad del injerto: 11x 1.5 x 1.6 cm (largo, ancho y altura).

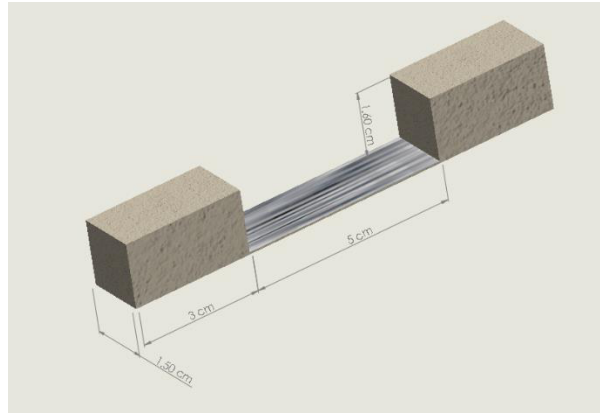


Figura 3. Esquema representativo de las dimensiones del injerto. Las medidas se basaron en los injertos que produce el banco de huesos y tejidos de la facultad de medicina de la U.A.N.L.

Se fijó el fémur de la rodilla a la prensa mecánica. Se removió el tejido graso que envuelve la rodilla para así poder identificar, de manera superficial, la ubicación del tendón. Posteriormente se realizaron dos cortes paralelos al tendón de tal manera que quedó expuesto. Se hizo una disección de la rótula sin dañar el tendón de interés. En este punto el tendón unido a la rótula se encontró separado del fémur. Después se cortó la superficie de la tibia de manera perpendicular al límite del tendón con ayuda de la sierra eléctrica para obtener una superficie plana de la tibia. Posteriormente se realizaron dos cortes en el hueso paralelos al ancho del tendón para formar la pastilla de hueso. Se midió el largo adecuado y se cortó el hueso perpendicularmente. Por último, se realizó un corte paralelo al tendón en la superficie plana de la tibia para extraer un cubo de hueso. Una vez extraído, se removió la vaina tendinosa que envuelve el tendón dejando así los filamentos expuestos. Para llevar a cabo la remoción de la vaina tendinosa se fijó el tendón en la

prensa mecánica. La vaina tendinosa fue removida de un extremo a otro cuidadosamente usando un bisturí con navaja en forma de hoz y unas pinzas de disección con dientes. El tendón se mantuvo tenso durante la remoción de la vaina para evitar cortar los filamentos y facilitar la disección.

El endotendón fue removido con especial cuidado para evitar cortar los filamentos. Se empleó una pinza de disección con dientes pequeña, se sujetó firmemente el endotendón y lentamente fue removido. El proceso finalizó cuando se removieron los remanentes de endotendón que envolvían los filamentos.

Al finalizar la disección, el tejido se lavó con PBS a 4°C para remover la sangre y sólidos remanentes. Los injertos se almacenaron individualmente en bolsas herméticas a -20°C hasta su procesamiento (Pridgen *et al.*, 2011).

Descelularización de tendón

Los tratamientos fueron diseñados en base a los métodos de Bronstein et al., 2013, Pridgen et al., 2011 y K R Stone, 2002.

Sonicación

Los tendones fueron sumergidos en agua destilada helada, se aplicó sonicación durante 15 minutos. Se empleó el equipo de sonicación Transsonic T420 de la compañía Elma, el cual consta de un recipiente de sonicación a una potencia de 35W/s constantes. Posteriormente, los tendones se sumergieron en una solución de 200 ml de PBS con 5% ácido peracético (pH 7) por 4 horas a temperatura ambiente (T.A.) bajo agitación constante (A.C.) y se lavaron en PBS. A continuación, se colocaron en 200 ml de una solución al 0.1% de EDTA a pH 8 en agua destilada a T.A. por 1 hora en A.C., se cambiaron a una solución al 0.1% de SDS en agua destilada a T.A. por 24 horas en A.C., por último, fueron lavados en PBS por 1 hora a T.A. bajo A.C. Se almacenaron en bolsas herméticas a -20°C hasta su análisis (Bronstein *et al.*, 2013).

Tratamiento con detergente

Los tendones se lavaron en una solución de 200 ml de 0.1% de EDTA pH 8 en agua destilada a T.A. por 4h en A.C., se removió la solución con PBS. Posteriormente, se colocaron en una solución de 200 ml de 0.1% SDS a T.A. bajo A.C por 24 horas. Se concluyó con un lavado en PBS por 1 hora a T.A. bajo A.C. Se almacenaron en bolsas herméticas a -20°C hasta su análisis (Pridgen *et al.*, 2011).

Tratamiento por congelación y descongelación

Los tendones se incubaron en 200 ml de alcohol isopropílico 70% por 5 minutos a T.A. para sanitizar y remover remanentes sólidos. Posteriormente, se congelaron a -80°C durante toda la noche y se descongelaron en una solución isotónica a 25°C por 10 minutos sin añadir calor extra. Se repitió este procedimiento 4 veces. Posteriormente, los tendones se sometieron a una fijación con glutaraldehído para realizar un entrecruzamiento de las fibras de colágeno con el fin de reforzar los filamentos de la matriz extracelular. Las muestras fueron sumergidas en 200 ml de glutaraldehído al 4% en PBS a un pH de 7.4 por 5 días. Posteriormente, las muestras se enjuagaron con PBS para remover el exceso. Posteriormente, se lavaron en glicina al 0.05M por 1 hora y por último se enjuagaron en PBS (K R Stone, 2002).

El grupo control fue fijado en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. El número de la muestra fue de 10 tendones por grupo. Una porción de los tejidos fue liofilizada para su análisis molecular, mientras que la mayor parte se evaluó histológicamente.

Análisis Morfológico

Para llevar a cabo el análisis morfológico se separó la porción fibrosa del hueso. Las fibras fueron orientadas correctamente en un plano longitudinal y trasversal en un contenedor de plástico para micrótopo. Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% en PBS a

un pH de 7.4 a excepción de las muestras del grupo de congelación y después se embebieron en parafina. Posteriormente, mediante microtomía se realizaron cortes histológicos longitudinales y transversales con un grosor de 4 μm . Los cortes fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina y Eosina (H&E) para la evaluación de los componentes celulares y tisulares generales. Las tinciones especiales de Tricrómico de Masson y Verhoeff se emplearon para la identificación de fibras de colágena y fibras elásticas respectivamente. Se llevó a cabo un análisis fluorométrico con DAPI (Vectashield, Vector) para cuantificar los núcleos celulares remanentes. Las muestras se analizaron con un microscopio de campo claro Nikon Eclipse 50i y un sistema de fotografía con el software Qcapture 2.9.13 de la compañía Q Imaging.

Conteo celular

Los cortes trasversales marcados con DAPI fueron evaluados en 5 campos representativos a un aumento de 40x utilizando el programa computacional Image J Versión 1.49 (NIH) con el plugin Cell Counter.

Cuantificación de Colágeno

El contenido de colágeno fue medido utilizando el kit de ensayo para hidroxiprolina MAK008 de la compañía Sigma-Aldrich. Este ensayo se basa en la técnica colorimétrica de oxidación de hidroxiprolina y conjugación con la molécula de 4-(Dimetilamino) benzaldehído (DMAB), la cual deriva en una molécula colorimétrica (560 nm). Esta

metodología se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El tejido se liofilizó y se pesaron 10 mg por muestra, después fueron diluidos en 100 μ l de agua y 100 μ l de ácido clorhídrico concentrado dentro de un tubo de plástico a 120 °C por 3 horas. Se transfirió 10 μ l de sobrenadante a una placa de 96 pozos y se evaporó a 60 °C. Se prepararon los pozos de los estándares y se procedió al ensayo. A todos los pozos utilizados se les añadió una mezcla de 6 μ l de cloramina T concentrada y 94 μ l de buffer de oxidación por pozo y se incubó por 5 minutos a T.A., posteriormente se añadió a cada pozo una mezcla de 50 μ l de DMAB concentrado y 50 μ l de la solución de ácido perclórico/isopropanol incluida en el kit y se incubó por 90 minutos a 60 °C. Se midió la absorbancia a 560 nm.

Análisis Estadístico

El tamaño de la muestra se calculó mediante una prueba de hipótesis y diferencia de dos medias o con la media de un valor de referencia, con un valor $Z\alpha$ de 1.96 con nivel de significancia del 95% para dos colas, y un valor $Z\beta$ de 0.84 con una potencia de 80%, se obtuvo una muestra de 5 unidades por grupo.

Consideraciones Éticas

El presente protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. No existen ganancias financieras o comerciales por la realización de este estudio por lo que los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de interés.

4. Resultados

Obtención de los injertos hueso-tendón-hueso

Los tendones fueron extraídos a la brevedad bajo condiciones asépticas, permaneciendo en todo momento bajo refrigeración. El tiempo promedio para procesar cada muestra fue de 20 minutos. Se observó que las fibras del tendón se encontraron laxas ya que se removió la vaina tendinosa que las compactaba, pero no se apreció pérdida de resistencia ni desprendimiento de los filamentos al realizar un leve estiramiento. Se observaron remanentes de sangre dentro de la estructura del hueso, incluso después de realizar un lavado con PBS (Figura 4). Los tendones fueron congelados en bolsas herméticas de manera individual hasta su tratamiento.



Figura 4. Injerto hueso-tendón-hueso. Después de realizar la remoción de la vaina tendinosa se pueden observar a simple vista las fibras de colágeno expuestas. Al manipular la muestra se observa una disgregación de las fibras. No se puede apreciar el debilitamiento de las fibras al manipular las muestras.

Remoción del contenido celular

Los tendones fueron descongelados en PBS a temperatura ambiente. Al descongelarse regresaron a su consistencia original y no se observó daño aparente a las fibras. Se

aplicaron los tratamientos correspondientes a un total de 10 muestras por grupo. Al terminar el tratamiento se observó un aclaramiento de las fibras y una limpieza interna del hueso.

Análisis de la remoción de contenido celular

Para analizar la presencia de material celular remanente en los tejidos, se realizaron las técnicas histológicas de tinción por hematoxilina y eosina (H&E) y fluorescencia con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y se analizaron cortes longitudinales y trasversales de los tendones.

En los cortes longitudinales del grupo control teñidos con H&E (Figura 5) se observaron las fibras de colágeno acidófilas ordenadas en haces paralelos un poco laxos. Entre las fibras se observan los núcleos basófilos de los fibroblastos de aspecto fusiforme (señalados con flechas). En un plano trasversal se pudo observar los fascículos de las fibras de colágeno rodeados de tejido conectivo laxo correspondiente al endotendón (señalado por cabezas de flecha). Se observó que las fibras están un poco disgregadas (los espacios están señalados por ♦); entre las fibras de colágeno se observan los núcleos basófilos de aspecto circular debido al plano de corte, en la periferia del fascículo se observa una gran presencia de núcleos celulares entre el tejido conectivo laxo correspondiente al endotendón.

En los cortes longitudinales teñidos con H&E del grupo tratado por congelación (Figura 6) se observa una disposición de las fibras de colágeno similar a las del grupo control, se

aprecia una cantidad similar de células y las fibras de colágeno se organizan de la misma manera que el grupo control, en haces paralelos poco laxos.

En cortes longitudinales teñidos con H&E del grupo de sonicación y ácido peracético (Figura 7) se observan las fibras de colágeno acidófilas ordenados en haces paralelos laxos y disgregados, con más espacios entre las fibras en comparación con el grupo de congelación y no se observa la presencia de núcleos de fibroblastos. En los cortes transversales se observan las fibras de colágeno ordenadas en haces paralelos con una gran cantidad de espacios entre las fibras y los fascículos. Se observa una leve cantidad de núcleos basófilos de fibroblastos entre las fibras de colágeno (señalados con flechas).

En los cortes longitudinales teñidos con H&E del grupo de lavado con SDS (Figura 8) se observa una distribución de las fibras de colágeno acidófilas en haces paralelos más laxas que los grupos anteriores, se observa claramente que la cantidad de espacios entre las fibras es mucho mayor. En este plano no se observan núcleos de fibroblastos entre las fibras de colágeno. En los cortes trasversales la cantidad de espacio entre las fibras de los fascículos es notoriamente mayor que los grupos anteriores. No se puede observar la presencia de núcleos entre las fibras de colágeno.

