



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE
MATERIALES

**OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO
ACELULAR PARA SUBSTITUCIÓN
DE TRÁQUEA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS E INGENIERÍA DE
MATERIALES**

PRESENTA:

ING. DAVID MAURICIO GIRALDO GOMEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. MARIA CRISTINA PIÑA BARBA

MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A DIOS por haberme permitido llegar a este punto de mi vida, por haberme dado la oportunidad de vivir en México esta gran aventura llamada Maestría, a mi madre por ser todo para mí y hacerme todo lo que soy, a mi hermanita por estar siempre a mi lado, las AMO

AGRADECIMIENTOS

Al culminar este trabajo, también termina una etapa de mi vida, por esto es preciso agradecer a quienes de alguna manera hicieron posible que hoy haya llegado a feliz término toda esta gran aventura que emprendí hace dos años para obtener mi grado de Maestro en Ciencias e Ingeniería de Materiales, en una de las mejores universidades de América y la máxima casa de estudios de México, lo que hace que no solo yo me sienta orgulloso, sino quienes han estado a mi lado de corazón.

En primer lugar quiero agradecer una vez más a quien nunca me cansaré de agradecer; a mi Madre por su inmenso amor y cariño, por ser todo para mí, por enseñarme a ser quien soy, por guiarme y mostrarme siempre el mejor camino, por estar siempre a mi lado, por enseñarme que no son los golpes ni las caídas lo que hacen fracasar a alguien; sino su falta de voluntad para seguir adelante. Gracias por todo MAMI.

A mi hermanita por ser siempre mi cómplice, mi mejor amiga, la otra mitad de mi vida, por las aventuras vividas, por las peleas, porque de ellas también aprendí, por estar a mi lado aunque fuere de corazón, a la distancia, por toda nuestra vida manita, que hoy se resume en veintitantos años que seguirán siendo tan fabulosos como lo han sido; hasta que estemos ancianitos manita.

A la Dra. María Cristina Piña por ser mi mentora, mi guía en este trabajo; por ayudarme,

guiarme y enriquecerlo con sus invaluable aportes de experiencia y sabiduría, por darme la libertad de experimentar, de equivocarme en el aprender de la ciencia, esa ciencia que se compone de errores, que a su vez, son los pasos hacia la verdad.

A todos los buenos profesores que tuve a lo largo de mi maestría quienes supieron con sus enseñanzas aportar a mi desarrollo académico e incluso personal.

Un agradecimiento especial, a ti Lilus porque aunque no estuviste desde un principio en este trabajo tu ayuda, aporte y apoyo fueron fundamentales para llevarlo a feliz término.

A todos mis verdaderos y grandes amigos, a los que siempre han estado a los del alma, a los del Cole, a mis Univallunos del alma, a los que empezaron conmigo esta aventura, a quienes se unieron en el camino y quienes alguna vez estuvieron y hoy ya no están, pero siguen de corazón, gracias Clau, Johans, Vane, Carito y Aldo, Ali, Willi, Esteban, Diana, Soni, Carlos, Malu, Coste, Paisa, a todos muchachos no sólo por las chelas, sino por todo, gracias.

A mis compañeros del laboratorio de Biomateriales, que más que compañeros de trabajo se convirtieron en compañeros de lucha, de quienes aprendí mucho, además de hacer más amenos esos momentos en el laboratorio y fuera de él, por sus aportes, ayuda y colaboración para con este trabajo, gracias Karlita, Rodrigo, Ismael, Caro Jr, Naye, Benja, Zule, Caro, Dani y Gerardo.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (CVU/Becario: 332801/235241) para poder llevar a cabo mis estudios de maestría en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el soporte económico mediante el proyecto IT104011-3.

A cada una de las personas e instituciones que sin su apoyo no hubiese sido posible este trabajo, como el Dr. Fernando Villegas y su equipo de trabajo del departamento de Cirugía de la UNAM por su apoyo técnico y económico a lo largo de toda la investigación, al Dr. Omar

Novelo y el Biol. Armando Zepeda y su equipo de trabajo por el apoyo técnico con las imágenes de Microscopia electrónica de barrido, a la Dra. Avelina Sotres Vega por toda la colaboración en este trabajo y la Histopatologa Ericka Peña del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) por su apoyo técnico con la histología, a la Dra. Lizeth Fuentes y Annia Lopez de la unidad de investigación en el Hosp. Gral. Manuel Gea Gonzales por su apoyo con la electroforesis. Al Dr. David Garciadego Cazares del laboratorio de ingeniería de tejidos en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) por su apoyo en la espectrofotometría. Al Ing. Esteban Fregoso por la ayuda técnica en las pruebas de análisis térmico. Y a todas las personas que de alguna forma colaboraron con este trabajo.

A la prestigiosa Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones en Materiales por darme y ofrecerme todo para lograr esta gran meta en mi vida, por lo que hoy me siento orgulloso de poder decir que soy Puma y que haré todo lo posible por dejar su nombre en alto a donde quiera que vaya.

GRACIAS.... TOTALES UNAM

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.
CD. UNIVERSITARIA, DICIEMBRE 2011

David M. Giraldo Gomez

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
OBJETIVO Y METAS	XV
1 TRÁQUEA	17
1.1 Anatomía	17
1.2 Fisiología	18
1.3 Histología	19
1.4 Cartílago traqueal	20
1.5 Colágena tipo II como material constitutivo del cartílago	22
1.5.1 Proteínas, su estructura y función	22
1.5.2 Aminoácidos	22
1.5.3 Colágena	23
1.6 Patología traqueal	26
1.7 Ingeniería de tejidos	30
1.7.1 Matriz extracelular como biomaterial	30
1.8 Adhesión celular, union célula-matriz extracelular	32
1.8.1 Las integrinas	32
1.8.2 Las integrinas son heterodímeros transmembrana	33

1.8.3	Las integrinas pueden interactuar con el citoesqueleto para unir las células a la matriz extracelular	34
1.9	Las Moléculas MHC	35
1.9.1	Existen dos clases principales de moléculas MHC	36
1.10	Descelularización de matrices	37
2	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN, FUNDAMENTOS TEÓRICOS	39
2.1	Histología	39
2.1.1	Pasos de la técnica histológica	40
2.2	Microscopía electrónica de barrido	43
2.3	Espectrofotometría de absorción molecular	46
2.4	Electroforesis en gel de poliacrilamida	47
2.4.1	Equipo y mecanismo de formación del gel	48
2.4.2	Tamaño de poro de gel de poliacrilamida	49
2.4.3	Condiciones de electroforesis	51
2.4.4	Sistemas de electroforesis	51
2.5	Calorimetría diferencial de barrido	52
2.6	Análisis termogravimétrico	55
2.6.1	Instrumentación	56
2.6.2	Generalidades	56
3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	58
3.1	Procesos de Descelularización	58
3.1.1	Lavado “ <i>DNasa</i> ”	60
3.1.2	Lavado “ <i>EDTA</i> ”	61
3.1.3	Lavado “ <i>Tripsina</i> ”	62
3.2	Caracterización	63
3.2.1	Histología	63
3.2.2	Microscopía electrónica de barrido	67
3.2.3	Cuantificación de ADN por espectrofotometría	69
3.2.4	Electroforesis	71

3.2.5	Análisis Térmico	74
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS	76
4.1	Histología	76
4.2	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	82
4.3	Cuantificación de ADN	86
4.4	Electroforesis	88
4.5	Análisis Térmico	91
	CONCLUSIONES	95
	BIBLIOGRAFÍA	97

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Esquema de una Tráquea Normal [6]	17
1.2	Vista endoscópica de la tráquea	18
1.3	Histología traqueal (Tricrómica de Masson, 10X)	20
1.4	Cartilago traqueal(Hematoxilina-Eosina): (a) 10X (b) 40X.	21
1.5	Estructura general de un aminoácido [13]	23
1.6	Esquema de la estructura de colágena. En la parte superior se muestra la disposición en haz de unidades de tropocolágena. Se puede apreciar el escalonamiento de las unidades y los espacios que quedan entre los extremos de esas unidades en cada hilera. Todas las moléculas constitutivas tienen la misma orientación, es decir, sus extremos N-terminales miran hacia el mismo lado. En la parte inferior se esquematiza una sección ampliada de tropocolágena, mostrando la triple hélice. Cada uno de los tres polipéptidos que forman la superhélice tiene una disposición en hélice extendida. [13]	25
1.7	Patologías traqueales: (a) Estenosis (b) Neoplasia (c)Tráquea disecada y referida (d)Resección de los anillos traqueales (e)Puntos separados durante la realización de la anastomosis finalizada (f)Anastomosis traqueal (Imágenes, Departamento Cirugía Experimental, INER) [2]	28
1.8	Diferentes tipos de prótesis y bioprótesis traqueales [2]	29
1.9	Estructura en subunidades de un receptor matriz de superficie celular de tipo integrina [46]	34

1.10	Importancia del citoesqueleto en la adhesión celular: este dibujo ilustra la razón por la cual las moléculas de adhesión celular han de unirse al citoesqueleto para poder mediar una fuerte adhesión célula-matriz. En realidad, muchas de las proteínas de adhesión pueden ser expulsadas de la célula junto con fragmentos de la membrana adheridos, los agujeros dejados en la membrana se vuelven a cerrar al instante.[46]	35
1.11	Moléculas MHC de clase I y II respectivamente. [46]	36
2.1	Esquema de los componentes de un SEM. [14]	44
2.2	señales emitidas durante el escaneo de la muestra por SEM. [14]	45
2.3	Equipo de electroforesis para proteína	49
2.4	Reacción de polimerización de la poliacrilamida	50
2.5	Sistema discontinuo SDS-PAGE	52
2.6	Curva de capacidad calorífica Vs Temperatura [14].	54
2.7	componentes de una termobalanza: A, brazo; B, copa y soporte de la muestra; C, contrapeso; D, lámpara y fotodiodos; E, bobina; F, imán; G, control del amplificador; H, calculador de la tara; I, amplificador; J, registro [29].	56
3.1	Técnica quirúrgica: (a) preparación del donante, (b) aplicación de vaso constrictor, (c) extirpación del segmento traqueal, (d) fraccionamiento de la tráquea . .	59
3.2	Proceso de lavado enzimático “ <i>DNasa</i> ”	61
3.3	Proceso de lavado enzimático “ <i>EDTA</i> ”	62
3.4	Proceso de lavado enzimático “ <i>Tripsina</i> ”	63
3.5	Histokinete usado para deshidratar las muestras	65
3.6	Microtomo de rotación	65
3.7	Proceso de desparafinado, tinción y montaje	66
3.8	Deshidratación (a) muestras y alcoholes, (b) inmersión de las muestras en los alcoholes	68
3.9	Equipo de secado por punto crítico (a) cámara e intercambiador, (b) cámara . .	68
3.10	Equipo de deposición de oro (a) Equipo de deposición asistida por plasma, (b) plasma generado durante la deposición	69

3.11 Espectrofotómetro GeneQuant [®] . usado para cuantificar ADN	70
3.12 Procedimiento de preparación de la muestra	73
3.13 Procedimiento de carga de muestras y corrida.	74
3.14 Proceso de obtención de muestras para análisis térmico	75
4.1 Tráquea control HE 2,5X	77
4.2 Comparación de tratamientos mediante histología (H-E) : (a) Control. (b) DNasa. (c) EDTA (d)Trispsina	78
4.3 promedio de condrocitos sin núcleo encontradas mediante histología	80
4.4 Reacción de quelación con EDTA	81
4.5 Reacción de hidrolisis enzimática catalizada por Tripsina	81
4.6 Micrografías SEM de tráquea: (a) panorámica lagunas y condrocitos. (b) Con- drocito. (c) Cilios (d) hematocitos contenidos en el tejido fibroconectivo	83
4.7 Micrografías de la muestra DNasa. (a) Cartílago con tejido fibroconectivo (b) lagunas de cartílago	84
4.8 Micrografías de la muestra EDTA. (a) Cartílago (b) lagunas de cartílago	85
4.9 Micrografías de la muestra Tripsina. (a) Cartílago (b) lagunas de cartílago	86
4.10 Reacción de hidrolisis enzimática del ADN catalizada por la DNasa-1	88
4.11 Curva patrón cuantificación de proteínas	88
4.12 Patrón de SDS-PAGE electroforesis (M) Marcador <i>SeeBlue</i> [®] Plus2 Pre-Stained Standard - <i>Invitrogen</i> [®] (D) tratamiento “ <i>DNasa</i> ” (E) tratamiento “ <i>EDTA</i> ” (T) tratamiento “ <i>Tripsina</i> ” (CTR) <i>Control</i>	90
4.13 Perfil de calorimetría diferencial de barrido de las muestras + control	92
4.14 Perfil de termogravimetría de las muestras + control	94

ÍNDICE DE TABLAS

3.1	Curva patrón de BSA para determinación de proteínas totales	71
3.2	Calculo de volumen de carga	73
4.1	Cuantificación de ADN	87
4.2	Cuantificación de Proteínas	89

INTRODUCCIÓN

La tráquea (del griego *τραχὺς trakhys*; “áspero, rugoso”) es un órgano del aparato respiratorio de carácter cartilaginoso y membranoso que va desde la laringe a los bronquios. Su función es brindar una vía abierta al aire inhalado y exhalado desde los pulmones[1], desde el punto de vista histológico, está integrada por anillos de cartílago interconectados entre sí, que constituyen la estructura de soporte y mantienen la permeabilidad de la luz. Fundamentalmente, existen diferentes alteraciones traqueales relacionadas con la función del cartílago, tales como, estenosis (disminución de la luz) tumores (crecimiento de tejido impropio) y malacias (reblandecimiento del cartílago). Estas alteraciones, son capaces de provocar en el paciente, un colapso dinámico con obstrucción de la vía aérea e insuficiencia respiratoria[2, 3].

El tratamiento de elección para los pacientes que presentan este tipo de patología, consiste en reseca de manera definitiva el segmento traqueal dañado, sin embargo, es importante mencionar que este procedimiento, es útil exclusivamente para la reparación de defectos traqueales con una longitud máxima de 7cm, lo que excluye a los pacientes portadores de lesiones con mayor extensión, en los que es necesario entonces, tratar de paliar la insuficiencia respiratoria ocasionada por obstrucción de la vía aérea, empleando procedimientos recurrentes y no definitivos, como traqueostomías, aplicación de rayo láser, dilataciones traqueales o colocación de diferentes tipos de "stents"[2]

Actualmente, no existen estrategias quirúrgicas definitivas para la reparación de lesiones

traqueales mayores de 7 cm, a pesar de numerosos intentos realizados con prótesis sintéticas, tejidos autólogos y trasplante traqueal, sin embargo, con ninguna de estas alternativas ha sido posible realizar una reconstrucción funcional, ya que con todas ellas se generan complicaciones como: devascularización, estenosis, necrosis, dehiscencia (ruptura de la sutura), reacciones inmunológicas y la formación de tejido de granulación, lo que demanda la búsqueda de una estrategia definitiva para los pacientes portadores de extensas lesiones en los que no existe la posibilidad de realizar una resección traqueal y debe de resolverse la insuficiencia respiratoria que les provoca fatales complicaciones funcionales e infecciosas. [2, 3]

Para dar solución a este tipo de problemas relacionados con alteraciones en la integridad y función de órganos y tejidos, actualmente, se ha venido incursionando en un campo de la investigación que implica la colaboración de diferentes ramas y disciplinas como es la Ingeniería de tejidos, también conocida como medicina regenerativa, ésta, es la rama de la bioingeniería que se sirve de la combinación de células, métodos de ingeniería de materiales, bioquímica y fisicoquímica para mejorar o reemplazar funciones biológicas. Dicha especialidad aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida a la fabricación de substitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano. De naturaleza eminentemente interdisciplinaria, la ingeniería de tejidos incluye conceptos de ramas tan diversas como la biología celular, la microfabricación, la robótica y la ciencia de los materiales en el diseño de partes para el reemplazo en el cuerpo humano.[5]

En el diseño y tratamiento por medio de ingeniería de tejidos, uno de los principales objetivos radica en la obtención del material sobre el cual se lleva a cabo la regeneración del tejido u órgano a reparar, bien sea, con el uso de células o sin ellas, a dicho material, se le denomina andamio o “*scaffold*”, ya que este sirve como soporte para reemplazar el tejido dañado y es sobre el cual se guía la reparación y recuperación del mismo, en el caso específico de la tráquea es el cartílago su principal componente, y a su vez, la colágena, es la proteína que se establece como matriz extracelular y primordial agente constitutivo del tejido cartilaginoso.[5]

OBJETIVO Y METAS

Objetivo

El objetivo fundamental de este trabajo, es obtener una matriz acelular de cartílago que tenga las características adecuadas para substituir tejido traqueal, por medio de la evaluación de diferentes métodos de lavados, principalmente de carácter enzimático para obtener un implante de tipo heterólogo, que pueda ser usado como un andamio acelular para la regeneración y/o recuperación del tejido traqueal, de modo que pueda servir como alternativa para aquellos pacientes que presentan lesiones traqueales en los que la resección no es una alternativa viable .

Metas

- Establecer un mejor tratamiento para descelularizar matrices de cartílago de acuerdo a los procedimientos previos reportados en la literatura.
- Comprobar el decremento en el número de células mediante técnicas de tinción histológica (microscopía óptica), microscopía electrónica de barrido y espectrofotometría de absorción.
- Determinar alteraciones en la matriz debidas al proceso, mediante caracterización fisico-química del material obtenido, a través de microscopía óptica, microscopía electrónica de

barrido, electroforesis, calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría.

TRÁQUEA

1.1. Anatomía

La tráquea es la parte de las vías respiratorias que se halla comprendida entre el límite inferior de la laringe (2 cm por debajo de las cuerdas vocales) y la Carina o bifurcación que da origen a los bronquios principales, a nivel de la cuarta o quinta vértebra dorsal (Fig. 1.1). Su función es brindar una vía abierta al aire inhalado y exhalado desde los pulmones. [6].

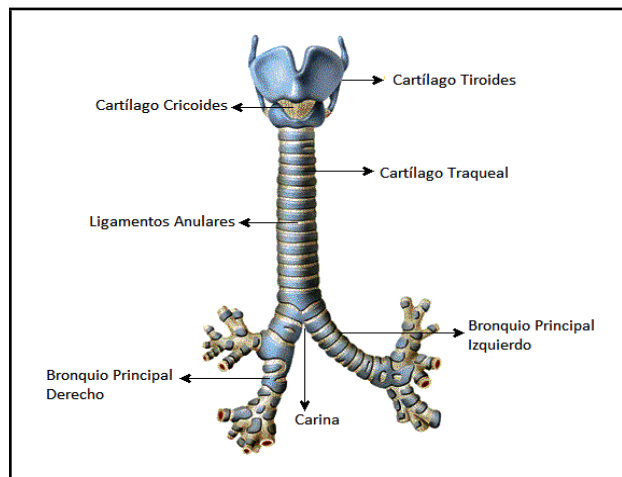


Figura 1.1: Esquema de una Tráquea Normal [6]

La longitud normal de la tráquea es de 10-13 cm y aumenta hasta 2 cm con una inspiración profunda. Ocupa un área de 250-350 mm² y un volumen de 30-40 mm³ a una capacidad pulmonar total (TLC). La pared de la tráquea es de 2-3 mm y su diámetro total normal de 15-25 mm; en los hombres aumenta hasta un 10 % durante la inspiración profunda[6].

La tráquea está formada por anillos de cartílago en forma de “C”, incluidos dentro de tejido muscular liso a intervalos regulares e incompletos por la parte posterior en donde se unen a través de una membrana elástica a la que se denomina porción membranosa de la tráquea (Fig. 1.2). Cada anillo de cartílago se conecta al anillo adyacente por tejido conectivo fibroelástico. El cartílago cricoides de la laringe que surge con el primer anillo traqueal, es el único anillo cartilaginoso completo [2, 3, 7, 8].



Figura 1.2: Vista endoscópica de la tráquea
(Imagen, Departamento Cirugía Experimental, INER) [2]

1.2. Fisiología

La tráquea es una vía aérea de conducción. Las fibras elásticas longitudinales permiten el descenso traqueal en la inspiración y junto con los pedículos pulmonares su elasticidad ayuda a la retracción pulmonar durante la espiración [2, 3, 9] .

La tráquea participa en la conducción, en el acondicionamiento (calentamiento, humidi-

ficación) y en la depuración del aire inspirado ya sea por la nariz o boca hacia las zonas de intercambio gaseoso, posee función mucociliar, interviene en la protección de las vías respiratorias bajas y en el proceso de fonación, es decir el trabajo muscular realizado para emitir sonidos inteligibles para que exista la comunicación oral [2, 3, 9].

1.3. Histología

La tráquea está revestida internamente por epitelio respiratorio que deriva del endodermo. La pared de la tráquea se compone de cuatro capas: (de adentro hacia afuera): 1)La mucosa, (epitelio pseudestratificado ciliado y una lámina propia fibroelástica), 2)La submucosa (tejido conectivo), 3) Los cartílagos hialinos y 4)la adventicia (tejido conjuntivo laxo) (Fig. 1.3) [2, 3, 10].

