UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

INSTITUTO DE CIENCIAS CLÍNICAS VETERINARIAS

ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE HUESO ESPONJOSO PORCINO INORGÁNICO IMPLANTADO EN TEJIDO SUBCUTÁNEO DE RATONES (*Mus musculus*)

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO.

VIVIANA LORENA NANNIG JEREZ

VALDIVIA – CHILE

2007

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Leonel Cardona Rodríguez Firma

PROFESORCOPATROCINANTE

Dr. Gabriel Morán Ruz Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dra. Sara Rodríguez Firma

Dr. Jorge Ulloa Firma

FECHA DE APROBACIÓN: Enero 2 de 2008

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSIÓN	27
7. BIBLIOGRAFÍA	32
8. ANEXOS	39
9. AGRADECIMIENTOS	42

1. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar y evaluar mediante histopatología el tipo de respuesta inflamatoria en ratones producida por un xenoinjerto de tejido esponjoso porcino a nivel subcutáneo y evaluar la efectividad de la técnica de desmineralización y desnaturalización proteica utilizada.

El tejido óseo esponjoso porcino se colectó de huesos largos, preferentemente fémur y húmero de cerdos adultos comerciales. Las muestras de tejido óseo esponjoso fueron sometidas a un proceso de desmineralización mediante inmersión en una solución de Hidróxido de Sodio al 1% con Buffer Fosfato Salino 1x más Peróxido de Hidrógeno al 1%. Posteriormente se realizó el proceso de desproteinización mediante inmersión en una solución de Ácido Clorhídrico. Se utilizaron 62 ratones *(Mus musculus,* cepa Rockefeler*)* sin distinción de sexo, los cuales fueron divididos en forma aleatoria en 5 grupos: un grupo Control Sano de 4 animales al cual no se le realizó ningún procedimiento, un grupo Incisión de 16 animales a los cuales solo se les realizó una incisión cutánea en la zona cervical dorsal, un grupo Cuerpo Extraño de 16 animales a los cuales se les implantó una serie de pequeños trozos de set de infusión intravenoso plástico estéril, un grupo Xenoinjerto de 18 animales a los cuales se le injertó tejido esponjoso porcino inorgánico y otro grupo Xenoinjerto de 8 animales a los cuales se les injertó tejido esponjoso porcino natural. En todos los grupos los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Nembutal) y posteriormente se les realizó una incisión en la zona cervical dorsal de 1 cm de longitud hasta llegar a tejido subcutáneo. Luego de la incisión se procedió a injertar el material correspondiente. Los animales fueron eutanasiados en grupos con una sobredosis de Nembutal. Los días 10 y 20 se sacrificaron animales de los grupos Incisión y Cuerpo extraño. Los días 10, 20 y 30 se sacrificaron los animales del grupo Xenoinjerto y el día 10 se sacrificaron los animales del grupo Control y Xenoinjerto sin desproteinizar ni desmineralizar. De todos los animales en estudio se obtuvieron muestras para histología que fueron teñidas con Hematoxilina Eosina para su posterior análisis.

Los hallazgos histológicos encontrados revelan que el grupo Incisión presentó una típica respuesta inflamatoria, el grupo Cuerpo Extraño presentó una reacción inflamatoria granulomatosa con infiltrado de células gigantes multinucleadas y el grupo Xenoinjerto sin desproteinizar ni desmineralizar generó una severa respuesta inflamatoria con necrosis, hemorragia y pérdida de la histoarquitectura normal. El grupo Xenoinjerto presentó una reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño al ser injertado subcutáneamente en ratones, la cual se ve que disminuida en relación directa con el tiempo. Además la técnica de desmineralización y desnaturalización proteica utilizada fue efectiva, ya que se logró eliminar el material inmunogénico presente en el tejido esponjoso porcino, no generando éste una respuesta inmunomediada en el organismo receptor.

Palabra clave: xenoinjerto, tejido esponjoso, análisis histológico.

2. SUMMARY

The objective of this study was to identify and assess by histopathology the type of inflammatory response caused by a xenograft of pig cancellous bone tissue implanted in the subcutaneous tissue of mice at different periods of time.

The cancellous bone tissue was collected from long bones, preferably femur and humerus of commercial slaughtered pigs. The tissue samples were submitted to a demineralization process by immersion in a solution of 1% sodium hydroxide, Phosphate Buffer Saline 1x and 1% hydrogen peroxide and right after that, to a desproteinization process through an immersion in a hydrochloric acid solution. 62 mice were used (Mus musculus, strain Rockefeler) irrespective of sex; which were divided randomly into 5 groups: a control group of 4 healthy animals without any kind of treatment, a group of 16 animals called Incision, to which an incision on the skin of the cervical dorsal area was made, a group of 16 animals called foreign object to which a series of small pieces of plastic intravenous infusion sterile set were grafted, a group of 18 animals called Xenograft which were grafted with the cancellous inorganic pig bone tissue and a group of 8 animals called Untreated Xenograft which were grafted with natural (untreated) cancellous pig bone tissue. All the animals were anesthetized with sodium pentobarbital, later a 1 cm incision was performed on the dorsal cervical area all the way to the subcutaneous tissue, were the grafts were placed. The animals were euthanized within the different groups with an overdose of Nembutal. Days 10 and 20 were euthanized animals of the incision and foreign object group. Days 10, 20 and 30 animals from the Xenograft group and on day 10 animals from the control and Untreated Xenograft groups. Samples from all animals were taken for histology stained with Hematoxylin and Eosin for subsequent analysis.

The histological findings revealed that the incision group showed an incisional inflammatory response, the foreign object group presented a granulomatus inflammatory response with giant multinucleated cells infiltration and the untreated xenografted group presented a severe inflammatory response with necrosis, haemorrhage, and loss of normal histo architecture. The xenograft group presented an inflammatory response similar to the one generated by a foreign object when grafted subcutaneously in mice, which diminishes in direct relation with time. The demineralization and denaturating techniques used were effective, because all the immunogenic material contained in the cancellous bone pig tissue was successfully eliminated, not generating this a immunomediated response in the organism of the recipient.

Keyword: xenograft, cancelous bone tissue, histological analysis.

3. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo, principal componente del esqueleto, tiene la función de proteger y apoyar los órganos vitales debido a su firmeza y resistencia. La capacidad de regeneración se relaciona con la habilidad de los factores de crecimiento de dirigir a las células blanco hacia la condrogénesis y osteogénesis (Finkemeyer 2002, Walsh y col 2006). Dentro de éste proceso juegan un rol importante las fuerzas mecánicas que estimulan la remodelación ósea. Sin embargo, cuando el defecto óseo por su extensión no es capaz de reparar en forma espontánea, es necesario recurrir a la técnica de los implantes biológicos para aumentar la eficiencia en el tratamiento y mejorar el pronóstico (Piña y col 2006). La obtención de tejidos es a partir de fuentes donantes, como son, el mismo individuo o individuos de la misma o diferente especie (Carneiro y col 2005, Piña y col 2006).

El tratamiento mediante transplantes presenta hoy un problema cada vez mayor, debido a la escasez de tejidos y órganos donantes. Desafortunadamente, es probable que tal escasez continúe creciendo a pesar de los grandes esfuerzos por obtener tejidos y órganos (De Long y col 2007). Sin embargo, si se pudiera transplantar órganos y tejidos de una especie animal a otra disminuyendo el rechazo inmunológico, sería posible solucionar en parte los problemas atribuibles a los procesos de transplante (Kemp 1996). Los injertos frescos han sido clínicamente insatisfactorios debido a la respuesta inmune que generan, la cual puede causar un numero alto de fracasos en estos implantes y a la lentitud de su incorporación. Esto ha determinado el uso de injertos preservados para disminuir la antigenicidad y para mejorar la incorporación (Piña y col 2006).

3.1. TIPOS DE INJERTO

Los adelantos en las técnicas quirúrgicas han permitido desplazar muchos tejidos y órganos entre partes distintas del cuerpo de un mismo individuo o entre diferentes especies (Gallie 2007).

Cuando se cambia de sitio un tejido en el cuerpo del mismo individuo, no desencadena una reacción inmunitaria, denominándose autoinjerto. Los isoinjertos son tejidos que se transplantan entre individuos genéticamente idénticos. Los aloinjertos son injertos que se transplantan entre miembros genéticamente diferentes de la misma especie (Stevenson 1999, Carneiro y col 2005). Ya que las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y las de los grupos sanguíneos del aloinjerto son diferentes de las del huésped, los aloinjertos inducen una reacción inmunitaria intensa que producirá el rechazo del injerto. Este proceso debe suprimirse para que el tejido transplantado sobreviva (Kim y col 2004). Los xenoinjertos son tejidos que se transplantan entre individuos de diferentes especies. Los tejidos que así se transplantan tienen características bioquímicas e inmunitarias diferentes a las del huésped. En consecuencia, originan una reacción inmunitaria rápida e intensa, difícil de suprimir (Tizard 1998).

3.2. HISTORIA

Los primeros reportes de transplantes se refieren a experimentos realizados utilizando alotransplantes en el año 600 A.C. Los primeros xenotransplantes fueron hechos con células y tejidos (sangre, hueso, piel, testículo, etc.); los de órganos se utilizaron posteriormente, ya que no existían técnicas disponibles para controlar la hemorragia después de la resección del órgano enfermo ni para restaurar la circulación después del trasplante (Gallie 2007).

Wayne en 1997 reportó que no ha existido una supervivencia a largo plazo de ningún injerto xenogénico. Sin embargo se ha probado que un órgano animal puede sobrevivir y funcionar dentro de un organismo humano. La mejor demostración fue realizada por Reemtsma en 1963 quién tuvo éxito manteniendo vivo por 9 meses a un paciente trasplantado con los riñones de un chimpancé. En otro experimento, Bailey en 1984 mantuvo viva a un bebé por 20 días después de realizarle un xenotransplante de corazón de babuino, demostrando al mundo las perspectivas ofrecidas por el xenotransplante. Debido a un mayor control del rechazo, los nuevos ensayos clínicos de xenotransplantes conducen, no a órganos, sino a tejidos o células (Kim y col 2004).

Aunque la xenotransplantación tiene una larga historia, los estudios de la era moderna acerca de la biología del xenoinjerto y especialmente el rechazo de éste se pueden dividir básicamente en fase transgénica y pretransgénica (Kim y col 2004). Esta división es posible ya que la opción de dirigir un xenoinjerto a disminuir su inmunogenicidad, aumentar su supervivencia y funcionalidad produce importantes consecuencias (Steele y Auchincloss 1995, Van Oberdam y col 2000).

3.3. INJERTOS ÓSEOS

El tejido óseo presenta una característica única, que es la de reparar sus soluciones de continuidad con un tejido igual al original, es decir, es capaz de regenerar (Kim y col 2004, Piña y col 2006), lo que ha llevado a intentar transplantar el hueso a las extremidades que sufren patologías osteoarticulares debidas a problemas genéticos, fracturas, presencia de tumores o inflamaciones crónicas (Piña y col 2006, De Long y col 2007).

La incorporación de los injertos de hueso desencadena un proceso de inflamación, seguida por la revascularización, osteogénesis y remodelación, terminando en una estructura mecánicamente eficiente (Piña y col 2006, Walsh y col 2006).

El injerto óseo autólogo ha sido utilizado en el tratamiento de problemas ortopédicos como defectos óseos, no uniones, unión retardada y fusión espinal. Sus limitaciones son significativas; incluyendo insuficiente suministro, un procedimiento quirúrgico adicional y dolor post quirúrgico asociado al sitio donante del tejido (Tizard 1998). El autoinjerto se considera el material de injerto inicial y puede ser utilizado como estándar para comparar otros materiales. Los autoinjertos de esponjosa promueven una reparación rápida por medio de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Finkemeyer 2002). La osteogénesis del injerto radica en la supervivencia de las células dispensadoras y de su réplica dentro del receptor (De Long y col 2007). El autoinjerto es

limitado por la cantidad de hueso que se necesita retirar, aumentando el riesgo de infección, mediante la generación de una herida de gran tamaño, hematomas y grandes cicatrices en el segundo sitio quirúrgico (Soin y col 2000, Zambuzzi y col 2005). Para minimizar esto, se han desarrollado aloinjertos y (Kim y col 2004). No debe ser tóxico y no debe producir reacciones inmunológicas. Debe también ser totalmente integrado en el sitio receptor y no debe ser encapsulado por tejido conectivo (Soin y col 2000, Donos y col 2004, Worth y col 2005).

3.3.1. Xenoinjertos

Si el material de los implantes se obtiene de individuos de una especie diferente a la receptora, se les conoce como implantes xenogénicos o xenoimplantes (Wayne 1997). Últimamente, se ha discutido en forma extensa la generación de un nuevo campo interdisciplinario: la ingeniería del tejido, que tiene como objetivo el desarrollo de substitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de diversos tejidos (De Long y col 2007). Por consiguiente, los injertos óseos se investigan actualmente en un intento por encontrar un material biológico seguro y eficiente (Carneiro y col 2005). Actualmente, la investigación de los biomateriales se debe focalizar en la regeneración de los tejidos en vez de su reemplazo (Zambuzzi y col 2005).