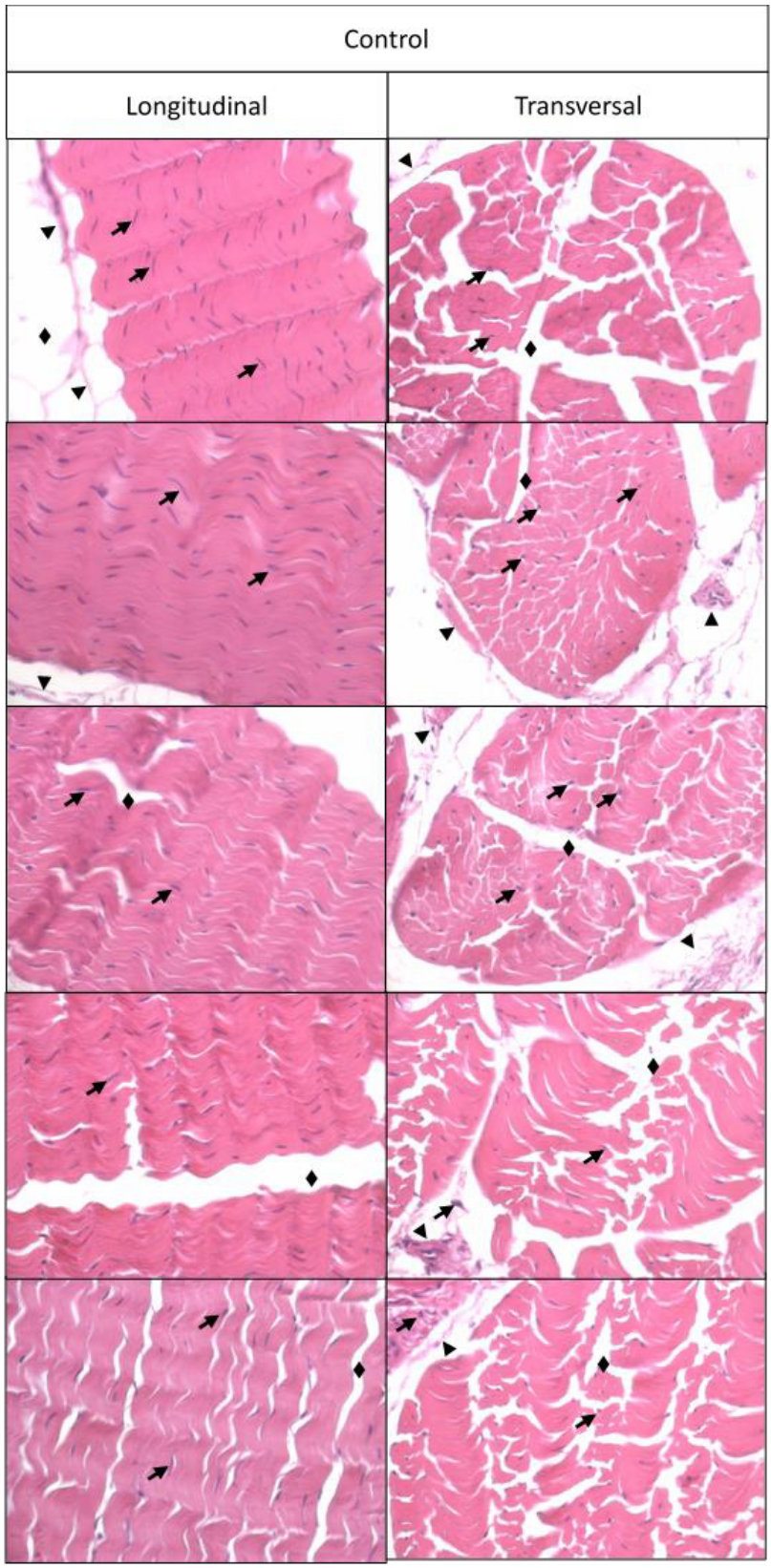


Figura 5. Micrografías representativas de los tendones del grupo control teñidas con H&E observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

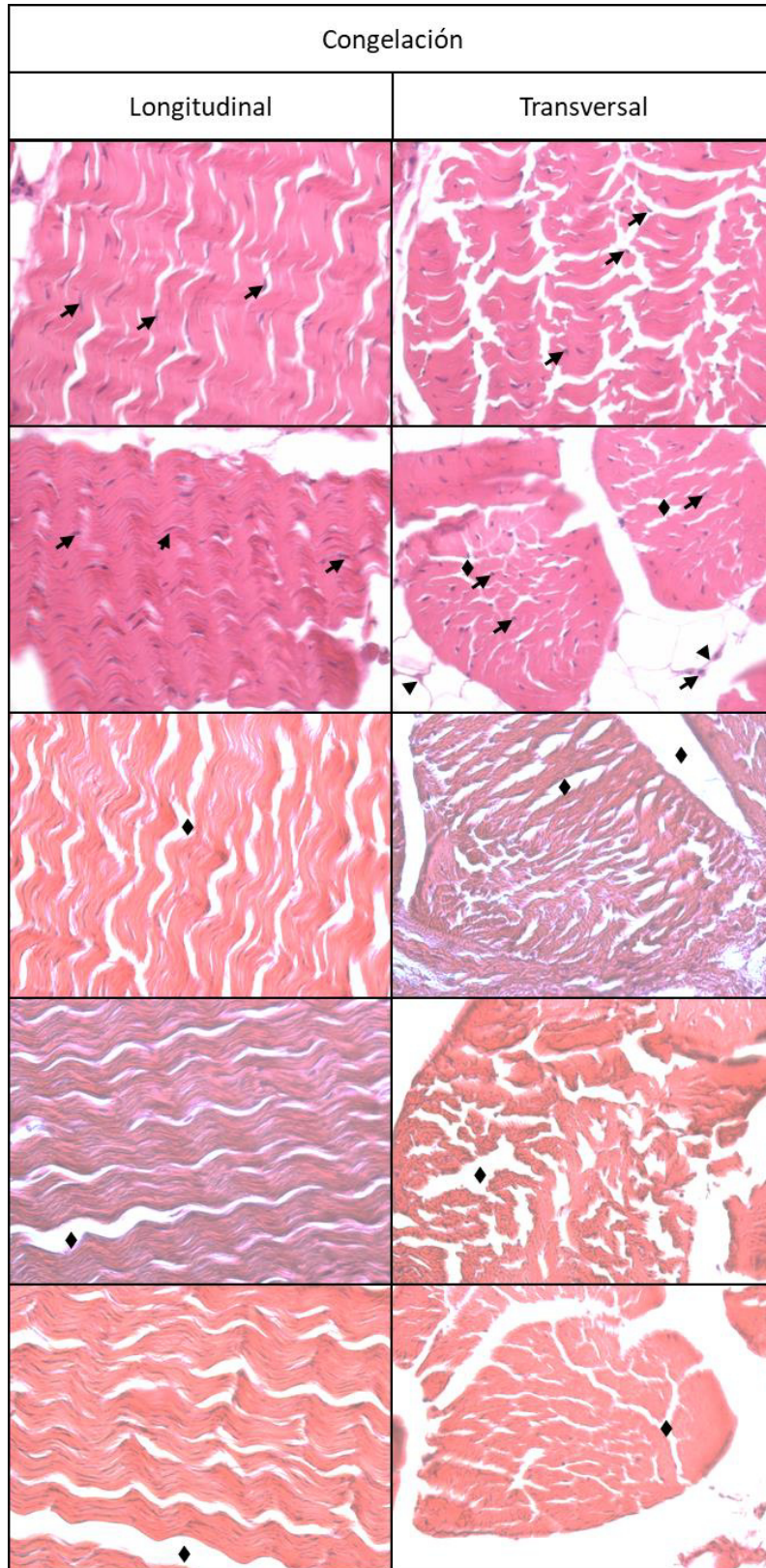


Figura 6. Micrografías representativas de los tendones del grupo de congelación teñidas con H&E observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

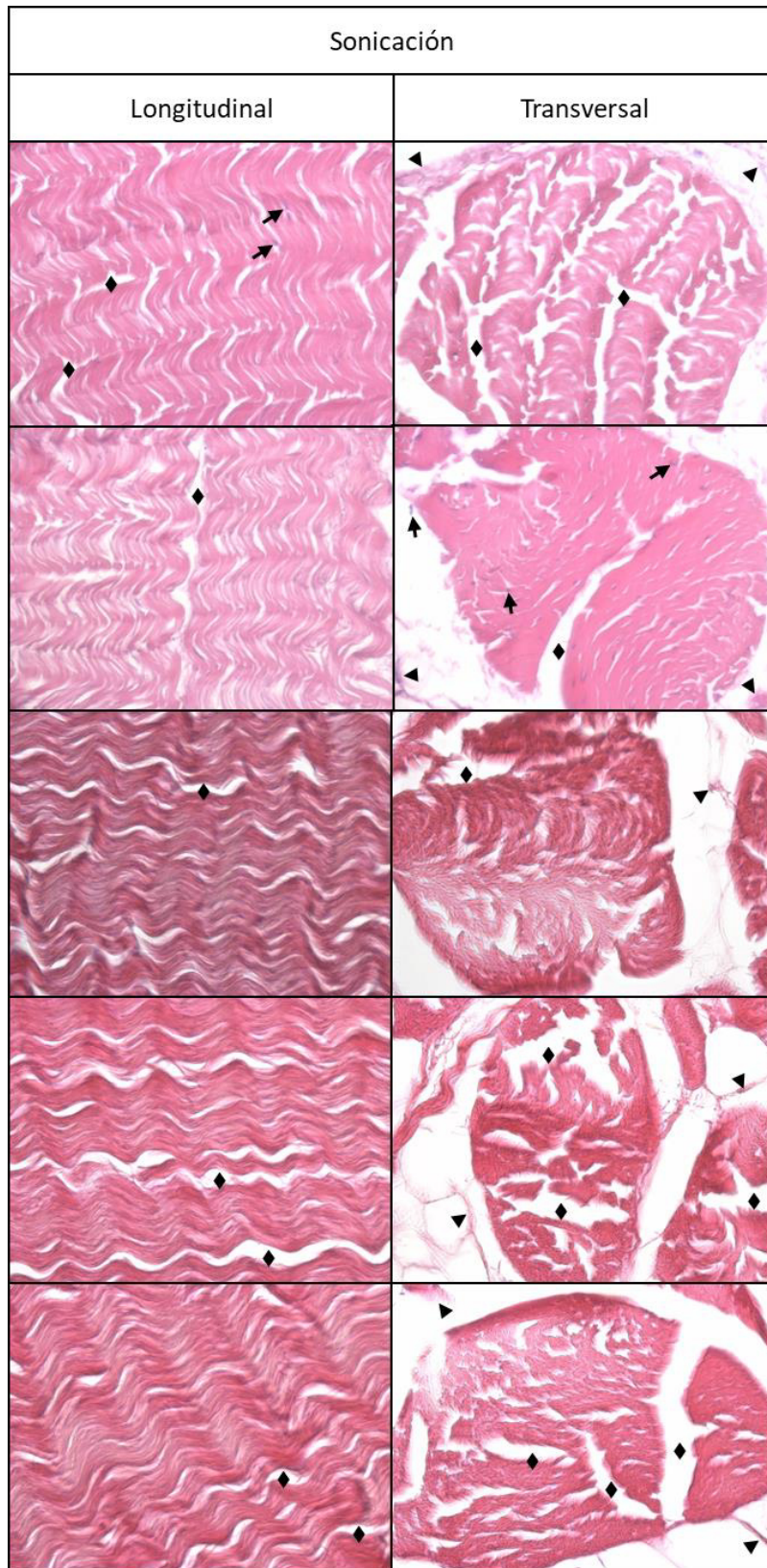


Figura 7. Micrografías representativas de los tendones del grupo de sonicación teñidas con H&E observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

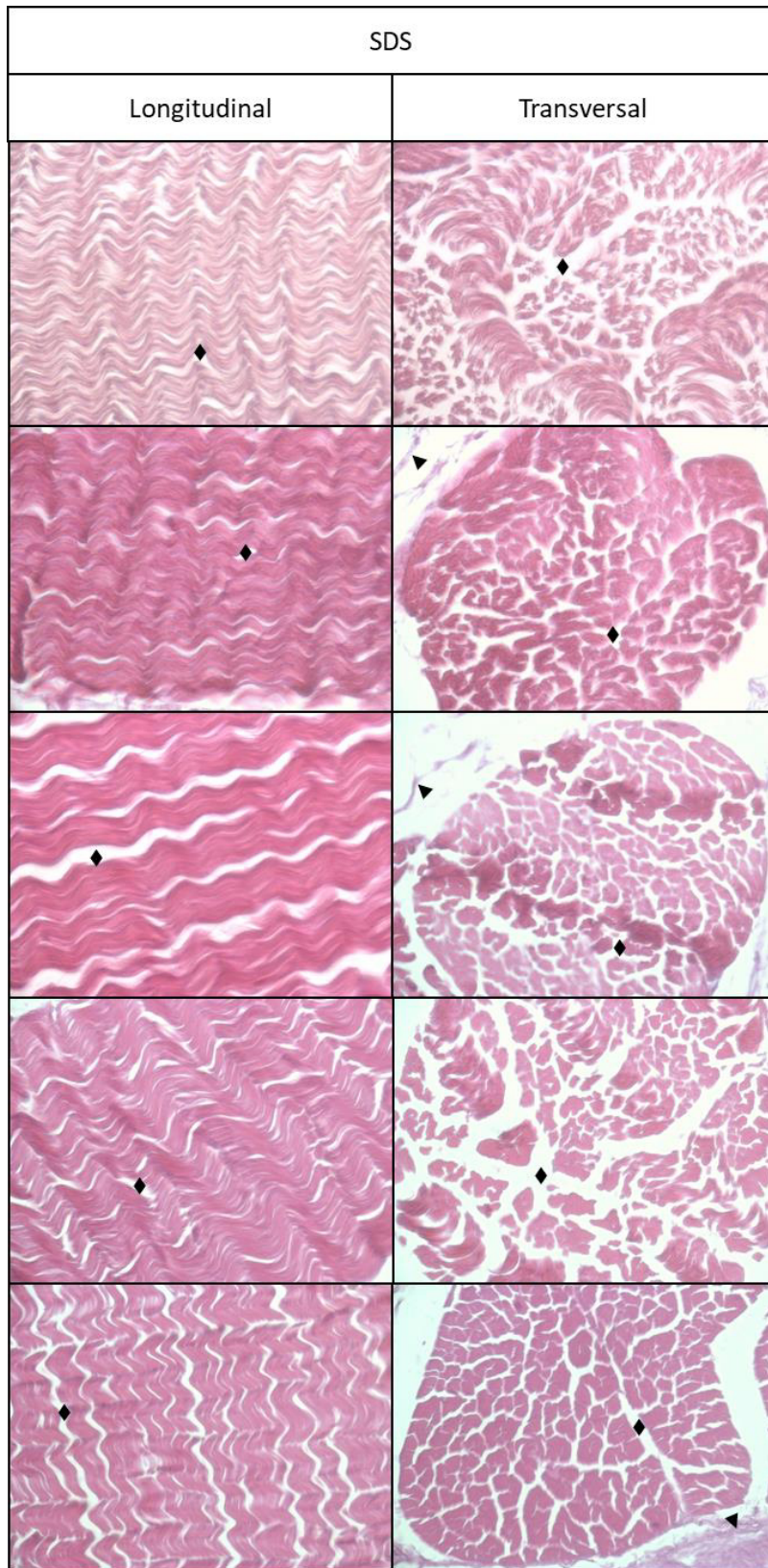


Figura 8. Micrografías representativas de los tendones del grupo de SDS teñidas con H&E observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los ◆ indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