La mucosa está formada por epitelio pseudoestratificado ciliado que tiene como función actuar como una barrera protectora, ya que produce moco, que filtra y remueve a través de los cilios las partículas atrapadas en él hacia la parte proximal de la tráquea, además de una lámina propia de tejido conjuntivo laxo compuesta principalmente de fibras elásticas. La submucosa, separada de la mucosa por una membrana elástica, está integrada por una capa de fibras elásticas entremezcladas con abundantes fibras de colágena. La capa submucosa termina en donde las fibras del tejido conectivo se mezclan con el pericondrio de la capa cartilaginosa (Fig. 1.3) [2, 3, 10].

El cartílago traqueal es de tipo hialino está revestido por pericondrio que se extiende en forma de un tejido conectivo fibroso que une a los cartílagos entre sí y cuya función es proporcionar estabilidad a la tráquea. La brecha entre los extremos libres de los cartílagos en la parte posterior de la tráquea y adyacente al esófago, está cubierta por tejido fibroelástico y musculatura lisa. Las glándulas son especialmente abundantes en la brecha libre del cartílago de la porción posterior de la tráquea, algunas atraviesan la capa muscular en este sitio, por lo que también forman parte de la adventicia. Los anillos de cartílago y el músculo traqueal separan a la submucosa de la adventicia. La adventicia es la cubierta externa de la tráquea y

se encuentra formada por tejido conectivo laxo y su función es unir a la tráquea con los tejidos adyacentes del cuello y el mediastino y es periférica a los anillos cartilagosos y al músculo traqueal [2, 3, 10].

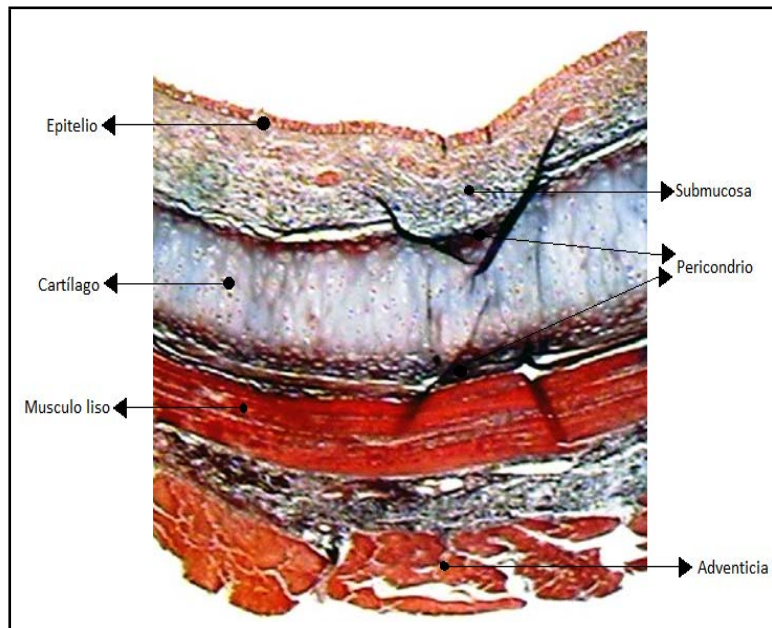


Figura 1.3: Histología traqueal (Tricrómica de Masson, 10X)
(Imagen, Departamento Cirugía Experimental, INER) [2]

1.4. Cartílago traqueal

El tejido cartilaginoso es una modalidad especializada del tejido conjuntivo de consistencia firme que carece de vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. El cartílago traqueal (Fig.1.4a) es de tipo hialino, se encuentra cubierto por una capa de tejido conjuntivo denso denominado pericondrio responsable del aporte sanguíneo y la eliminación de los restos metabólicos [2, 3, 10].

El cartílago está integrado por células denominadas condrocitos y por el material extracelular que constituye la matriz. La matriz extracelular es un gel formado por macromoléculas de proteoglicanos y glicoproteínas estructurales que rellena el espacio entre las células y las fi-

bras del tejido conjuntivo [10]. Los condrocitos renuevan las macromoléculas de la matriz del cartilago, sintetizan colágena tipo II, proteoglicanos y condronectina [2, 10, 11].

Las cavidades de la matriz ocupadas por los condrocitos reciben el nombre de “lagunas”. Una laguna puede contener uno o más condrocitos. En la periferia del cartilago hialino, los condrocitos presentan una forma alargada con su eje mayor paralelo a la superficie mientras que en la parte central, son más redondeados y aparecen en grupos isógenos de hasta ocho células que se originan en un único condroblasto (Fig. 1.4b) [2, 10].

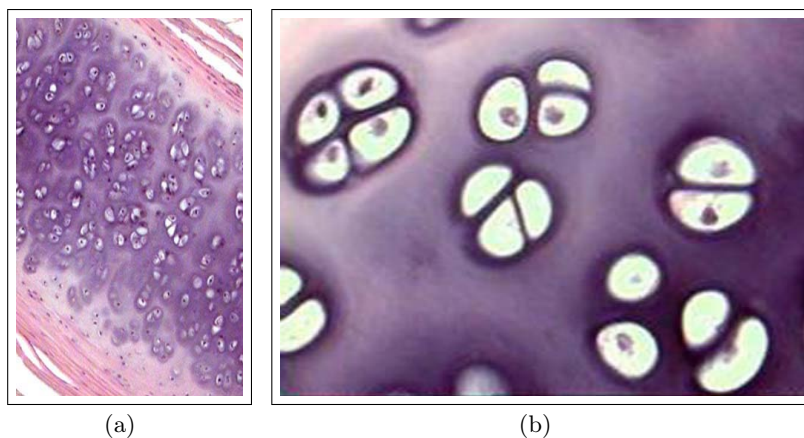


Figura 1.4: Cartilago traqueal(Hematoxilina-Eosina): (a) 10X (b) 40X.
(Imagen, Departamento Cirugía Experimental, INER) [2]

La consistencia firme del cartilago se atribuye a las uniones covalentes de los glucosaminoglicanos sulfatados que forman parte de los proteoglicanos, los cuales interactúan con las fibras de colágena y con las moléculas de agua unidas a los grupos sulfato de éstos mismos glucosaminoglicanos. Esto mantiene la rigidez de la matriz extracelular, le da resistencia a la deformación y le confiere plasticidad al tejido. La cualidad mecánica fundamental de los proteoglicanos es proporcionar una alta compresión hidrostática interna al cartilago, que es semejante a la de un amortiguador [10]. En el cartilago, la mayor parte de los proteoglicanos interactúan específicamente con el ácido hialurónico y forman estructuras agregadas que intervienen en las interacciones entre los condrocitos y entre éstos con la matriz extracelular [10].

La condronectina es la proteína responsable de la adherencia entre las células, las fibras y las macromoléculas de matriz extracelular con los condrocitos [2, 10].

Los anillos de cartílago estructuran el soporte para las paredes anterior y lateral de la tráquea, le confieren rigidez al mismo tiempo que le permiten los movimientos de flexión, extensión y torsión, mantienen la permeabilidad de la luz durante la respiración forzada, durante la espiración y cuando se presentan accesos de tos. La pérdida del apoyo cartilaginoso permite el colapso dinámico y obstrucción de las vías respiratorias [2, 3, 12].

1.5. Colágena tipo II como material constitutivo del cartílago

Queda claro que el principal elemento de la tráquea es el cartílago, el cual a su vez se estructura de colágena, entre otros elementos constitutivos, es por esto que se hace necesario comprender a fondo las características, estructura y función de dicha proteína.

1.5.1. Proteínas, su estructura y función

Las proteínas, son moléculas importantes constituyentes de los seres vivos. En los vertebrados, las proteínas son los compuestos orgánicos más abundantes, pues representan alrededor del 50 % del peso seco de los tejidos [13].

1.5.2. Aminoácidos

Los aminoácidos son las unidades estructurales básicas de las proteínas. Un α -aminoácido consta de un grupo amínico, un grupo carboxílico, un átomo de hidrógeno y un grupo distintivo, R, todos ellos unidos al átomo de carbono- α . Este átomo de carbono se denomina α porque es adyacente al grupo carboxilo (Fig 1.5). El grupo R se menciona como cadena lateral [13].

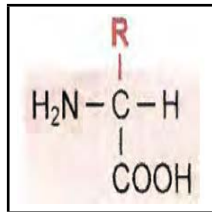


Figura 1.5: Estructura general de un aminoácido [13]

Los aminoácidos en disolución, a un pH neutro, son predominantemente iones dipolares (zwitteriones) en vez de moléculas no iónicas. En la forma dipolar, el grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) está protonizado y el grupo carboxilo está disociado ($-\text{COO}^-$). El estado de ionización de un aminoácido varía con el pH. En disolución ácida, el grupo carboxilo no está ionizado ($-\text{COOH}$) y el grupo amino está ionizado ($-\text{NH}_2^-$) [13].

En el caso de la colágena, ésta se encuentra constituida por una serie repetida de aminoácidos, el más sencillo de ellos y de todos los aminoácidos que componen las proteínas es la *glicina*, cuya cadena lateral está formada por un átomo de hidrógeno [13].

La *Prolina*, otro de los aminoácidos que compone la colágena tiene también una cadena lateral de cadena alifática pero difiere de otros miembros de este tipo de aminoácidos en que esta cadena lateral está unida tanto al nitrógeno como al carbono alfa. La estructura cíclica resultante influye notablemente en la arquitectura de la proteína. La prolina, situada con frecuencia en los codos de las cadenas proteicas dobladas, es hidrofílica, es decir no tiene aversión a quedar expuesta al agua [13].

1.5.3. Colágena

Es la proteína más abundante en los mamíferos. La colágena es una proteína fibrosa, componente principal de la piel, hueso, tendones, cartílago y dientes. Esta proteína extracelular contiene tres cadenas polipéptidicas helicoidales, de unos 1000 residuos de longitud [13].

La colágena es insoluble en agua y difícil de digerir por enzimas del tracto gastrointesti-

nal, sin embargo una vez sometida a agua en ebullición se transforma en gelatina, soluble y digerible [13].

La estructura primaria de la colágena es muy singular. Posee una elevada proporción de restos de glicina y prolina: uno de cada tres residuos en su secuencia es glicina y uno de cada cuatro es prolina. La molécula está conformada principalmente por glicina aproximadamente en un 33 %, prolina 12 %, hidroxiprolina 9 %, así como por lisina e hidroxilisina, es por ello que la secuencia de esta proteína está formada principalmente por la unidad repetitiva Gly-Pro-Y y Gly-X-Hyp, donde X y Y son cualquier aminoácido [14, 15].

Las cadenas polipeptídicas de la colágena, debido a su estructura primaria tan rica en prolina e hidroxiprolina, no pueden formar hélices α . El núcleo pirrolidina impone a la cadena disposiciones incompatibles con la hélice α . En la colágena se forma en cambio una hélice más extendida que la α , enrollada hacia la izquierda (hélice levógira), con tres residuos por vuelta. Este tipo de hélice es una estructura secundaria casi exclusiva de esta proteína [13].

Tres cadenas polipeptídicas así enrolladas se asocian para formar una superhélice. Las tres hélices se envuelven a su vez apretadamente sobre un eje central, de manera similar a las hebras componentes de una soga (Fig 1.6). Las cadenas se interconectan y se mantienen unidas mediante puentes de hidrógeno. [13].

Como la glicina es un aminoácido muy pequeño (R=H), puede acomodarse hacia el interior de la superhélice sin estorbar la aproximación de las cadenas. Los restos más voluminosos de otros aminoácidos se proyectan hacia el exterior. No se forman puentes disulfuro porque prácticamente no existen cisteínas [13].

La triple hélice forma una unidad estructural llamada *tropocolágena*, bastoncillo de 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro. Cada una de las tres cadenas integrantes de esta unidad está formada por unos 1000 residuos aminoacídicos [13].

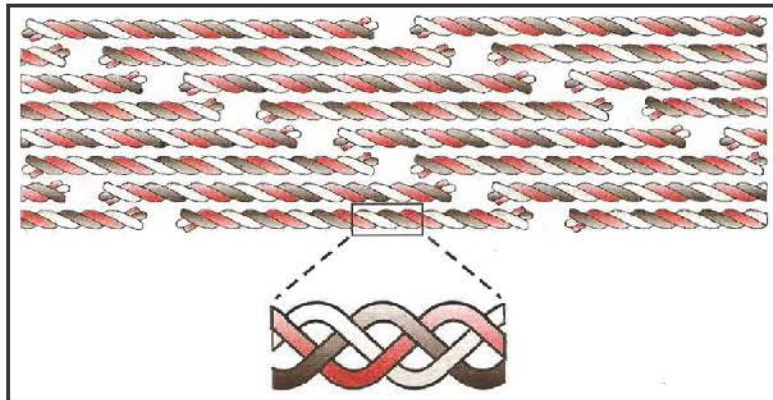


Figura 1.6: Esquema de la estructura de colágena. En la parte superior se muestra la disposición en haz de unidades de tropocolágena. Se puede apreciar el escalonamiento de las unidades y los espacios que quedan entre los extremos de esas unidades en cada hilera. Todas las moléculas constitutivas tienen la misma orientación, es decir, sus extremos N-terminales miran hacia el mismo lado. En la parte inferior se esquematiza una sección ampliada de tropocolágena, mostrando la triple hélice. Cada uno de los tres polipéptidos que forman la superhélice tiene una disposición en hélice extendida. [13]

Aunque todas las cadenas polipeptídicas de la colágena presentan características similares, existen distintas variedades que difieren entre sí en estructura primaria. De acuerdo con las cadenas participantes en la composición de la superhélice se han identificado diversos tipos de colágena [13].

En el caso de la colágena tipo II por ejemplo está constituida por tres cadenas denominadas $\alpha 1(\text{II})$. Son tres cadenas iguales, entrelazadas, donde lo característico es que presenta más, hidroxilisina y lisina que en la colágena tipo I, además de que forma fibrillas más cortas 10-20nm de longitud [16].

La característica primordial de la cadena $\alpha 1(\text{II})$, es el alto grado de similitud estructural con la cadena $\alpha 1(\text{I})$, una de las dos cadenas que componen la colágena tipo I. Sin embargo, algunos estudios sugieren que puede haber al menos dos diferentes cadenas que originalmente han sido designadas como $\alpha 1(\text{II})$. Por lo tanto, existe la clara posibilidad de que exista más de una especie en la población de moléculas actualmente conocida como el colágeno tipo II [16].

Las unidades de tropocolágena se disponen en hileras y estas a su vez se empaquetan en

haces que constituyen fibrillas. Todas las unidades de tropocolágena en una fibrilla tienen igual orientación, esto es, las “cabezas”(extremos N-terminales de las cadenas polipeptídicas) están dirigidas hacia el mismo lado. Las unidades que forman una hilera no entran en contacto directo, “cabeza a cola”; dejan un espacio entre sí (Fig 1.6) [13].

Cada segmento de tropocolágena en una hilera está desplazado con respecto al segmento de la hilera adyacente en aproximadamente un cuarto de la longitud de la unidad. Este desplazamiento se mantiene con gran regularidad en todas las filas y es responsable de las estriaciones que presentan las fibrillas colágenas cuando se las observa al microscopio electrónico [13].

Las tropocolágenas de hileras adyacentes establecen uniones mediante un tipo especial de enlace entre cadenas laterales de dos restos lisina o hidroxilisina. Estos enlaces cruzados entre lisinas otorgan al conjunto una mayor resistencia física. La resistencia de la colágena a la tracción es realmente enorme; se calcula que una fibra de 1mm de diámetro puede soportar un peso de 10kg [13].

1.6. Patología traqueal

Desde mediados del siglo veinte, se ha realizado investigación clínica-quirúrgica para resolver diferentes tipos de patología traqueal, desafortunadamente, hasta la fecha, no se cuenta con avances substanciales médico-quirúrgicos que resuelvan lesiones extensas de este órgano. La traqueostomía se practica desde hace muchos años, mientras que las reconstrucciones de tráquea, como parte de la cirugía general de tórax, llevan poco tiempo de realizarse [2, 3, 17, 18]. El pensamiento que se tenía de que “el cartilago traqueal difícilmente cicatrizaba y que la máxima extensión, que se podía reseca de la tráquea eran dos o tres anillos”, originó que se incrementara la investigación quirúrgica para resolver, traqueopatías con extensiones mayores a dos centímetros. El pionero en la búsqueda de soluciones para esta patología es el Dr. Hermes C. Grillo, quien ideó diferentes procedimientos quirúrgicos, para poder reseca más de “dos o tres anillos” (2.1 anillos por centímetro) logrando buenos resultados en extirpaciones de 4 cm [3, 19, 20]. En México, en 1954, Pacheco y cols., publicaron un trabajo de alotransplante

traqueal “fresco” en el que describen la destrucción y fibrosis del injerto [2, 21].

El tratamiento de elección para diferentes alteraciones traqueales como estenosis (Fig. 1.7a), malacias, neoplasmas (Fig. 1.7b) y malformaciones congénitas entre otras, incluye una resección quirúrgica con anastomosis término-terminal, es decir un procedimiento mediante el cual se extrae el segmento que presenta el problema y se unen nuevamente los segmentos resultantes (Fig 1.7e-f), sin embargo, este procedimiento presenta dos inconvenientes importantes: 1) frecuentemente está obstaculizado por la falta de tejido sano y 2) es útil exclusivamente en reparaciones que comprometen menos de la mitad de la longitud de la tráquea en adultos y hasta la tercera parte de la longitud traqueal en niños, con lo que la aplicación de este procedimiento se limita a la reconstrucción de segmentos traqueales con una extensión entre 5 y 7 cm. [2, 4, 12].

Así que, por lo extenso de las lesiones traqueales y por no ser posible la anastomosis término-terminal, se idearon “prótesis de diferentes materiales sintéticos”, para sustituir a la tráquea con el objetivo de dar una solución a la insuficiente ventilación que sufren estos pacientes [2, 3, 4]. Actualmente, no existen estrategias quirúrgicas definitivas para la reparación de defectos traqueales mayores de 7 cm, a pesar de que para tratar de reparar la lesión se han utilizado numerosas opciones tanto sintéticas como biológicas (Fig 1.8) que incluyen el uso de prótesis de diferentes materiales (dacrón, silicón, poliuretano, politetrafluoroetileno, propileno y metal), tejidos autólogos (piel, hueso, periostio, pericondrio, músculo, esófago, pericardio, duramadre, intestino delgado; así como el uso de “colgajos” para favorecer la vascularización) [2, 3, 4, 12]. Sin embargo, con ninguna de estas alternativas quirúrgicas ha sido posible realizar una reconstrucción funcional [2, 4, 32, 33, 34], ya que con todas ellas se generan complicaciones como devascularización, estenosis, necrosis, dehiscencia (abertura de la herida suturada), infección, reacciones inmunológicas y la formación de tejido de granulación [2, 4, 31, 35, 36].

Por otro lado autoreparación de lesiones en el cartílago, es difícil, dado su baja capacidad regenerativa y el suministro de sangre en el cartílago. Con el uso de andamios biodegradables y terapias de reemplazo celular, la ingeniería de tejidos se ha convertido en uno de los enfoques

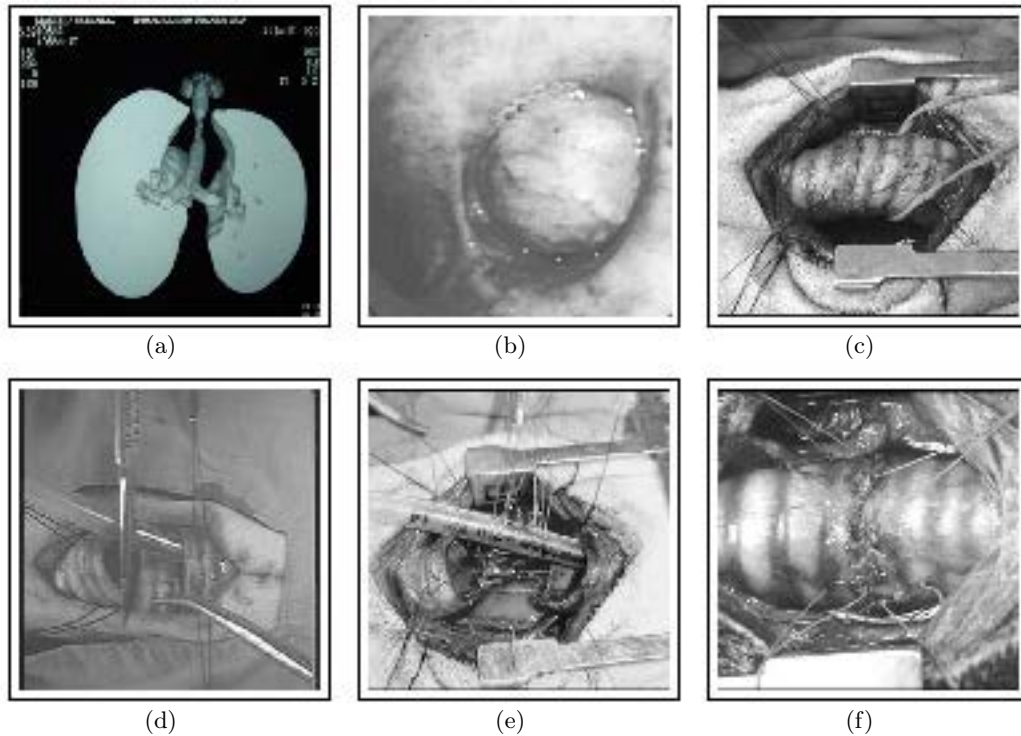


Figura 1.7: Patologías traqueales: (a) Estenosis (b) Neoplasia (c)Tráquea disecada y referida (d)Resección de los anillos traqueales (e)Puntos separados durante la realización de la anastomosis finalizada (f)Anastomosis traqueal (Imágenes, Departamento Cirugía Experimental, INER) [2]

prometedores para la regeneración de cartílago [37, 38, 39, 40]. Los andamios proveen una estructura en tres dimensiones, para el crecimiento de las células mientras mantienen su función de diferenciación. Numerosos materiales biodegradables y bioreabsorbibles como Acido Poliláctico (PLA), Acido Poliglicólico (PGA), Colágena tipo I, y matrices acelulares o descelularizadas de cartílago, han sido utilizados para ingeniería de cartílago [38, 41, 42]. Entre estos, las matrices de cartílago acelular, los cuales contienen los ingredientes naturales del cartílago, han mostrado buena biocompatibilidad para el crecimiento de condrocitos [43]. Teóricamente, estas matrices pueden ser el andamio ideal para la reconstrucción, reparación y sustitución del cartílago (ingeniería de cartílago) [44].