El desarrollo de nuevos biomateriales xenogénicos, como hueso bovino, el cual se comporta como promotor de la reparación y portador de los factores de la inducción del hueso, parece representar el futuro de la reconstrucción de los defectos óseos; sin embargo, ha habido una constante preocupación con la presentación de estos biomateriales en cuanto a su forma y tamaño (Kim y col 2004). El papel de portadores de los factores de la inducción del hueso puede ser potencialmente desempeñado por el hueso esponjoso o cortical bovino, macro o microgranular, desproteinizado o desmineralizado, según se ha demostrado ya en estudios clínicos. Además de proveer una estructura de soporte y osteoconductibilidad, también proporciona un alto contenido de calcio y fósforo, esencial para la nueva formación del hueso (De Long y col 2007). Sin embargo, el papel real del tamaño de estos materiales en relación a la respuesta celular del receptor es todavía muy polémico (Martín y col 2001, Xu y col 2003, Carneiro y col 2005, Worth y col 2005.

3.3.2. Hueso esponjoso

El hueso esponjoso, se puede definir como tejido óseo trabeculado o reticulado ubicado en la epífisis de huesos largos y en huesos planos. En la parte interna del tejido esponjoso, entre las trabéculas óseas, se encuentra la médula ósea. La orientación de cada trabécula y la disposición de sus laminillas óseas está determinada por las tensiones mecánicas locales con el objeto de resistir las compresiones y las tensiones a que es sometida (Koch y col 2001, Xu y col 2003).

Los injertos de hueso esponjoso son de mucha ayuda, ya que promueven la osteoconducción y osteoinducción, facilitando y acelerando la cicatrización, ya que cuentan con todas la características esenciales de un material de implante como resistencia mecánica y osteoblastos vivos (Kim y col 2004).

En injertos de esponjosa la respuesta vascular es mucho mas rápida que en el caso de injertos de cortical. La “cama” esponjosa completa puede ser revascularizada en

aproximadamente 1 o 2 semanas, la población celular de este ambiente se compone principalmente de osteoblastos. No se sabe si estas células se producen a partir del sitio receptor o si provienen de células transplantadas con el injerto (Worth y col 2005, Abbott y col 2007). En injertos de cortical la principal diferencia radica en la cantidad y tiempo de revascularización y su remodelación. La revascularización toma aproximadamente 2 meses y es causada por la estructura del injerto cortical, que no permite un área de contacto suficiente para la penetración vascular entre el injerto y el receptor. La revascularización se logra a través de los viejos canales haversianos y de Volkmann (Abbott y col 2007).

Osteoinducción es definida como la capacidad de inducir dinámicamente la formación de nuevo hueso en el tejido del receptor a través de la estimulación de las células residentes para producir una matriz apropiada mediante la presencia de diversos factores de crecimiento, proteínas, citoquinas, enzimas y componentes de matriz. (Zambuzzi y col 2005). Osteoconducción es el proceso pasivo por el cual el injerto sirve como un andamio o plantilla sobre los cuales los tubos capilares, las células del osteoprogenitor y los componentes de la matriz el tejido del anfitrión pueden crecer (Fitch y col 1997, Tizard 1998, Kim y col 2004). Osteogénesis es la producción de nuevo hueso a partir de elementos celulares dentro del injerto que sobreviven al procedimiento del trasplante, que no representa más de un 10% (Dasso y col 1998, Stevenson 1999). La ventaja principal del uso de los injertos de esponjosa es la rápida regeneración ósea, aproximadamente 4 semanas (Xu y col 2003).

Entre los injertos de hueso esponjoso, el mejor es el autólogo, es decir, el hueso que proviene del mismo individuo al cual se le aplica, pues se reduce el riesgo de rechazo, aumentando las posibilidades de curación (Zambuzzi y col 2005). Hasta ahora, el injerto autólogo es considerado el material por excelencia y puede ser usado como el estándar con el cual se comparan los otros materiales que se emplean con los mismos fines (Dasso 1998). Sin embargo, como ya se dijo anteriormente, tiene la desventaja de implicar una doble cirugía para el paciente con todos los riesgos que esto conlleva como son: mayor dolor, pérdida de sangre, riesgos de infección, trombosis y fractura del hueso de donde se toma el injerto y además está la limitante de la disponibilidad de éste tejido, ya que se puede requerir mucho más de lo que se pueda obtener (Carneiro y col 2005).

El hueso esponjoso al que se le ha retirado toda la materia orgánica quedando únicamente conformado por la matriz ósea se conoce como hueso inorgánico o desproteinizado y ha resultado ser útil en el campo de los implantes xenogénicos (Dasso y col 1998). Por no contener material orgánico, estar formado de hidroxiapatita (HA) y tener una estructura porosa adecuada cumple con los requisitos de ser biocompatible. La matriz ósea o hueso inorgánico presenta cohesividad, fuerza estructural alta y su disponibilidad en cantidad es elevada (Kujala y col 2004, Piña y col 2006).

El comportamiento mecánico del hueso esponjoso es afectado fuertemente por su microestructura, y además, asume una serie de formas, desde una delicada red tridimensional hasta una densa estructura de placas cuya arquitectura es dependiente de su ubicación en el hueso (Worth y col 2005).Las dimensiones de los elementos estructurales de esta red y la manera en que están conectados tienen un profundo efecto en las características mecánicas (Carneiro y col 2005).

3.4. REACCIÓN DEL RECEPTOR FRENTE AL INJERTO

Los factores que afectan inmunogenicidad (propiedad de inducir una respuesta inmune) de una molécula son la similitud con moléculas propias, ya que una de las características básicas del sistema inmune es reconocer lo propio, desconocer lo extraño y reaccionar frente a esto (Davis y col 2003), por lo tanto, la inmunogenicidad de una molécula es mayor al ser más diferente a lo reconocido como propio; por otro lado la inmunogenicidad de una molécula aumenta a medida que aumenta su peso molecular (Tizard 1998). La naturaleza química de una molécula también afecta su inmunogenicidad, así la estructura que mayor inmunogenicidad genera es la de las proteínas y sus combinaciónes ya que poseen muchos epítopes de diferentes especificidades (Miller 1999). La vía de inoculación de un antígeno (Ag) es uno de los factores que en mayor medida afecta la inmunogenicidad, el órgano linfoide que primero sea impactado afecta la calidad de la respuesta inmune, por ejemplo la inoculación vía endovenosa el Ag impacta primero al bazo y en este caso la respuesta generada no es tan intensa como la inoculación subcutánea donde el Ag va a impactar directamente los ganglios linfáticos regionales (Roos y Daha 2002 ,Welniak y col 2007).

Un individuo receptor puede generar diferentes tipos de rechazo frente a un injerto, lo que depende directamente del tipo de injerto. En el caso de los xenoinjertos, al ser el receptor y donador de especies diferentes, por lo general se produce un rechazo hiperagudo dentro de las primeras horas posterior al injerto (Tizard 1998, Tantravahi y col 2007). Éste rechazo está mediado por anticuerpos y linfocitos T (Tizard 1998) y es irreversible (Miller 1999). Inmediatamente posterior a la injertación de un tejido xenogénico se produce la sensibilización del receptor por parte de los linfocitos T en caso de tratarse de un receptor no inmunizado previamente, y por anticuerpos en caso de ser un receptor previamente inmunizado (Roos y Daha 2002, Davis y col 2003) y posteriormente se produce la destrucción del xenoinjerto por parte de los linfocitos T CD4, linfocitos T CD8 y moléculas del CMH clase I y clase II. Los genes de CMH determinan cuales antígenos se presentan y transforman, por lo tanto representa el principal componente genético de la resistencia o susceptibilidad (Tizard 1998, Van Oberdam y col 2000, Roos y Daha 2002, Welniak y col 2007).

Los aloinjertos y xenoinjertos óseos pueden generar respuestas inmunes en el receptor que van a interferir con la nueva formación de hueso (osteoinducción) alrededor de los implantes (Kim y col 2004). Sin embargo, el uso de implantes óseos procesados en vez del material fresco, puede reducir al mínimo la respuesta inmune del anfitrión (Wayne 1997). Diversos métodos de depleción del antígeno en osteoimplantes alogénicos y xenogénicos han sido utilizados para disminuir la respuesta inmune del receptor, mientras que se mantienen las características osteogénicas del implante (Tizard 1998, Goldstein 2006, Walsh y col 2006).La inmunogenicidad del hueso reside principalmente en los componentes en fresco de la médula ósea (Wayne 1997, Bracy y col 1999, Walsh y col 2006).

Ha sido demostrado que el rechazo retardado de un xenoinjerto involucra a un infiltrado de macrófagos y células Natural Killers independiente de linfocitos T, pero en asociación con una marcado expresión de citoquinas (Tizard 1998, Van Oberdam 2000, Roos y Daha 2002 ,Welniak y col 2007).

3.5. TEJIDO PORCINO COMO BIOMATERIAL

Aunque la mayoría de los xenoinjertos clínicos exitosos han sido realizados de primates no humanos a humanos, actualmente, el cerdo se ve como la fuente más probable de obtención de órganos y tejidos para xenotransplantes a futuro (Yamada y col 2005). Desde un punto de vista poligenético, los primates no humanos serían la mejor opción ya que se les considera concordantes con los seres humanos. Sin embargo, los chimpancés y simios son los únicos primates no humanos del tamaño adecuado para proporcionar un órgano a un ser humano adulto y al estar en peligro de extinción no son una fuente potencial de órganos o tejidos (Auchincloss y Sachs 1998, Bach 1998, Platt y Lin 1998, Yamada y col 2005), además que el peligro de transmisión de enfermedades es mayor entre especies relacionadas que entre especies discordantes, así, la mayoría de los expertos en la materia creen que una especie discorde, particularmente, el cerdo, será el donante más conveniente para xenoinjerto (Kemp 1996, Kim y col 2004).Los cerdos tienen muchas características que los hacen una fuente favorable para xenoinjertos. Poseen características de crianza favorables, ya que tiene muchas crías por camada, alcanzan madurez sexual y edad adulta relativamente rápido. Ya que los cerdos son más distantes en relación a los primates no humanos, se cree que la transmisión de enfermedades hacia los seres humanos es baja (Seebach y col 2001, Yamada y col 2005).

Otras razones de favorecer el cerdo como fuente de tejidos y órganos para el trasplante incluyen: la disponibilidad, la facilidad con la cual el cerdo puede ser criado, el riesgo limitado de que se produzca una enfermedad zoonótica por el uso de cerdos como fuente de tejidos y órganos y la posibilidad de introducir nuevos genes en la línea porcina (Kim y col 2004). De hecho, la ingeniería genética porcina a través de técnicas transgénicas y el uso de éstos tejidos y órganos como injertos tienen evidentes ventajas sobre la terapia convencional (Apgar y col 1998, Platt y Lin 1998, Seebach y col 2001).

3.6. DESARROLLO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Los organismos complejos poseen tres líneas de defensa contra injurias externas y patógenos invasores. La primera de ellas es la barrera creada por la piel intacta y las membranas mucosas. El segundo nivel de protección es la respuesta inmune innata y su mayor efecto producido es la inflamación. La tercera línea de defensa corresponde a la inmunidad adquirida, la cuál también puede producir una respuesta inflamatoria con el fin de destruir al inmunógeno extraño (Tizard 1998, Cone 2001). La epitelización se define como el proceso por el cual las células de la epidermis ubicadas al borde de una lesión, proliferan y emigran con el fin de cubrir la superficie del defecto cutáneo(Cone 2001). La angiogénesis es la proliferación y crecimiento directo del endotelio capilar (Block y Poser 1995).

La inflamación es la respuesta del organismo a la irritación o lesión y puede considerarse un proceso por el cual los mecanismos protectores de tipo inmunitario se orientan y enfocan a una región hística determinada (Tizard 1998, Harrison 1991).

El papel de la respuesta inflamatoria, sea parte de la inmunidad innata o adquirida, es la destrucción y eliminación del agente extraño (Cone 2001).

La inflamación según su duración se divide en aguda y crónica. La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos (Park y Barbul 2004). La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo (Apgar y col 1997,Tizard 1998).

La inflamación aguda presenta cambios que se producen tras la lesión tisular y estos se deben a tres procesos: cambios en el flujo y calibre vascular, que hacen que aumente el flujo sanguíneo; cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio, y el paso de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones. El resultado de todo ello es el acúmulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos (Block y Poser 1995, Tincani y col 2007). Las primeras células inmunes en llegar a la zona de lesión son los neutrófilos, los cuales aparecen aproximadamente 24 horas posteriores a la lesión y su rol primario es la fagocitosis (Razzaque y col 2005). El día 3 posterior a la lesión tisular, los neutrófilos ya han sido reemplazados casi en su totalidad por macrófagos. Estos predominan durante las 48 a 72 horas posterior a la lesión alrededor de la zona afectada. No solo actúan como células fagocitarias, sino que también producen una serie de factores implicados en la proliferación y diferenciación de la matriz celular para generar la estimulación de los fibroblastos a sintetizar proteínas de matriz (Trepels y col 2006). También poseen una función antimicrobiana a través de la producción de radicales libres como óxido nítrico. La mayor contribución de los macrófagos en la reparación de heridas, es la secreción de citoquinas y factores de crecimiento. Éstas citoquinas actúan de forma paracrina para activar y recluir otras células implicadas en el proceso de reparación, como más macrófagos y linfocitos. Las citoquinas y factores de crecimiento también regulan la quimiotáxis de fibroblastos, proliferación y síntesis de colágeno. A través de éstas funciones, los macrófagos influencian angiogénesis, proliferación de células endoteliales y fibroblastos y síntesis de colágeno (Dray 1995, Mantovani y col 2007).