Para realizar un análisis morfométrico de la cantidad de núcleos presentes en el tejido tratado se realizó un marcaje por fluorescencia usando DAPI, el cual es una molécula afín a las regiones enriquecidas con adenina y timina de ácidos nucleicos. El tejido fue irradiado con una longitud de onda de aproximadamente 350 nm para poder observar la emisión de la señal de 460nm que produce DAPI, la cual se encuentra en el espectro azul (Figura 9). La cuantificación de los núcleos se realizó utilizando el software Image J versión 1.51J8 (64 bits) mediante la herramienta Cell Counter (multi-point tool). Se realizó un conteo puntual de cada señal correspondiente a núcleo en un total de 5 campos por laminilla, se realizó un análisis estadístico usando el software GraphPad Prism 6 versión 6.01 graficando el promedio con desviación estándar. Con esta técnica se pudo observar que los tratamientos con el que se obtuvo una completa descelularización fue el de SDS y sonicación, al contrario del de congelación que no presentó diferencia respecto al control (Gráfica 1).

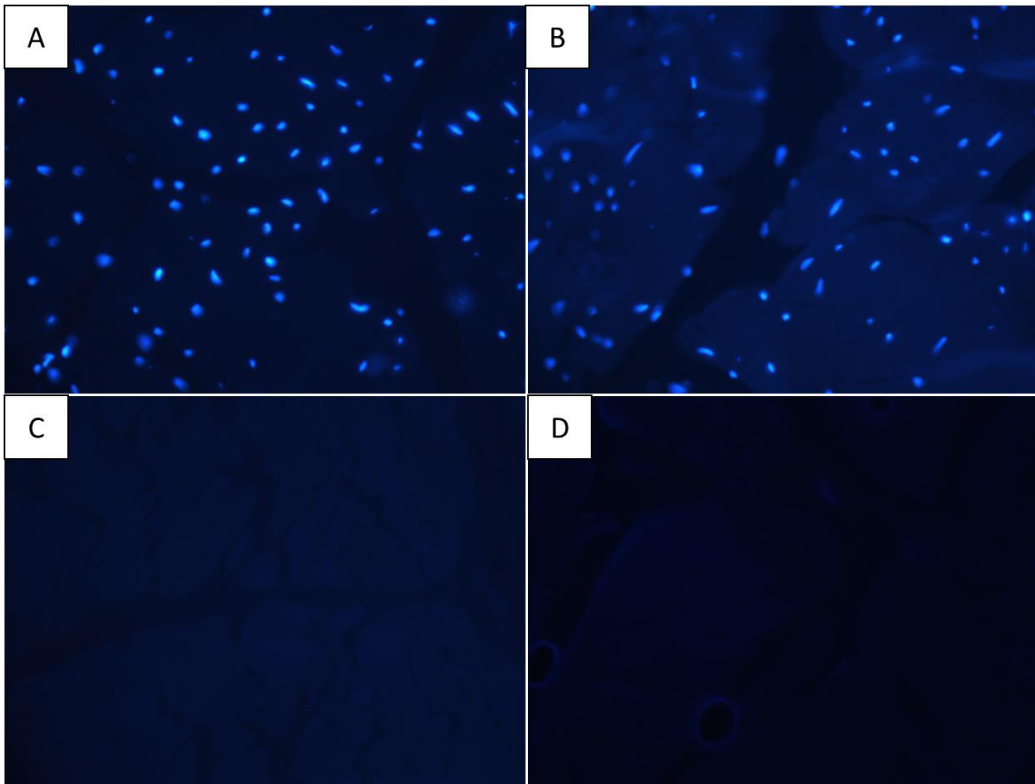
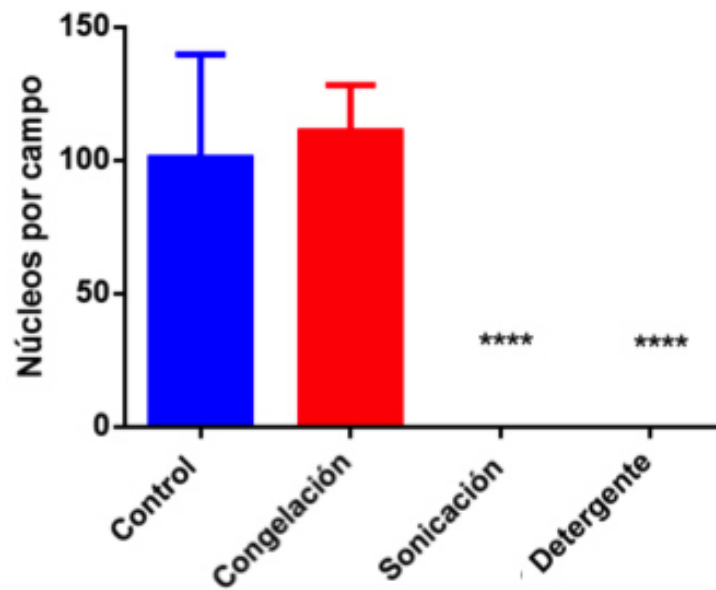


Figura 9. Micrografías representativas del análisis con DAPI observadas a un aumento de 400X. A) micrografía correspondiente al grupo control. B) micrografía correspondiente al grupo de congelación. C) micrografía correspondiente al grupo de SDS. D) micrografía correspondiente al grupo de sonicación.



Gráfica 1. Conteo de núcleos mediante fluorescencia. Al realizar el conteo de los núcleos se puede observar que los tratamientos con sonicación y SDS son los que presentan mejor eficiencia al remover el contenido celular.

Análisis de la preservación de la matriz extracelular

Para realizar un análisis cualitativo de la preservación de la matriz se realizaron las tinciones especiales de tricrómico de Masson para marcar fibras de colágeno y Verhoeff para marcar fibras elásticas; también se realizó un análisis cuantitativo de la cantidad de colágeno empleando el kit de ensayo para hidroxiprolina MAK008 de la compañía Sigma-Aldrich.

Se realizaron cortes longitudinales y trasversales de los tendones. En los cortes longitudinales teñidos con tricrómico de Masson del grupo control (Figura 10) se observan las fibras de colágeno teñidas de color azul ordenadas en haces paralelos, entre las fibras se observan los núcleos de color azul oscuro de aspecto fusiforme (señalados con flechas). En un plano trasversal se puede observar los fascículos de las fibras de colágeno rodeados de tejido conectivo laxo correspondiente al endotendón (señalado por cabezas de flecha), se puede apreciar claramente que las fibras están un poco disgregadas (los espacios están señalados por ♦). Se observan los núcleos de fibroblastos entre las fibras de colágeno de aspecto circular debido al plano de corte, en la periferia del fascículo se observa una gran presencia de núcleos celulares entre el tejido conectivo laxo correspondiente al endotendón (señalado por cabezas de flecha). En general se aprecia una conservación de las fibras de colágeno a nivel microscópico tal como se aprecia a nivel macroscópico (Figura 4).

En los cortes longitudinales teñidos con tricrómico de Masson del grupo de congelación (Figura 11) se observa una disposición de las fibras de colágeno en haces paralelos similar a las del grupo control. Entre las fibras se aprecia una gran cantidad de fibroblastos similar

al grupo control. En un plano transversal se puede observar la disposición de las fibras de colágeno en fascículos, entre las fibras de colágeno se observan los núcleos de fibroblastos de aspecto circular debido al plano de corte. Se puede observar una disparidad en la intensidad del colorante debido a los tiempos de exposición al colorante, pero en general esta técnica demuestra la presencia de las fibras de colágeno.

En los cortes longitudinales teñidos con tricrómico de Masson del tratamiento con sonicación y ácido peracético (Figura 12) se observa la distribución paralela de las fibras de colágeno más laxas y disgregadas, con más espacios entre las fibras y menor cantidad de núcleos (señalados con flechas) en comparación con el grupo control y el de congelación. En un plano transversal, observa gran cantidad de espacios entre las fibras de los fascículos (señalados con ♦) y una menor cantidad de núcleos de fibroblastos en comparación con los grupos anteriores.

En los cortes longitudinales teñidos con tricrómico de Masson del grupo de lavado con SDS (Figura 13) se aprecia una distribución de las fibras en haces paralelos más laxas que los grupos anteriores, se observa claramente que la cantidad de espacios entre las fibras es mayor (señalado con ♦) y no se observa presencia de núcleos de fibroblastos entre las fibras. En un plano transversal, se puede observar que la cantidad de espacio entre las fibras de los fascículos es mayor que los grupos anteriores y no se detecta la presencia de núcleos.

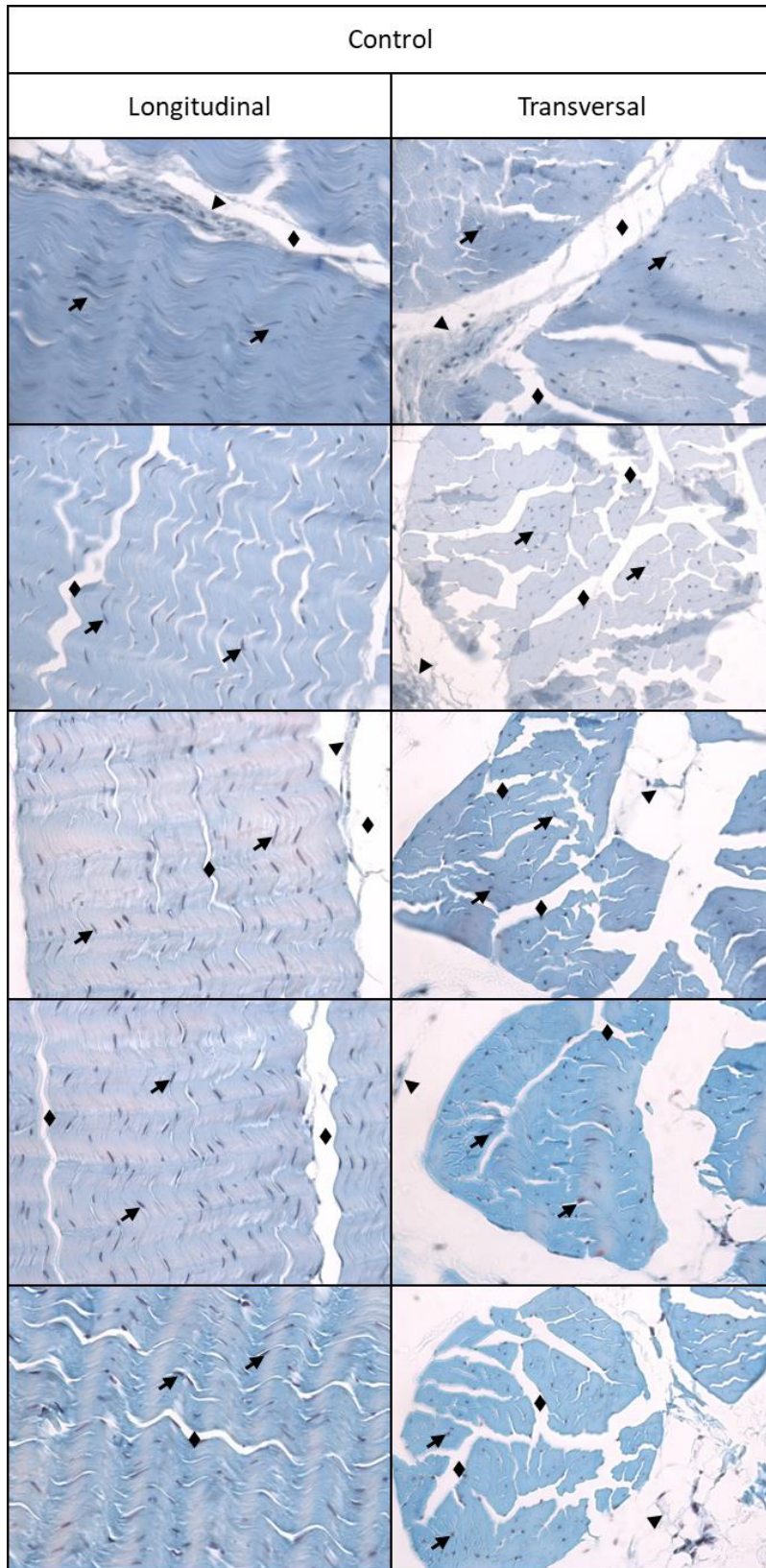


Figura 10. Micrografías representativas de los tendones del grupo control teñidas con tricrómico de Masson observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