Sin embargo, las matrices acelulares de cartílago no han sido ampliamente usadas, debido a su estructura única. Se conoce que el cartílago es un tejido compacto, en el cual es difícil

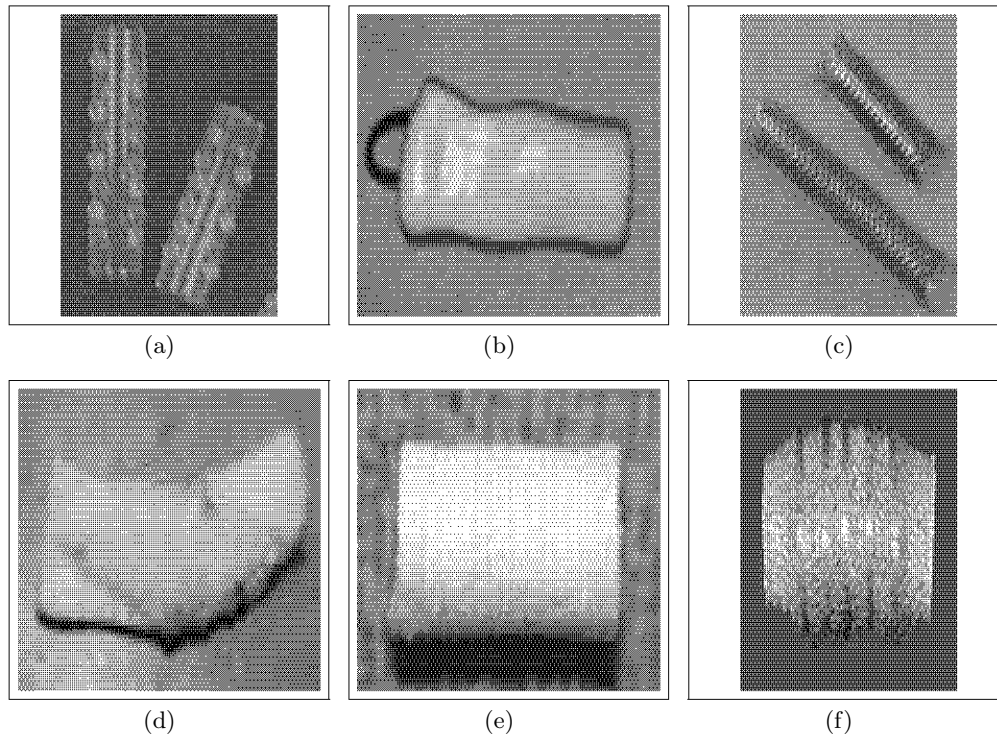


Figura 1.8: Diferentes tipos de prótesis y bioprótesis traqueales [2]

remover el componente celular, además, a pesar de que las células pueden ser completamente eliminadas del bloque de cartílago mediante numerosos ciclos de proceso de descelularización, el proceso de repoblar la matriz con condrocitos puede representar un desafío en ocasiones mayor. Para superar estos problemas, Yang y col. rompieron el cartílago en microfragmentos, y reticularon los fragmentos con carbodiimida [45]. Aunque las células, pueden ser removidas mediante este tratamiento, la estructura original y propiedades mecánicas de la matriz son destruidas. Recientemente Macchiarini y col. construyeron una tráquea funcional cultivando células madres meséquimales derivadas de condrocitos en una tráquea descelularizada, para lograr reemplazar un bronquio en un paciente mediante ingeniería de tejidos [37]. Sin embargo, aún existe una gran preocupación, por el destino a largo plazo del implante, debido a que no se proporcionaron datos convincentes para demostrar si las células sembradas migraron hacia el interior del andamio y se diferenciaron en condrocitos o no. Si las células no migraron eficientemente hacia el interior de la matriz descelularizada, la estructura puede llegar a colapsar

al interior del cuerpo debido a la degradación de la matriz [44].

De acuerdo con el estado del arte hasta el momento es posible vislumbrar entonces, que la ingeniería de cartílago tiene un futuro promisorio en las matrices descelularizadas, donde es importante tener en cuenta el espesor de la matriz a tratar, para asegurar la descelularización completa del andamio.

1.7. Ingeniería de tejidos

Esta investigación, tiene como objetivo centrarse en el campo de la medicina regenerativa o ingeniería de tejidos, dentro del cual se encamina hacia la obtención de un material adecuado para la regeneración del órgano o tejido. El desarrollo de las técnicas adecuadas para la obtención de scaffolds es un campo de los biomateriales eminentemente interdisciplinario, este campo aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener, o mejorar alguna función de tejido u órgano. En este sentido los materiales tienen un alto potencial en la ingeniería de tejidos ya que la óptima configuración física y química de nuevos biomateriales y la interacción con células vivientes producen nuevos tejidos artificiales “*tissue-engineered*”. Estos biomateriales pueden ser permanentes o biodegradables, pueden ser naturales, sintéticos, o híbridos, deben ser desarrollados de modo tal que sean compatibles con sistemas vivientes o células vivas in vitro e in vivo. La interface entre células e implante debe ser claramente entendida para que pueda ser optimizada. El diseño de estas características se plantea como el mayor desafío para este campo [5].

1.7.1. Matriz extracelular como biomaterial

Un andamio utilizado en ingeniería de tejidos puede ser considerado como una matriz extracelular (MEC) artificial (*Rosso y col., 2005*). Es bien sabido que una MEC biológica normal, además de contribuir a la integridad mecánica, desempeña importantes funciones de señalización y regulación en el desarrollo, mantenimiento y regeneración de tejidos [5].

Los componentes de la MEC, en sinergia con señales solubles provenientes de los factores de crecimiento y hormonas, participan en el control de la expresión génica de tejidos específicos a través de una variedad de mecanismos de transducción (*Blum y col., 1989; Jones y col., 1993; Juliano y Haskill, 1993; Reid y col., 1981*). Además, la MEC en sí misma es una estructura dinámica la cual es remodelada activamente por las células con las que interactúa (*Behonick y Werb, 2003; Birkedal-Hansen, 1995*). Una importante área futura en la ingeniería de tejidos es el desarrollo de andamios mejorados que reúnan las propiedades biológicas más semejantes a una MEC auténtica (*Lutolf y Hubbell, 2005*) [5]

En este sentido los órganos o tejidos descelularizados pueden servir como fuente de MEC para ingeniería de tejidos. El alto grado de conservación evolutiva de muchos de los componentes de la MEC permite el uso de Xenoinjertos (Injerto de tejido procedente de un donante de una especie diferente a la del receptor a menudo de origen porcino). Varios tipos de matrices extracelulares han sido usadas con éxito en la ingeniería de tejidos en modelos animales como ejemplo de ello tenemos productos que incorporan válvulas descelularizadas de corazón, submucosa de intestino delgado y vejiga urinaria, los cuales han recibido una aprobación por parte de entes regulatorios para uso en pacientes humanos (*Gilbert y col., 2006*). El uso de matrices descelularizadas se plantea como una herramienta viable y válida con tendencia a expandir su uso, debido a que estas retienen el complejo conjunto de moléculas y la estructura tridimensional de una auténtica MEC a diferencia de las alternativas sintéticas como andamiajes de MEC, ya que estos últimos deben ser sintetizados a partir diferentes tipos de materiales los cuales en primera instancia deben cumplir una serie de requisitos para desempeñar una adecuada función de andamiaje, y en segunda instancia no poseen de manera intrínseca los complejos de moléculas que hacen parte de una MEC. A pesar de las múltiples ventajas que presentan las matrices descelularizadas, también existe una gran preocupación por el uso de este tipo de materiales; tales como el potencial antigénico que podría presentar, la posible presencia de agentes infecciosos, variabilidad en las cantidades preparadas y la incapacidad para especificar y caracterizar los componentes bioactivos de dichos materiales.[5]

1.8. Adhesión celular, union célula-matriz extracelular

Es importante entender los mecanismos de adhesión célula-matriz extracelular, y los componentes que intervienen en estos, ya que son un agente crucial en los procesos de descelularización.

En la gran mayoría de los organismos pluricelulares, las células se organizan en conjuntos cooperativos llamados tejidos, que a su vez, se asocian formando grandes unidades funcionales denominadas órganos. Las células contactan, generalmente, con una compleja red de macromoléculas secretadas, denominada matriz extracelular. Esta participa en el mantenimiento de la estructura tisular y en los animales posee una organización reticular mediante la cual las células integrantes de un tejido también se mantienen en su lugar por medio de adhesiones intercelulares. [46]

1.8.1. Las integrinas

Para entender como interacciona la matriz extracelular con las células, es necesario identificar tanto las moléculas de la superficie celular (los receptores de la matriz) que se unen a los diversos componentes de la matriz, como a los propios componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, la unión última a la célula requiere de una proteína transmembrana que una la matriz al citoesqueleto cortical de las células, algunos proteoglicanos con proteínas centrales transmembrana actúan como correceptores para los componentes de la matriz, pero los principales receptores en las células animales para la mayoría de proteínas de la matriz extracelular, incluyendo la colágena, la fibronectina y la laminina, son las **integrinas**, una gran familia de proteínas de unión, transmembrana y homólogas [46].

Las integrinas difieren de los receptores de hormonas de la superficie celular en que se unen a sus ligandos con una afinidad relativamente baja ($K_a = 10^6$ - 10^9 litros/mol) y que habitualmente se presentan con concentraciones a nivel de la superficie celular entre 10 y 100 veces mayores. Esta situación tiene sentido ya que la unión simultánea pero débil a un gran

número de moléculas de la matriz permite a las células explorar su medio sin dejar de unirse a él. Si la unión fuera demasiado fuerte, las células podrían probablemente llegar a pegarse irreversiblemente a la matriz sin poder desplazarse, un problema que no se presenta si la unión depende de múltiples adhesiones débiles [46].

1.8.2. Las integrinas son heterodímeros transmembrana

Las integrinas son receptores de vital importancia debido a que constituyen los mecanismos principales del que disponen las células para unirse a la matriz extracelular y responder a ella.

Las integrinas están constituidas por dos subunidades glucoproteicas transmembrana unidas entre sí no covalentemente, denominadas α y β ; ambas contribuyen a la unión de las células a las proteínas de la matriz (Fig 1.9). Parece que algunas integrinas se unen únicamente a un tipo de macromolécula de la matriz, como fibronectina y laminina. Una subfamilia de integrinas reconoce la secuencia de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) presente en estas y en otras proteínas de la matriz, mientras que otras reconocen otras secuencias o dominios. Una misma molécula de integrina localizada en diferentes tipos celulares puede presentar diferentes afinidades por el ligando, puede especularse que determinados factores adicionales pueden interactuar con las integrinas modulando su actividad [46].

La unión de las integrinas a sus ligandos depende de cationes bivalentes extracelulares (Ca^{2+} o Mg^{2+} , dependiendo de la integrina) lo cual refleja la presencia de tres o cuatro dominios de unión a cationes divalentes en la gran región extracelular de la cadena α . Este tipo de cationes divalentes puede influir tanto la afinidad como la especificidad de la unión de una integrina a sus ligandos [46].

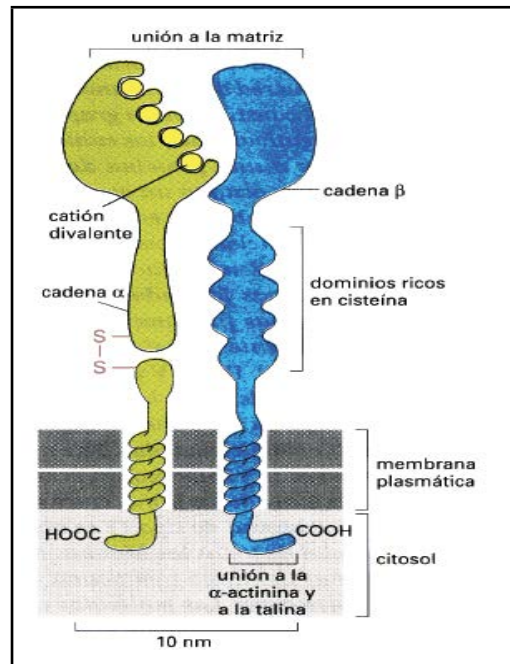


Figura 1.9: Estructura en subunidades de un receptor matriz de superficie celular de tipo integrina [46]

1.8.3. Las integrinas pueden interactuar con el citoesqueleto para unir las células a la matriz extracelular

Las integrinas actúan como acopladores transmembrana (o “*integradores*”) mediante las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular que son necesarias para que las células se adhieran a la matriz. La mayoría de las integrinas se asocian a haces de filamentos de actina. Tras la unión de una integrina típica a su ligando de la matriz, la cola citoplasmática de la cadena β se une a la talina y a la α -actinina, iniciando el ensamblaje de un complejo de proteínas de unión intracelulares que unen la integrina a los filamentos de actina en el córtex celular; se cree que así es como se forman los contactos focales entre las células y la matriz extracelular. Parece que la unión transmembrana con el citoesqueleto es un requisito general importante para las uniones célula-matriz: sin tales anclajes internos, el lugar de unión está dispuesto a ser eliminado de la célula (Fig. 1.10). Las uniones al citoesqueleto también pueden agrupar las integrinas, dando lugar a una importante agregación de elementos de unión celular [46].

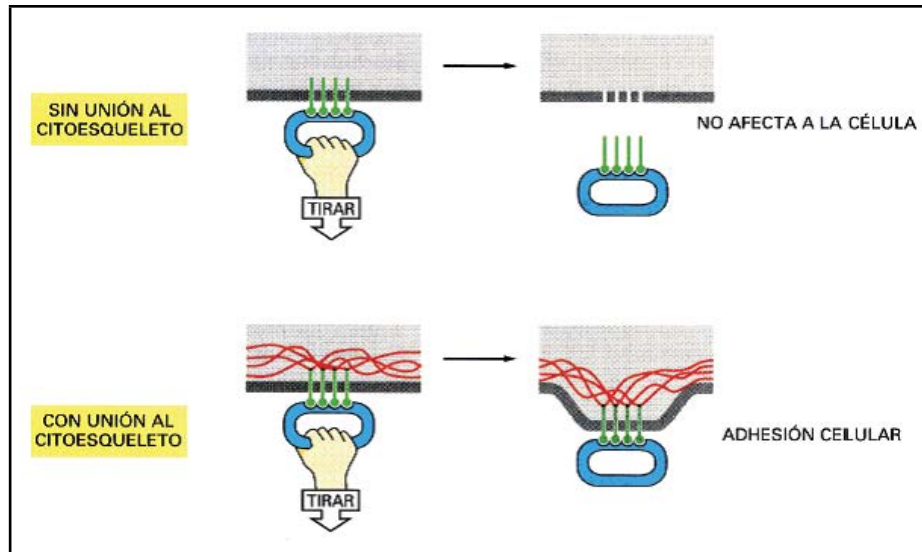


Figura 1.10: Importancia del citoesqueleto en la adhesión celular: este dibujo ilustra la razón por la cual las moléculas de adhesión celular han de unirse al citoesqueleto para poder mediar una fuerte adhesión célula-matriz. En realidad, muchas de las proteínas de adhesión pueden ser expulsadas de la célula junto con fragmentos de la membrana adheridos, los agujeros dejados en la membrana se vuelven a cerrar al instante.[46]

1.9. Las Moléculas MHC

En los años 1950, experimentos realizados con injertos de piel entre diferentes cepas de ratón demostraron que el rechazo del injerto es una respuesta inmunitaria frente a antígenos extraños de la superficie de las células injertadas. Más tarde se demostró que estas reacciones están mediadas principalmente por células T y que están dirigidas contra versiones genéticamente “extrañas” de las glicoproteínas de la superficie celular denominadas moléculas de histocompatibilidad (“histo” significa tejido). Con diferencia, las más importantes de estas moléculas son las de la familia de proteínas codificadas por el grupo de genes del **complejo principal de histocompatibilidad (MHC)**. Las moléculas MHC se expresan en todas las células de los vertebrados superiores. En humanos, estas moléculas se denominan *antígenos HLA* (*Human Leucocyte Associated antigens*) debido a que se describieron por primera vez en leucocitos [46].

1.9.1. Existen dos clases principales de moléculas MHC

Las proteínas MHC de clase I y de clase II presentan estructuras muy similares. Ambos son heterodímeros transmembrana cuyos dominios extracelulares amino terminales se unen al antígeno para la presentación a las células T (Fig. 1.11). [46]

Cada gen MHC de clase I codifica una cadena polipeptídica (denominada α) la mayor parte de la cual se pliega en tres dominios extracelulares globulares (α_1 , α_2 , α_3). Al igual que las moléculas MHC de clase I, las **moléculas MHC de clase II** son heterodímeros con dos dominios conservados.

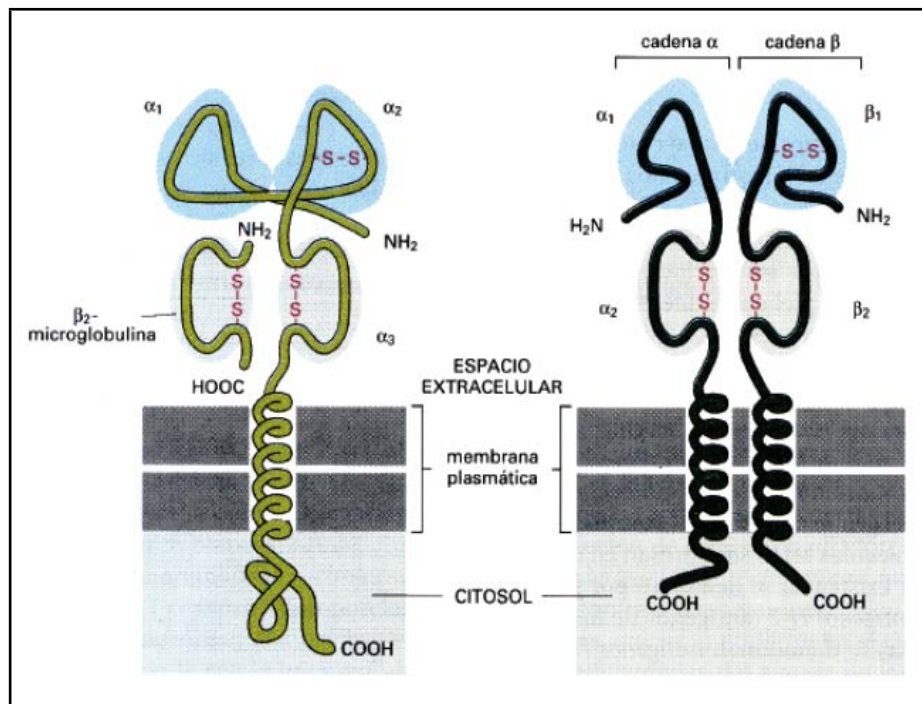


Figura 1.11: Moléculas MHC de clase I y II respectivamente. [46]

1.10. Descelularización de matrices

Los procesos de descelularización de matrices extracelulares son una novedosa técnica que está siendo usada para reparar diversos órganos y tejidos, ya que estos tienen una gran ventaja sobre cualquier tipo de sustituto, ya que estos contienen los ingredientes naturales del tejido a reemplazar, además varios estudios han mostrado buena biocompatibilidad para el crecimiento de las células nativas [43]. Teóricamente, estas matrices pueden ser el andamio ideal para la reconstrucción, reparación y sustitución de los tejidos.

Sin embargo, las matrices descelularizadas no han sido ampliamente usadas, debido a la estructura única y específica que poseen ciertos tejidos.

La obtención de matrices acelulares de colágena es utilizado para la reconstrucción de diferentes tejidos, dado que el material obtenido no genera respuesta inmunológica (rechazo) y favorece el crecimiento celular [47]. El proceso de descelularización lleva diversas etapas, pero la matriz finalmente obtenida mantiene la conformación espacial del tejido previamente tratado [48].

En los procesos de descelularización se busca favorecer en primera instancia la lisis celular, es decir la ruptura de la membrana celular, de modo que se destruya la célula, esto se logra con la incubación del tejido en medio acuoso por largos periodos [49].