Si la inflamación dura semanas o meses se considera crónica (Park y Barbul 2004) y tiene dos características importantes: el infiltrado celular está compuesto principalmente por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y la reacción inflamatoria es más productiva que exudativa, es decir, la formación de tejido fibroso prevalece sobre el exudado de líquidos (Cone 2001).

Las características histológicas de la inflamación crónica son la infiltración de células mononucleares como macrófagos y sus derivados (células epitelioides y gigantes), linfocitos y células plamáticas (Trepels y col 2006). También se produce una proliferación de fibroblastos y en algunos casos de angioblastos. Se incrementa el tejido conectivo y la destrucción tisular (Tizard 1998, Cone 2001). Sánchez y col (2004) definen a las células gigantes como una fusión de células epitelioides que poseen un gran número de núcleos y que se ubican en la periferia de los granulomas y a las células epitelioides como un macrófago evolucionado con un citoplasma más amplio, más retículo endoplásmico rugoso, más mitocondrias y un núcleo alargado.

Un tipo de inflamación crónica es la inflamación granulomatosa, la cuál tiene una histología peculiar que consiste en el acúmulo de macrófagos modificados llamados epitelioides formando unos agregados nodulares llamados granulomas (Trepels y col 2006). Las células epitelioides reciben ese nombre porque se asemejan a células epiteliales (Tizard 1998). Tienen un núcleo vesicular y abundante citoplasma eosinófilo, además, los macrófagos pueden fusionarse y formar células gigantes que contienen hasta 100 núcleos (Cone 2001). En los granulomas puede haber fenómenos alternativos como necrosis central, además se pueden presentar neoangiogénesis, proliferación focal de fibroblastos y formación de fibrillas de colágeno (Block y Poser 1995). Ademas, si la inflamación granulomatosa contiene neutrófilos, recibe el nombre de píogranuloma (Cone 2001).

En algunos granulomas se presentan células gigantes histiocitarias multinucleadas. El citoplasma y los núcleos presentan en general caracteres similares a los de los macrófagos (Muldahev y col 2005). Las células gigantes se forman según la concepción clásica, que prevalece por división sucesiva de núcleos, sin división del citoplasma (plasmodio). Algunos creen que se producen por fusión de macrófagos (representarían por tanto un sincicio). Las dos células gigantes más frecuentes son las de Langhans y las de reacción a cuerpo extraño (Tizard 1998, Cone 2001, Trepels y col 2006). En las de reacción a cuerpo extraño los núcleos se disponen irregularmente, suelen ser vesiculosos y presentar un nucléolo notorio, el citoplasma con frecuencia es ligeramente basófilo (Muldahev y col 2005). Estas células suelen verse en relación con partículas extrañas y signos evidentes de fagocitosis (Cone 2001).

Los granulomas se desarrollan alrededor de una partícula extraña pero no antigénica, donde se comienzan a reclutar macrófagos y células epitelioides, las cuales al liberar citocinas estimulan la formación de células gigantes (Muldashev y col 2005). Posteriormente los fibroblastos comenzarán a proliferar alrededor, puede existir un pequeño foco necrótico al centro del granuloma (Tizard 1998).

La necrosis es la muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar o curar como por ejemplo el aporte insuficiente de sangre al tejido o isquemia, un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, por la acción de sustancias químicas o tóxicos, por una infección, o por el desarrollo de una enfermedad autoinmune o de otro tipo. Una vez que se ha producido y desarrollado la necrosis, es irreversible (Banks 1995, Cotran y col 2000).

Los granulomas inmunes son causados por partículas percibidas como antigénicas y que son capaces de inducir una respuesta inmune de hipersensibilidad retardada (Muldashev y col 2005).

Todas las reacciones degenerativas, necróticas, inflamatorias e inmunitarias que afectan a los tejidos del organismo por el contacto de éste con un material extraño se presentan y observan de igual modo (Cotran y col 2000).

3.7. HIPÓTESIS

El injerto de hueso esponjoso desmineralizado y desproteinización de cerdo induce una respuesta inflamatoria al ser implantado en el tejido subcutáneo de ratones.

3.8. OBJETIVOS

3.8.1. General

Determinar la respuesta inflamatoria producida por un xenoinjerto porcino inorgánico en el tejido subcutáneo de ratones.

3.8.2. Específicos

3.8.2.1. Evaluar la eficacia de una técnica de desmineralización y desproteinización de un injerto de hueso esponjoso porcino.

3.8.2.2. Evaluar el tipo de respuesta inflamatoria producida por el xenoinjerto porcino inorgánico en el tejido subcutáneo de ratones en cada periodo de tiempo post injerto mediante histopatología.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo entre los meses de Junio y Agosto del año 2007, en las dependencias del Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile.

4.1 MATERIAL

4.1.1. Material Biológico

En este estudio se utilizaron 60 ratones *(Mus musculus,* cepa Rockefeler*)* de entre 36 y 40 gramos de peso, sin distinción de sexo, suministrados por el Instituto de Inmunología de la Universidad Austral del Chile, los cuales se encontraban clínicamente sanos.

Los injertos de tejido esponjoso porcino fueron colectados de huesos largos de cerdos comerciales con edades entre 8 y 10 meses y pesos entre 140 y 160 kilos, sin distinción de sexo.

4.1.2. Material Farmacológico

Tramadol[1]
Pentobarbital sódico[2]

4.1.3. Material Quirúrgico

4.1.3.1. Obtención de tejido esponjoso porcino	Hojas de bisturí nº 22 Pinza Ronger Pinza anatómica Tubos Falcon de 50 ml Guantes
4.1.3.2. Procedimiento quirúrgico	Mango de bisturí nº 4 Hojas de bisturí nº 22 Pinza anatómica Jeringas de tuberculina Algodón y Gasa Alcohol Povidona yodada Tijeras

[1] Laboratorio Biosano, Chile.
[2] Nembutal, laboratorio Merck, Alemania.

Porta agujas Mayo
Suturas 2-0 no absorbible
Guantes Estériles
Set de infusión intravenoso plástico

4.1.4. Material procesamiento tejido esponjoso

Na OH 1%
H_2O_2
HCl
PBS 1x
Pipetas 5 y 10 ml
Tubos Falcon 50 ml
Matráz 100 ml
Guantes
Centrífuga Daemon /IEC División
Campana de flujo laminar
Pipet-aid
Parafilm M
Tijeras
Placa Petri

4.1.5. Material permanencia de los ratones

Jaulas grupales
Pellet comercial
Recipiente para el agua
Viruta

4.1.6. Material para histología

Hematoxilina de Harris
Eosina
Formalina 10%
Alcohol etílico
Xilol
Parafina
Micrótomo
Hematoxilina de Weigert
Fucsina de Ponceau
Ácido fosfomolíbdico

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Injertos de tejido esponjoso porcino

El tejido esponjoso porcino se colectó de huesos largos, preferentemente fémur y húmero, de cerdos híbridos provenientes de predios locales de la Décima Región,

sacrificados con un peso aproximado de entre 140 y 160 kilos. Los huesos fueron obtenidos en expendios de carne de la ciudad de Valdivia y Osorno.

Los huesos largos se mantuvieron refrigerados en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Austral de Chile para realizar la extracción del tejido esponjoso, los cuales fueron seccionados en forma transversal con una sierra manual para facilitar el procedimiento. Con la ayuda de una hoja de bisturí número 22, una pinza de hueso Ronger y una pinza anatómica, se procedió a retirar el tejido esponjoso del hueso de manera aséptica. La muestra obtenida fue almacenada en tubos Falcon de 50 ml previamente esterilizados en autoclave.

Las muestras de tejido esponjoso porcino fueron sometidas a un proceso de desmineralización y desproteinización respectivamente en el laboratorio del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile. Para realizar la desmineralización, las muestras fueron sumergidas en una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 1% con buffer fosfato salino (PBS) 1x más Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1% en solución 1:1, a temperatura ambiente durante una hora.

Posteriormente la muestra fue centrifugada a 690 G durante 10 minutos, luego se procedió a eliminar el sobrenadante y a resuspenderla en PBS 1x para someterla a una nueva centrifugación con las mismas características de la anterior; éste procedimiento se repitió 3 veces. En el siguiente paso se realizó el procedimiento de desproteinización, en el cuál la muestra ya lavada fue sumergida en ácido clorhídrico (HCl) 1 N durante 48 horas a 4ºC. Luego, se realizó el mismo procedimiento de lavado señalado anteriormente para finalmente proceder a esterilizar la muestra mediante radiación ultra violeta (UV) en campana de flujo laminar durante 2 horas. La muestra de tejido esponjoso fue almacenada en una Placa Petri 4ºC hasta su inoculación (Figura 1.).

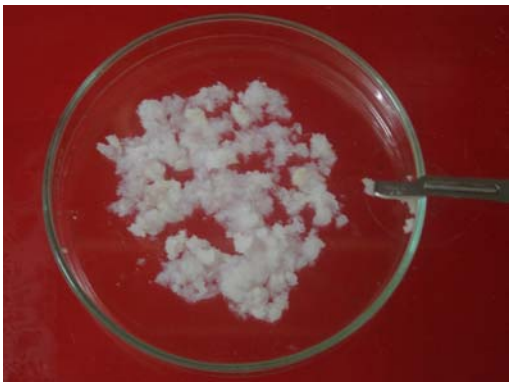

Figura 1. Tejido esponjoso porcino inorgánico.

4.2.2. Técnica quirúrgica y manejo de los animales

Se utilizaron 62 ratones *(Mus musculus,* cepa Rockefeler*)* los cuales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile en cajas plásticas de 30 centímetros de largo por 20 de ancho y 10 de alto, con capacidad para 8 animales, sin embargo, en este estudio se mantuvieron en grupos de 4 para evitar la restricción de su movilidad. Las cajas contaron con cama de

viruta, cuyo cambio se realizó dos veces por semana. La alimentación fue con pellet comercial para roedor, administrada *ad libitum,* al igual que el agua. Se mantuvieron a una temperatura promedio de 18 a 22º C con una humedad promedio de 55%, tal como lo señala el "Canadian Council of Animal Care" (1993) y "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del National Research Council" (1996) (Figura 2.).

Para los fines del estudio los ratones fueron divididos en cinco grupos: un grupo control negativo que constó de 4 animales, a los cuales no se les realizó ningún procedimiento, un grupo control positivo o placebo de 16 animales a los cuales solo se les realizó una incisión cutánea en la zona cervical dorsal, un grupo Control Positivo Cuerpo Extraño de 16 animales a los cuales se les implantó una serie (4 – 6) de pequeños trozos de set de infusión intravenoso plástico estéril de aproximadamente 0,5 mm cada uno, un grupo Xenoinjerto de 18 animales a los cuales se le injertó tejido esponjoso porcino inorgánico en una cantidad de 0.5 gramos y un grupo Xenoinjerto sin tratar de 8 animales a los cuales se les injertó tejido esponjoso porcino sin tratar.

Figura 2. Jaulas grupales de ratones cepa Rockefeler.

Cada ratón de los grupos Incisión, Cuerpo Extraño, Xenoinjerto tratado y Xenoinjerto sin tratar fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de tiopental sódico a una dosis de 30 mg/kg de peso vivo Posteriormente se les realizó una tricotomía en la región cervical dorsal y una correcta desinfección de la zona con alcohol yodado. Luego, se realizó una incisión cráneo-caudal de 1 cm de longitud con bisturí mango nº 4 y una hoja nº 22 hasta llegar al tejido subcutáneo (Figura 3.). En ésta región, a los ratones se les realizó el procedimiento de implantación correspondiente a cada grupo (Figura 4.). La incisión quirúrgica fue suturada con monofilamento no absorbible 2-0 realizando un único punto simple a nivel cutáneo el cuál fue retirado al cabo de diez días. Para el manejo del dolor postoperatorio se utilizó Tramadol inyectado intramuscular en una única dosis de 2 mg/kg.

Figura 3. Incisión en zona cervical dorsal de 1 cm de longitud.

Figura 4. Procedimiento de implantación del material que corresponda en cada grupo.

La eutanasia fue realizada mediante una sobredosis de Nembutal administrado vía intraperitoneal sin producir estrés ni sufrimiento siguiendo las normas internacionales de manejo de animales experimentales (Figura 5.). En el caso de los grupos Incisión y Cuerpo Extraño, se les realizó eutanasia a ocho individuos de cada grupo los días 10 y 20 posterior al procedimiento respectivo. En el grupo Xenoinjerto se realizó eutanasia a seis ratones los días 10, 20 y 30 respectivamente, y en el caso del grupo Control y Xenoinjerto sin tratar, se procedió a eutanasiar a la totalidad de los individuos el día diez. Inmediatamente después de la eutanasia se tomaron muestras en bloque de cada grupo en la región cervical dorsal correspondiente con la zona en la cuál se realizó la incisión e injerto respectivamente.

Figura 5. Eutanasia mediante sobredosis de Nembutal vía intraperitoneal.

4.2.3. Análisis Histopatológico

Se obtuvieron muestras de la zona cervical dorsal de los ratones en estudio de un grosor máximo de 0,5 cm., las cuales fueron fijadas por inmersión en una solución de formalina al 10%. Posteriormente fueron deshidratadas con alcohol etílico y aclaradas con xilol. Luego las muestras fueron impregnadas en parafina para su posterior inclusión y corte mediante micrótomo a un grosor de 5 micras. Todo esto fue realizado en Instituto de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile.