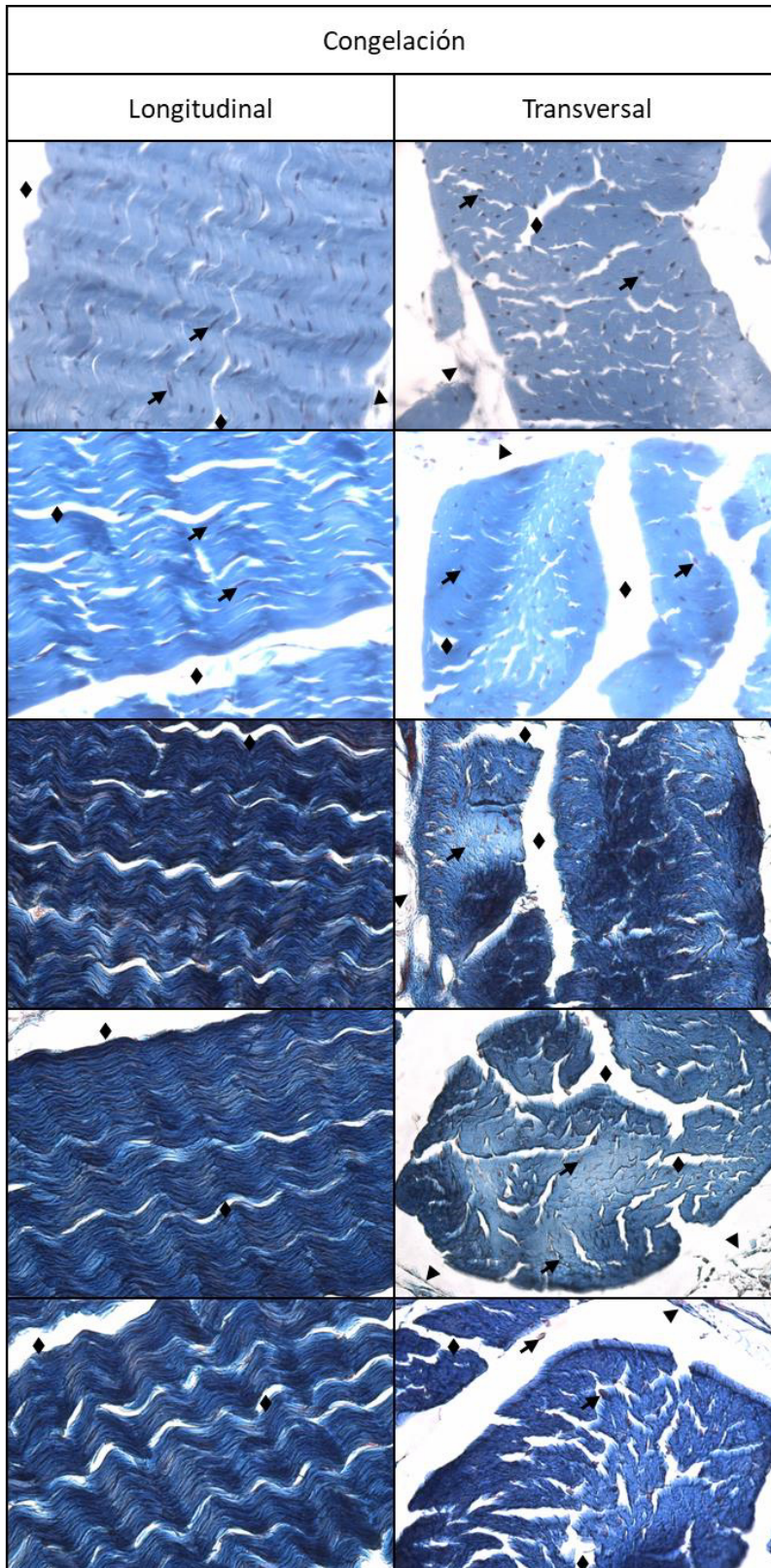


Figura 11. Micrografías representativas de los tendones del grupo de congelación teñidas con tricrómico de Masson observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

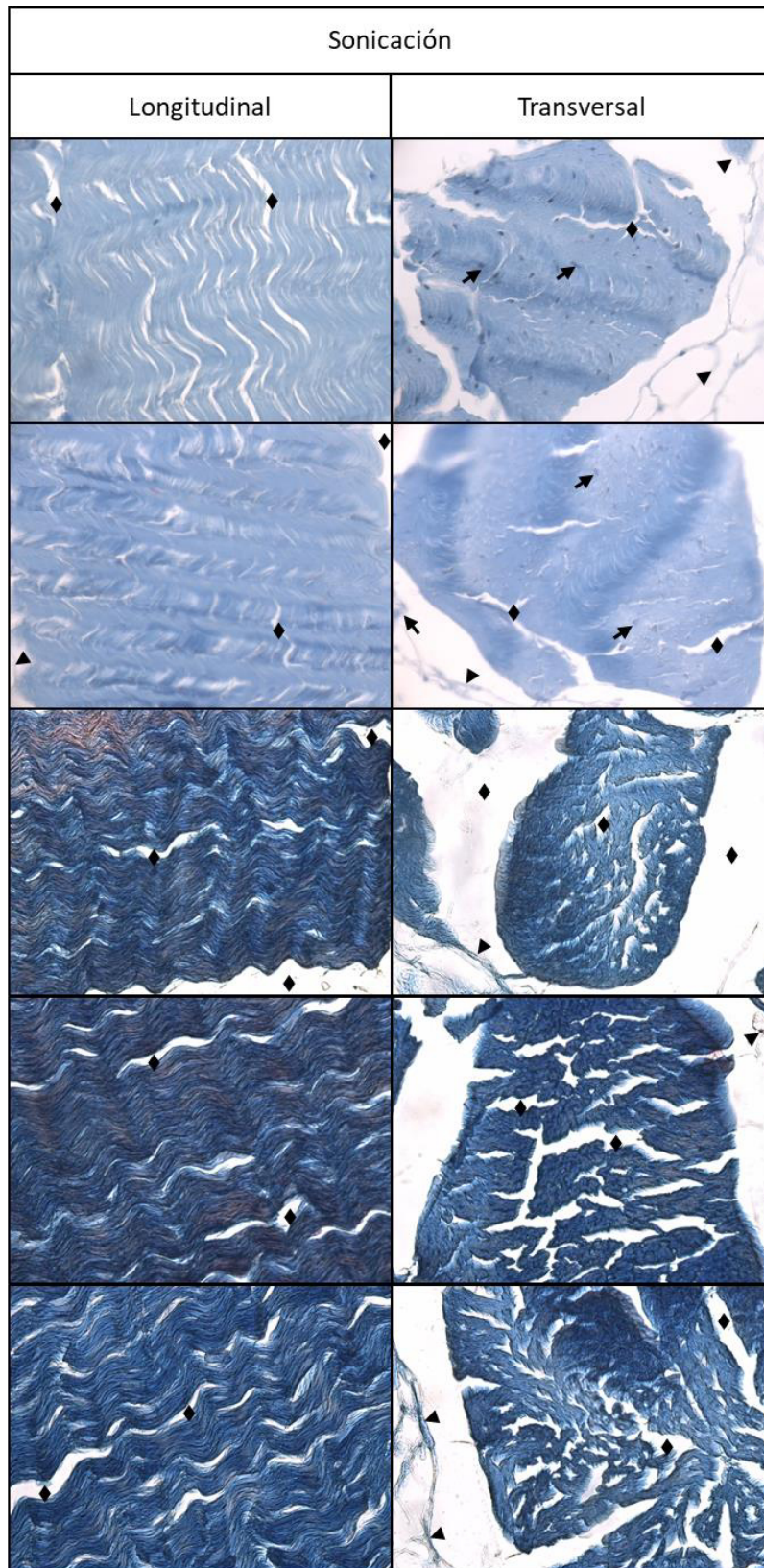


Figura 12. Micrografías representativas de los tendones del grupo de sonicación teñidas con tricrómico de Masson observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

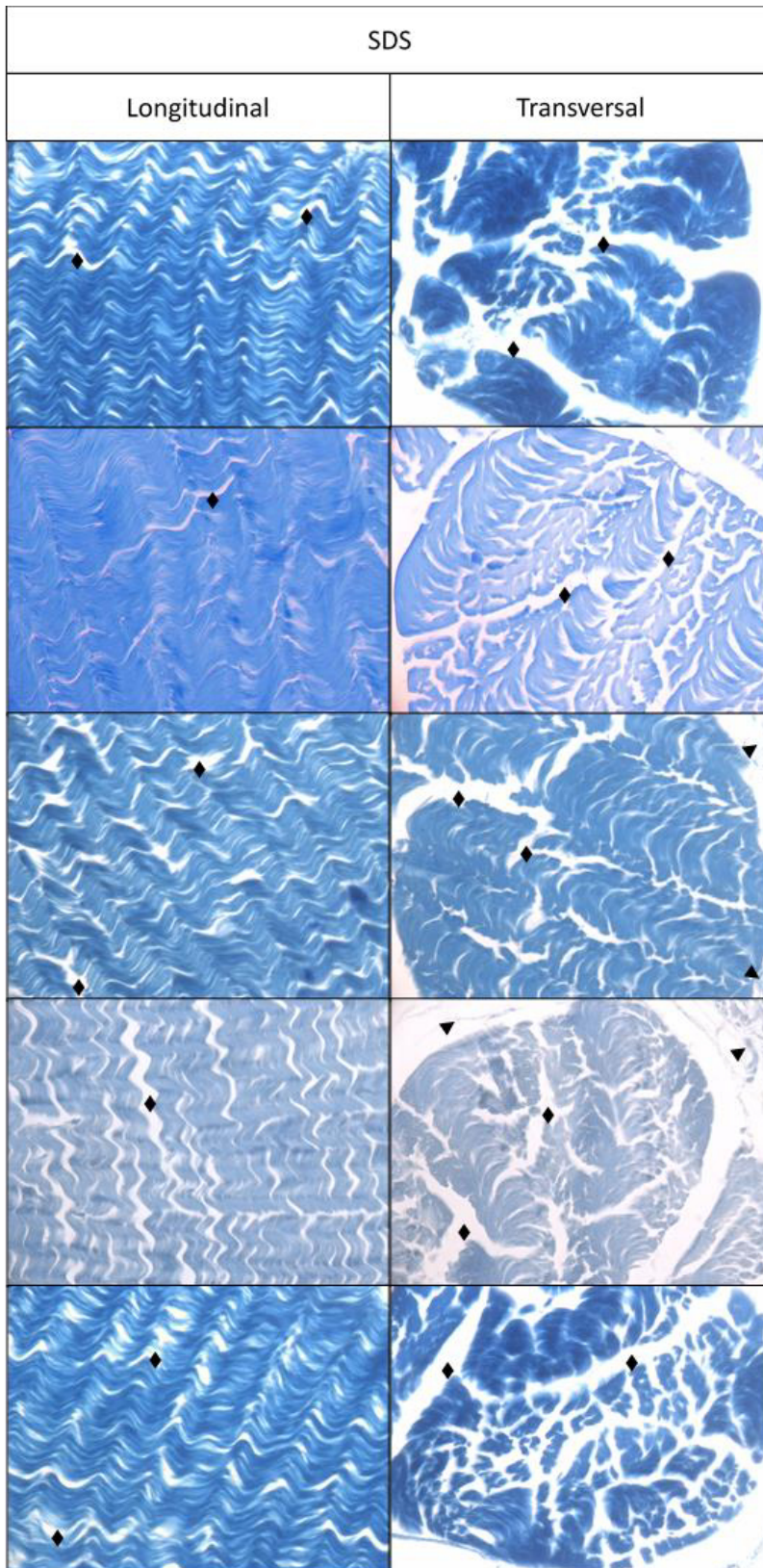


Figura 13. Micrografías representativas de los tendones del grupo de SDS teñidas con tricrómico de Masson observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno y las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras.