Otro paso importante en este tipo de proceso implica el uso de detergentes (Triton, Desoxicolato de Sodio, Dodecilsulfato Sódico). Algunos procesos de descelularización como el método de Meezan [50] además de utilizar detergentes incluyen el uso de enzimas como DNasa, el uso de esta enzima hidroliza las cadenas de ADN (Ácido Desoxiribonucleico) solubilizando los contenidos nucleares y degradando el ADN. El proceso se lleva a cabo en ciclos repetitivos, 25 en total [51].

En resumen los procedimientos que han sido usados para descelularizar matrices incluyen el uso de detergentes y enzimas que tienen como objeto destruir las partes celulares mem-

branas, citoplasma y núcleos para con esto dejar inviable las células de modo que con esto se disminuye la respuesta inmunogenica del tejido ya que las células son las portadoras del MHC.

Capítulo 2

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN, FUNDAMENTOS TEÓRICOS

En este capítulo se tratan los fundamentos de las técnicas que se utilizaron para determinar y medir diferentes características y propiedades necesarias para establecer los cambios ocurridos en la matriz extracelular, no solo a nivel material, sino también cambios a nivel biológico, por lo tanto es de importancia conocer los fundamentos de las técnicas para, de este modo, comprender más a fondo la utilidad de cada una de éstas y así, aprovecharlas al máximo.

2.1. Histología

La histología es la ciencia que estudia todo lo referente a los tejidos orgánicos: su estructura microscópica, su desarrollo y sus funciones. La histología se identifica a veces con lo que se ha llamado anatomía microscópica, pues su estudio no se detiene en los tejidos, sino que va más allá, observando también las células interiormente y otros corpúsculos, relacionándose con la bioquímica [52].

Las primeras investigaciones histológicas fueron posibles a partir del año 1600, cuando se

incorporó el microscopio a los estudios anatómicos. Marcello Malpighi es el fundador de la histología y su nombre aún está ligado a varias estructuras histológicas [52].

La histología es el estudio de la estructura microscópica del material biológico y de la forma en que se relacionan tanto estructural y funcionalmente los distintos componentes individuales. Es crucial para la medicina y para la biología porque se encuentra en las intersecciones entre la bioquímica, la biología molecular y la fisiología por un lado y los procesos patológicos y sus consecuencias por el otro [52].

2.1.1. Pasos de la técnica histológica

En el desarrollo de la misma, se pueden distinguir la sucesión de los siguientes procesos: 1) Obtención del material histológico. 2) Proceso de fijación. 3) Proceso de inclusión. 4) Obtención de cortes. 5) Proceso de coloración. 6) Montaje final.

1. **Obtención del material:** en la obtención del material histológico hay que cumplir con varias reglas, como son:
 - Realizar la toma del tejido del lugar correcto.
 - Es preciso obrar con cuidado y precaución, a fin de evitar la destrucción de los tejidos.
 - Cortar la pieza de tejidos en trozos pequeños (entre 1 y 3 cm. x 0.5 cm.), teniendo en cuenta la configuración anatómica.
 - Los órganos huecos no deben ser muy distendidos para que se conserve su aspecto normal.
 - Realizar éste proceso con la mayor rapidez posible para evitar la autodestrucción del tejido (autolisis).

2. **Proceso de fijación:** Por medio de la fijación se busca interrumpir el desarrollo de los procesos orgánicos fijando y conservando de la manera más fidedigna posible el estado

y la situación en que se encontraban los tejidos en vida. Los tejidos deben ser fijados inmediatamente después de extirparlos; ésta es la única forma de interrumpir instantáneamente los procesos vitales. Si la fijación se produce algún tiempo después de la obtención del material, puede suceder que ya hayan comenzado los procesos de post-mortem. En un organismo muerto pueden tener lugar varios tipos de desintegración, como por ejemplo, “la autólisis”, que consiste en la destrucción de los tejidos por sus propias enzimas locales producidas por los lisosomas. El segundo tipo de desintegración consiste en la “putrefacción”, en donde se produce la destrucción de los tejidos en acción conjunta con las bacterias. Por lo enunciado, se puede definir la Fijación como un proceso que consiste en alcanzar una situación estable de los constituyentes tisulares, debido a la interrupción de las reacciones enzimáticas [52].

3. **Proceso de inclusión:** Para obtener cortes delgados y uniformes en un solo plano es necesario que las piezas adquieran una dureza determinada, por lo tanto es necesario aclarar que existen 2 procedimientos fundamentales para la obtención del corte, ellos son:
 - a) Previa congelación del material de estudio: Este procedimiento confiere a los tejidos un endurecimiento uniforme y permite realizar diagnósticos inmediatos de piezas operatorias y estudios histoquímicos, ya que la congelación no altera la composición química de los componentes histológicos del material a examinar [52].
 - b) Previa inclusión del material en parafina: El material congelado no reúne de manera suficiente las condiciones óptimas, ya que los cortes obtenidos por congelación son siempre más gruesos que los obtenidos por inclusión. Por lo dicho y si se cuenta con el tiempo necesario, es preferible impregnar los tejidos con una sustancia líquida que luego pasa a una fase sólida y homogénea. Este procedimiento se denomina “Inclusión”. En el transcurso de este, se deposita el medio de inclusión en todos aquellos lugares en donde se encuentra el agua, o donde ésta ha sido extraída. Los medios o sustancias de inclusión pueden ser: Solubles en el agua: Como la Celoidina, Gelatina, Plexiglas, o bien Insolubles en el agua, como por ejemplo la “Parafina” [52].

4. **Obtención de los cortes:** Con el objeto de realizar los cortes adecuados para el estudio al microscopio, se utilizan distintos métodos y variados aparatos de gran precisión, a los que se denominan Microtomos. Su empleo está condicionado al estudio que se desee realizar en los diversos tejidos. Así se cuenta con microtomos de deslizamiento, microtomo Tetander, microtomo de parafina tipo Minot (cuchilla fija), el ultramicrotomo, el criotomo, entre otros. El espesor del corte puede variar de 2 a 20 μm . Los espesores más utilizados van desde 5 a 8 μm . La elección del grosor depende de la textura del tejido y de los elementos y detalles que se quieran observar y estudiar [52].

5. **Proceso de coloración:** La coloración es el proceso por el cual un cuerpo toma color bajo la acción de un colorante y no desaparece con lavados de la misma sustancia en que se disolvió el colorante.

Las estructuras contenidas en las preparaciones histológicas, poseen poco contraste o carecen de él completamente, por lo que no van a poder ser distinguidas al microscopio. Este inconveniente queda salvado por la propiedad que tienen los distintos componentes celulares y tisulares de incorporar con variable intensidad sustancias colorantes [52].

6. **Montaje final:** Tiene por objeto mejorar la observación, facilitar el manejo y aumentar la duración de los preparados histológicos. La coloración deja totalmente embebido en agua al preparado y debe ser eliminada. Esta parte de la Técnica Histológica consta de 4 pasos:
 - a) Deshidratación: A través de alcoholes en forma creciente 70°, 80°, 96°, 100°.

 - b) Homogenización (aclaración o diafanización): Con benzol o xilol, adicionando ácido carbónico o fénico, muy ávidos de agua.

c) Colocación del cubreobjetos: Para proteger la preparación, se cubre con una laminilla de vidrio muy fina y de diversos tamaños. Para adherir el cubreobjetos al portaobjetos, quedando entre ambos el corte, se utiliza Bálsamo de Canadá, sustancia soluble en bencol o xilol, de modo que difunde bien en el corte aclarado. Además su índice de refracción es semejante al del vidrio, lo cual evita la desviación de los rayos luminosos.

d) Fijación de la coloración: Sólo en el caso de usar colorantes lábiles, poco estables, como por ejemplo los colorantes básicos de anilina [52].

2.2. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido o SEM (*Scanning Electron Microscopy* por sus siglas en inglés) constituye una de las técnicas más utilizadas en el análisis de superficies debido a que provee una imagen de gran amplificación y definición.[14]

Los primeros desarrollos en el diseño de un microscopio de electrones de barrido nace en los laboratorios RCA por Zworykin, Hillier y Snyder en 1942 [22] con una resolución de 1000 nm, sin embargo, durante el periodo comprendido entre 1948 y 1965 se mejoró el diseño con una resolución de 50 nm. Y es hasta esta época cuando surge el primer microscopio comercial, The Cambridge Scientific Instruments Mark I “Stereoscan” [23].

El equipo de microscopía electrónica de barrido consiste en una columna que alberga un filamento (una fuente de electrones), objetivo o lente electromagnética y unas bobinas de exploración (Fig. 2.1). En la base de la columna está la cámara que contiene a los detectores y a la plataforma donde se deposita la muestra [14].

Dependiendo del objetivo en particular del estudio, se puede operar el equipo de diferentes

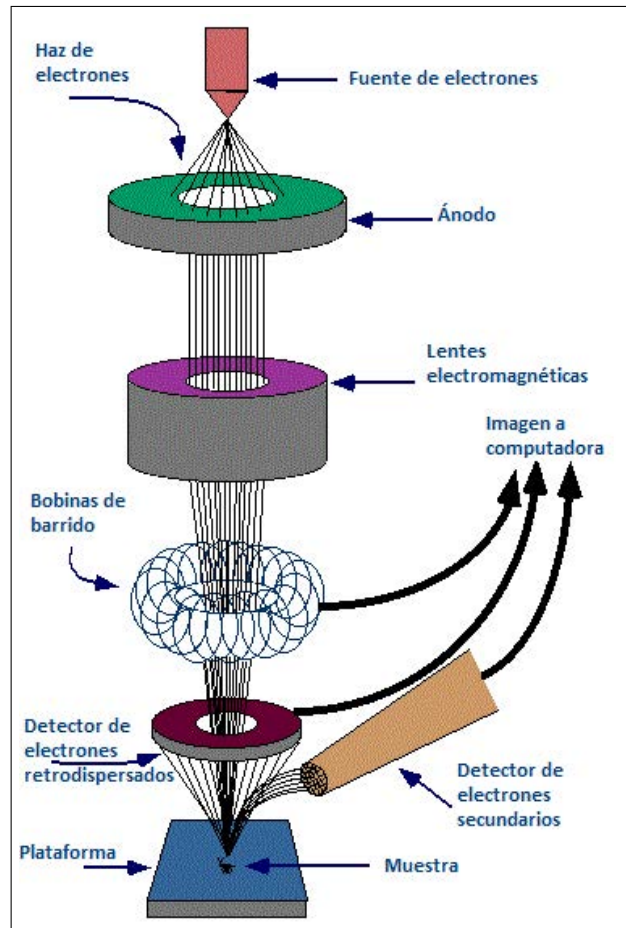


Figura 2.1: Esquema de los componentes de un SEM. [14]

maneras por ejemplo bajo voltaje, superficie sensible, alta resolución.

En el SEM, los electrones emitidos por un cañón de electrones (electrones primarios) se centran por medio de unos cilindros Wehnelt y por lentes electromagnéticas sobre la superficie de la muestra, que escanea punto por punto a la muestra. De esta forma se adquieren datos de la muestra de un punto. En cada lugar donde un haz de electrones primarios impacta en la muestra, un flujo de electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, y otros tipos de señales son emitidas de la muestra (Fig. 2.2) [14].

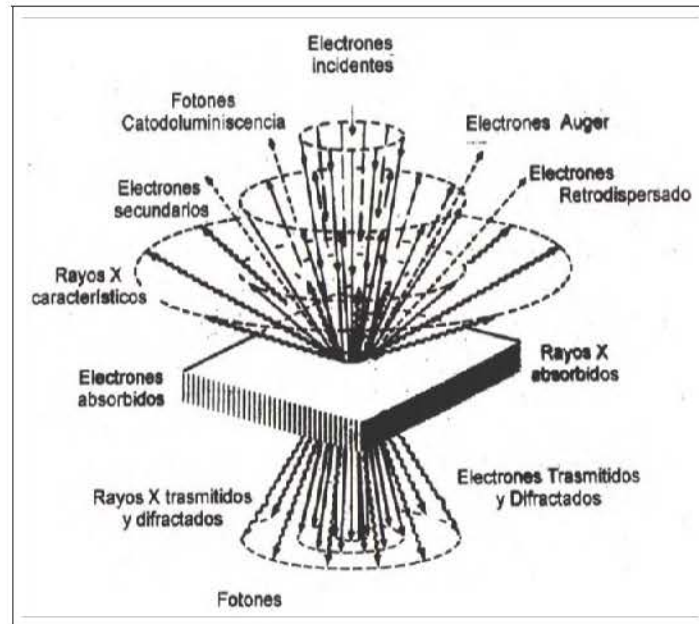


Figura 2.2: señales emitidas durante el escaneo de la muestra por SEM. [14]

Los electrones secundarios y los electrones retrodispersados emitidos por la muestra son capturados por detectores y presentados por modulaciones de brillo, en un monitor. Los electrones secundarios provienen de una capa superficial de hasta 10 nm de espesor, mientras que los electrones retrodispersados se originan en capas más profundas [14].

Una porción de cada señal emitida viaja en tal dirección que entra en el detector, el cual mide la intensidad de electrones emitidos en cada punto sobre la muestra y convierte este valor de intensidad en una escala de grises. Entonces valores digitalizados son desplegados en el monitor. La imagen que se obtiene en el monitor está sincronizada con el movimiento y posición del haz de electrones sobre la muestra [14].

Este proceso de formación de la imagen se aplica a todas las señales colectadas y permite que la imagen de cada señal sea recogida simultáneamente. El resultado es una imagen topográfica muy ampliada de la muestra [24].

En los nuevos equipos de SEM, todos los controles (filamento, voltaje, foco, amplificación,

plataforma de control, etc) son operados mediante una computadora y una palanca de control [14].

La muestra que se observa por SEM debe ser conductora, en el caso de los materiales poliméricos como la colágena, deben ser recubiertos con una película metálica (oro, oro-paladio, cromo o carbono, por ejemplo), para evitar que la muestra se cargue o se caliente cuando sea irradiada por el haz de electrones [14].

2.3. Espectrofotometría de absorción molecular

A través de esta técnica de espectrofotometría es posible determinar la concentración de las macromoléculas biológicas, en este caso de proteínas, en solución. Se basa en medir la cantidad de energía que absorbe una molécula en la región ultravioleta o en la región visible para pasar del estado fundamental a un estado excitado [14].

El fenómeno consiste en hacer pasar la luz a través de un monocromador, con el cual se selecciona la longitud de onda, esta luz monocromática con una potencia radiante P_0 incide en una muestra contenida en una celda de cuarzo la cual posee una longitud de paso óptico b (generalmente colocada de 10 mm). La potencia radiante del haz que emerge por el lado opuesto de la muestra es P , como la muestra puede haber absorbido algo de luz, entonces $P \leq P_0$ [14].

La transmitancia T , se define como la fracción de la luz incidente que pasa a través de la muestra y está dada por:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (2.1)$$

Donde T puede valer 0 ó 1.

A su vez la transmitancia está relacionada con la absorbancia, que de acuerdo a la ley de Lambert-Beer

$$A = \varepsilon c \ell \quad (2.2a)$$

ó

$$A = \text{Log}_{10} T \quad (2.2b)$$

Donde c es la concentración molar, ℓ , la longitud en el paso de la luz en cm y ε el coeficiente de absorción molar [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$], esta última es una constante de proporcionalidad característica de cada cromóforo y como lo indican sus unidades, está en función de la concentración de la muestra y del paso óptico de la celda. La absorbancia leída es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe la luz en la muestra [25].

Cuando se determina la concentración de alguna especie en solución, en primer lugar se construye una curva patrón, en donde el cero se conoce como blanco y se utiliza para fijar el cero de absorbancia en el espectrofotómetro y la concentración de las muestras se calcula interpolando los valores de la absorbancia leída y las de la curva patrón.

La parte de la molécula responsable de la absorción de la luz se llama cromóforo, por lo tanto toda sustancia que absorbe luz visible aparece coloreada cuando trasmite o refleja la luz [14].

2.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida

El término electroforesis fue introducido por primera vez en 1907 por Michaelis para definir el fenómeno por el cual una molécula que posee una carga neta se desplaza en respuesta a la

aplicación de un campo eléctrico. Es una técnica comúnmente utilizada para la identificación y caracterización de moléculas biológicas (ADN, proteínas, polisacáridos, péptidos). La velocidad de migración o movilidad (V) de la partícula a través del campo eléctrico dependerá de varios factores como son: la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo; así como de la intensidad de dicho campo (E); la carga neta (q), tamaño y forma de las moléculas (coeficiente de fricción, f) [14].

$$V = \frac{q E}{f} \quad (2.3)$$

El campo eléctrico aplicado no puede incrementarse indiscriminadamente, ya que generaría un calor excesivo, y tampoco puede ser bajo, ya que puede ocurrir una pobre separación, por causa de la difusión por tiempo prolongado de la corrida electroforética. La carga neta de la partícula está dada por el pH del medio y puede ser modificada por la interacción de pequeñas moléculas de iones u otras macromoléculas [14].

2.4.1. Equipo y mecanismo de formación del gel

El equipo y material utilizado para llevar a cabo esta técnica, consiste en una cámara de electroforesis, la cual puede ser horizontal o vertical, que consta de dos electrodos (cátodo y ánodo) y dos recipientes que contienen el amortiguador de corrida (superior e inferior), fuente de poder, que permite mantener un potencial de voltaje constante y los elementos necesarios en la formación del gel como son, peine, espaciadores, vidrios, (Fig. 2.3) y por supuesto el soporte (gel) cuya tarea es la de un tamiz molecular [14].

Los soportes de elección para la electroforesis de proteínas son los geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés “polyacrilamide gel electrophoresis”), debido a su buena resolución y gran versatilidad, además de que posee una serie de ventajas como: ser químicamente inerte y transparente, se prepara rápidamente y se puede controlar el tamaño el poro variando

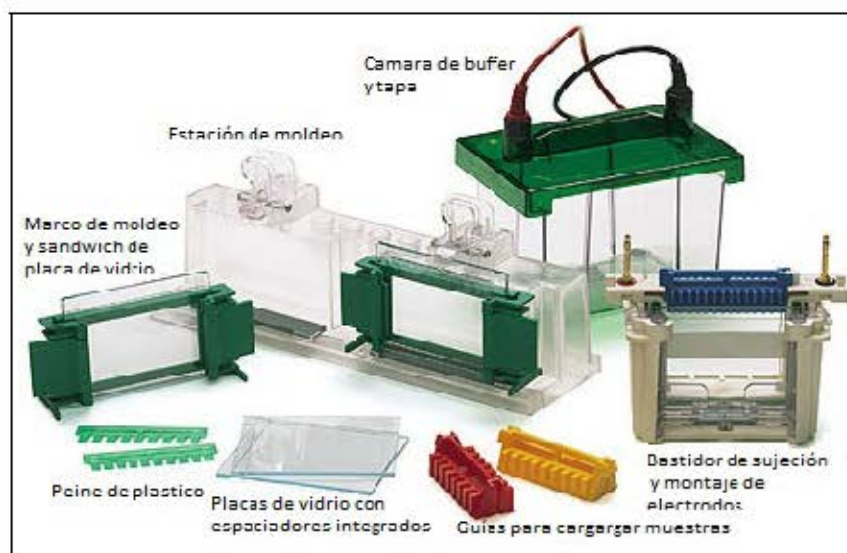


Figura 2.3: Equipo de electroforesis para proteína

la concentración de reactivos que la conforman [14].

El mecanismo de la formación del gel consta de la polimerización vía radicales libres del monómero acrilamida $CH_2 = CH - CONH_2$ y el monómero entrecruzante *N,N'*-metilen-bis-acrilamida $CH_2 = CH - CO - NH - CH_2 - NH - CO - CH = CH_2$, la cual es catalizada por *N,N,N',N'*-tetrametilendiamina (TEMED) que ayuda en la formación de radicales libres que dirigen la reacción a partir del ion persulfato que se añade en forma de persulfato de amonio $(NH_4)_2S_2O_8$ (APS) y que actúa como iniciador, como se muestra en la figura 2.4. La reacción es inhibida por oxígeno, es por ello que se debe desgasificar la solución [14].

2.4.2. Tamaño de poro de gel de poliacrilamida

El tamaño de poro del gel se puede controlar utilizando dos parámetros, %*T* y %*C*, donde el primero se refiere al porcentaje en masa del monómero total empleado (acrilamida + entrecruzador) que determina la longitud de la cadena del polímero, y el segundo, que se refiere al porcentaje en masa de la bis-acrilamida con respecto al monómero acrilamida (w/w) [53].