Para la coloración de la muestra se utilizó la tinción de Hematoxilina de Harris y Eosina, en la cual los núcleos se observan color azul, citoplasma en rosa, músculo en tonos rojizos y fibrina en rosa intenso.

El estudio histológico de las láminas para identificar, localizar y caracterizar áreas de reacción inflamatoria fue realizado en microscopio óptico (Olympus CX31) y evaluado por un observador calificado. La caracterización de la respuesta tisular fue realizada según lo señalado por Nickel y col 1999, Muldahev y col 2005, Abramov y col 2007 (Anexo 1.).

Todos los procedimientos y técnicas fueron realizadas por una alumna egresada de Medicina Veterinaria de la Universidad Austral de Chile bajo supervisión de profesionales Médicos Veterinarios y fueron sometidas a una evaluación por parte del Comité de Ética para el "Uso de Animales en la Investigación" de la Universidad Austral de Chile.

4.2.4. Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se utilizó una descripción de los hallazgos histológicos según una caracterización de la respuesta tisular adaptado de un estudio realizado por Níkel y col (1999) quienes reportan una graduación de 0 a 3 para caracterizar la respuesta inflamatoria en ausente, escaso, moderado y abundante para neutrófilos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos y necrosis respectivamente. En un estudio similar, Muldahev y col (2005) gradúan la respuesta tisular frente a una injuria en 5 grados utilizando los mismos parámetros que el estudio señalado anteriormente para neutrófilos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos, granuloma y necrosis respectivamente, además se utilizó una adaptación de un estudio realizado por Abramov y col (2007) quienes clasifican la respuesta inflamatoria en 4 grados según sea ausente, leve, moderado o severo la presentación de neutrófilos, macrófagos, linfocitos, fibroblastos, granulomas, hemorragia y necrosis respectivamente. Para el análisis de los datos también se realizó una valoración basada en porcentajes y expresada en gráfico circular.

Tabla 1: Caracterización de la respuesta tisular (adaptado de Nickel y col 1999, Muldahev y col 2005, Abramov y col 2007).

	GRADO				
VARIABLE	0	1	2	3	4
Neutrófilos	ausente	ausente	moderado	abundante	abundante
Macrófagos	ausente	moderado	abundante	abundante	abundante
Linfocitos	ausente	escaso	moderado	moderado	abundante
Fibroblastos	ausente	abundante	moderado	escaso	escaso
Hemorragia	ausente	ausente	escaso	moderado	abundante
Granuloma	ausente	escaso	moderado	abundante	escaso
Necrosis	ausente	ausente	ausente	escaso	moderado

5. RESULTADOS

5.1. DESCRIPCIÓN Y VALORACIÓN PORCENTUAL DE HALLAZGOS HISTOLÓGICOS

5.1.1. Grupo Control Sano

Al análisis histológico se observó que la muestra está constituida por piel delgada, cuya histoarquitectura se encontró dentro de los límites histológicos normales para la especie. Todas las muestras controles poseen epidermis, dermis, hipodermis y parte del músculo subcutáneo (Figura 6). En su valoración porcentual este grupo presentó Grado 0 de respuesta tisular en el 100% de sus muestras (Figura 7). Los grados restantes no se presentaron (Tabla 1).

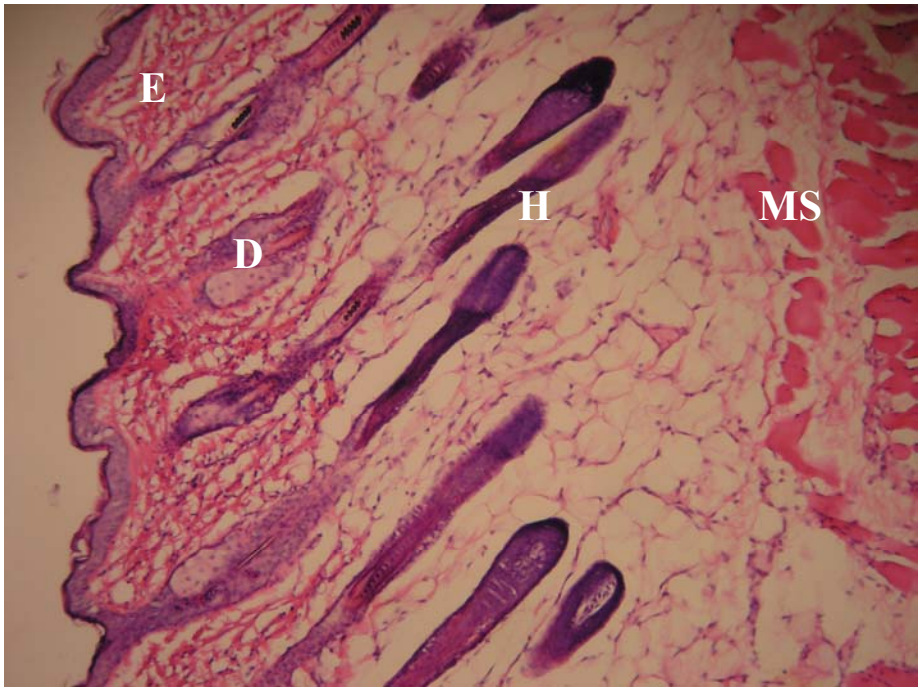

Figura 6. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón, grupo Control. Tinción H-E.10X (imagen ampliada). (E) Epidermis, (D) Dermis, (H) Hipodermis, (MS) Músculo subcutáneo.

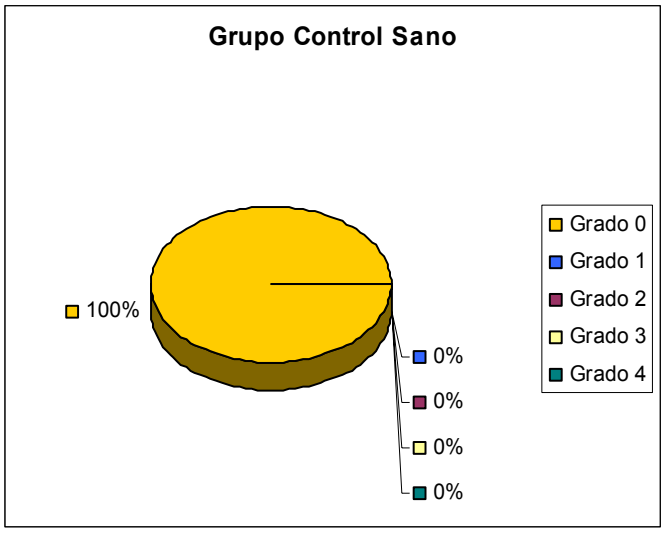

Figura 7. Respuesta tisular Grupo Control Sano medida en porcentaje (n = 4).

5.1.2. Grupo Incisión 10 días

Se observó que la epidermis presenta úlcera focalizada, con abundante cantidad de tejido necrótico, en el cual se encontró infiltrado por polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos. Es posible observar presencia de células epiteliales libres y proliferantes en los bordes de la incisión, así como neoformación capilar (Figura 8.). En su valoración porcentual en este grupo se observó que un 88% de las muestras presentaron Grado 3 en su respuesta tisular y solo un 12% de las muestras presentaron Grado 4 (Figura 9). Los grados restantes estuvieron ausentes (Tabla 1).

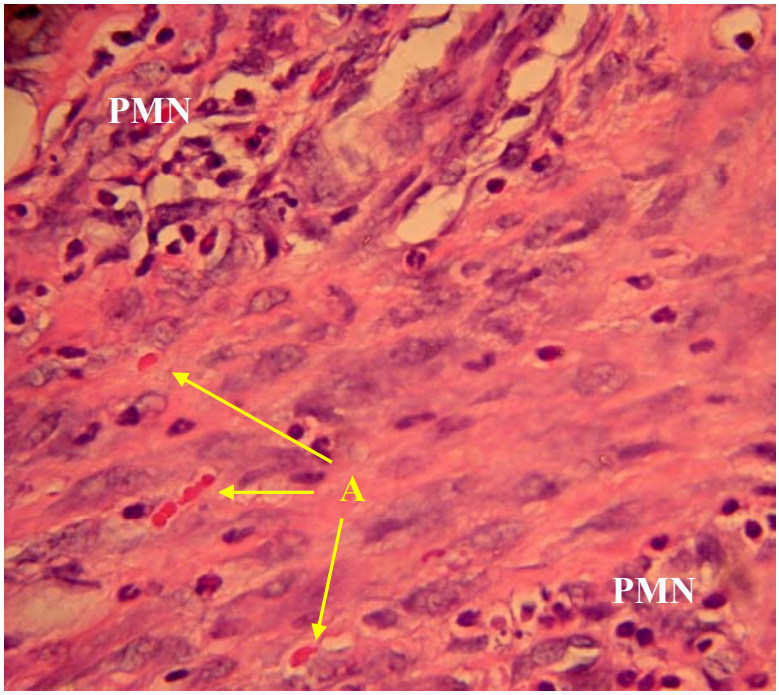

Figura 8. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón, Grupo Incisión 10 días. Tinción H-E. 40X (imagen ampliada). (PMN) Polimorfonucleares, (A) Angiogénesis.

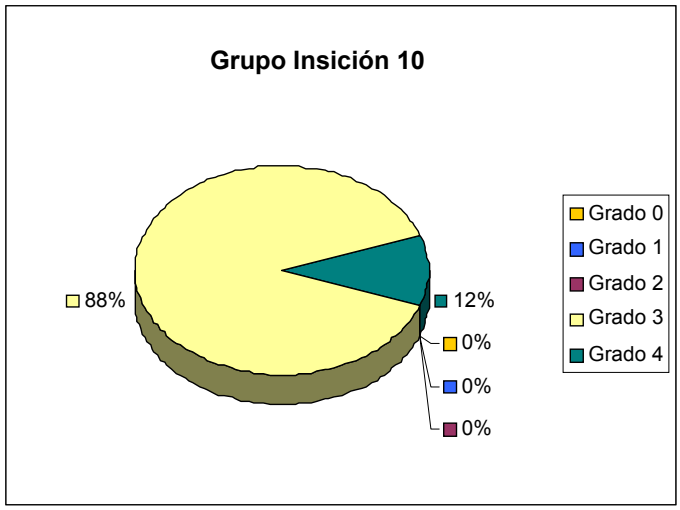

Figura 9. Respuesta Tisular Grupo Incisión 10 días medida en porcentaje (n=8).

5.1.3. Grupo Incisión 20 días

Se observó regeneración del epitelio epidérmico, con escaso infiltrado polimorfonuclear neutrofílico. En la dermis superficial se observó presencia focalizada de abundantes fibroblastos en una matriz de colágeno formada por fibras delgadas dispuestas de forma desordenada, constituyendo tejido cicatricial (Figura 10.).En su valoración porcentual este grupo presentó un 78% de las muestras con Grado 2 en su respuesta tisular y un 22% presentó Grado 3 (Figura 11). Todos los grados restantes estuvieron ausentes (Tabla 1).

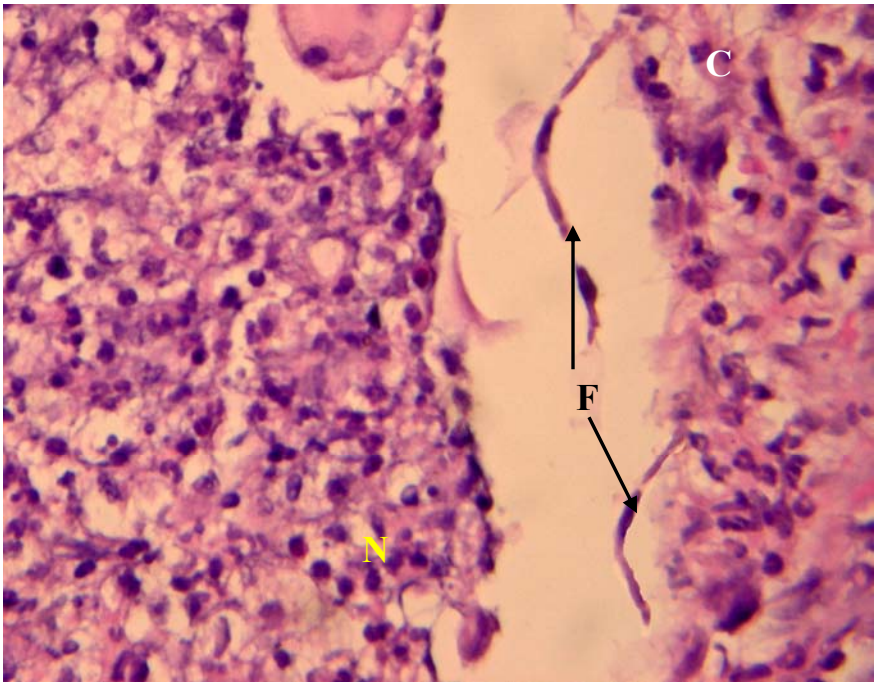

Figura 10. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón, Grupo Incisión 20 días. Tinción H-E. 40X (imagen ampliada). (N) Neutrófilos, (F) Fibroblastos, (C) Colágeno.