Análisis de fibras elásticas

Por último, para realizar el análisis cualitativo de la presencia de fibras elásticas se llevó a cabo la tinción de Verhoeff que tiñe las fibras elásticas en color negro y se contrastó con la tinción de Van Gieson que tiñe las fibras de colágeno en un color anaranjado. En los cortes longitudinales teñidos con Verhoeff del grupo control (Figura 14) se observa una distribución en haces paralelos de las fibras de colágeno de color anaranjado. Entre las fibras se observan los núcleos de los fibroblastos fusiformes de color negro. Se observa que las fibras de colágeno se encuentran un poco laxas (los espacios están señalados con ♦). En este plano no se pueden apreciar las fibras elásticas. En un plano trasversal se puede observar los fascículos de las fibras de colágeno rodeados de tejido conectivo laxo (señalado por cabezas de flecha). Se puede observar que, de igual manera, las fibras están un poco disgregadas (los espacios están señalados con ♦). Entre las fibras de colágeno se observan los núcleos de color negro de aspecto circular debido al plano de corte. En la periferia del fascículo, entre los componentes del endotendón se observa la presencia de las fibras elásticas de color negro (señaladas con •).

En los cortes longitudinales teñidos con Verhoeff del grupo tratado por congelación (Figura 15) se observa una disposición en paralelo de las fibras de colágeno similar a las del grupo control. Se observan los fibroblastos fusiformes de color oscuro entre las fibras de colágeno en cantidad similar al grupo control. En la periferia del fascículo, entre los componentes del endotendón se observa la presencia de las fibras elásticas de color negro (señaladas con •).

En los cortes longitudinales teñidos con Verhoeff del grupo tratado con sonicación y ácido peracético (Figura 16) se observa la disposición en paralelo de las fibras de colágeno. Se observan espacios entre las fibras ya que se encuentran laxas y disgregadas (los espacios están señalados con ◆). Se observa menor cantidad de núcleos celulares entre las fibras en comparación con el grupo control y el de congelación. En un plano trasversal se observa una distribución paralela de las fibras de colágeno y una gran cantidad de espacios entre las fibras de los fascículos (señalados con ◆). En este plano se observa una disminución en la cantidad de núcleos presentes entre las fibras (señalados con flechas).

En los cortes longitudinales teñidos con Verhoeff del grupo lavado con SDS (Figura 17) se observa una distribución paralela de las fibras de colágeno más laxas que los grupos anteriores. Se observa una gran cantidad de espacios entre las fibras (los espacios están señalados con ◆). En un plano trasversal la cantidad de espacio entre las fibras de colágeno en los fascículos es mayor que los grupos anteriores (señalados con ◆). En este plano no se observa la presencia de núcleos entre las fibras ni la presencia de fibras elásticas entre el endotendón.

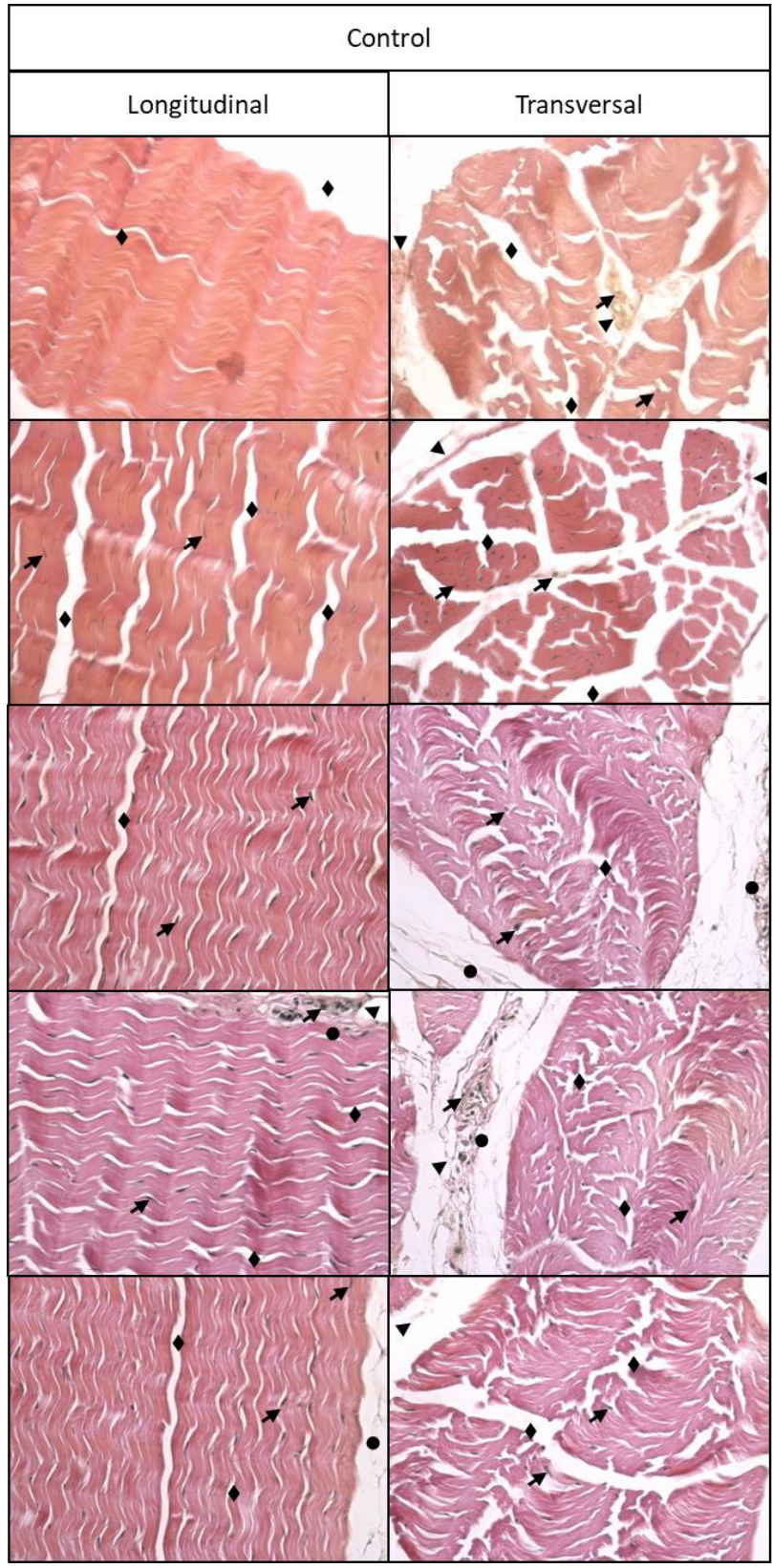


Figura 14. Micrografías representativas de los tendones del grupo control teñidas con Verhoeff observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno, las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras y el \bullet indica la presencia de las fibras elásticas.

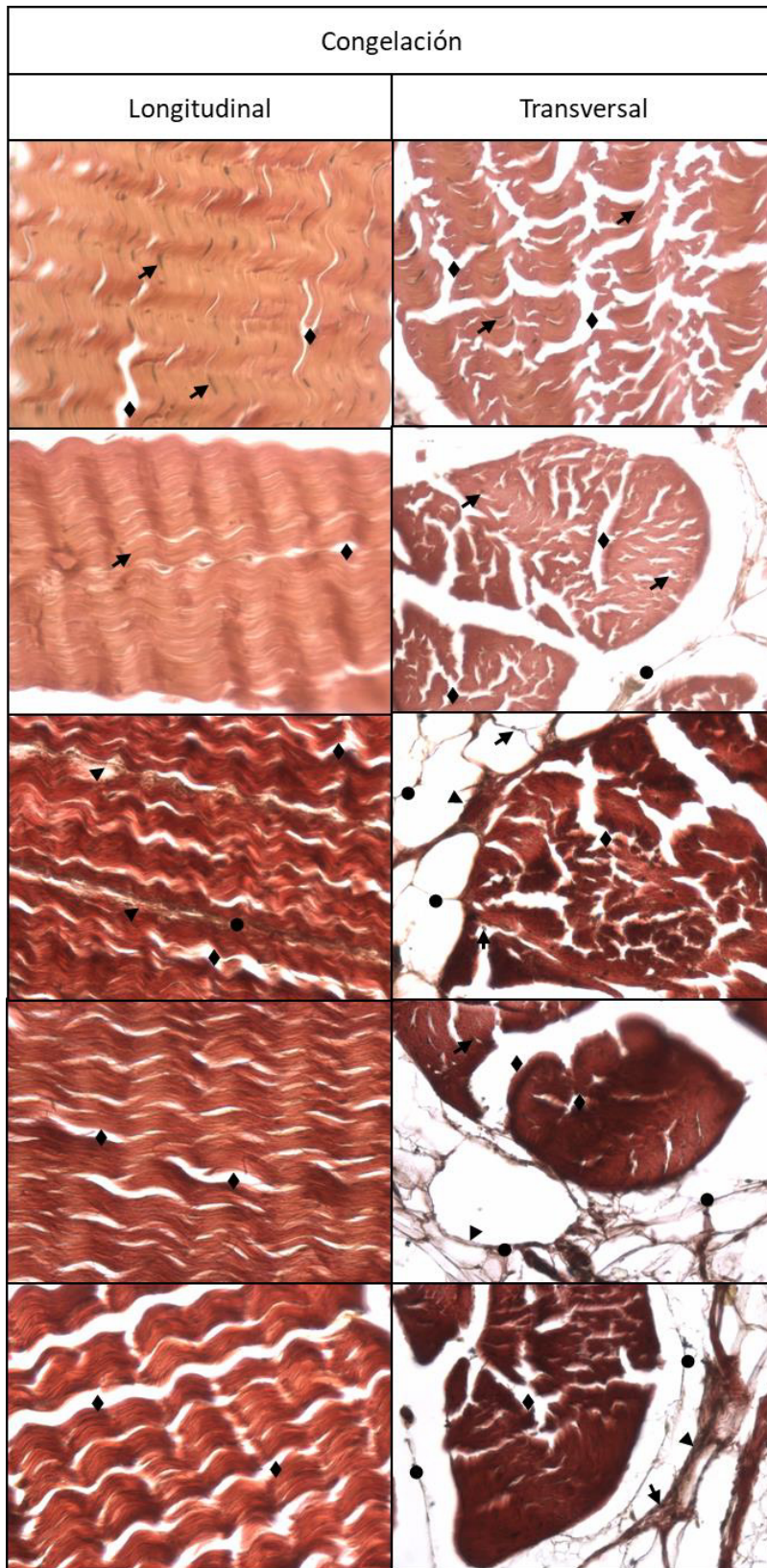


Figura 15. Micrografías representativas de los tendones del grupo de congelación teñidas con Verhoeff observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los ◆ indican los espacios entre las fibras de colágeno, las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras y el • indica la presencia de las fibras elásticas.

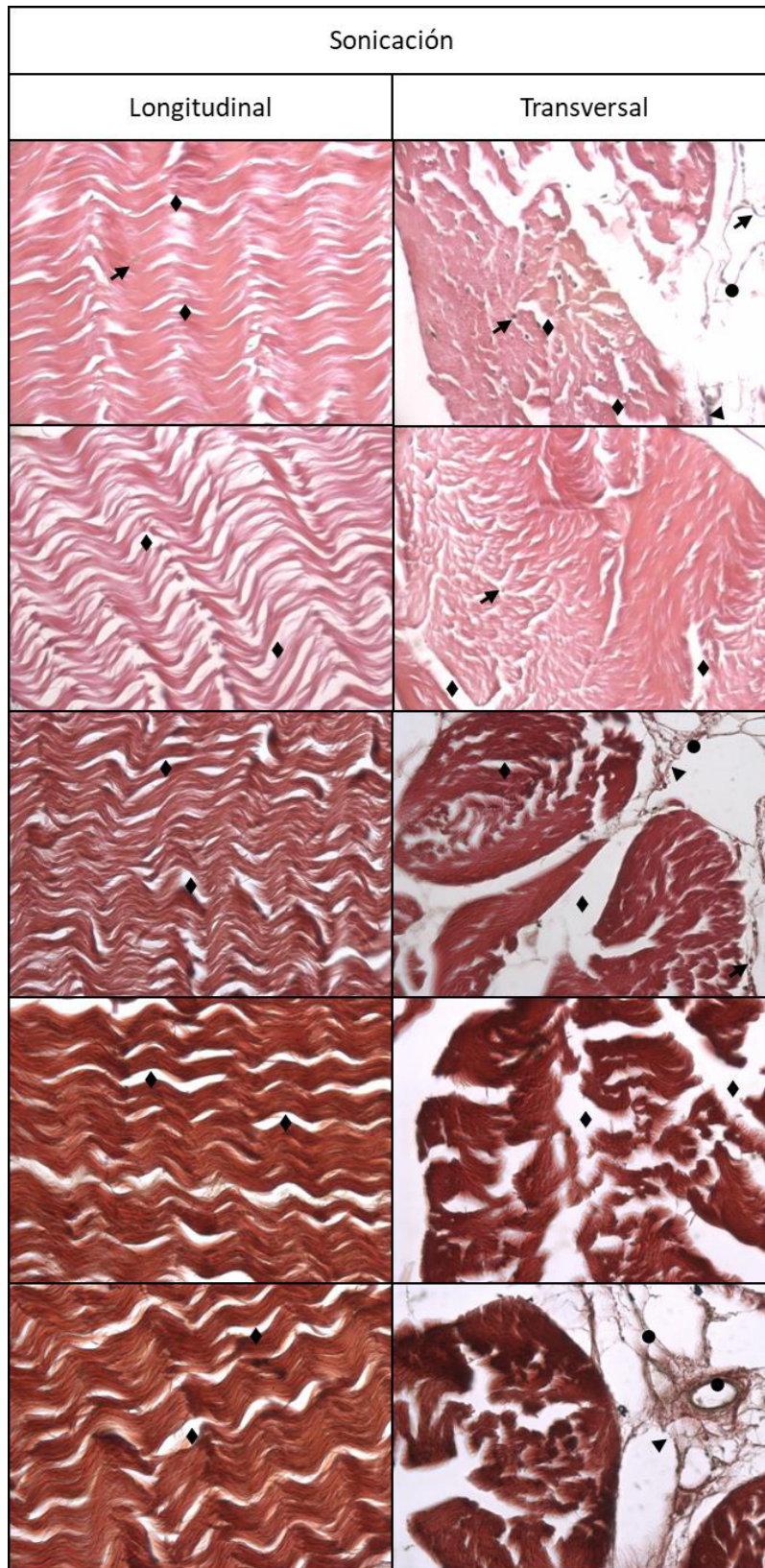


Figura 16. Micrografías representativas de los tendones del grupo de sonicación teñidas con Verhoeff observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los \blacklozenge indican los espacios entre las fibras de colágeno, las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras y el \bullet indica la presencia de las fibras elásticas.