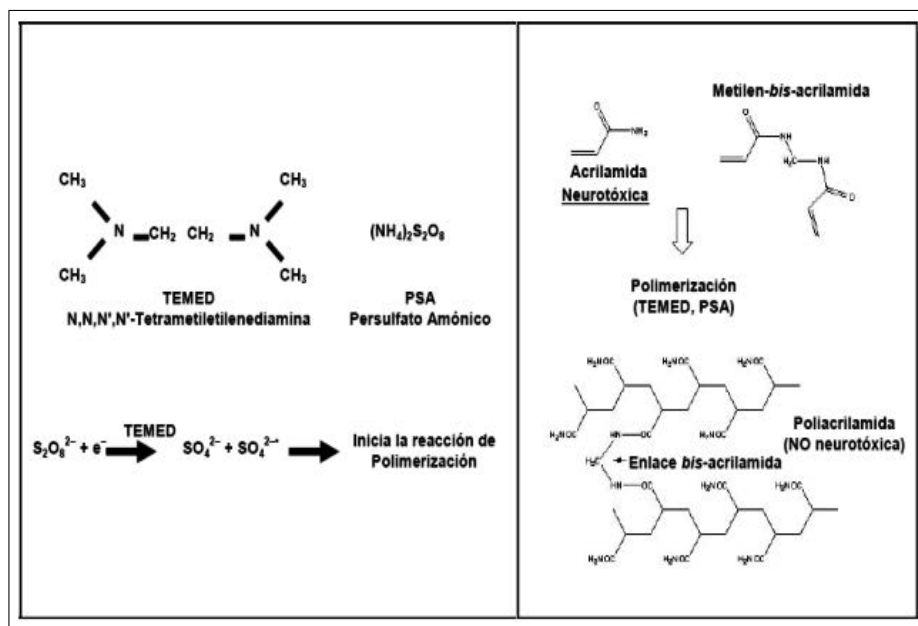


Figura 2.4: Reacción de polimerización de la poliacrilamida

$$\%T = \frac{\text{Acrilamida}(g) + \text{Bisacrilamida}(g)}{\text{Volumen}(ml)} \times 100 \quad (2.4)$$

$$\%C = \frac{\text{Bisacrilamida}(g)}{\text{Acrilamida}(g) + \text{Bisacrilamida}(g)} \times 100 \quad (2.5)$$

Así, geles con un alto porcentaje de acrilamida (10-15 %T) son óptimos para la separación de proteínas de baja masa molecular (menores a 50 KDa), mientras que geles de porcentajes menores (<10 %T) son indicados para la separación de proteínas mayores [53].

2.4.3. Condiciones de electroforesis

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida puede llevarse a cabo en condiciones nativas (ND-PAGE) o desnaturalizadas (SDS-PAGE). Las diferencias radican en los componentes de los geles, tampón y tratamiento de las muestras. En la electroforesis en condiciones nativas, las proteínas mantienen su estructura terciaria y las diferentes cadenas polipéptidicas permanecen unidas, separándose en función de su carga eléctrica, forma y tamaño. Por el contrario en condiciones desnaturalizantes (descritas por Laemmli en 1970) (SDS-PAGE) se incluyen agentes desnaturalizantes como reductores (β -mercaptoetanol), detergentes (SDS, dodecil sulfato sódico) o calor, los cuales destruyen enlaces disulfuros en el caso de un agente reductor y rompen las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas. Los grupos dodecil se colocan en el interior de la molécula, mientras que los grupos sulfato en la superficie, así los complejos SDS-proteína adquieren una carga neta negativa. Aproximadamente una molécula de SDS se une a dos residuos de aminoácidos, con una relación SDS/proteína de 1.4 g/g. Debido a que la cantidad de SDS que se une a las proteínas es prácticamente proporcional a su tamaño, los complejos SDS-proteínas presentan un valor de carga/masa constante y por lo tanto se separan sólo en base a su tamaño y por ello la masa molecular de las proteínas puede ser estimada [53].

2.4.4. Sistemas de electroforesis

Actualmente existen dos sistemas de electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en base a los tampones empleados:

1. Sistema continuo de Weber y Osborn. Constituido de un gel uniforme y un mismo tampón empleado en la formación del gel y de corrida[14].
2. Sistema discontinuo o de Laemmli. Consta de dos geles: un gel llamado concentrador con un tamaño de poro grande y pH de 6.8 (colocado en la parte superior); y un gel separador que posee menor tamaño de poro y un pH de 8.8 (Fig. 2.5)[14].

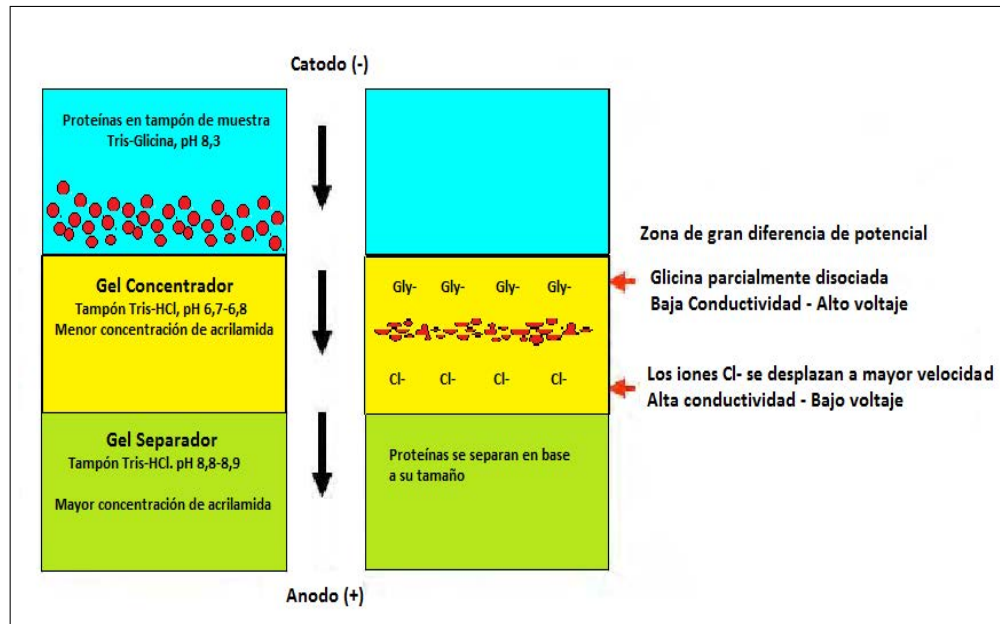


Figura 2.5: Sistema discontinuo SDS-PAGE

La movilidad de una proteína en el gel concentrador es intermedia entre la movilidad de los iones de cloruro del gel y la movilidad del ion glicinato del tampón de muestra. Por tanto, entre ambos frentes existe una zona de baja conductividad y gran diferencia de voltaje, de forma que las proteínas se concentran en una zona muy reducida entre ambos iones. Una vez en el gel separador, el pH básico favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de los polipéptidos concentrados, justo por detrás de los iones cloruro. A partir de este momento las proteínas migran a través del gel separador en una zona de voltaje y pH uniforme de forma que se separan en base a su tamaño. La capacidad de este sistema para concentrar la muestra mejora considerablemente la resolución de los geles [53].

2.5. Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido o DSC por sus siglas en inglés “*Differential Scanning Calorimetry*” mide el cambio del flujo de calor hacia y desde el material en función del tiempo o la temperatura. El equipo de DSC consiste en dos cámaras cada una contiene un crisol. Los

crisoles están fabricados en diferentes materiales, el más utilizado es el crisol de aluminio el cual trabaja hasta una temperatura máxima de 600 °C, por arriba de esta temperatura se utilizan crisoles de oro, carbono, platino, plata y acero inoxidable, una condición para emplear también el crisol de aluminio es evitar la interacción química de la muestra [14].

En uno de los crisoles se coloca la muestra a analizar, mientras que el otro crisol se queda vacío, sirviendo de referencia. Durante el calentamiento de la muestra se mide el flujo de calor, manteniendo un equilibrio térmico entre la referencia y la muestra; esto se hace alterando la corriente que pasa a través de los calentadores de ambas cámaras. Por ejemplo, la referencia y una muestra se calientan a una velocidad determinada hasta que la muestra empieza a consumir o emitir calor. Si se trata de un proceso endotérmico, la temperatura de la muestra será menor que la de referencia [14].

Los circuitos del equipo están programados para proporcionar temperatura constante a los compartimientos de la muestra y la referencia. Se suministra por lo tanto una corriente adicional al compartimiento de la muestra para elevar la temperatura hasta la referencia. Se registra la corriente necesaria para mantener la temperatura constante entre la muestra y referencia. Al término de la corrida se tiene una gráfica denominada termograma, en donde aparecen varios picos que reflejan las transiciones ocurridas durante el experimento y donde el área bajo la curva resultante es una medida directa del calor de transición, la dirección de los picos indica si el proceso es endotérmico o exotérmico, en este estudio los picos hacia abajo denotan procesos endotérmicos y por el contrario los picos hacia arriba se refieren a procesos exotérmicos [14].

Entre las variables que se pueden determinar a partir de esta técnica están las siguientes: temperatura de fusión, temperatura de ebullición, temperatura de cristalización, calor específico, pureza de la muestra, temperatura de transición vítrea, capacidad calorífica, entalpía de fusión [26].

Por otro lado, cuando se estudian proteínas, una de las principales variables a determinar

y en el mejor de los casos a controlar es la estabilidad de las mismas, lo que conlleva a obtener moléculas más resistentes a agentes externos como son, la temperatura, detergentes, solventes orgánicos, etc. Sin embargo, los factores antes mencionados están directamente relacionados con la falta de compresión en el mecanismo de plegamiento y desplegamiento de las proteínas esto a causa de la compleja organización de éstas. Es así que a través de la calorimetría diferencial de barrido y en específico de alta sensibilidad es posible obtener información de los parámetros termodinámicos y cinéticos [14].

Uno de los parámetros importantes en el caso de las proteínas a determinar con esta técnica es la capacidad calorífica (C_p), que como bien se aprecia en la figura 2.6, no es la misma antes y después de la desnaturalización, por lo que $\Delta C_p > 0$, T_m es el valor de la temperatura media a la que se alcanza el valor máximo de C_p y ΔH es la entalpia de transición de fase y se determina integrando el área bajo el pico de transición [14].

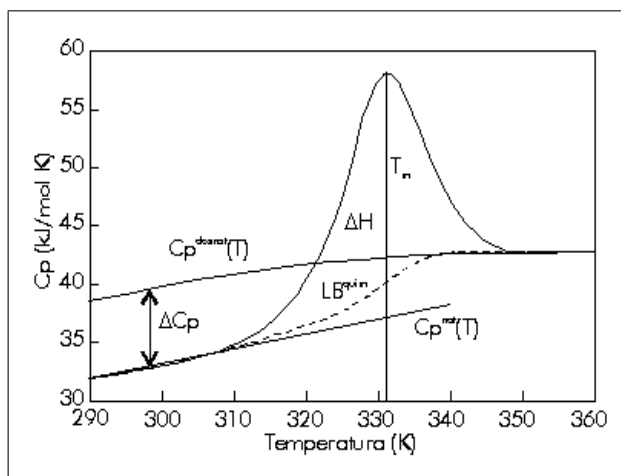


Figura 2.6: Curva de capacidad calorífica Vs Temperatura [14].

Generalmente, se traza una curva de capacidad calorífica contra temperatura. Esta curva consiste en tres regiones, la primera región es el estado nativo correspondiente al poblado en condiciones fisiológicas, la segunda región es el punto máximo de la curva representativa a una transición de primer orden y la tercera región es la posterior al punto máximo y consiste en el estado desnaturalizado. Debido a que en la T_m ya no sólo hay una única contribución por parte

del estado nativo, la capacidad calorífica en exceso se define como la suma de las contribuciones en términos energéticos de todos los estados presentes durante la transición térmica [27].

La reversibilidad de la transición de desnaturalización se comprueba con el recalentamiento de la muestra, inmediatamente después de enfriar la celda que se calentó en el primer barrido y con ello se muestra que el sistema vuelve al estado inicial (nativo), aunque es posible que no se llegue al equilibrio, si es que el sistema está controlado cinéticamente y esto se relaciona directamente con la velocidad de calentamiento. De lo anterior surge un enérgico estudio para entender el proceso de desnaturalización de las proteínas y se encuentran con dos caminos, uno donde el proceso está dado por el equilibrio (reacción reversible) y el segundo denotado por un proceso que no está en equilibrio (reacción irreversible). Por lo que se emplean métodos para calcular parámetros tales como energía de activación, fracción de moléculas en el estado nativo y desnaturalizado, constantes de equilibrio y de velocidad, entalpia de Van't Hoff definida como la cantidad de calor necesario para que cada unidad cooperativa lleva a cabo la transición de fases, etc. Dentro de los pioneros están los estudios realizados por Sánchez-Ruiz J.M. [28].

2.6. Análisis termogravimétrico

En un análisis termogravimétrico o TGA por sus siglas en inglés (*Termogravimetric Analysis*) se registra continuamente la masa de una muestra, colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra (normalmente de forma lineal con el tiempo). La representación de la masa o del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina termograma o curva de descomposición térmica [29].

2.6.1. Instrumentación

Los instrumentos comerciales modernos empleados en termogravimetría constan de: (1) una balanza analítica sensible, (2) un horno, (3) un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte (o algunas veces reactiva) y (4) un microprocesador/microordenador para el control del instrumento y la adquisición y visualización de datos. Además, existe la opción de añadir un sistema para cambiar el gas de purga en las aplicaciones en las que este gas debe cambiarse durante el experimento [29].

2.6.2. Generalidades

Cuando se lleva a cabo el procedimiento un cambio en la masa de la muestra provoca una desviación en el brazo de la termobalanza como se aprecia en la figura 2.7, que cierra el paso de la luz entre la lámpara y uno de los fotodiodos. El desequilibrio resultante en la corriente fotodiódica se amplifica y alimenta la bobina E, que está situada entre los polos del imán permanente F el campo magnético generado por la corriente en la bobina devuelve al brazo a su posición original. La corriente amplificada del fotodiodo se recoge y transforma en información sobre la masa o pérdida de masa en el sistema de adquisición de datos [29].

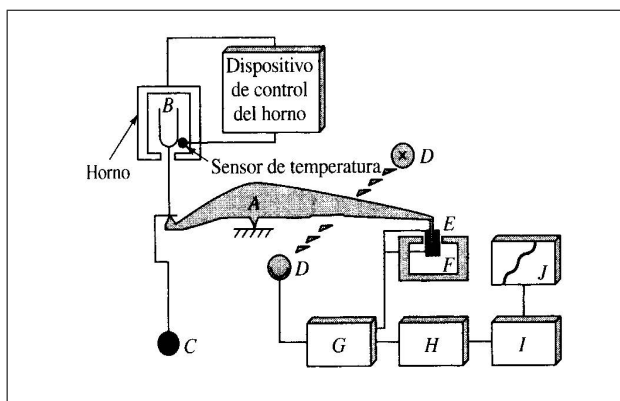


Figura 2.7: componentes de una termobalanza: A, brazo; B, copa y soporte de la muestra; C, contrapeso; D, lámpara y fotodiodos; E, bobina; F, imán; G, control del amplificador; H, calculador de la tara; I, amplificador; J, registro [29].

Las termobalanzas modernas utilizan normalmente un ordenador para el control de rutina de la temperatura, que compara automáticamente la tensión de salida del termopar con una tabla que se almacena en la memoria ROM y que relaciona las tensiones con las temperaturas. El microordenador utiliza la diferencia entre la temperatura del termopar y la temperatura especificada en la memoria ROM para ajustar la tensión del calentador. Utilizando este método es posible alcanzar una concordancia excelente entre el programa de temperaturas y la temperatura de la muestra. La reproducibilidad típica de un programa concreto es de ± 2 °C en todo el intervalo de operación del instrumento [29].

La información que proporciona el TGA, es más limitada que la que se obtiene con otros métodos como el DSC o el DTA (Análisis Térmico Diferencial), ya que en este método una variación de temperatura tiene que causar un cambio en la masa del analito. Por tanto el TGA está limitado en su mayor parte a las reacciones de descomposición y de oxidación a procesos tales como la vaporización, la sublimación y la desorción [29].

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe la metodología utilizada en esta investigación para tratar las matrices mediante tres procesos de descelularización, partiendo del método reportado por Meezan [50]. De igual manera, se describe la metodología que se usó para comprobar la descelularización de las matrices y posterior caracterización del material finalmente obtenido.

3.1. Procesos de Descelularización

En este caso la metodología llevada a cabo se basó en trabajos previos realizados, como el método de Meezan [50], el cual también fue referido por Macchiarini y col. [37] reportando buenos resultados de descelularización de matrices de cartílago después de 25 ciclos. Sin embargo, en la metodología descrita por este autor reporta que el tratamiento de 25 ciclos requiere alrededor de dos meses para obtener una descelularización casi completa, es por esto, que en esta investigación se propone modificar el método de Meezan de manera que se logre obtener una matriz acelular apta, en menor tiempo, lo que se verá reflejado de modo importante al disminuir el tiempo de espera de los pacientes, como ya se mencionó, es crítico en diferentes tipos de patología traqueal.

En primera instancia, se obtuvo una tráquea de porcino (Fig. 3.1). El procedimiento quirúr-

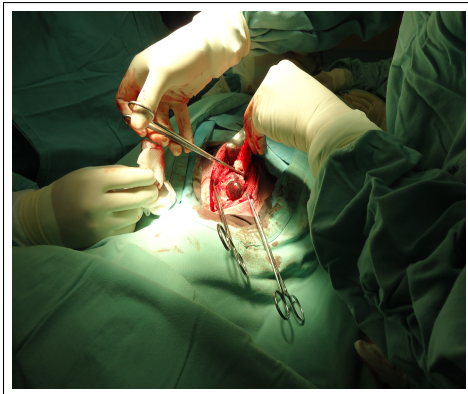
gico del donante se llevó a cabo en el *departamento de cirugía* de la *facultad de medicina* en la *Universidad Nacional Autónoma de México*, de acuerdo a las normas bioéticas para este tipo de procedimientos [30]; donde se resecó una sección de 15 cm aproximadamente (Fig. 3.1d)



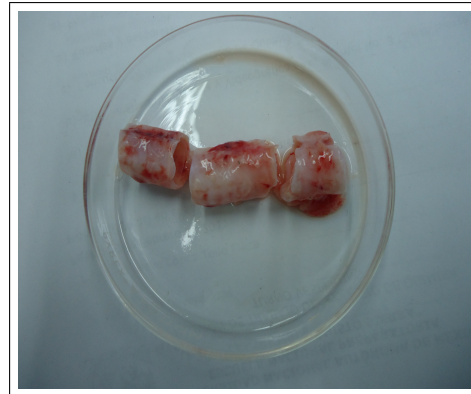
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 3.1: Técnica quirúrgica: (a) preparación del donante, (b) aplicación de vaso constrictor, (c) extirpación del segmento traqueal, (d) fraccionamiento de la tráquea

El segmento traqueal mencionado se extrajo en el quirófano experimental de la unidad previamente mencionada, el donante porcino fue sedado y preparado, se aplicó vasoconstrictor (lidocaína-epinefrina) en la zona de piel que recubre la porción de la tráquea donde se realizó la incisión, esto para minimizar el sangrado al corte (Fig. 3.1b). Finalmente se seccionó la traqueal obtenida en tres fragmentos (Fig. 3.1d), para realizar con cada uno de estos, los procesos de descclularización (lavados) descritos a continuación.

3.1.1. Lavado “DNasa”

En forma inmediata posterior a la obtención de la tráquea, se realizó una disección fina de la misma con objeto de retirar la mayor cantidad de tejido conectivo circundante a la tráquea, para después continuar con el proceso de lavado como se enlista a continuación (Fig. 3.2):

1. Primero se procedió al lavado de desinfección:
 - El segmento traqueal se enjuagó con una solución 1 % Yodopovidona (PVPI) en Buffer de Fosfato Salino (PBS)
 - Inmediatamente después, se realizaron 4 lavados continuos, dos de ellos con una solución de Yodopovidona al 1 % en agua desionizada (diH_2O) y dos con una mezcla de antibiótico-antimicótico al 1 % en agua Milli-Q.
2. Concluidos los lavados de desinfección, el tejido traqueal se incubó durante 4 horas en Deoxicolato de Sodio (**SIGMA**[®]) en agitación continua.
3. Se realizaron dos lavados con agua desionizada (diH_2O).
4. A continuación se retomó la incubación del tejido en solución de Cloruro de Sodio 1M adicionada con *Deoxyribonulcase 1* (DNase-1) **Invitrogen**[®]; bajo agitación suave por 3 horas a temperatura ambiente.
5. Paso seguido se lavó el segmento dos veces con diH_2O .
6. Finalmente se procedió a almacenar el segmento traqueal en una solución de *antibiótico-antimicótico* al 1 % en PBS a 4°C.

Se llevaron a cabo, un total de 15 ciclos. Este tratamiento fue el parámetro para posteriormente evaluar, el efecto de la adición de ácido etilendiaminotetracético, como agente quelante y por otro lado, la adición del mismo en combinación con la enzima tripsina.