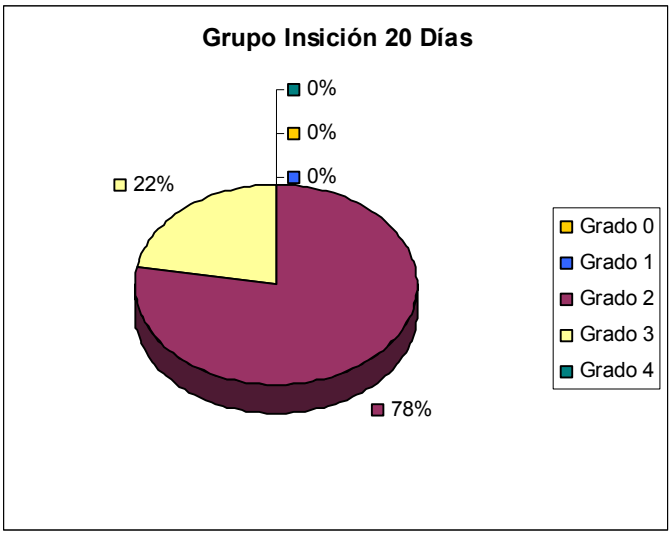

Figura 11. Respuesta Tisular Grupo Incisión 20 días medida en porcentaje (n=8).

5.1.4. Grupo Cuerpo Extraño 10 días

Al análisis histológico se observó que la dermis superficial, profunda y parte de la hipodermis se encontró con un infiltrado multifocal diseminado severo de polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y de células gigantes (piogranulomatoso), los cuales delimitan múltiples regiones de tejido necrótico hemorrágico. Fibrosis moderada (Figura 12). En su valoración porcentual este grupo de muestras presentó Grado 3 en el 86% de ellas, en tanto que en sólo el 14% de éstas presentó Grado 2 (Figura 13). Los restantes grados estuvieron ausentes (Tabla1).

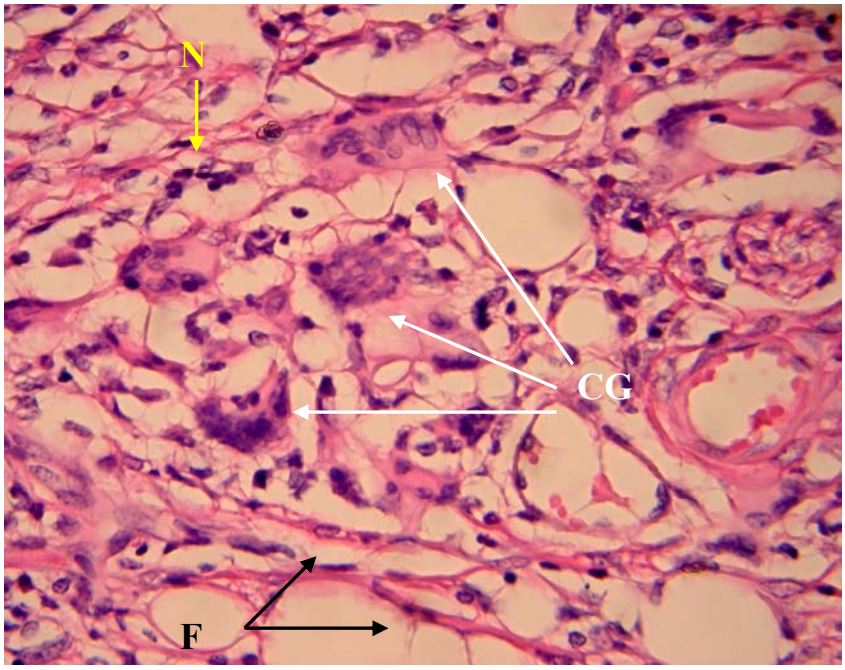

Figura 12. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón, Grupo Cuerpo Extraño10 días. Tinción H-E. 40X (imagen ampliada). (N) Neutrófilos, (CG) Célula gigante, (F) Fibroblastos.

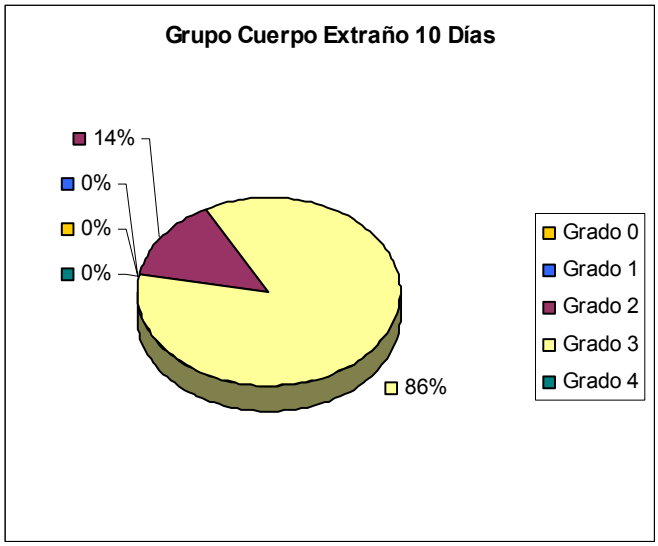

Figura 13. Respuesta Tisular Grupo Cuerpo Extraño 10 días medida en porcentaje (n=8).

5.1.5. Grupo Cuerpo Extraño 20 días

Al análisis histológico se observó que la dermis superficial, profunda y parte de la hipodermis se encontró con un infiltrado multifocal diseminado de macrófagos, células gigantes y linfocitos (granulomatoso), los cuales delimitan múltiples regiones de tejido necrótico. Rodeando estos focos, se observó presencia de fibroblastos y abundante tejido conectivo colágeno (Figura 14.). En su valoración porcentual en este grupo de muestras, un 62% de ellas presentó Grado 2 en su respuesta tisular y un 38% presentó Grado 3 (Figura 15). Los restantes grados no se presentaron (Tabla 1).

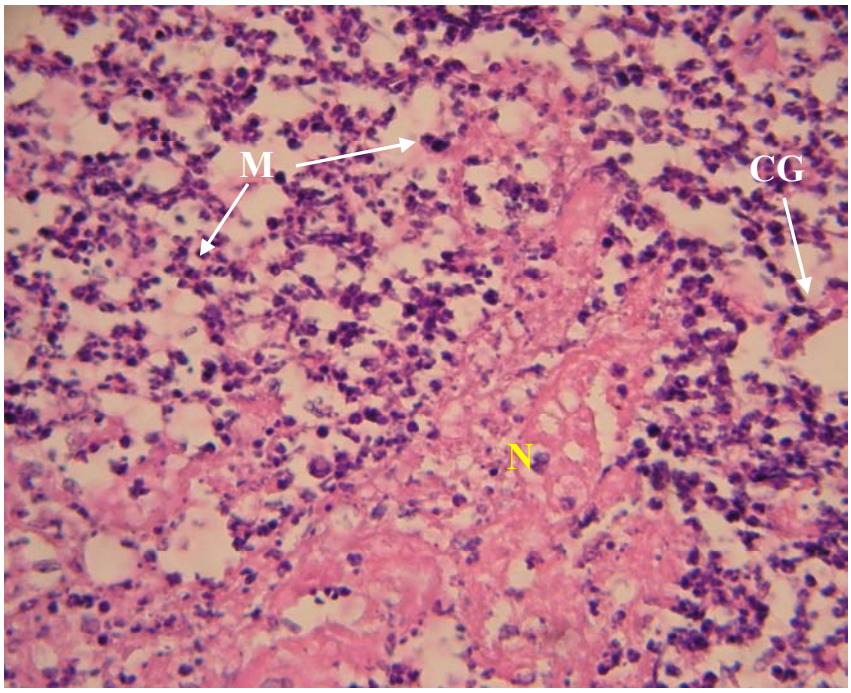

Figura 14. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón Grupo Cuerpo extraño 20 días. Tinción H-E. 40X(imagen ampliada). (M) Macrófagos, (CG) Célula gigante, (N) Necrosis.

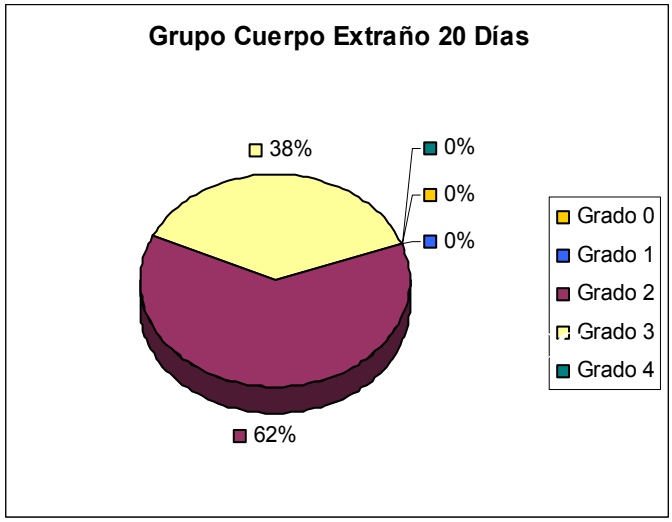

Figura 15. Respuesta Tisular Grupo Cuerpo Extraño 20 días medida en porcentaje (n=8).

5.1.6. Grupo Xenoinjerto 10 días

Se observó que la dermis superficial, profunda e hipodermis presentaron múltiples estructuras trabeculares eosinófilas con un infiltrado severo de polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y células gigantes. Todo este foco aparece mal delimitado por tejido conectivo colágeno. Por otra parte, se observaron múltiples focos hemorrágicos (Figura 16). En su valoración porcentual en este grupo sólo un 25% de las muestras presentó Grado 2 en su respuesta tisular, en tanto que un 75% de ellas presentó Grado 3 (Figura 17). Los restantes grados no se presentaron (Tabla 1).

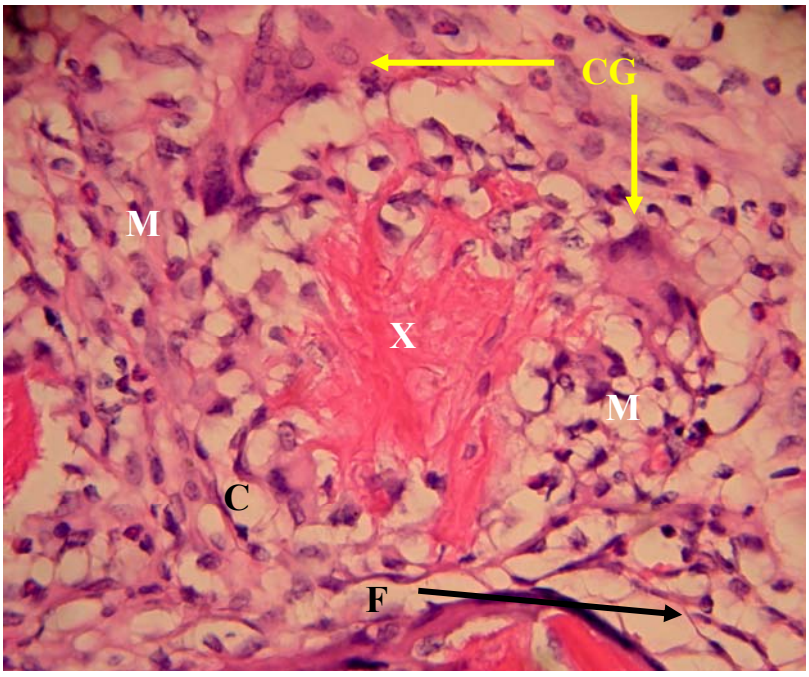

Figura 16. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón, Grupo Xenoinjerto 10 días. Tinción H-E. 40X (imagen ampliada). (X) Xenoinjerto, (M) Macrófagos, (CG) Célula gigante, (F) Fibroblastos, (C) Colágeno.

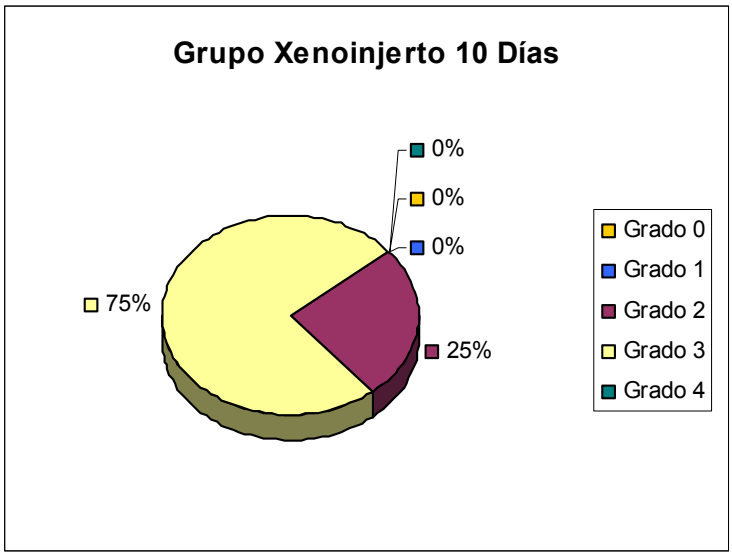

Figura 17. Respuesta Tisular Grupo Xenoinjerto 10 días medida en porcentaje (n=6).

5.1.7. Grupo Xenoinjerto 20 días

Se observó que la dermis superficial y profunda presentaron múltiples estructuras trabeculares eosinófilas con un infiltrado moderado de macrófagos, células gigantes y escasos polimorfonucleares neutrófilos. Todo este foco apareció a su vez delimitado por tejido conectivo colágenoso. (Figura 18). En su valoración porcentual éste grupo de muestras un 82% presentó Grado 2 en su respuesta tisular, en cambio sólo un 18% de ellas presentó Grado 3 (Figura 19). Los restantes grados no se presentaron (Tabla 1.).