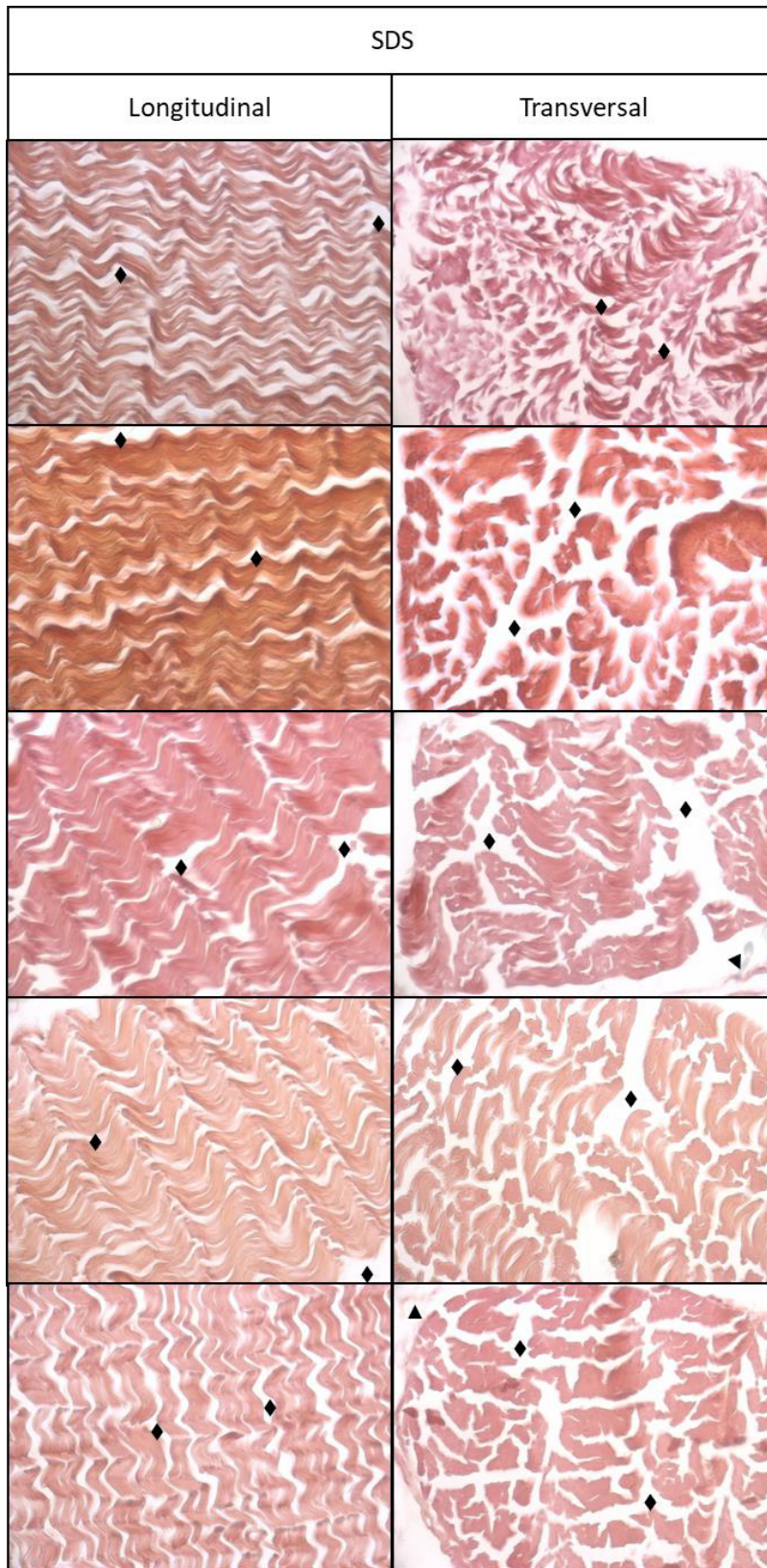
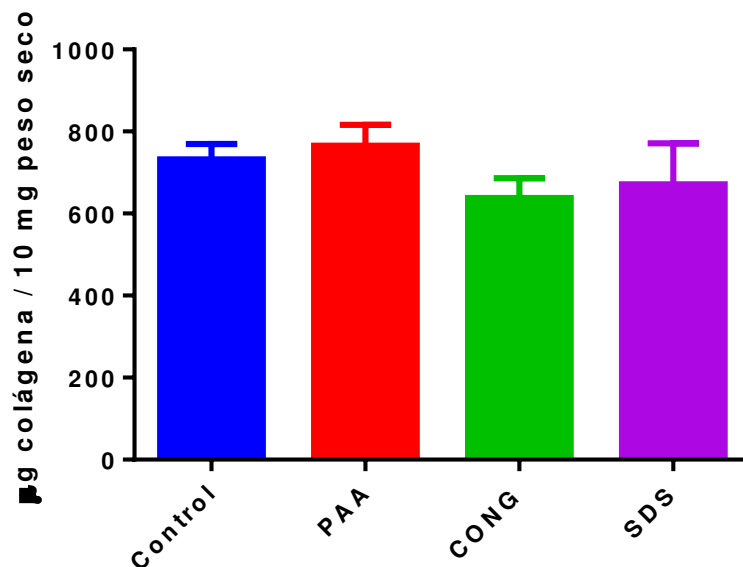


Figura 17. Micrografías representativas de los tendones del grupo de SDS teñidas con Verhoeff observadas a un aumento de 400X. Las imágenes de la izquierda corresponden a los cortes longitudinales mientras que las de la derecha corresponden a los cortes transversales. Las flechas indican los núcleos celulares, los ◆ indican los espacios entre las fibras de colágeno, las cabezas de flecha indican el tejido conectivo laxo que rodea las fibras y el • indica la presencia de las fibras elásticas.

Cuantificación de colágeno

Para llevar a cabo un análisis cuantitativo de la cantidad de colágeno por peso seco se liofilizó el tejido y se empleó el kit de ensayo para hidroxiprolina MAK008 de la compañía Sigma-Aldrich el cual se basa en la técnica colorimétrica de oxidación de hidroxiprolina y conjugación con la molécula de 4-(Dimetilamino) benzaldehído (DMAB), la cual deriva en una molécula colorimétrica (560 nm). La hidroxiprolina es un componente principal de la estructura del colágeno, confiere estabilidad a su estructura de hélice y debido a que su presencia es casi restringida al colágeno, la medición de los niveles de hidroxiprolina puede ser utilizado como indicador del contenido de esta proteína. La reacción se realizó en una placa de 96 pozos de acuerdo con la metodología del fabricante y la medición se llevó a cabo en un lector de placas para análisis colorimétrico. El análisis de los datos se llevó a cabo en el software del proveedor del equipo realizando una interpolación de las señales de las muestras problema en la curva construida mediante cantidades estándar.



Gráfica 2. Cuantificación de colágeno. En el análisis de cuantificación del colágeno por peso seco no se encuentra diferencia estadística entre los tratamientos.

Se realizó un análisis estadístico usando el software GraphPad Prism 6 versión 6.01 graficando el promedio con desviación estándar (Gráfica 2).

5. Discusión

La estrategia del uso de xenoinjertos descelularizados ha demostrado un amplio abanico de posibles soluciones debido a su disponibilidad, biocompatibilidad con el cuerpo humano y aprovechamiento de la estructura propia de la matriz extracelular la cual es propicia para una rápida recuperación (Docheva et al., 2015). La premisa en la cual se basa el presente trabajo es el éxito del antecedente directo que reporta la compañía Aperion Biologics, Inc en 2016, la cual obtiene una tasa de éxito del 88% en un estudio clínico a largo plazo de 24 meses en 66 pacientes a los cuales les fue reconstruido el ligamento cruzado anterior empleando un xenoinjerto descelularizado patentado por la propia compañía (K R Stone, 2002). Este trabajo busca sentar las bases metodológicas para la obtención de un injerto hueso-tendón-hueso procedente de tendones rotulianos porcinos descelularizados. Hoy en día, existe gran cantidad de metodologías para llevar a cabo la descelularización de tendones y ligamentos, la mayoría de ellas tienen como factor común el uso de detergentes, enzimas y procesos físicos y químicos.

Las metodologías destacadas que recopila este estudio son la de Stone, 2002, Pridgen *et al.*, 2011 y Bronstein *et al.*, 2013. El proceso en el que se basa la metodología de Stone consiste principalmente en la disrupción celular mediante ciclos de congelación y descongelación; a pesar de que esta estrategia no plantea el uso de detergentes para la

remoción celular, fue de gran interés ya que en ella se basa la patente de Aperion Biologics, inc. que ha demostrado éxito en la clínica. Al llevar a cabo la metodología que se plantea en la patente se puede observar que la remoción de la sangre interna del hueso es muy limitada y al final del proceso obtenemos un injerto que aún presenta restos de sangre. En comparación con los otros tratamientos este resultó ser el menos eficiente en la limpieza de sangre en el hueso. Cuando se llevó a cabo el análisis histológico sobre el tendón se observa que la presencia de células entre las fibras y en el tejido conectivo que rodea los fascículos es muy marcada a simple vista, en comparación con el grupo control no se observa diferencia. Al realizar una comparación de la cantidad de núcleos marcados por fluorescencia no se obtiene una diferencia entre este grupo y el control, por lo que se puede considerar que esta metodología no es eficiente en la remoción de fibroblastos. Estos resultados son contrastantes con la publicación de Suhodolčan *et al.* ya que ellos mencionan que la remoción celular no se lleva a cabo mediante este método, por lo cual solo evalúan la preservación de las propiedades mecánicas del tejido (Suhodolčan *et al.*, 2013). Por otra parte, al contrastar estudios de otros autores, además de realizar ciclos de congelación también emplean lavados con detergentes, incubación con endonucleasas e incluso con ácido peracético (Arianna B. Lovati, Marta Bottagisio, 2016; Herbert, Jones, Ingham, & Fisher, 2015; Jones *et al.*, 2017). Esto da pie a pensar que debido a que se trate de una patente la metodología disponible sea imprecisa y más aún, no se reportan los resultados obtenidos por lo que no hay punto de comparación.

La metodología basada en el trabajo de Bronstein *et al.*, 2013 plantea la aplicación de ultrasonicación para crear un microambiente más laxo el cual permita la entrada a las

soluciones posteriores; también se plantea el uso de ácido peracético como agente oxidante que incremente la porosidad del tejido y por ende la eficiencia de descelularizado mediante el lavado con EDTA y detergente SDS. Al realizar el análisis histológico sobre los tendones tratados mediante este método se observa una menor cantidad de contenido celular en comparación con el grupo control y el de congelamiento. La eficacia de la remoción celular se hace evidente en el análisis con fluorescencia, al disminuir significativamente la cantidad de núcleos presentes en el injerto (Gráfica 1). Los resultados obtenidos mediante las tinciones con H&E son similares a los resultados del equipo de Bronstein y del equipo de Ingram (Ingram, Korossis, Howling, Fisher, & Ingham, 2007) obteniendo una alta eficiencia en la remoción de las células del tejido.

Por último, el método basado en el trabajo de Pridgen *et al*, 2011 fue el más eficiente en la remoción de contenido celular y el más sencillo de los tres tratamientos. Se lleva a cabo mediante un prelavado con EDTA y un lavado con SDS. En el análisis histológico se puede observar una gran disgregación de las fibras, pero no la presencia de células. Al realizar el conteo celular con DAPI no se detecta la presencia de núcleos celulares. En la mayoría de las metodologías que emplean SDS la descelularización es muy eficiente, los resultados que se obtuvieron son muy similares a los trabajos evaluados por Lovati y colaboradores (Arianna B. Lovati, Marta Bottagisio, 2016).