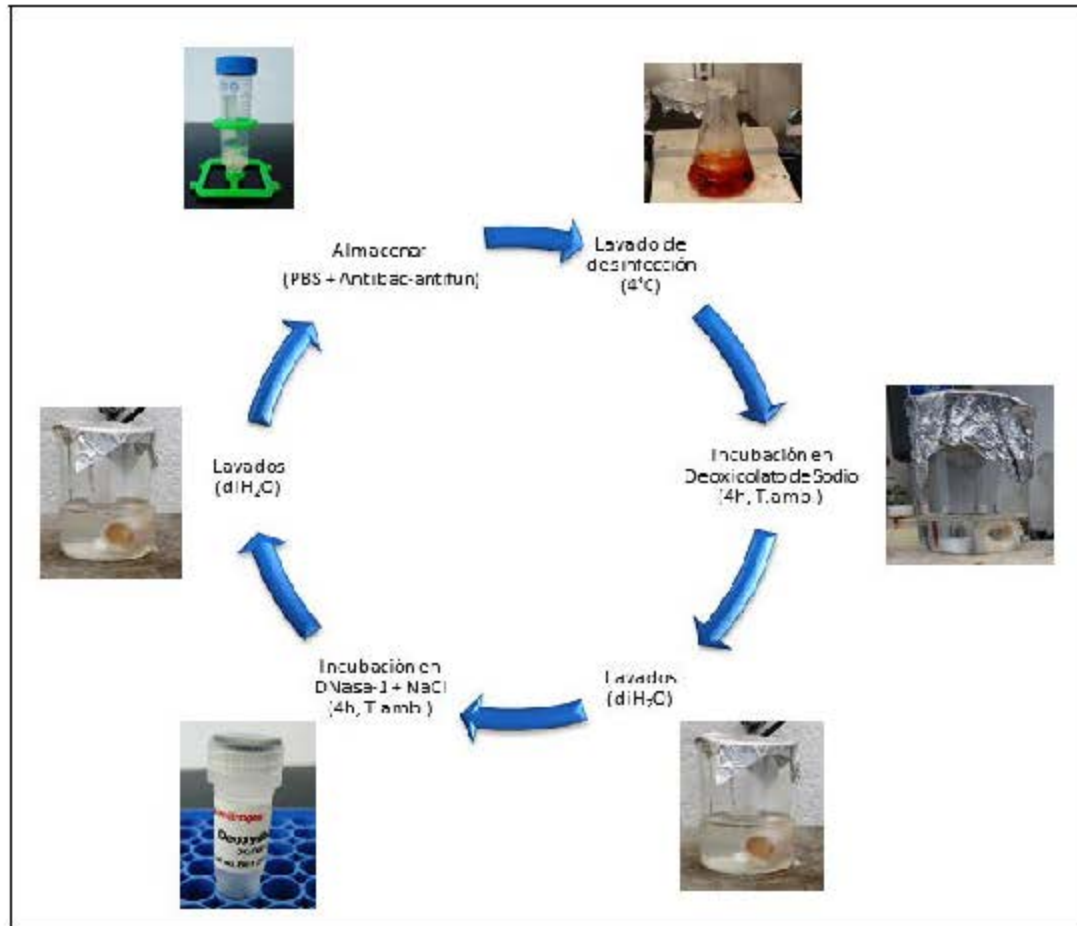


Figura 3.2: Proceso de lavado enzimático "DNasa"

3.1.2. Lavado "EDTA"

El proceso de lavado incluyó los pasos descritos previamente y la incubación del tejido en *ácido etilendiaminotetracético* (EDTA). Para evaluar el efecto de este agente, como removedor de las células, se realizó una incubación a temperatura ambiente durante 3 horas. Los ciclos de lavado se hicieron de manera similar al procedimiento previamente descrito y se ilustran en la figura 3.3. Se realizaron 15 ciclos de lavado.

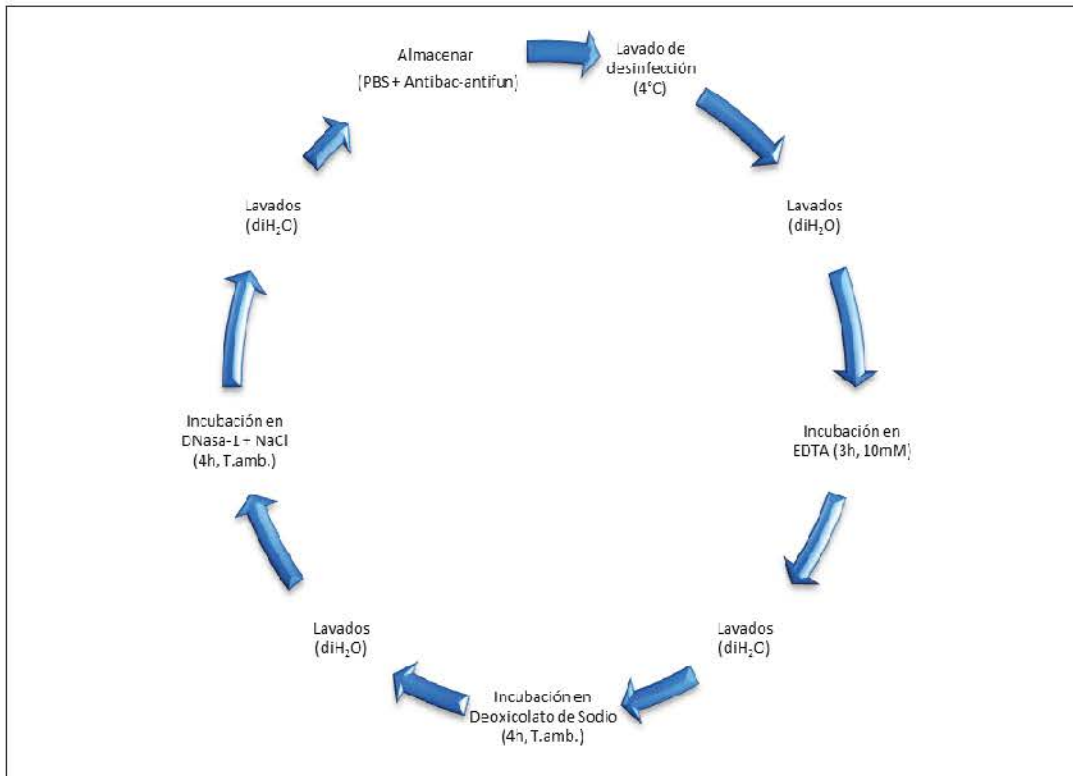


Figura 3.3: Proceso de lavado enzimático “EDTA”

3.1.3. Lavado “*Tripsina*”

Para esta última variación, se incluyó además de la *DNase-1* y el *EDTA*, una incubación del tejido adicionando la enzima *Tripsina*, ya que con el uso del *EDTA* se interfiere la unión de las células a la matriz por medio de las integrinas, con la adición de esta enzima se pretende inhibir la unión célula-matriz extracelular rompiendo enlaces peptídicos de la condronectina (glicoproteína de la matriz de cartílago que interviene en la unión de las células a la matriz).

El procedimiento de lavado la solución de incubación de *Tripsina* se preparó a una concentración de 1% (w/v) en PBS, se incubó el tejido en esta solución por 3 horas a temperatura ambiente manteniendolo bajo agitación suave, después de realizar la incubación en *EDTA* (Fig. 3.4), a continuación, se prosiguió con el procedimiento al igual que se hizo con el tratamiento “*DNasa*”. En este evento, se realizaron solamente 5 ciclos de lavado, ya que la *tripsina* también

puede disolver la matriz extracelular.

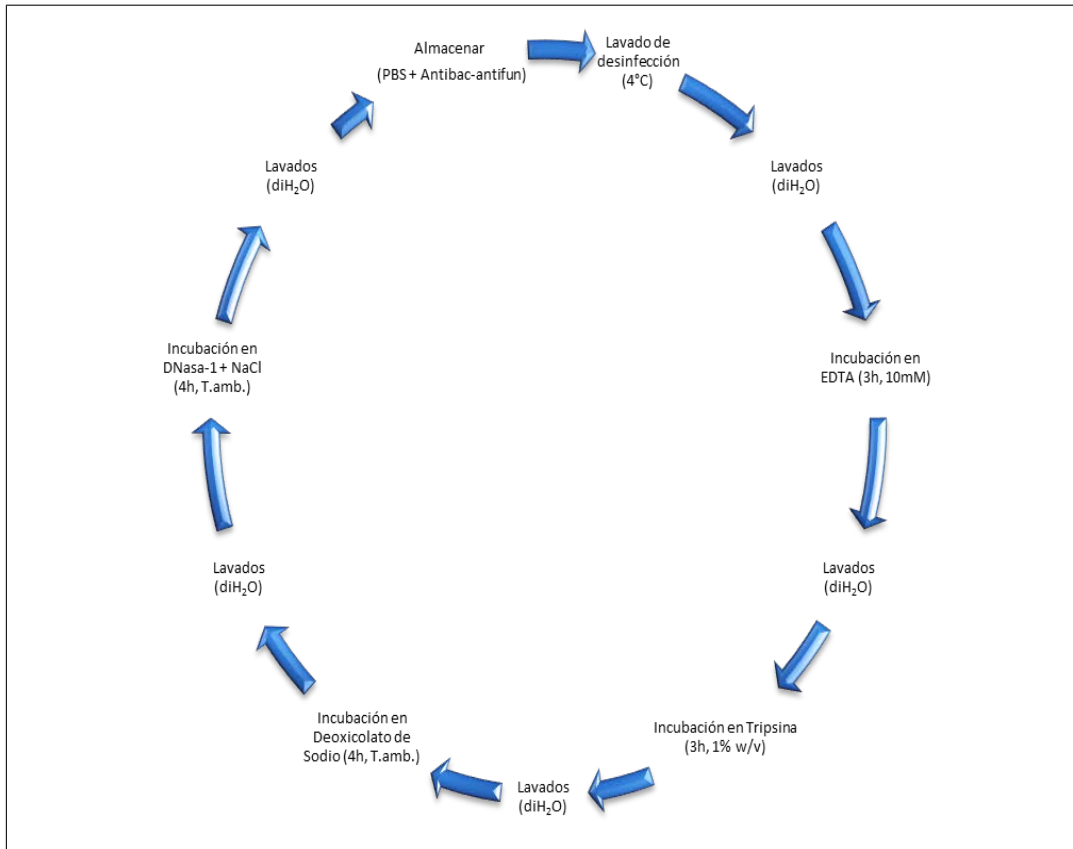


Figura 3.4: Proceso de lavado enzimático “Tripsina”

3.2. Caracterización

Una vez que se llevaron a cabo los ciclos totales de lavado para cada uno de los procedimientos, se caracterizaron las matrices obtenidas. La metodología, se describe a continuación.

3.2.1. Histología

Todos los segmentos traqueales fueron sometidos a una evaluación microscópica del tejido traqueal, tal y como se describe en la sección 2.1.1. Esta evaluación se realizó en el *Depar-*

tamento de histopatología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de México.

La evaluación histológica incluyó la integridad física y estructural de cada uno de los elementos constitutivos de la tráquea con base en:

- La integridad estructural de los anillos de cartílago.
- La tinción del cartílago.
- Las matrices pericelular, territorial e interterritorial.
- La presencia de condrocitos conservados y con alteraciones (degeneración celular).
- La continuidad y desprendimiento del epitelio pseudoestratificado ciliado a lo largo de la mucosa traqueal.
- Y la integridad de las fibras (colágena y músculo liso).

La tinción hematoxilina-eosina permite observar con claridad todos y cada uno de los parámetros establecidos para evaluación, sin requerir de tinciones específicas para el cartílago (safranina-O) y para fibras (Masson). La eosina es un colorante ácido con densidad de carga negativa que se asocia a estructuras del citoplasma y de la matriz extracelular con carga catiónica, tales como filamentos citoplasmáticos, membranas intracelulares y fibras extracelulares. La hematoxilina al igual que el azul alciano y la safranina actúa como colorante básicos (densidad de carga positiva) que se asocia a iones con carga aniónica (sulfatos, fosfatos y carboxilos) contenidos en la cromatina, en los nucleolos y en el caso de la matriz extracelular del cartílago, los glucosaminoglicanos sulfatados que forman parte de los proteoglicanos además de grupos hialurónicos y condroitín sulfato.

Los pasos de la técnica histológica incluyeron:

1. La deshidratación del tejido mediante inmersiones en concentraciones crecientes de alcohol, esto se realizó con la ayuda de un histokinete (Fig. 3.5) :

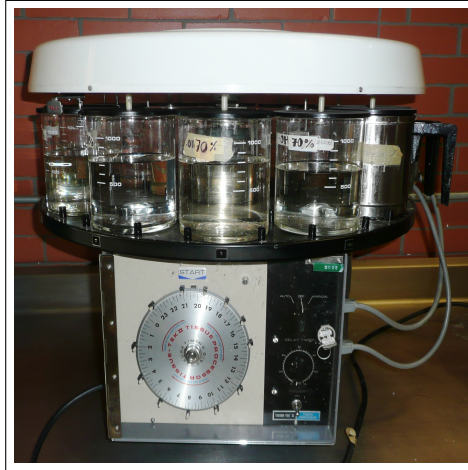


Figura 3.5: Histokinete usado para deshidratar las muestras

2. Una inclusión de la muestra en parafina, para después proceder al corte en laminillas de 25 a 20 μm de espesor con la ayuda de un micrótopo de rotación (Fig. 3.6):



Figura 3.6: Microtopo de rotación

3. El proceso prosiguió con el desparafinado de los cortes, esto se hace introduciendo la muestra en agua tibia, a continuación de proceder a introducirla en xileno, para terminar con el desparafinado e hidratarla, de modo, que queda lista para la hidratación previa al proceso de tinción (Fig. 3.7).
4. La tinción consistió en colocar la laminilla de tejido por tres minutos en hematoxilina,

después se enjuaga y se prosigue con la inmersión en eosina para finalmente enjuagarla y proceder con la deshidratación del tejido y el montaje (Fig. 3.7).

5. La deshidratación, consistió en sumergir la muestra por lapsos de 10 min en concentraciones crecientes de etanol (80% - 100%) y finalmente culmina con xileno, ya que este hace más fácil la unión del tejido al portaobjetos (Fig. 3.7).
6. Finalmente, el montaje consistió en colocar la muestra sobre el portaobjetos y como medio de montaje se utilizó bálsamo de Canadá el cual fija la muestra al portaobjetos y permite además, que el cubreobjetos se adhiera (Fig. 3.7). Una vez concluido el proceso, la evaluación histológica se realiza con la ayuda de un microscopio óptico.

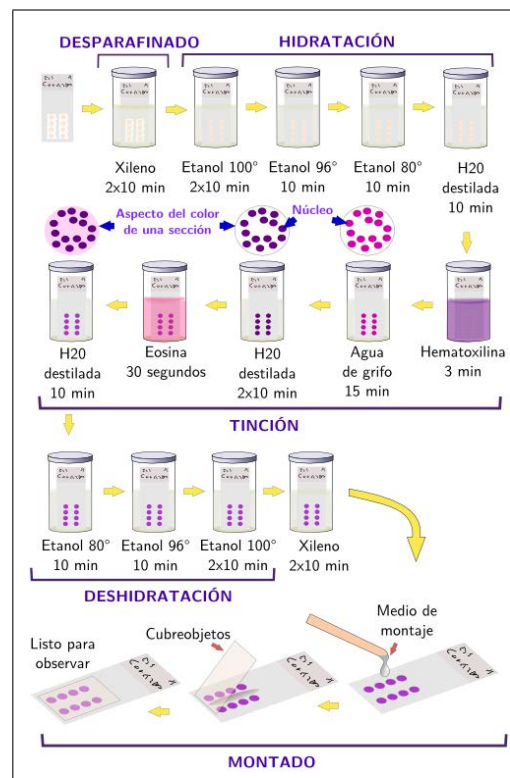


Figura 3.7: Proceso de desparafinado, tinción y montaje

3.2.2. Microscopía electrónica de barrido

Para realizar esta caracterización, es necesario preparar la muestra ya que se requiere asegurar que la estructura del andamio así como la de las células presentes en él, no se alteren. El procedimiento se realizó en el *Departamento de cirugía de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México*.

La muestra, debe estar completamente seca para poder introducirla en la cámara de vacío del microscopio. El proceso para lograrlo se conoce como secado a punto crítico, que inicia con una fijación primaria para evitar la hidrólisis de proteínas, creando redes estables con aldehídos, para lo que se utiliza un buffer de glutaraldehído al 2.5 %.

El proceso prosigue con una fijación secundaria o postfijación, esta se hace para evitar la oxidación de lípidos mediante la inmersión del tejido en buffer de tetróxido de osmio al 1 %, éste reactivo estabiliza la membrana de la célula durante la remoción de agua.

El siguiente paso, consiste en realizar una deshidratación gradual del tejido mediante un proceso muy similar al preparar las muestras para microscopía óptica. Para lo cual, la muestra se sumerge una serie de concentraciones crecientes de alcoholes empezando en 30 % y finalizando con etanol puro (100 %) (Fig. 3.8). La muestra se deja por 10 min en cada una de las concentraciones.

Finalmente, procede el secado por punto crítico con CO_2 . Con este procedimiento, se asegura mantener la integridad estructural de las células, ya que otros métodos como la liofilización por ejemplo destruyen la anatomía original de las células presentes. El proceso consiste en llenar las cavidades que posee la muestra (célula y tejidos) con el CO_2 líquido que reemplaza el etanol que originalmente contenía la muestra. La muestra se introduce en una cámara hermética conectada a un intercambiador de calor (Fig. 3.9) donde se tienen las condiciones para contener el CO_2 líquido, es decir, una temperatura $T = 16 \text{ }^\circ\text{C}$ y una presión de $P = 900 \text{ psi}$. Una vez que se ha asegurado que el CO_2 ha llenado por completo el tejido, la cámara se lleva a las condiciones del punto triple de CO_2 : $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ y $P = 1150 \text{ psi}$, de modo que todo el



Figura 3.8: Deshidratación (a) muestras y alcoholes, (b) inmersión de las muestras en los alcoholes

CO_2 se evapora alcanzando una T de $34\text{ }^\circ\text{C}$. Una vez hecho esto se debe bajar gradualmente la presión de la cámara, ya que un descenso brusco en la presión puede causar la ruptura de tejidos y membranas celulares.

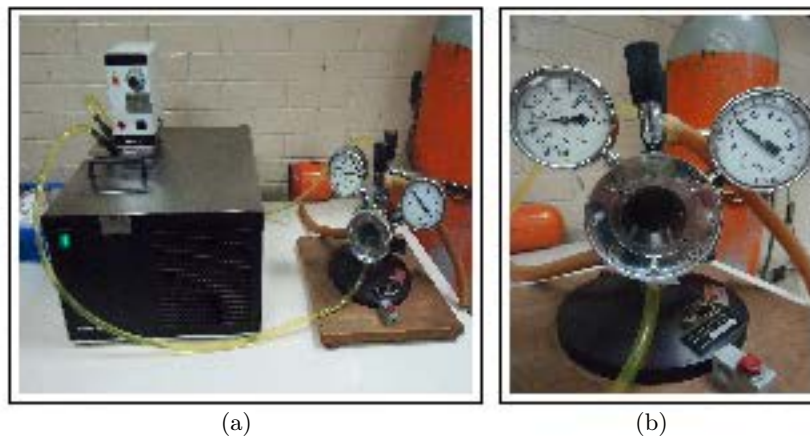


Figura 3.9: Equipo de secado por punto crítico (a) cámara e intercambiador, (b) cámara

El proceso culmina al igual que para materiales no conductores, recubriendo la muestra con un material conductor para poder observarla con el haz de electrones del microscopio electrónico sin quemarla. Esto se hace depositando una fina capa de oro sobre la muestra mediante deposición asistida por plasma. El equipo utilizado para esto (Fig. 3.10) somete un blanco de oro a un alto voltaje, desprende los átomos del blanco generando así un plasma y

depositando sobre la superficie de la muestra los átomos de oro.

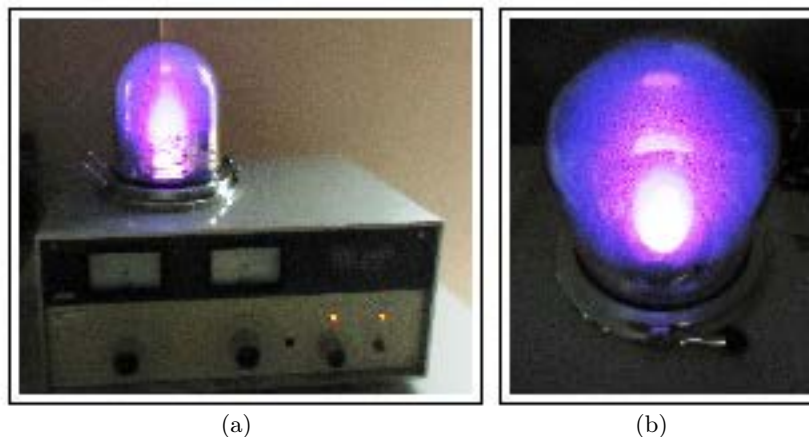


Figura 3.10: Equipo de deposición de oro (a) Equipo de deposición asistida por plasma, (b) plasma generado durante la deposición

3.2.3. Cuantificación de ADN por espectrofotometría

Para realizar la cuantificación del ADN, es preciso primero aislar el ADN de la muestra, para esto se empleó el método de separación de TRIzol[®] (SIGMA[®]). El método se describe a continuación:

Cada muestra de tejido se homogenizó usando un Polytron (Kinematica PT 2100) y se colocó en diferentes tubos que se incubaron a temperatura ambiente (TA) por 5 min. Se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitaron por 15 seg. y se mantuvieron en reposo durante 3 min. Las muestras se centrifugaron las muestras a 12,000 g por 15 min a 4°C, se separó el sobrenadante (Este contiene el ARN) y se colocó la fase intermedia en un tubo nuevo, se agregaron 300 μ l de etanol al 100 %, se mezclaron por inversión y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3 min. Se centrifugó a 2000 g por 5 min a 4°C, se retiró el sobrenadante (Este contiene proteína), se adicionó 1ml de citrato de sodio y se permitió un reposo de 30 min a TA con agitación suave. Nuevamente se centrifugó a 2000 g por 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. el botón del extracto se resuspendió en 1.5 ml de etanol al 75 %, se dejó en agitación suave a TA por 10 min, se centrifugó a 2000 g a 4°C durante 5 min, se desechó el

sobrenadante, se dejó secar al aire, y el botón se resuspendió en $50\mu\text{l}$ de Hidróxido de sodio al 8mM.