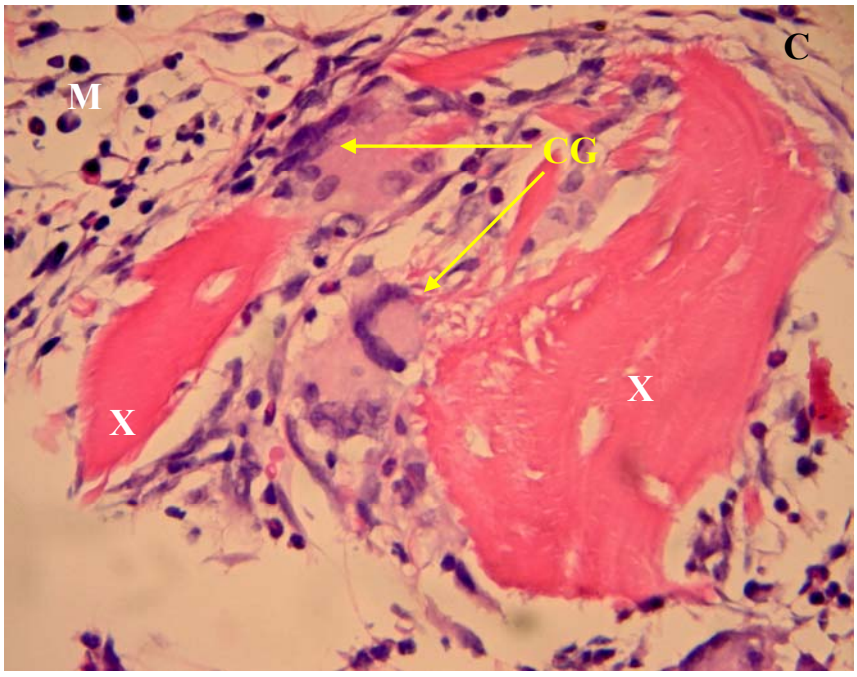

Figura 18. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón Grupo Xenoinjerto 20 días. Tinción H-E. 40X (imagen ampliada). (X) Xenoinjerto, (M) Macrófagos, (CG) Célula gigante, (C) Colágeno.

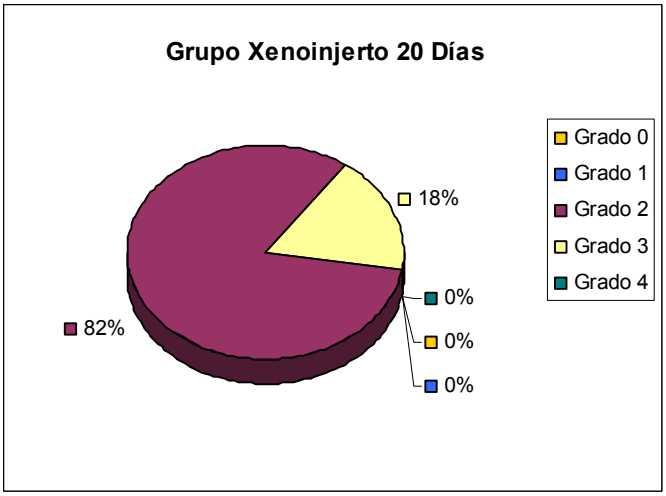

Figura 19. Respuesta Tisular Grupo Xenoinjerto 20 días medida en porcentaje (n=6).

5.1.8. Grupo Xenoinjerto 30 días

Se observó que la dermis superficial y profunda presentan múltiples estructuras trabeculares eosinófilas con un infiltrado leve de macrófagos y abundante cantidad de tejido conectivo colágeno dispuesto concéntricamente, lo cual delimita todo este tejido injertado. Abundante cantidad de vasos sanguíneos (Figura 20). En este grupo un 70% de las muestras presentó Grado 1 en su respuesta tisular, en tanto que un 30% de ellas presentó Grado 2 (Figura 21). Los restantes grados no se presentaron (Tabla 1).

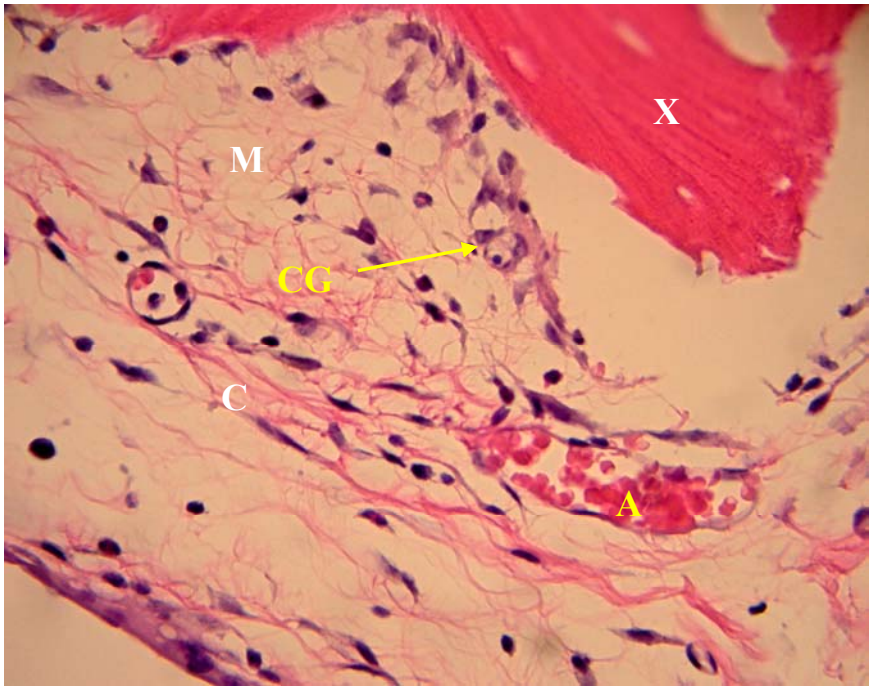

Figura 20. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón, Grupo Xenoinjerto 30 días. Tinción H-E. 40X (imagen ampliada). (X) Xenoinjerto, (M) Macrófagos, (CG) Célula gigante, (C) Colágeno, (A) Angiogénesis.

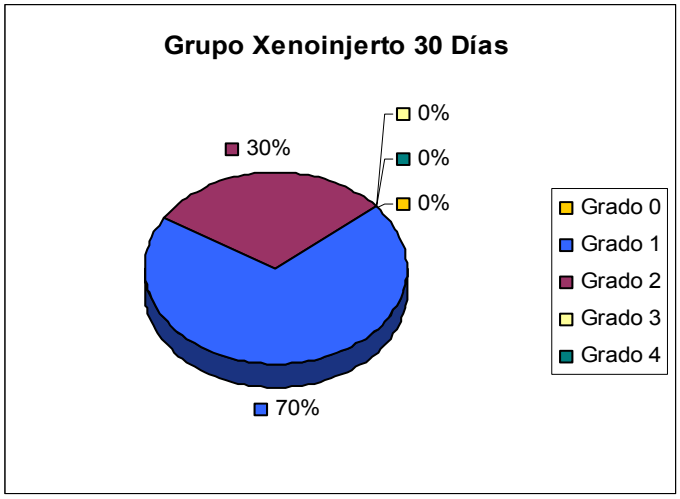

Figura 21. Respuesta Tisular Grupo Xenoinjerto 30 días medida en porcentaje (n= 6).

5.1.9 Grupo Xenoinjerto Sin Tratar 10 días

Histológicamente se observó marcada distorsión de la histoarquitectura de la piel. La dermis apareció con un infiltrado difuso severo de polimorfonucleares neutrófilo, macrófagos y células gigantes. Estas células infiltraron múltiples focos de tejido necrótico, hemorrágico y capas de la piel, provocando la distorsión y pérdida de glándulas anexas y pelo (Figura 22.). En este grupo de muestras un 87% de ellas presentó Grado 4 en su respuesta tisular, en cambio sólo un 13% presentó Grado 3 (Figura 23). Los restantes grados no se presentaron (Tabla 1).

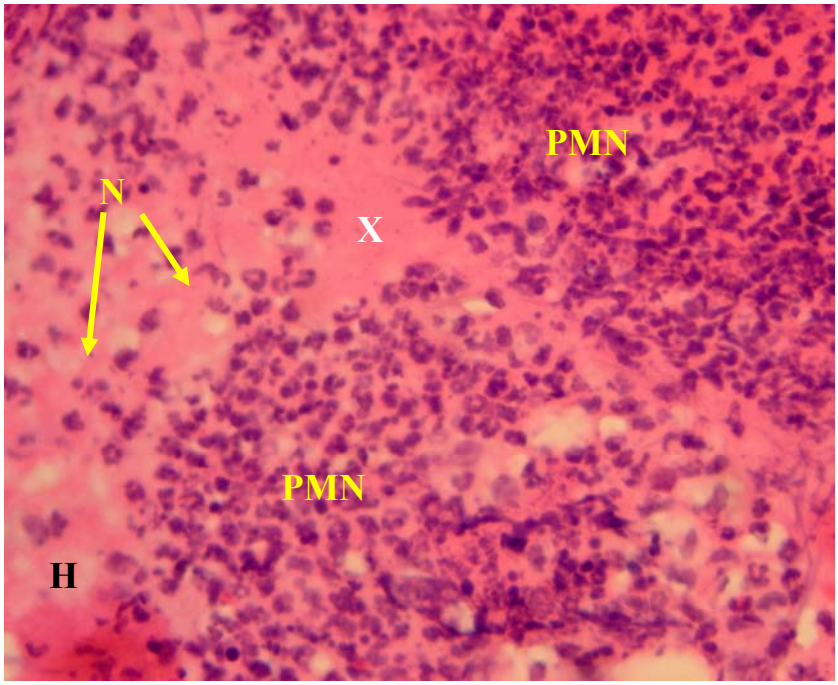

Figura 22. Corte histológico de tejido subcutáneo de ratón, Grupo Xenoinjerto sin tratar 10 días. Tinción H-E. 40X (imagen ampliada). (X) Xenoinjerto, (PMN) Polimorfonucleares, (N) Necrosis, (H) Hemorragia.

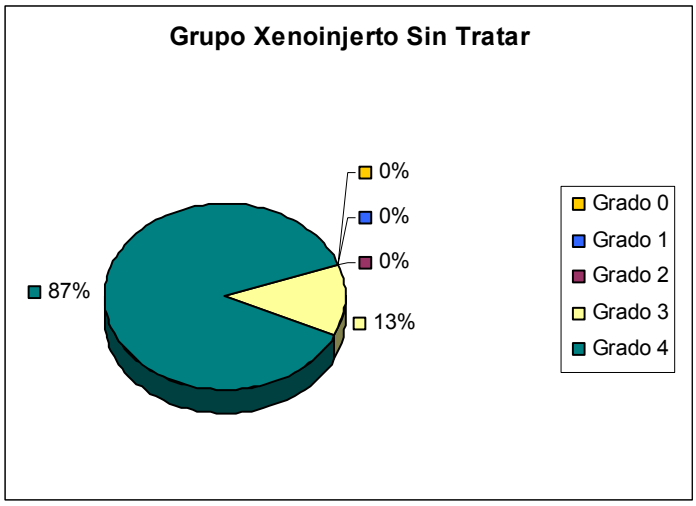

Figura 23. Respuesta Tisular Grupo Xenoinjerto Sin Tratar 10 días medida en porcentaje. (n= 8)

6. DISCUSIÓN

El uso de ratones (*Mus musculus*) como modelo animal de experimentación es la especie animal más utilizada en la actualidad, debido principalmente a sus características reproductivas, ya que ofrece la ventaja de tener un ciclo reproductivo muy corto y camadas grandes; su tamaño y la facilidad de manejo y también a que su genoma es totalmente conocido (Carbone y Maschi 2006, Boneva y Folks 2007).

En el presente estudio se utilizaron porcinos como donadores de tejido óseo esponjoso, dado que esta especie posee una serie de características que los hace apropiados como donantes de órganos y tejidos. Es una especie que puede ser criada con facilidad, tiene camadas numerosas y alcanzan la madurez reproductiva rápidamente. En la escala zoológica, los cerdos están más alejados de los humanos que los primates, por lo que existe un riesgo muy limitado de producir enfermedades zoonóticas al realizar xenoinjertos entre porcinos y humanos (Platt y Lin 1998, Cooper y col 2002).

6.1. XENOINJERTO ÓSEO PORCINO

El lugar de obtención de los injertos de tejido esponjoso debe ser huesos largos, preferentemente del fémur, ya que en este lugar anatómico es donde se encuentra la mayor cantidad del tejido señalado (Anderson y col 2000,Worth y col 2005).

En este estudio se utilizó tejido esponjoso como material de injerto y no tejido óseo cortical, ya que como lo señalan Worth y col (2005) y Abbott y col (2007), los injertos de esponjosa presentan una respuesta vascular mucho mas rápida que en el caso de injertos de cortical, puesto que la red esponjosa completa puede ser revascularizada en una o dos semanas. Por el contrario, la revascularización del tejido óseo cortical puede llegar a tardar algo más de dos meses producto que la estructura del injerto cortical no permite un área de contacto suficiente para la penetración vascular entre el injerto y el receptor, y donde la penetración vascular es el resultado de resorción osteoclástica periférica por los canales haversianos y de Volkman (Kim y col 2004).