En todos los grupos incluyendo al grupo control, se observó una laxitud de las fibras de colágeno en cuanto la vaina tendinosa fue removida, por lo cual este aspecto no es de gran preocupación ya que no representa una situación aislada a un tratamiento en particular. Por otra parte, solo un estudio de análisis mecánico nos indicará realmente si el

injerto se encuentra en condiciones óptimas para soportar las fuerzas de tensión que requiere la rodilla. Por último, si se considera necesario, se puede plantear el recubrimiento de las fibras para simular una vaina tendinosa que regrese la compactación original a las fibras.

En el análisis de preservación de la matriz extracelular se consideró la preservación de colágeno como indicativo principal ya que la composición de las fibras del tendón es principalmente colágeno. Al realizar la tinción especial de tricrómico de Masson para detectar la presencia de colágeno se pudo observar una preservación en todos los grupos de manera cualitativa. Al realizar un análisis cuantitativo por el método de oxidación y detección de hidroxiprolina se pudo determinar que efectivamente todos los grupos preservan una cantidad similar de colágeno (no hay diferencia significativa entre los grupos). Estos resultados indican que la aplicación de sustancias químicas como el ácido peracético y detergentes aniónicos como el SDS y tratamientos físicos como congelación y sonicación no alteran la cantidad de colágeno presente en el tejido. De manera macroscópica tampoco se observa un cambio en las fibras de colágeno que no sea la disgregación, es decir, no se presenta una ruptura o disolución de las fibras en las soluciones de trabajo.

Otro aspecto tomado en cuenta en la preservación de la matriz extracelular fue la presencia de fibras elásticas. Las fibras elásticas están presentes principalmente en tejidos elásticos como vasos sanguíneos, ligamentos y tejidos que requieran la capacidad de elasticidad. El tendón rotuliano cumple la función de mantener la tensión entre la rótula y la tibia, es decir no posee gran elasticidad, por lo que se esperaba que la presencia de

fibras elásticas estuviera restringida casi exclusivamente a vasos sanguíneos y el endotendón. En los cortes analizados mediante la tinción especial de Verhoeff para marcar fibras elásticas se observó en todos los grupos un marcaje en vasos sanguíneos y endotendón que rodea los fascículos de fibras de colágeno. Algunos autores plantean que la presencia de fibras elásticas puede propiciar la recuperación de la morfología ondulada después de un estiramiento (Docheva et al., 2015). De igual manera, también se plantea que la preservación de los glucosaminoglicanos puede ser un aspecto importante en la recuperación de las propiedades mecánicas y morfológicas del tendón (Vavken et al., 2009).

La inmunogenicidad es un aspecto importante a tener en cuenta en los estudios clínicos. Galili *et al* menciona ampliamente que la principal barrera inmunológica entre las distintas especies animales y los simios superiores como el humano es el epítipo α -gal. El epítipo α -gal se encuentra como componente constante de los glucosaminoglicanos de la matriz extracelular en las especies diferentes a los monos superiores. Al estar ausente este epítipo, los monos superiores han desarrollado rechazo inmunológico a los tejidos que lo contengan (Galili, 2015b). Una estrategia que se puede llevar a cabo para la remoción de estos epítipos es mediante la digestión enzimática con α -galactosidasa (Kevin R Stone, Walgenbach, et al., 2007; Kevin R Stone, Abdel-Motal, et al., 2007; Yoshida et al., 2012).

La recelularización ha sido propuesta como un pre-acondicionamiento que permita la regeneración más rápida en los pacientes (Lomas et al., 2004; Whitlock et al., 2007b; Woon et al., 2011a). Se ha observado que las propiedades mecánicas no se ven disminuidas al realizar una descelularización y una posterior recelularización. Debido a

esto, es de gran interés evaluar a futuro una comparativa entre el tratamiento de sonicación y de lavado con SDS mediante ensayos de recelularización.

6. Conclusiones

- Se logró estandarizar la técnica de obtención del injerto hueso-tendón-hueso procedente del tendón rotuliano porcino.
- Tanto la técnica de sonicación y ácido peracético como la de EDTA y SDS muestran una gran eficiencia en la remoción de células del tejido; por otra parte, el tratamiento de congelación no presenta remoción de células del tejido.
- Los tres tratamientos preservan las fibras de colágeno del tejido.

7. Perspectivas

- Realizar un análisis biomecánico que garantice la preservación de la resistencia del tendón.
- Analizar mediante inmunohistoquímica la remoción del epítipo α -gal del tejido descelularizado.
- Analizar mediante pruebas bioquímicas la preservación de los glucosaminoglicanos.

8. Literatura Citada

- Aperion Biologics, Inc.: Private Company Information - Businessweek. (2015). Retrieved February 10, 2016, from <http://www.bloomberg.com/research/stocks/private/snapshot.asp?privcapId=12315083>
- Arianna B. Lovati, Marta Bottagisio, and M. M. (2016). Decellularized and Engineered Tendons as Biological Substitutes: A Critical Review. *Stem Cells International*, 2016, 24. Retrieved from <http://www.hindawi.com/journals/sci/2016/7276150/>
- Benjamin, M., Kumai, T., Milz, S., Boszczyk, B. ., Boszczyk, A. ., & Ralphs, J. . (2002). The skeletal attachment of tendons—tendon “entheses.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(4), 931–945. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00138-1)
- Bronstein, J. A., Woon, C. Y. L., Farnebo, S., Behn, A. W., Schmitt, T., Pham, H., ... Chang, J. (2013). Physicochemical decellularization of composite flexor tendon-bone interface grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132(1), 94–102. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318290f5fc>
- Chen, J., Xu, J., Wang, A., & Zheng, M. (2009). Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Review of Medical Devices*, 6(1), 61–73. <https://doi.org/10.1586/17434440.6.1.61>
- Chong, A. K. S., Riboh, J., Smith, R. L., Lindsey, D. P., Pham, H. M., & Chang, J. (2009). Flexor tendon tissue engineering: acellularized and reseeded tendon constructs. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 123(6), 1759–66. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181a65ae7>
- Deeken, C. R., White, A. K., Bachman, S. L., Ramshaw, B. J., Cleveland, D. S., Loy, T. S., & Grant, S. A. (2011). Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 96(2), 199–206. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31753>
- Derwin, K. A., Codsì, M. J., Milks, R. A., Baker, A. R., McCarron, J. A., & Iannotti, J. P. (2009). Rotator cuff repair augmentation in a canine model with use of a woven poly-L-lactide device. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 91(5), 1159–71. <https://doi.org/10.2106/JBJS.H.00775>
- Dines, J. S., Grande, D. A., & Dines, D. M. Tissue engineering and rotator cuff tendon healing. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et Al.]*, 16(5 Suppl), S204-7. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2007.03.004>

- Docheva, D., Müller, S. A., Majewski, M., & Evans, C. H. (2015, April). Biologics for tendon repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.015>
- Endress, R., Woon, C. Y. L., Farnebo, S. J., Behn, A., Bronstein, J., Pham, H., ... Chang, J. (2012). Tissue-engineered collateral ligament composite allografts for scapholunate ligament reconstruction: an experimental study. *The Journal of Hand Surgery*, *37*(8), 1529–37. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2012.05.020>
- Evans, S., Shaginaw, J., & Bartolozzi, A. (2014). Acl reconstruction - it's all about timing. *International Journal of Sports Physical Therapy*, *9*(2), 268–73. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4004131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Farnebo, S., Woon, C. Y. L., Bronstein, J. A., Schmitt, T., Lindsey, D. P., Pham, H., ... Chang, J. (2014). Decellularized tendon-bone composite grafts for extremity reconstruction: an experimental study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *133*(1), 79–89. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000436823.64827.a0>
- Fox, P. M., Farnebo, S., Lindsey, D., Chang, J., Schmitt, T., & Chang, J. (2013). Decellularized human tendon-bone grafts for composite flexor tendon reconstruction: a cadaveric model of initial mechanical properties. *The Journal of Hand Surgery*, *38*(12), 2323–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2013.08.092>
- Galili, U. (2015a). Avoiding Detrimental Human Immune Response Against Mammalian Extracellular Matrix Implants. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *21*(2), 231–241. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0392>
- Galili, U. (2015b). Significance of the Evolutionary α 1,3-Galactosyltransferase (GGTA1) Gene Inactivation in Preventing Extinction of Apes and Old World Monkeys. *Journal of Molecular Evolution*, *80*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00239-014-9652-x>
- Getgood, A., & Bollen, S. (2010). What tissue bankers should know about the use of allograft tendons and cartilage in orthopaedics. *Cell and Tissue Banking*, *11*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1007/s10561-009-9129-0>
- Gianotti, S. M., Marshall, S. W., Hume, P. A., & Bunt, L. (2009). Incidence of anterior cruciate ligament injury and other knee ligament injuries: A national population-based study. *Journal of Science and Medicine in Sport*, *12*(6), 622–627. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2008.07.005>
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, *27*(19), 3675–83. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
- Herbert, A., Jones, G. L., Ingham, E., & Fisher, J. (2015). A biomechanical characterisation of acellular porcine super flexor tendons for use in anterior cruciate ligament replacement: investigation into the effects of fat reduction and bioburden reduction

bioprocesses. *Journal of Biomechanics*, 48(1), 22–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.11.013>

- Hinsenkamp, M., Muylle, L., Eastlund, T., Fehily, D., Noël, L., & Strong, D. M. (2012). Adverse reactions and events related to musculoskeletal allografts: reviewed by the World Health Organisation Project NOTIFY. *International Orthopaedics*, 36(3), 633–41. <https://doi.org/10.1007/s00264-011-1391-7>
- Hogan, M. V., Bagayoko, N., James, R., Starnes, T., Katz, A., & Chhabra, A. B. (2011). Tissue engineering solutions for tendon repair. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 19(3), 134–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21368094>
- Holman, R. C., Belay, E. D., Christensen, K. Y., Maddox, R. A., Minino, A. M., Folkema, A. M., ... Schonberger, L. B. (2010). Human prion diseases in the United States. *PloS One*, 5(1), e8521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008521>
- Hudson, T. W., Zawko, S., Deister, C., Lundy, S., Hu, C. Y., Lee, K., & Schmidt, C. E. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Engineering*, 10(11–12), 1641–51. <https://doi.org/10.1089/ten.2004.10.1641>
- Ingram, J. H., Korossis, S., Howling, G., Fisher, J., & Ingham, E. (2007). The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue scaffolds for use in anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Engineering*, 13(7), 1561–72. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0362>
- Jones, G., Herbert, A., Berry, H., Edwards, J. H., Fisher, J., & Ingham, E. (2017). Decellularization and Characterization of Porcine Superflexor Tendon: A Potential Anterior Cruciate Ligament Replacement. *Tissue Engineering. Part A*, 23(3–4), 124–134. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0114>
- Kurt, T. D., & Sigurdson, C. J. (2016). Cross-species transmission of CWD prions. *Prion*. <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1118603>
- Lee, K.-I., Lee, J.-S., Kim, J.-G., Kang, K.-T., Jang, J.-W., Shim, Y.-B., & Moon, S.-H. (2013). Mechanical properties of decellularized tendon cultured by cyclic straining bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 101(11), 3152–8. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34624>
- Lomas, R. J., Jennings, L. M., Fisher, J., & Kearney, J. N. (2004). Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts. *Cell and Tissue Banking*, 5(3), 149–60. <https://doi.org/10.1023/B:CATB.0000046071.11459.bd>
- Lutolf, M. P., & Hubbell, J. A. (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular

- microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 23(1), 47–55. <https://doi.org/10.1038/nbt1055>
- Martinello, T., Bronzini, I., Volpin, A., Vindigni, V., Maccatrozzo, L., Caporale, G., ... Patruno, M. (2014a). Successful recellularization of human tendon scaffolds using adipose-derived mesenchymal stem cells and collagen gel. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(8), 612–9. <https://doi.org/10.1002/term.1557>
- Martinello, T., Bronzini, I., Volpin, A., Vindigni, V., Maccatrozzo, L., Caporale, G., ... Patruno, M. (2014b). Successful recellularization of human tendon scaffolds using adipose-derived mesenchymal stem cells and collagen gel. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(8), 612–9. <https://doi.org/10.1002/term.1557>
- Minami, A., Ishii, S., Ogino, T., Oikawa, T., & Kobayashi, H. (1982). Effect of the immunological antigenicity of the allogeneic tendons on tendon grafting. *The Hand*, 14(2), 111–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6288520>
- Murray, D. H., Kubiak, E. N., Jazrawi, L. M., Araghi, A., Kummer, F., Loebenberg, M. I., & Zuckerman, J. D. The effect of cartilage-derived morphogenetic protein 2 on initial healing of a rotator cuff defect in a rat model. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et Al.]*, 16(2), 251–4. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2006.07.002>
- Nín, J. R., Leyes, M., & Schweitzer, D. (1996). Anterior cruciate ligament reconstruction with fresh-frozen patellar tendon allografts: sixty cases with 2 years' minimum follow-up. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy : Official Journal of the ESSKA*, 4(3), 137–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8961227>
- Pridgen, B. C., Woon, C. Y. L., Kim, M., Thorfinn, J., Lindsey, D., Pham, H., & Chang, J. (2011). Flexor tendon tissue engineering: acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 17(8), 819–28. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0457>
- Raghavan, S. S., Woon, C. Y. L., Kraus, A., Megerle, K., Choi, M. S. S., Pridgen, B. C., ... Chang, J. (2012). Human flexor tendon tissue engineering: decellularization of human flexor tendons reduces immunogenicity in vivo. *Tissue Engineering. Part A*, 18(7–8), 796–805. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0422>
- Rodeo, S. A. Biologic augmentation of rotator cuff tendon repair. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons ... [et Al.]*, 16(5 Suppl), S191–7. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2007.03.012>