Una vez que se obtuvo el extracto de ADN se tomó $1\mu\text{l}$ de cada una de las muestra y se disolvió en $99\mu\text{l}$ de NaOH al 8mM para tener un volumen total de $100\mu\text{l}$, lo que se procedió a cuantificar.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro **GeneQuant**[®] (Fig. 3.11). Todo el procedimiento se realizó en el *Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) México*.

Una vez terminado el procedimiento de aislamiento se procedió a introducir *c/muestra* en la cubeta del espectrofotómetro de donde se obtuvo la absorbancia y la concentración. Se tomaron cuatro lecturas por cada una de las muestras (medición repetida) para finalmente reportar el promedio de las mismas.



Figura 3.11: Espectrofotómetro **GeneQuant**[®]. usado para cuantificar ADN

3.2.4. Electroforesis

Con esta técnica, es posible evaluar la pureza de las proteínas obtenidas. Esto se determina al observar el “patrón de corrida” en los geles de electroforesis, ya que si se presentan gran cantidad de bandas para una muestra particular, esto indica un mayor número de proteínas presentes de diferente peso, por lo tanto de diferente naturaleza. Una vez que se ha realizado la corrida y la respectiva tinción de los geles, es posible determinar si hubo una degradación de la proteína en la muestra, en cuyo caso aparece una especie de “barrido” en el carril electroforético y no una banda única bien definida.

La técnica de electroforesis se llevó a cabo realizando primero una homogenización de las muestras tratadas y una muestra control sin tratamiento. El procedimiento se realizó en el *Unidad de investigación del Hospital General Manuel Gea González*.

Se llevó a cabo la cuantificación de proteína utilizando el método de Lowry (Lowry y col., 1951) y como referencia se realizó por duplicado cada medición, obteniéndose una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA, fracción V, *Calbiochem*[®]) como se detalla en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Curva patrón de BSA para determinación de proteínas totales

Tubo	[BSA] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	0
2	1
3	1.5
4	2
5	3
6	4
7	5
8	6
9	7
10	8
11	9

La curva patrón y las muestras a analizar, previamente diluidas en 40 μl de agua destilada estéril, se colocaron en placas de 96 pozos (Costar, *Corning*[®] Incorporated). En cada uno de los pozos, se adicionaron 200 μl del reactivo C conteniendo:

- 100 partes del reactivo A (Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N).
- 1 parte del reactivo B1 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%) (Merck).
- 1 parte del reactivo B2 (Tartrato NaK al 2%) (Merck).

Las placas se incubaron durante 10 minutos en oscuridad. En seguida se adicionaron 20 μl del reactivo de Folin (reactivo de fenol de Ciocalteu Folin, Sigma-Aldrich) a cada pozo y se incubó durante 20 minutos en oscuridad. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 580 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se graficaron utilizando el programa *CurveExpert 1.4*. Para calcular la concentración de las muestras problemas en función de la curva estándar se aplicó la fórmula:

$$y = a + bx \tag{3.1}$$

La reacción que tiene lugar usando el método de Lowry es bastante compleja y no del todo conocida. Se desarrolla en las siguientes fases:

1. Reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} , en presencia de tartrato para evitar la precipitación.
2. Reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu para fenoles (ácido fosfomolibdo-túngstico), que se reduce por medio de los grupos fenol (y en menor medida imidazol e indol) presentes en la proteína a un complejo de color azul oscuro, que se mide colorimétricamente. El complejo coloreado, cuya composición es desconocida, presenta dos máximos de absorción a las longitudes de onda de 560 y 680 nm. La elección de una u otra depende de la concentración proteica de la muestra estudiada.

3. Dado que este método da resultados variables se requiere una curva de calibración que se hace a partir de seroalbúmina bovina.
4. Se calculó el volumen que se requiere para cargar al gel 15 μg de proteína total en un volumen final de 15 μl (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Calculo de volumen de carga

Muestra	Vol. de muestra para (15 μg)	Vol. de Buffer de carga para 15 μl
EDTA	12.5	2.5
DNasa	8.72	6.28
Tripsina	8.06	6.94
Control	4.2	10.8

Una vez se tuvo el volumen de muestra a cargar y el buffer de carga se adicionó a la muestra, se procedió a desnaturalizar las proteínas, ya que en este caso se realizó el procedimiento en condiciones desnaturalizantes, para esto se colocaron las muestras en baño maría (100°C) por tres minutos antes de cargarlas en el gel (Fig. 3.12).

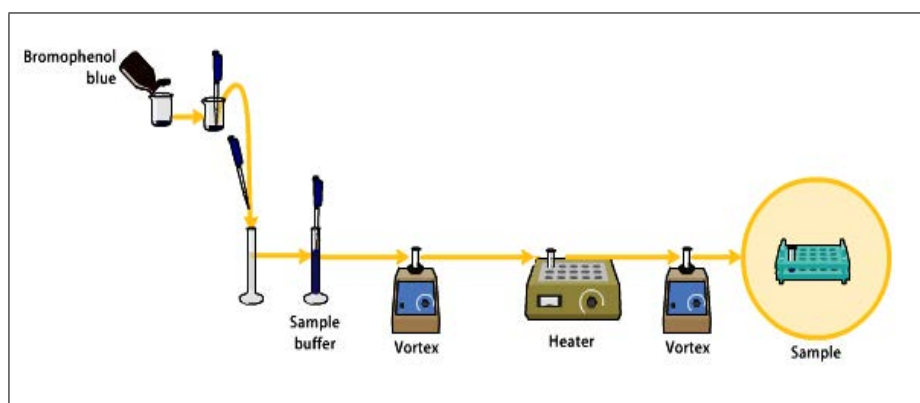


Figura 3.12: Procedimiento de preparación de la muestra

Después del proceso de preparación de la muestra se procedió a cargar la muestra en un gel de acrilamida (Fig. 3.13). En este caso se usaron geles premoldeados (Mini-PROTEAN®)

Precast Gel. **BIO RAD**[®]). Se corrió le electroforesis a un voltaje de 120 Voltios hasta que el frente de corrida estuviese en la parte inferior del gel.

Una vez terminada la corrida, se tiñó el gel con azul de Coomasie para revelar las bandas, para después dejar desteñir el gel con agua corriente y finalmente secar el gel, colocándolo en papel transparente.

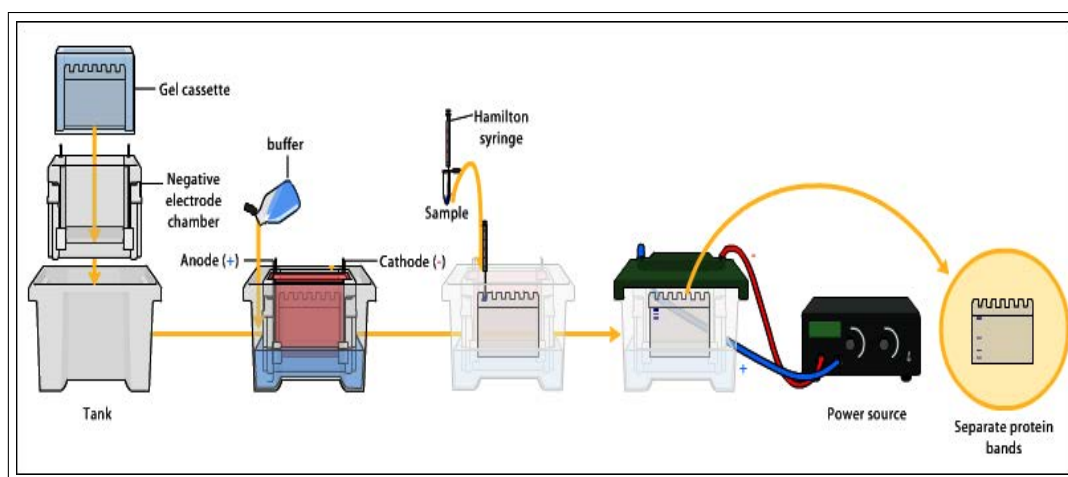


Figura 3.13: Procedimiento de carga de muestras y corrida.

3.2.5. Análisis Térmico

El análisis térmico es importante no solo para caracterizar cambios estructurales en las macromoléculas de los andamios obtenidos, provocados por efecto de la temperatura. Sino también permite establecer si hubo algún grado de degradación de las mismas, ya que al ser comparados contra una muestra control es posible determinar si las reacciones exotérmicas o endotérmicas que pueda presentar una muestra exhibe algún grado de degradación, esto al someter la muestra a un “barrido de temperatura” para el caso del *DSC*. Además este tipo de técnica en combinación con la termogravimetría (TGA) permite establecer a que temperatura se dan cambios específicos como la pérdida de agua sobre la molécula, la temperatura de desnaturalización para el caso de proteínas, la temperatura de degradación parcial y completa

de la molécula, así como los factores termodinámicos que caracterizan cada uno de estos procesos.

Para llevar a cabo los análisis térmicos (Termogravimetría y Calorimetría Diferencial de Barrido) se tomó un fragmento de cada una de las muestras tratadas, así como de la muestra control, se liofilizaron para eliminar el agua contenida en las muestras sin alterar la estructura de las mismas, posteriormente se pesaron y segmentaron obteniéndose tres fracciones de las muestras para asegurar que el peso de cada segmento fuese el mismo (Fig. 3.14), esto se hizo con el fin de realizar tres corridas por cada una de las muestras y reportar una curva promedio.

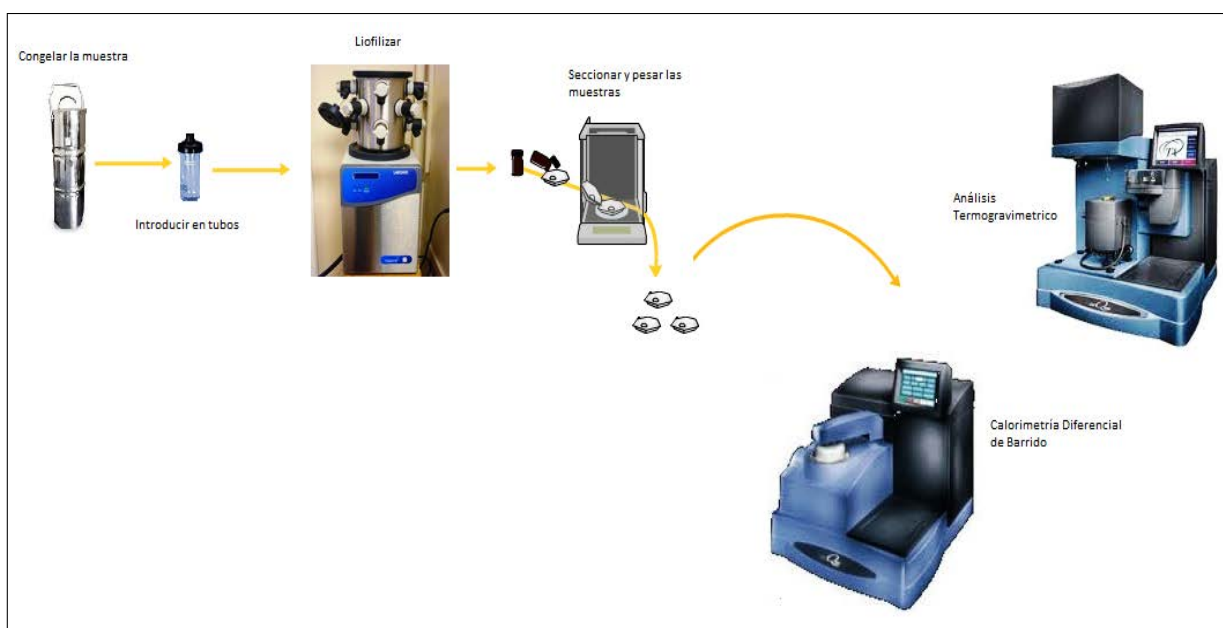


Figura 3.14: Proceso de obtención de muestras para análisis térmico

Finalmente se llevaron a cabo los análisis térmicos. La termogravimetría se llevó a cabo en un “*Thermogravimetric Analyzer Q500 TA Instruments*”, en atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y un rango de temperatura desde T ambiente hasta 500°C . Mientras que la calorimetría diferencial de barrido fue hecha en un “*Differential Scanning Calorimeter Q100 TA Instruments*” a una velocidad de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en atmósfera de Nitrógeno y un rango de temperaturas desde T ambiente a 300°C .

Capítulo 4

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Los resultados que se muestran en este capítulo se refieren a la evaluación y caracterización del material obtenido una vez lavado, para ser utilizado como andamio celular. Primeramente, se mostrará el resultado obtenido de la caracterización microscópica de la matriz, con la que es posible evaluar cambios estructurales sobre esta. Luego se hará referencia a la caracterización electroforética del material, donde se evaluará las características fisicoquímicas del material, en particular las proteínas obtenidas después de llevar a cabo los tratamientos de lavado. Finalmente se hará la discusión y análisis de la caracterización térmica del material, lo que sentará las bases para un análisis integral de la estructura obtenida.

4.1. Histología

Se llevó a cabo el procedimiento descrito en la Sección 3.2.1 (ver Pag. 63), se obtuvieron las micrografías correspondientes al tejido traqueal, en las que se pueden observar las estructuras propias de la tráquea como son: el cartílago hialino, tejido fibroconectivo, glándulas submucosas y epitelio respiratorio íntegro.

Al comparar los hallazgos histológicos entre las muestras de tejido traqueal obtenidas después de cada uno de los tratamientos que fueron probados (Ver Fig 4.2), fue posible identificar

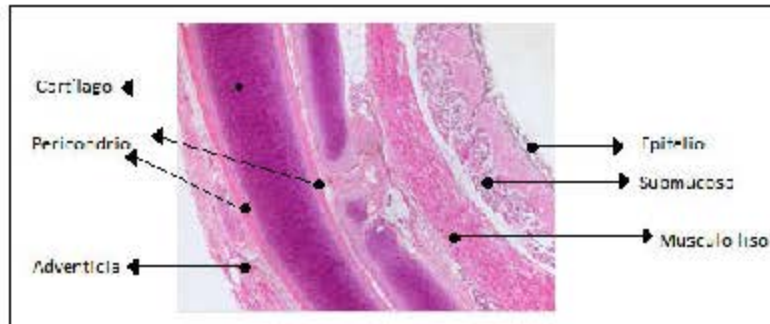


Figura 4.1: Tráquea control HE 2,5X

cambios notorios entre ellas. Primero, en la muestra control fue posible identificar: el cartílago traqueal, las lagunas, las células propias del cartílago (condrocitos), además de su núcleo celular, lo que indica sin lugar a dudas un tejido viable y una actividad metabólica al momento de extraer la muestra.

En las micrografías que corresponden a los tratamientos “*DNasa*” y “*EDTA*” éstas muestran de igual forma el tejido cartilaginoso con los condrocitos al interior de las lagunas, pero en este caso, a diferencia de la muestra control, las células no muestran evidencia de núcleo celular lo que puede inferirse como una ausencia de actividad metabólica en las mismas. No se observa alteración alguna en la matriz del cartílago. Al observar y comparar la muestra “*Tripsina*” con la muestra “*Control*” resulta evidente la total ausencia de condrocitos.

Con estos resultados y considerando diferentes campos de cada muestra, a igual ampliación, se realizó una estadística, de donde se obtuvo lo siguiente:

Se realizó el conteo de lagunas y condrocitos para la muestra “*Control*”, a partir de las imágenes obtenidas por medio de tinción histológica con HE. En los campos seleccionados, fue posible contar un total de 50 lagunas dentro de las cuales se encontró un total de 43 células con núcleo visible. De acuerdo con lo anterior se tiene que el nivel de ocupación de las lagunas antes de someter el tejido a cualquier tratamiento fue de un 86 %, es decir que en promedio, hubo 14.3 ± 6.11 condrocitos por campo, en una muestra aleatoria de tejido cartilaginoso de tráquea sin tratamiento alguno.

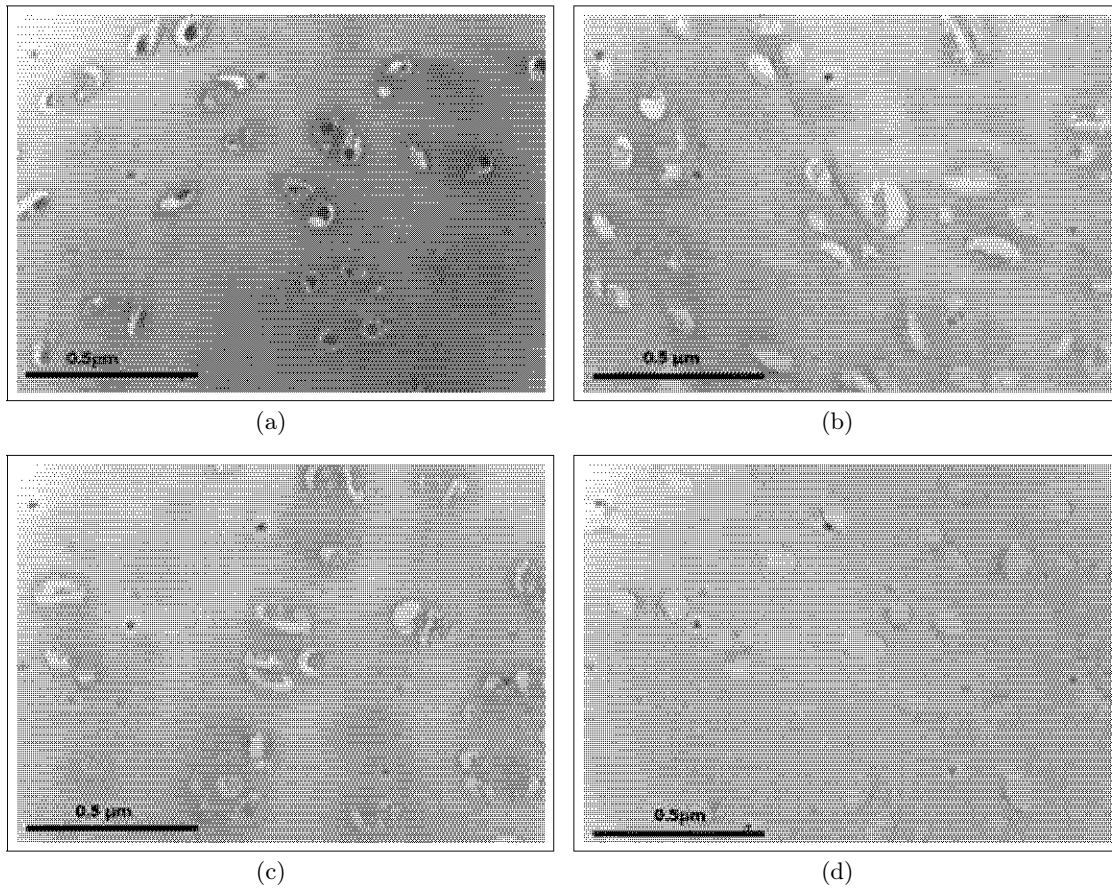


Figura 4.2: Comparación de tratamientos mediante histología (H-E) : (a) Control. (b) DNasa. (c) EDTA (d)Trispsina

En lo que respecta al tratamiento “*DNasa*”, cuando se realizó el conteo de lagunas y condrocitos en los campos seleccionados se obtuvo un total de 70 lagunas dentro de las cuales se encontraron un total de 47 condrocitos sin nucleo apreciable. De acuerdo con lo anterior, el nivel de ocupación de las lagunas, después de someter el tejido a tratamiento al método de Meezan y completar 15 ciclos de lavado fue de un 67.14%, con un promedio de 15.6 ± 4.5 condrocitos por campo.

Para el tratamiento “*EDTA*” se obtuvieron un total de 58 lagunas dentro de las cuales se

encontró un total de 40 condrocitos sin evidencia de nucleo. De acuerdo con lo anterior el nivel de ocupación de las lagunas después de someter el tejido a este tratamiento y tras 15 ciclos fue de un 68.96 %, con un promedio de 13.3 ± 3.21 condrocitos por campo.

Finalmente, en el tratamiento “*Tripsina*”, se observó cómo se mencionó anteriormente, un tejido prácticamente desprovisto de células viables. En los campos seleccionados, fue posible contar un total de 53 lagunas dentro de las cuales se encontraron un total de 6 condrocitos. De acuerdo con lo anterior, el nivel de ocupación de las lagunas después de someter el tejido a este tratamiento fue de un 11.3% con 2 ± 2.6 condrocitos por campo.