Además, la integración del injerto cortical se inicia por osteoclastos más que por osteoblastos a diferencia del injerto esponjoso que se compone principalmente de osteoblastos. Los osteoclastos son las células responsables de la resorción de la matriz ósea y los osteoblastos son las células responsables de la formación y organización de la matriz extracelular del hueso y de su posterior mineralización. Además liberan algunos factores que son probablemente mediadores de la resorción ósea. Ambos tipos celulares están involucrados en la remodelación del hueso, pero son los osteoblastos las células sintetizadoras de tejido óseo (Brito y col 2006).

6.2. GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN

El Grupo Control Sano corresponde a un grupo de ratones a los cuales no se les realizó ningún tipo de procedimiento, por lo tanto las muestras de tejido subcutáneo analizadas histológicamente presentaban epidermis, dermis e hipodermis con características histológicas normales (Monteiro y col 1993, Banks 1995).

Los hallazgos histológicos encontrados en los individuos del Grupo Incisión 10 días, concuerdan con lo reportado por Reiter (1995) y Sardari y col (2006), quienes señalan que la incisión quirúrgica superficial causa daño en la línea de células epiteliales, interrumpe la membrana basal y daña el tejido conectivo circundante. Esto último, induce una respuesta inflamatoria local con depósitos de células inflamatorias. Inmediatamente después de la lesión, se produce un acumulo de sangre, fibrina y otras células sanguíneas constituyendo un coagulo (Harrison 1991, Park y Barbul 2004).

Aproximadamente una semana posterior a generarse la lesión tisular, las características inflamatorias esenciales van desapareciendo, sin embargo, la proliferación y depósito de fibroblastos continúa (Park y Barbul 2004), lo cual concuerda con lo encontrado en las muestras 10 días posterior a la lesión tisular, ya que estas presentaban infiltración de polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos, como también una considerable cantidad de fibrina, concordando con Razzaque y col (2005) quienes reportan resultados muy similares al realizar un análisis histológico a cortes de tegumento de ratas Wistar 7 y 10 días posterior a realizada una incisión cutánea mediante hoja de bisturí.

En el caso del Grupo Incisión 20 días, los hallazgos histológicos encontrados coincide con lo reportado por Muldahev y col (2005) y Sardari y col (2006), quienes reportaron que al final del primer mes la lesión ha sido reparada por tejido cicatrizal cubierto por una delgada capa de tejido epitelial y que el infiltrado neutrofílico ya casi ha desaparecido. Es en esta etapa donde ocurre la epitelización (Swaim y col 2001). Witte y Barbul (1997) reportan que el tejido de fibrosis cicatricial encierra elementos celulares como fibroblastos, células de tipo linfático y leucocitos, con abundantes polimorfonucleares y que estos elementos van desapareciendo a medida que la cicatriz envejece. Abramov y col (2007) reportaron en conejos, que entre los días 14 y 21 posterior a una lesión, la evaluación histológica del tejido dañado muestra escaso infiltrado neutrofílico pero abundantes macrófagos, lo que señala una inflamación crónica, presentándose abundante tejido de granulación y neoangiogénesis, coincidiendo con los hallazgos histológicos encontrados en el Grupo Incisión 20 días del presente estudio.

En éste estudio, tanto los injertos de un trozo de set de infusión intravenoso plástico estéril como los de hueso esponjoso porcino inorgánico se realizaron a nivel subcutáneo, concordando con lo realizado por Muldashev y col (2005) quienes inyectaron subcutáneamente en la base de la cola de ratas Wistar una suspensión de suero fisiológico mas un pulverizado de tejido óseo de conejo en relación de 15 ml por 125 mg respectivamente. Restrepo y col (1994) como también Kim y col (2004), reportaron en humanos y ratas respectivamente, que al análisis histológico de una zona sometida a la presencia de un cuerpo extraño presenta un abundante infiltrado de células gigantes, aparte del clásico infiltrado de polimorfonucleares como respuesta inflamatoria local, lo que concuerda con los hallazgos encontrados en los grupos Cuerpo Extraño 10 y 20 días del

presente estudio. A diferencia del grupo Cuerpo Extraño 10 días que presentó un infiltrado piogranulomatoso, el Grupo Cuerpo Extraño 20 días solo presentó infiltración de macrófagos, ya que generalmente los neutrófilos desaparecen durante los primeros días del proceso inflamatorio y solo persisten los macrófagos, como lo señala Nickel y col (1999), quienes describen detalladamente el proceso inflamatorio. Por otra parte, Tizard (1998), Cone (2001) y Trepels y col (2006) señalan que las células gigantes de reacción a cuerpo extraño poseen núcleos dispuestos en forma irregular los cuales suelen ser vesiculosos, presentar un nucleolo muy notorio y poseer un citoplasma basófilo. Por lo tanto, el trozo de set de infusión intravenoso plástico estéril generó una reacción típica de cuerpo extraño con abundante infiltrado de células gigantes y polimorfonucleares en cantidad variable dependiente del tiempo.

La presencia de tejido necrótico en las muestras Cuerpo Extraño 10 y 20 días, puede ser consecuencia de que el trozo de set de infusión intravenoso plástico implantado en el tejido subcutáneo sufrió algún grado de contaminación bacteriana o que el mismo cuerpo extraño lesionó de tal forma el tejido circundante que se generó una isquemia con la consecuente necrosis, o simplemente la necrosis se presentó como consecuencia del granuloma, concordando con Cone (2001), González (2002) y Muldahev y col (2005), quienes reportan que al análisis histológico de un proceso inflamatorio crónico granulomatoso, se pueden presentar focos de necrosis central, sin expresar esto la presencia de contaminación bacteriana secundaria.

En el Grupo Xenoinjerto 10 días, los hallazgos histológicos encontrados son muy similares a los encontrados en el grupo Cuerpo Extraño 10 días, lo que puede indicar que el xenoinjerto de tejido esponjoso porcino inorgánico generó una reacción de cuerpo extraño en el tejido subcutáneo de los ratones. Esto concuerda con lo descrito por Accorsi-Mendosa y col (2005), quiénes reportan resultados muy similares luego de haber injertado matriz ósea desmineralizada de bovino en defectos óseos en ratas Wistar (*Rattus norvegicus*). Por otra parte, Perlick y col (2001) reportan que al análisis histológico de tejido subcutáneo de ratones, luego de 14 días de realizarles un xenoinjerto de tejido esponjoso bovino inorgánico, se observa un abundante infiltrado difuso de polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos y una considerable cantidad de células gigantes en la periferia del xenoinjerto. En estudios similares, Donos y col (2005), Schultheiss y col (2004) y Charalambides y col (2005) reportan también la presencia de pequeños focos hemorrágicos y abundante tejido colágeno aproximadamente una semana posterior a la realización de un injerto de material inorgánico, concordando con los resultados obtenidos en el presente estudio.

En el Grupo Xenoinjerto 20 días, se observó un infiltrado moderado de polimorfonucleares delimitado por tejido colagenoso y múltiples focos de neoangiogénesis. Estos hallazgos coinciden con lo reportado en otros estudios, donde utilizaron un xenoinjerto esponjoso bovino inorgánico luego de 14, 18 y 20 días respectivamente, observando una notable disminución en el infiltrado de polimorfonucleares en la zona circundante al xenoinjerto en relación a la primera semana (Cone 2001, Perlick y col 2001, Schultheiss y col 2004). Hallazgos similares se presentaron en el Grupo Xenoinjerto 30 días, donde el infiltrado de polimorfonucleares macrófagos fue muy leve y se evidenció abundante tejido conectivo colagenoso el cual se encontró rodeando por completo al injerto.

Esto coincide con lo reportado por Xu y col (2003), Kim y col (2004) y Charalambides y col (2005), quienes señalan que luego de un mes de realizado un xenoinjerto de hueso esponjoso bovino, éste es encapsulado por fibras de tejido conjuntivo. En el tejido conectivo predominan las fibras colágenas por sobre las demás (reticulares y elásticas), entre las cuales pueden observarse núcleos de fibroblastos (Panayi y Corrigall 2006). Esta encapsulación del xenoinjerto por parte del tejido conectivo también indica que éste fue reconocido por el organismo del ratón como un cuerpo extraño inorgánico. Los grupos Xenoinjerto 20 y 30 días presentaron una considerable angiogénesis. La migración y división de células endoteliales de capilares y vénulas de los bordes de la herida desarrollan nuevos capilares que proveen nutrientes para la actividad celular aumentada de los fibroblastos (Keating y McQuen 2001). Algunos productos derivados de las plaquetas y la fibrina (productos de la activación de la cascada de coagulación) pueden inducir la neovascularización y posterior síntesis de colágeno. Se ha demostrado que plaquetas activadas por trombina "*in vivo"* tienen la capacidad de estimular la angiogénesis y el aumento en la síntesis de colágeno (Zunino y col 2004); así mismo se ha demostrado que la fibrina, fibrinopéptidos y/o productos de la degradación de la fibrina producen migración de leucocitos con subsiguiente neovascularización en corneas de conejo (Janovec y Dvora´k 1998). La angiogénesis presente en las muestras con xenoinjerto coincide con lo descrito por Keating y McQuen (2001) y Sardari y col (2006), quienes reportaron la utilización de un xenoinjerto de hueso bovino cortical o esponjoso (Bio-Oss®), producido por la extracción química de cualquier material orgánico. La variedad esponjosa es más indicada para rellenos óseos en defectos periodontales, debido a su porosidad y a su potencial para facilitar la angiogénesis. Al análisis histológico del Bio-Oss® injertado en defectos maxilares en humanos, aparecía una importante neoformación ósea en la mayor parte de la zona injertada y principalmente abundante angiogénesis. En un estudio similar, Accorsi-Mendoza y col (2005) injertaron hueso esponjoso bovino desmineralizado en ratas Wistar y 28 días posteriores al injerto, el análisis histológico reveló un leve infiltrado de macrófagos, abundante tejido colágeno y fibroso rodeando el xenoinjerto y angiogénesis en la periferia de éste.

En el Grupo Xenoinjerto 10 días sin tratar, al análisis histológico se observó un severo infiltrado difuso de polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y células gigantes, lo que indica una respuesta inflamatoria aguda muy severa con reacción a cuerpo extraño. A diferencia de los hallazgos encontrados en los otros grupos de xenoinjerto, en éste se evidencia abundante hemorragia, tejido necrótico y distorsión de la histoarquitectura de la piel y tejido subcutáneo. Esto se puede deber a que, al no realizar el tratamiento de desproteinización y desmineralización, el tejido esponjoso porcino injertado no actuó como material inerte generando una respuesta inflamatoria mucho mas intensa, lo que coincide con lo reportado por Dasso y col (1998), Bracy y col (1999), Gutiérrez-Ruíz y col (2002) y Carneiro y col (2005), quienes luego de realizar injertos sin tratar entre especies diferentes señalan que un xenoinjerto no inorgánico produce una reacción de rechazo hiperagudo por parte del tejido receptor.

6.3. CONCLUSIONES

El injerto de hueso esponjoso desmineralizado y desproteinizado de cerdo induce una respuesta inflamatoria al ser implantado en el tejido subcutáneo de ratones.

Al análisis histológico de las muestras es posible señalar que la reacción inflamatoria provocada por el injerto de tejido esponjoso porcino inorgánico corresponde a una reacción de cuerpo extraño la cual se ve disminuida en relación directa con el tiempo.

Se concluye que la técnica de desmineralización y desproteinización utilizada es efectiva, ya que se logró eliminar el material inmunogénico presente en el tejido esponjoso, no generando una respuesta inmunomediada.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbott L, E Schottstaedt, J Saunders, F Bost. 2007. The evaluation of Cortical and Cancellous Bone as grafting material: A Clinical and Experimental Study. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;29:381-414.

Abramov Y, B Golden, M Sullivan, S Botros, J Miller, A Alshahrour, R Goldberg, P Sand. 2007. *Wound Repair and Regeneration.* 15:80-86.

Accorsi-Mendosa T, W Zambuzzi, K Batista, J Pereira, T Cestari, R Taga, J Granjeiro. 2005. Expression of metalloprotinase 2 in the cell response to porous demineralized bovine bone matrix. *J of Molecular Hist.* 36:311-316.

Anderson I, M Mucalo, G Johnson, M Lorier. 2000. The processing and characterization of animalderived bone to yield materials with biomedical applications. Part III: material and mechanical properties of fresh and processed bovine cancellous bone. *J of Material Science.*11: 743-749.

Apgar J, A Juarranz, J Espada, A Villanueva, M Cañete, J Stockert.1998. Fluorescence microscopy of rat embryo sections stained with haematoxylin-eosin and Masson´s trichrome method. *J Microscopy.*191:20-27.

Auchincloss H, D Sachs.1998. Xenogeneic Transplantation. *Annu Rev Immunol.* 16:433-470.

Bach F. 1998. Xenotransplantation: problems and prospects. *Annu Rev Med*. 49:301-310.

Bailey M. 1984. Xenotransplantation-a brief history of clinical experiences. *Annu Rev Med*. 44:285-293.

Banks W.1995. Histología Veterinaria Aplicada. Segunda Edición. México DF. Capitulo 20. Pp 427-434.

Block J, J Poser. 1995. Does xenogeneic demineralized bone matrix have clinical utility as a bone graft substitute? *Med Hypoth.* 45:27–32.

Boneva R, T Folks. 2007. Xenotransplantation and risks of zoonotic infections. *Annals of Medicine.* 36: 504-517.