- Schmitt, T., Fox, P. M., Woon, C. Y., Farnebo, S. J., Bronstein, J. A., Behn, A., ... Chang, J. (2013). Human flexor tendon tissue engineering: in vivo effects of stem cell reseeded. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 132(4), 567e–576e. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3182a033cf>
- Stone, K. R. (2002, June 11). Anterior cruciate ligament xenografts. Google Patents. Retrieved from <http://www.google.com.na/patents/US6402783>
- Stone, K. R., Abdel-Motal, U. M., Walgenbach, A. W., Turek, T. J., & Galili, U. (2007). Replacement of human anterior cruciate ligaments with pig ligaments: a model for anti-non-gal antibody response in long-term xenotransplantation. *Transplantation*, 83(2), 211–9. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000250598.29377.13>
- Stone, K. R., Walgenbach, A. W., Turek, T. J., Somers, D. L., Wicomb, W., & Galili, U. (2007). Anterior cruciate ligament reconstruction with a porcine xenograft: a serologic, histologic, and biomechanical study in primates. *Arthroscopy : The Journal of Arthroscopic & Related Surgery : Official Publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, 23(4), 411–9. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2006.12.024>
- Subramanian, A., & Schilling, T. F. (2015). Tendon development and musculoskeletal assembly: emerging roles for the extracellular matrix. *Development*, 142(24), 4191–4204. <https://doi.org/10.1242/dev.114777>
- Suhodolčan, L., Brojan, M., Kosel, F., Drobnič, M., Alibegović, A., & Brecelj, J. (2013). Cryopreservation with glycerol improves the in vitro biomechanical characteristics of human patellar tendon allografts. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy : Official Journal of the ESSKA*, 21(5), 1218–25. <https://doi.org/10.1007/s00167-012-1954-1>
- Thomopoulos, S., Genin, G. M., & Galatz, L. M. (2010). The development and morphogenesis of the tendon-to-bone insertion - what development can teach us about healing -. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 10(1), 35–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3605736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Valencia Mora, M., Ruiz Ibán, M. A., Díaz Heredia, J., Barco Laakso, R., Cuéllar, R., & García Arranz, M. (2015). Stem cell therapy in the management of shoulder rotator cuff disorders. *World Journal of Stem Cells*, 7(4), 691–9. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i4.691>
- Vavken, P., Joshi, S., & Murray, M. M. (2009). TRITON-X is most effective among three decellularization agents for ACL tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 27(12), 1612–8.

<https://doi.org/10.1002/jor.20932>

- Whitlock, P. W., Smith, T. L., Poehling, G. G., Shilt, J. S., & Van Dyke, M. (2007a). A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials*, *28*(29), 4321–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.029>
- Whitlock, P. W., Smith, T. L., Poehling, G. G., Shilt, J. S., & Van Dyke, M. (2007b). A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials*, *28*(29), 4321–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.029>
- Whitlock, P. W., Smith, T. L., Poehling, G. G., Shilt, J. S., & Van Dyke, M. (2007c). A naturally derived, cytocompatible, and architecturally optimized scaffold for tendon and ligament regeneration. *Biomaterials*, *28*(29), 4321–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.029>
- Wingenfeld, C., Egli, R. J., Hempfing, A., Ganz, R., & Leunig, M. (2002). Cryopreservation of osteochondral allografts: dimethyl sulfoxide promotes angiogenesis and immune tolerance in mice. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, *84*–A(8), 1420–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12177273>
- Woon, C. Y. L., Pridgen, B. C., Kraus, A., Bari, S., Pham, H., & Chang, J. (2011a). Optimization of human tendon tissue engineering: peracetic acid oxidation for enhanced reseeding of acellularized intrasynovial tendon. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *127*(3), 1107–17. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318205f298>
- Woon, C. Y. L., Pridgen, B. C., Kraus, A., Bari, S., Pham, H., & Chang, J. (2011b). Optimization of human tendon tissue engineering: peracetic acid oxidation for enhanced reseeding of acellularized intrasynovial tendon. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *127*(3), 1107–17. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318205f298>
- Xing, S., Liu, C., Xu, B., Chen, J., Yin, D., & Zhang, C. (2014). Effects of various decellularization methods on histological and biomechanical properties of rabbit tendons. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *8*(2), 628–634. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1742>
- Yoshida, R., Vavken, P., & Murray, M. M. (2012). Decellularization of bovine anterior cruciate ligament tissues minimizes immunogenic reactions to alpha-gal epitopes by human peripheral blood mononuclear cells. *The Knee*, *19*(5), 672–5. <https://doi.org/10.1016/j.knee.2011.08.002>
- Zaffagnini, S., Grassi, A., Marcheggiani Muccioli, G. M., Roberti Di Sarsina, T., Raggi, F., Benzi, A., & Marcacci, M. (2015). Anterior cruciate ligament reconstruction with a novel porcine xenograft: the initial Italian experience. *Joints*, *3*(2), 85–90.

<https://doi.org/10.11138/jts/2015.3.2.085>

9. Anexo de Técnicas histológicas

Tinción hematoxilina y eosina

Procedimiento

Fijación por parafina o por congelación:

- 1.- Desparafinar con xilol 5 min.
- 2.- Etanol-Xilol 5 min.
- 3.- Etanol absoluto 2 min.
- 4.- Alcohol etílico 96° 2 min.
- 5.- Agua destilada, enjuague lento.
- 6.- Hematoxilina de Gill, 2 min.
- 7.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 8.- Alcohol Ácido, 1 inmersión rápida.
- 9.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 10.- Agua amoniacal 2 inmersiones rápidas.
- 11.- Agua de la llave (2 lavados), enjuague lento.
- 12.- Agua destilada, enjuague lento.
- 13.- Eosina 6 inmersiones.
- 14.- Alcohol etílico 96° enjuague breve.
- 15.- Alcohol etílico 96° 1 min.
- 16.- Etanol absoluto (2 cambios) 2 min.
- 17.- Etanol-Xilol 3 min.
- 18.- Xilol 2 min.
- 19.- Xilol 3 min.

20.- Montaje con resina sintética o Entellan.

Preparación de soluciones:

Solución de Agua Amoniaca (Virador).

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL

Eosina solución stock (concentrada)

Eosina amarillenta	1.0 gr
Agua destilada	20 mL
Alcohol del 96°	80 mL

Solución de trabajo:

*Tomar una parte de la solución stock y agregarla en tres partes de alcohol de 80 °C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

Solución de Alcohol-Ácido (Diferenciador o decolorante)

Alcohol de 70°	99 mL
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL

Hematoxilina de Gill

Agua destilada	730 ml
Etilenglicol	250 ml
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 gr
* Si está en cristales pesar	2.36 gr
Yodato de Sodio	0.2 gr

Sulfato de aluminio	17.6 gr
Ácido acético glacial	2.0 ml

* Para la preparación se debe seguir el orden, en agitación, a temperatura ambiente por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

Resultados:

Citoplasma, tejido fibroso, otros componentes tisulares: Rosa pálido a rosa intenso, anaranjado o en tonos rojizos.

Núcleos: Azul a morado oscuro

Método de Verhoeff y Tricrómico de Van Gieson (Fibras Elásticas y Tejido conectivo y muscular)

Combinación Verhoeff-Van Gieson (tetracrómico)

Procedimiento

1. Lavar con alcohol al 96 ° en el método de Verhoeff
2. Introducir los cortes en la solución de Van Gieson por 5 min.
3. Escurrir y deshidratar rápidamente en alcoholes graduales a partir de alcohol 96 ° (10 inmersiones rápidas, se decolora)
4. Montar con resina.

Método de Verhoeff

Procedimiento

1. Desparafinar y llevar los cortes hasta agua destilada.
2. Introducir los cortes en la solución de Verhoeff de 15-30 min.
3. Lavar en agua corriente.

4. Diferenciar en la solución acuosa de cloruro férrico al 2 % por 1-2 min, o hasta que las fibras aparezcan en color negro sobre un fondo grisáceo pero muy pálido.
5. Enjuagar en agua destilada.
6. Lavar en alcohol de 96º 1 min para remover cualquier coloración debida a residuos de iodo.
7. Contrastar con eosina (6 inmersiones), o con solución de Van Gieson.
8. Escurrir y lavar en alcohol 96 º para remover el exceso de coloración.
9. Deshidratar rápidamente en alcoholes graduales y montar con resina.

Preparación de soluciones

a. Hematoxilina Alcohólica 5%

Hematoxilina	5 gr
Alcohol absoluto	100 ml

b. Cloruro Férrico 10 %

Cloruro férrico	10 gr
Agua destilada	100 ml

c. Solución Ioduro de Lugol

Iodo	1 gr
Ioduro de potasio	2 gr
Agua destilada	100 ml

Solución de Verhoeff

Solución a.	20 ml
Solución. b.	8 ml

Solución. c. 8 ml

*Adicionar las soluciones en el orden citado y mezclar bien en cada adición

Tricómico de van Gieson

Procedimiento

1. Desparafinar y llevar los cortes hasta agua destilada.
2. Teñir con la solución diaria de hematoxilina de Weigert durante 10 min.
3. Lavar en agua destilada.
4. Teñir con la solución de Van Gieson de 3- 5 minutos
5. Deshidratar rápidamente en alcoholes graduales (10 inmersiones rápidas, se decolora)
6. Montar con resina.

Preparación de soluciones

Solución de Van Gieson

Solución acuosa de ácido pícrico 1.2 %	47.5 ml
Solución acuosa de fucsina ácida 1 %	2.5 ml

Tricómico de Masson

Procedimiento

Fijación en Formaldehído al 4 %

Inclusión en parafina y cortes de 4-5 μm de espesor.

1. Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol y agua destilada.

2. Usar como “mordente” el fijador de Bouin por 30-60 minutos a 56°C, o toda la noche a temperatura ambiente.
3. Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
4. Enjuagar los cortes en agua destilada.
5. Pasar los cortes a la hematoxilina Férrica de Weigert durante 10 min.
6. Lavar en agua corriente 5 minutos o hacer 3 cambios de 15 segundos
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Teñir con la solución de Fucsina-Escarlata por 5 segundos (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
9. Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
10. Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 minutos
11. Enjuagar brevemente con agua destilada.
12. Colorear con la solución de Azul de Anilina durante 15 segundos (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
13. Lavar con agua destilada varias veces hasta eliminar el exceso del colorante.
14. Pasar al acético acuoso por 1-2 minutos.
15. Deshidratar en alcohol de 96° por unos segundos (cuidar que no se decolore).
16. Continuar con el alcohol absoluto hasta aclarar en xilol y montar en resina.

Preparación de soluciones

Hematoxilina férrica de Weigert

Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 gr
Alcohol de 96º	100 ml

Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 ml
Agua destilada	95 ml
Ácido clorhídrico concentrado	1 ml

Solución de trabajo

*Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y de consistencia, con el tiempo suele precipitarse).

Solución acuosa de Cloruro Férrico

Cloruro férrico	14.5 gr
Agua destilada	50 ml

Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich

Escarlata de Biebrich acuosa al 1 %	90 ml
Fucsina ácida acuosa al 1 %	10 ml
Ácido acético glacial	1 ml

Solución acuosa de escarlata de Biebrich

Escarlata de Biebrich	1 gr
Agua destilada	100 ml

Solución acuosa de Fucsina ácida

Fucsina ácida	1 gr
---------------	------

Agua destilada	100 ml
----------------	--------

Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico

Ácido Fosfomolibdico	5 gr
----------------------	------

Ácido Fosfotúngstico	5 gr
----------------------	------

Agua destilada	200 ml
----------------	--------

Solución de azul de anilina

Azul de anilina	2.5 gr
-----------------	--------

Agua destilada	100 ml
----------------	--------

Ácido acético glacial	2 ml
-----------------------	------

Solución acuosa de ácido acético al 1%.

Ácido acético glacial	1 ml
-----------------------	------

Agua destilada	99 ml
----------------	-------

Solución fijadora de Bouin

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL
---	-------

Formaldehído (36-38 %)	25 mL
------------------------	-------

Ácido acético glacial	5 mL
-----------------------	------

Resultados esperados

Citoplasma, queratina y fibras musculares: Tonos de rojo

Núcleos: Café oscuro a negro

Fibras de colágena y mucus: Azul oscuro y claro