Bracy N, N Cretin, D Cooper, J Iacomini. 1999. Xenorective natural antibodies.*Cell Mol Life Sci.* 56:1001-1007.

Brito A, S Martínez, M Torres, M Sotelo, I López, J Cañas. 2006. Fractura con pérdida ósea segmentaria en niños. Reporte de dos casos tratado con injerto córticoesponjoso autólogo. *Acta Ortopédica Mexicana.*20:289-293.

Carneiro E, R Garcia, R Oliveira, F Moraes, R Menzes, A Letra, G Canova, T Cestari, J Granjeiro. 2005. Microscopic and Radiographic analysis of the effect of particle size of demineralyced Bovine Cancellous Bone Matrix on the repair of bone defects in femurs of Rabbits.*J Appl Oral Sci.* 13(2): 157-62.

Carbone C, F Maschi.2006. El ratón nude(nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Químicaviva.* 5:19-23.

Cone J.2001. Inflammation. *Am.J.Surg.* 182:558-562.

Cooper D, B Gollackner, D Sachs.2002. Will the Pig Solve the Transplantation Backlog?. *Annu.Rev.Med.* 53:13-147.

Cotran R, Komar V, Collins T. 2000. Reparación de los tejidos: proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas. En: MC Graw-Hill, ed. Patología estructural y funcional. 6 ed. Madrid. Interamericana.4:95-120.

Charalambides Ch, M Beer, A Cobb. 2005. Poor results after augmenting autograft with xenograft in hip revision surgery. *Acta Orthopaedica.*76:544-549.

Dasso G, MS Fernandez, JL Arias. 1998. Reparación ósea mediante aloimplantes sometidos a diferentes métodos de conservación en conejos. *Arch Med Vet* 3,1998; 57-66.

Davis M, M Krogsgaard, J Huppa, C Sumen, M Purbhoo, D Irvine, L Wu, L Ehrilch. 2003. Dynamics of Cell Surface Molecules During T Cell Recognition. *Annu Rev Biocem.* 72:717-742.

De Long W, T Einhorn, K Koval, M McKee, W Smith, R Sanders, T Watson. 2007. Injertos óseos y sustitutos de injerto óseo en la cirugía traumatológica ortopédica. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89: 649 - 658.

Donos N, D Bosshardt, N Lang, F Graziani, M Tonetti, T Karring, L Kostopoulos. 2004. Bone formation by enamel matrix proteins and xenografts: an experimental study in the rat ramus. *Clin Oral Impl. Res.* 16, 2005; 140–146.

Dray A. 1995. Inflammatory mediators of pain. *Bri J of Anaest.* 75:125-131.

Finkemeyer C. 2002. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:454-464.

Fitch R, S Kerwin, H Newman-Gage, K Sinibaldi. 1997. Bone autografts and allograft in dogs. *Comp Cont Ed Pract Vet.* 19(5):558-578.

Gallie W. 2007. The history of a bone graft. *J Bone Joint Surg Am.*12:201-212.

Goldstein D.2006.Toll like receptors and acute allograft rejection. *Transplant Immun.*17:11–15.

González R. 2002. Modelos experimentales para la evaluación de la acción cicatrizante de medicamentos. *Rev Cubana Farm.* 36:189-196.

Guide for the Care and Use of Experimental Animals.Canadian Council on Animal Care. 1993. Vol 1. Chapter 3: Rodents and Rabbits. University of Saskatchewan. Canadá.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute of Laboratory Animal 1996. Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C.

Gutiérrez-Ruíz M, G Robles-Díaz, D Kershenobich. 2002. Emerging Concepts in Inflammation and Fibrosis. *Archiv Med Res*.33:595-599.

Harrison J. 1991. Healing of surgical wounds in oral mucoperiosteal tissues. *J Endodon* 17:4001-4008.

Janovec M. K Dvora´k.1998. Autolyzed antigen-extracted allogeneic bone for bridging segmented diaphyseal bone defects in rabbits. *Clin. Orthop.* 229: 249–256.

Keating F, M McQuen. 2001. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Am.* 83:3–8. Kemp E. 1996. Xenotransplantation. *Journal of Internal Medicine.* 239: 287-297.

Kemp E. 1996. Xenotransplantation. *Journal of Internal Medicine.* 239: 287-297.

Kim S, L Shin, S Park, Y Kim, M Park, J Mok, W Yang, J Lee. 2004. Chemical, Structural Properties, and Osteoconductive Effectiveness of Bone Block Derived from Porcine Cancellous Bone. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater.* 68B,2004; 69–74.

Koch H, P Pokinskyj, R Wenz, W Linhart. 2001. Screw Fixation in Cancellous Osteoporotic Bone –First in Vitro Results with a Novel Augmentation Material. *Eur J Trauma*.27:550-557.

Kujala S, T Raatikainen, J Ryhanen, O Kaarela, P Jalovaara. 2004. Composite implant of native bovine bone morphogenetic protein (BMP), collagen carrier and biocoral in the treatment of resistant ulnar nonunions: report of five preliminary cases. *Arch Orthop Trauma Surg.* 124: 26-30.

Mantovani A, Garlanda C, Locati M, Veliz T, Gonzalvo S, Savino B, Vecchi A. 2007. Regulatory pathways in inflammation. *Autoimmun Rev.* 4:98-106.

Martin P, D Davis, M Weiss, D Grieger. 2001. Xenotransplantation of Bovien Bone Marrow Stromal Cells into Pigs Fetuses: incorporation into skeletan muscle. *Animal Biotechnology.* 12:183-191.

Miller J. 1999. Discovering the Origins of Immunogical Competence. *Annu Rev Immunol.* 17:1-17.

Monteiro N, A Stinson, H Calbourn. 1993. Integument. En: Dellman D (eds).*Textbook of Veterinary Histology.* Vol 1. Pp 285-312. Malvern.USA.

Muldahev E, S Muslimov, L Musina, R Nigmatullin, A Lebedeva, O Shangina, R Khasanov. 2005. The role of macrophages in the tissues regeneration stimulated by the biomaterials. *Cell and Tissue Banking.* 6: 99-107.

Nickel J, J Downey, I Young, S Boag. 1999. Asymptomatic inflammation and/or infection in benign prostatic hyperplasia. *BJU International.* 84: 976-981.

Panayi G, V Corrigall. 2006. BiP regulates autoimmune inflammation and tissue damage. *Autoimmunity Rev.* 5:140-142.

Park J, A Barbul. 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.*187:11-16.

Perlick L, O Diedrich, H Bathis, D Zander, C Kraft. 2001. A Comparison between Xenogenic Deproteinized Bone Substitute Pyrost® and Autologous Bone Graft in the surgical management of simple Bone Cysts. *Eur J Trauma.* 27:117-127.

Piña M, N Murguía, R Palma, E Lima. 2006. Caracterización del hueso bovino inorgánico: Nukbone. *Acta Ortopédica Mexicana.* 20,2006; 150-155.

Platt J, S Lin. 1998. The Future Promises of Xenotransplantation. *Departments of Surgery, Immunology and Pediatrics, Duke University Medical Center,Durham, North Carolina, USA*. Pp 5-15.

Razzaque M, M El-Hallak, A Azouz, T Tagushi. 2005. Tissue Scarring:Lessons from Wound Healing. *J Dermatol Sci.* 24:70-77.

Reiter D.1995. Methods and material for wound closure. *Otolaryngol Clin North Am*.28:1069–1080.

Reemtsma B. 1963. Is Xenotransplantation advantageous?. *Annu Rev Med*. 12: 129-134.

Restrepo F, R Guzmán, A Iglesias. 1994. Sinovitis aséptica erosiva por cuerpo extraño. *Colombia Médica.* 25:66-68.

Roos A, M Daha. 2002. Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection. *Transplant Immun.*9:257-270.

Sánchez A, P Monroy, A Pérez. 2004.Granuloma de colesterol coroideo simulando un tumor macular. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 79: 453.456.

Sardari K, M Dehgan, M Mohri, M Emami, A Mirshahi, M Maleki, M Najar Barjasteh, M Aslani. 2006. Macroscopic aspects of wound healing (contraction and epithelialisation) after topical administration of allicin in dogs. *Comp Clin Pathol.* 15:231-235.

Seebach J, M Schneider, C Comrack, A LeGuern, S Kolb, P Knolle, S Germana, H DerSimonian, C LeGuern, D Sachs. 2001. Immortalized bone-marrow derived pig endothelial cells. *Xenotransplantation*. 8: 48-61.

Schultheiss M, M Sarkar, M Arand, M Kramer, H Wilke, L Kinzl, E Hartwig. 2004. Solvent-preserved bovine cancellous bone blocks used for reconstruction of thoracolumbar fractures in minimally invasive spinal surgery-first clinical results. *Eur Spine J.* 14:192-196.

Soin B, M Vial, J Friend. 2000. Xenotransplantation. *Bri J Surg.* 87:138-148.

Steele D, H Auchincloss. 1995. Xenotransplantation. *Annu Rev Med.* 46:345-360.

Stevenson S. 1999. Biology of bone grafts.*Orthop Clin N Am.* 30(4):543-551.

Swaim S, Hinkle S, Bradley D.2001.Wound contraction: basic and clinical factors. *Compendium* 23:20–24.

Tantravahi J, K Womer, B Kaplan. 2007. Why hasn´t Eliminating Acute Rejection Improved Graft Survival?. *Annu Rev Med.* 58:369-385.

Tincani A, L Andreoli, C Bazzani, D Bosiso, S Sozzani. Inflammatory molecules: A target for treatment of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* doi:10.1016/j.autrev.2007.03.001 (in press).

Tizard I. 1998. Hipersensibilidad de tipo IV: rechazo de injertos. En: Inmunología Vetrerinaria. Pp 419-428. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México DF.

Trepels T, Zeiher A, Fichtlscherer S. 2006. The endothelium and inflammation. *Endothelium*.13:423-429.

Van Oberdam K, C Verbakel, E Kouwenhoven, N van Rooijen, R de Bruin, J Ijzermans, R Marquet. 2000. Negligible role for NK cells and macrophages in delayed xenograft rejection. *Transpl Int.* 13,2000; 504-507.

Walsh M, N Kim, Y Kadono, J Rho, S Lee, J Lorenzo, Y Choi. 2006. Osteoimmunology: Interplay Between the Immune System and Bone Metebolism. *Annu Re Immunol.* 2006;24:33-63.

Wayne W. 1997. Delayed Xenograft Rejection. *World J Surg.* 21.1997; 917-923.

Welniak L, B Blazar, W Murphy.2007. Immunobiology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Annu Rev Immunol.*25:139-170.

Witte M, Barbul A. 1997.General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* .77:509–528.

Worth A, M Mucalo, G Horne, W Bruce, H Burbidge. 2005. The evaluation of processed cancellous bovine bone as a bone graft substitute. *Clin Oral Impl Res.* 16, 2005; 379–386.

Xu H, Y Shimizu, S Asai, K Ooya. 2003. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. *Clin Oral Impl Res.* 14, 548–555.

Yamada K, A Griesemer, M Okumi. 2005. Pigs as xenogeneic donors. *Transplantation Reviews.* 19,2005; 164-177.

Zambuzzi W, R Oliveira, D Alanis, R Menezes, A Letra,T Cestari, R Taga, J Granjeiro. 2005. Microscopic analysis of porous microgranular bovine anorganic bone implanted in rat subcutaneous tissue. *J Appl Oral Sci.*13(4):382-6.

Zunino J, M Bengochea, J Johnston, H Deneo, S Hernández,C Servetto, L Taranto, G Ordoqui. 2004. Immunologic and osteogeneic properties of xenogeneic and allogeneic demineralized bone transplants. *Cell and Tissue Banking.* 5:141-148.

8. AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo incondicional en mi sueño de convertirme en Médico Veterinario. Por nunca desistir a pesar de las dificultades, por estar a mi lado siempre para darme ánimo, fuerza y valor. Gracias a mi querida abuela, a quién le debo tantas cosas y que incluso ahora desde el cielo me guía y apoya como siempre lo hizo.

Al doctor Leonel Cardona, profesor patrocinante de mi memoria de título y gran maestro. Gracias por su apoyo, sus enseñanzas, su paciencia y su amistad. En él logré ver un modelo a seguir en el arte de la cirugía ortopédica veterinaria, me mostró la importancia del trabajo en equipo y otras muchas cosas que me serán de gran ayuda en mi desempeño como profesional y también en el ámbito personal.

A los docentes y funcionarios del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Austral de Chile que con su apoyo, ayuda y simpatía hicieron que cada día mi estadía en el HOVE fuera algo especial. Gracias Dr. Mieres, Dr. Ojeda, Dr. Thibaut, don José, don Helio y Erica. Y muy especialmente, gracias Goñi.

A los docentes y funcionarios del Instituto de Inmunología, en especial al Dr. Gabriel Morán, por su fundamental ayuda en la realización de mi investigación.

A mis grandes amigos, Jaime Ojeda, Marcelo Gómez y Paola Oyarzún, y a muchos otros que aportaron en mi formación como veterinaria y me ayudaron a ser una mejor persona. Gracias por su cariño, sabios consejos y compañía.

Al Dr. J. Sebastián Galecio y al Dr. Alexander Ortloff, quienes me brindaron su ayuda en diferentes ámbitos de mi investigación, y en quienes encontré grandes amigos. Alex, Sebas.....gracias.

“ A mis padres, que en su vida juntos me dieron las alas y en sus vidas separadas me enseñaron a volar”