Estos resultados se muestran en la gráfica correspondiente a la Fig. 4.3, la cual muestra la diferencia encontrada en el promedio de células de acuerdo al tratamiento aplicado.

Con base en estos resultados, se observa que no hubo una disminución sustancial del promedio de células para los tratamientos “*DNasa*” y “*EDTA*”, este no es un resultado deseable de acuerdo con lo que se buscaba que es la descelularización de la matriz, sin embargo no debe olvidarse que los resultados histológicos, mostraron que las células presentes carecían de actividad metabólica aparente (no poseían núcleo visible) por lo que no es adecuado entonces descartarlas como posible sustituto de tráquea. Por otro lado al observar la muestra del tratamiento *Tripsina* es evidente el cambio dramático en el promedio de células en la matriz después de realizar dicho tratamiento.

Los comportamientos observados en cada tratamiento pueden ser atribuidos a:

1. La acción enzimática de la **DNasa-1** la cual hidroliza el ADN presente en el núcleo celular. Es por esto que en aquellas muestras donde aún se observa la presencia de material celular, el núcleo no es evidente.
2. Aunque se esperaba que el efecto del *ácido etilendiaminotetracético* (EDTA) tuviera como resultado una acción más eficaz en la descelularización, dado que tiene la propiedad

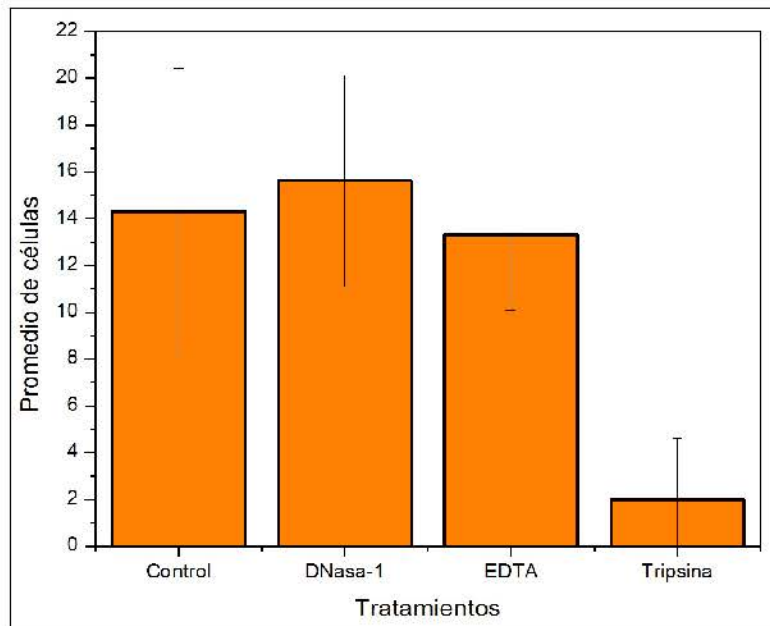


Figura 4.3: promedio de condrocitos sin núcleo encontradas mediante histología

de combinarse con iones metálicos polivalentes, para formar complejos coordinados cíclicos de anillo (no iónicos), solubles en agua y virtualmente no disociables (quelatos), debe recordarse que las interacciones célula-MEC (matriz extracelular) están dadas entre otras moléculas por las integrinas (Sección 1.8.2) (ver Pag. 33). La unión de las integrinas a sus ligandos depende de cationes divalentes extracelulares (Ca^{2+} o Mg^{2+} , dependiendo de la integrina), de tal modo que la reacción presente en este caso fue una formación de complejos con cationes (Fig. 4.4). Ya que el EDTA actúa como ligando del átomo metálico coordinante (Ca^{2+} o Mg^{2+}).

Por otro lado, las uniones celular-MEC también están gobernadas por las glicoproteínas que provienen de la MEC (Condronectina), lo cual demuestra que romper la unión de las integrinas no es suficiente para remover por completo las células.

Por último al analizar los resultados obtenidos con el uso del tratamiento “*Tripsina*” es claro que se logró la descelularización con gran efectividad, este hecho puede verse justificado

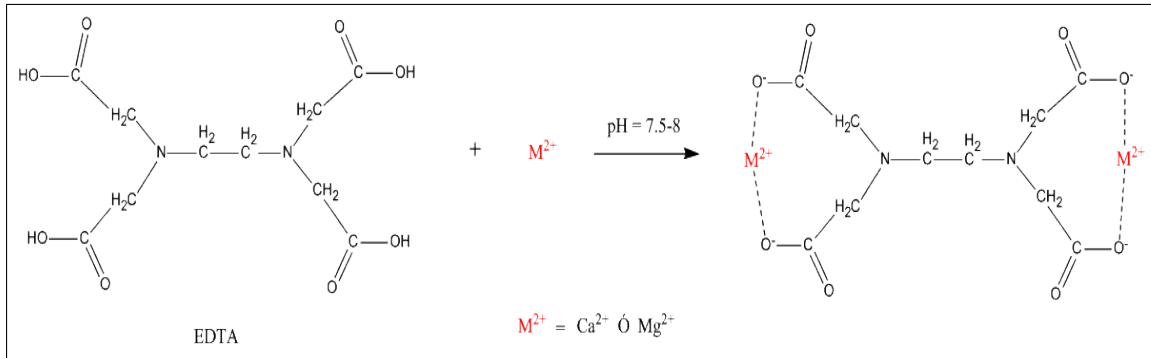


Figura 4.4: Reacción de quelación con EDTA

no sólo por el uso de esta enzima, sino también a un uso sinérgico de la Tripsina con el agente quelante (EDTA). En este la ruptura de los enlaces peptídicos que componen la condronectina, la cual también interviene en la unión célula-MEC, fue catalizada por la Tripsina, presentándose una hidrólisis enzimática (Fig. 4.5) lo que favoreció la eliminación del material celular.

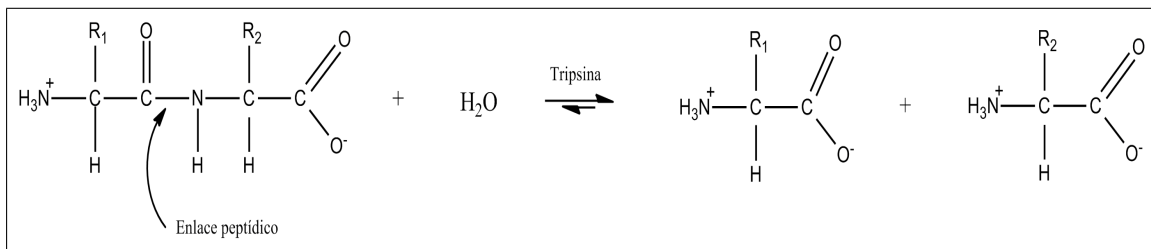


Figura 4.5: Reacción de hidrólisis enzimática catalizada por Tripsina

Aunque el uso de Tripsina promovió la descelularización de la MEC, que finalmente era lo que se buscaba, no debe olvidarse el hecho de que haya ruptura de enlaces peptídicos, y pues esto es un claro indicador de la formación de proteínas de menor peso molecular, lo que puede indicar un efecto adverso en las propiedades biomecánicas del andamio que se busca obtener. Es importante recalcar que no se deben descartar los otros tratamientos (“*DNasa*” y “*EDTA*”), ya que aunque no hubo una disminución en el promedio de condrocitos, es claro que éstas no poseen actividad metabólica alguna debido a que no existe evidencia de núcleo, esta evidencia sugiere que la membrana celular fue penetrada por la *DNasa-1*, la cual promovió la hidrólisis del ADN presente en el núcleo dejando la célula inviable, por lo tanto

esto finalmente puede conducir a una disminución en la respuesta inmune del implante, ya que al destruir la célula se destruyen con esta los MCH, responsables en mayor medida de la respuesta inmune que presentan los órganos y tejidos a trasplantar (Sección 1.11) (ver Pag. 36)

4.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta caracterización resulta de vital importancia no solamente para evaluar el proceso de descelerización como tal, sino también para establecer cambios y/o alteraciones sobre la matriz de colágena.

Al observar las primeras micrografías (Fig.4.6) correspondientes a la muestra control, en la primera de ellas (Fig.4.6a) se muestra un corte del tejido traqueal, en el que se observan los condrocitos (Fig.4.6b). También se observan los cilios propios de la estructura traqueal íntegros (Fig. .4.6c). Por último se muestran los hematocitos contenidos en una matriz de fibras (Fig.4.6d), estas fibras corresponden al tejido fibroconectivo que rodea el tejido traqueal, la presencia de estas células se justifica debido a que la muestra fue sometida a preparación para su análisis inmediatamente después de ser obtenida en el quirófano del donante. Todos estos elementos son claros indicadores de un órgano en buen estado y saludable apto para el estudio requerido.

En el caso de las muestras del tratamiento “*DNasa*”, las micrografías muestran tejido cartilaginoso con ausencia de células condrocíticas (ver Fig. 4.7), para la primera de estas, la imagen evidencia la presencia de tejido fibroconectivo, con una disminución evidente en el número de células (Fig. 4.7a.) y sin alteraciones aparentes en la matriz de cartílago por efecto del tratamiento. Al observar una mayor ampliación (Fig. 4.7b.) es evidente que se han perdido todos los condrocitos en el interior del cartílago, esta apreciación en principio parece contradecir los resultados histológicos, sin embargo debe tenerse en cuenta ciertos elementos de esta micrografía. Lo primero es que no se trata de un corte transversal del cartílago, de igual manera, los resultados histológicos muestran el cartílago hacia el centro del anillo traqueal, en este caso se trata de una superficie que quedó expuesta a la solución de lavado. En las áreas

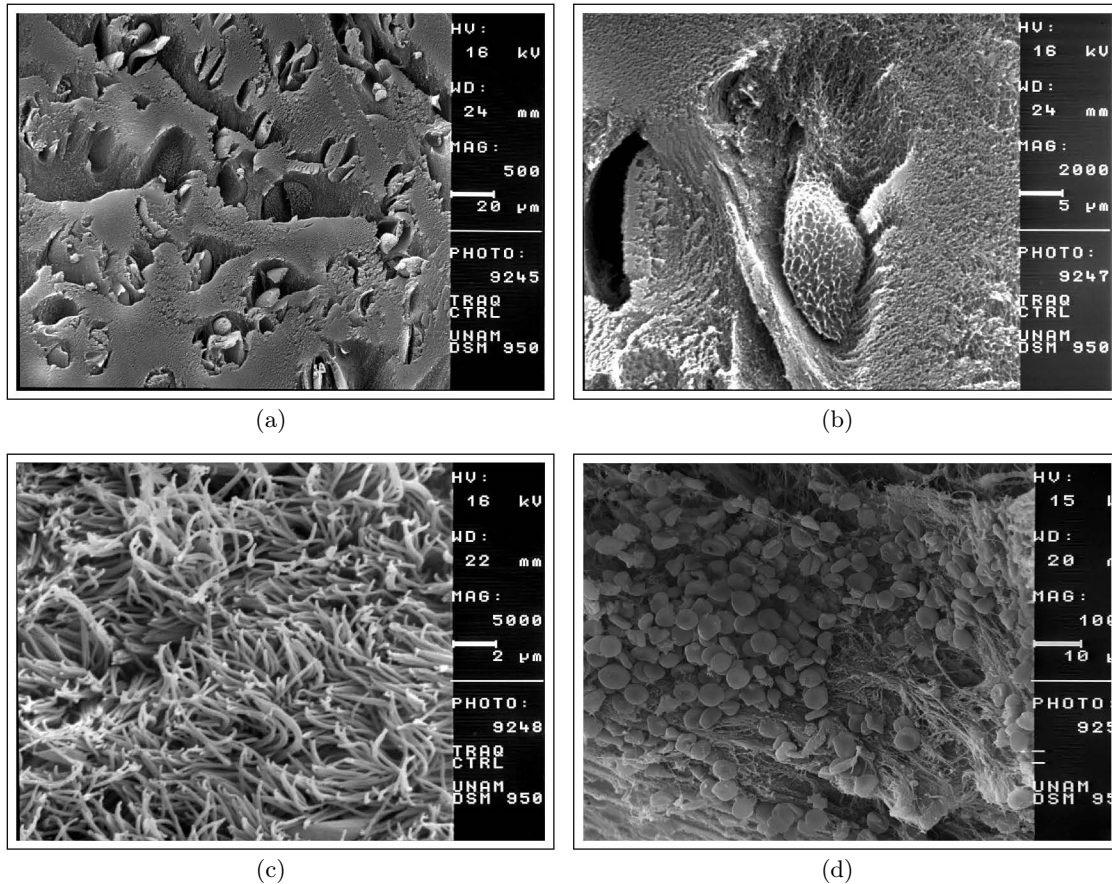


Figura 4.6: Micrografías SEM de tráquea: (a) panorámica lagunas y condrocitos. (b) Condrocito. (c) Cilios (d) hematocitos contenidos en el tejido fibroconectivo

de la periferia del tejido será más efectivo el proceso de remoción de material celular que hacia el centro del mismo.

Este hallazgo tiene su justificación en la naturaleza biológica del propio tejido cartilagi-
noso, dentro de las características propias del cartílago hialino se tiene que este carece de
vasos sanguíneos, linfáticos y nervios, es decir que el alimento de las células es transportado
por procesos difusivos a través de la matriz de cartílago (Sección 1.4) (ver Pag. 20). Por esta
razón es que el proceso avanza de acuerdo al coeficiente de difusión del cartílago y de acuerdo
con las leyes de Fick. El estudio de estos procesos escapa a los objetivos de esta investigación.

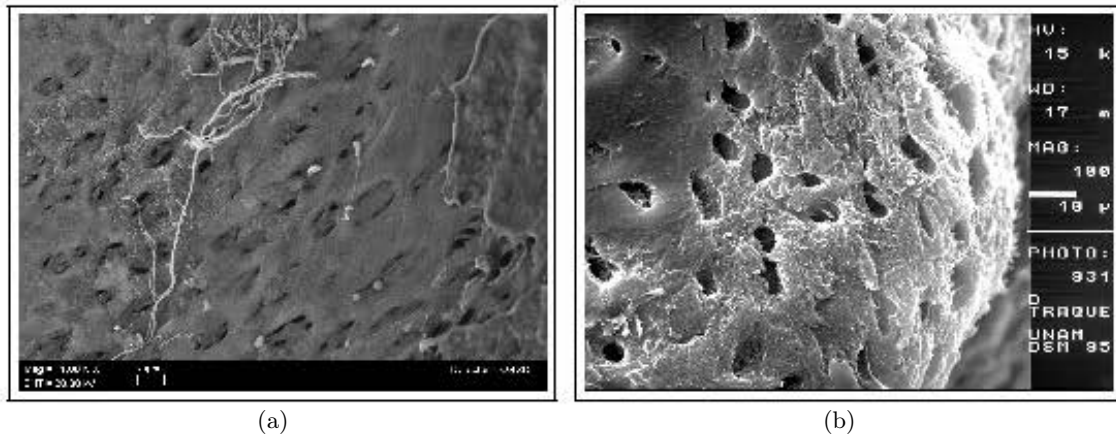


Figura 4.7: Micrografías de la muestra DNasa. (a) Cartílago con tejido fibroconectivo (b) lagunas de cartílago

En el caso del tratamiento “*EDTA*”, las micrografías mostraron que la adición del agente quelante no presentó efecto adverso aparente sobre la matriz del cartílago en primera instancia, de igual forma los resultados de histología lo confirman, pues como puede verse en la Fig. 4.8 se observa la presencia de células sobre la matriz. Aunque por otro lado, al observarse a ampliificaciones mayores (Fig. 4.8b) hay evidencia que en algunas partes de la matriz las lagunas se encuentran vacías. Estos resultados de microscopía electrónica de barrido sumados a los encontrados mediante la tinción histológica, confirman que la adición de un agente quelante como el **EDTA**, por sí solo y en las concentraciones que utilizadas en el proceso de lavado, no tiene un efecto significativo en la descelerización de las matrices.

En este caso se esperaba que la reacción de quelación entre el **EDTA** y los iones Ca^{2+} o Mg^{2+} de las integrinas (Sección 1.8.2) fuera suficiente para debilitar las uniones célula-matriz extracelular y así removerlas. No debe olvidarse que estas uniones en el caso del cartílago no solamente dependen de las integrinas sino también de la condronectina, la cual, contribuye a la fijación de los condrocitos a la colágena en la matriz.

Finalmente, las micrografías correspondientes a la muestra “*Tripsina*” (Fig 4.9), muestran un buen aspecto en la matriz de cartílago, sin alteraciones evidentes y ausencia de células,

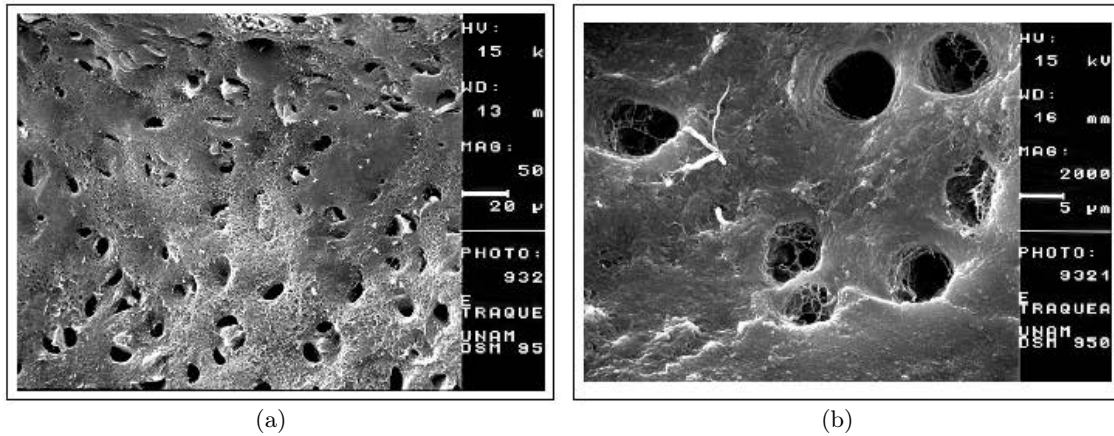


Figura 4.8: Micrografías de la muestra EDTA. (a) Cartílago (b) lagunas de cartílago

este último hecho se puede explicar porque además de que el tejido fue sometido a la acción del agente quelante (EDTA) también se incubó en la Tripsina, el efecto de dicha enzima está dado sobre los enlaces peptídicos de modo que puede actuar rompiendo los enlaces de las glicoproteínas como la condronectina por lo tanto en este caso se está actuando sobre los dos componentes principales de la unión célula-matriz extracelular, es por esto que este tratamiento fue más efectivo para la remoción de la células sobre la matriz, como lo confirman los resultados previos de histología.

Aunque las observaciones microscópicas confirman que el tratamiento “*Tripsina*” fue bastante efectivo para la remoción de material celular debe tenerse en cuenta que esta enzima actúa sobre los enlaces peptídicos y dichos enlaces no solamente se encuentran en la condronectina, sino en todas las proteínas como la colágena principal elemento constitutivo del cartílago. Es por esto que aunque los resultados macro y microscópicos no confirmen alteración aparente sobre la matriz debe hacerse un seguimiento sobre la estructura y peso molecular para establecer de qué manera pudo verse afectada la estructura del andamio, ya que al haber cortes de enlaces peptídicos esto sugiere que hubo decremento en el peso molecular de las proteínas, lo que a la postre puede generar pérdidas en las propiedades biomecánicas del andamio.

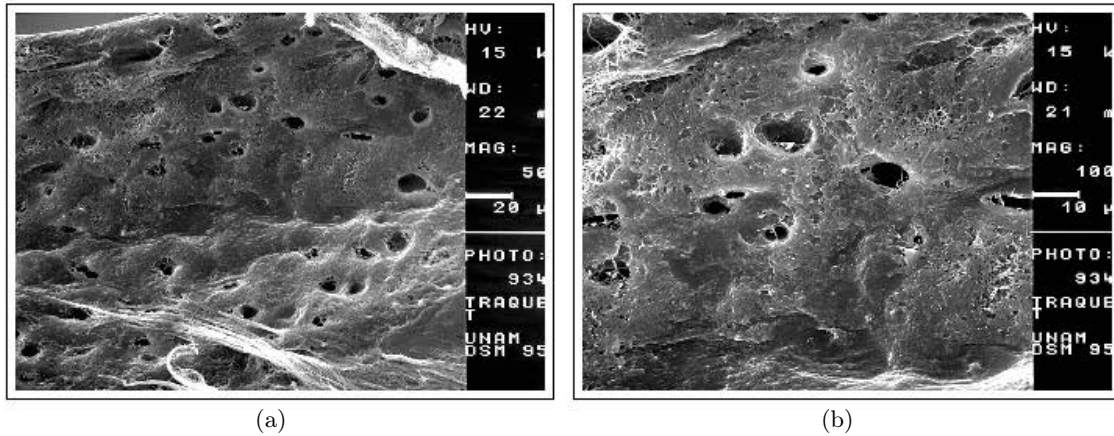


Figura 4.9: Micrografías de la muestra Tripsina. (a) Cartílago (b) lagunas de cartílago

4.3. Cuantificación de ADN

La cuantificación del Acido Desoxirribonucleico (ADN) es otra forma de confirmar o descartar la presencia de células de manera indirecta, ya que el ADN se encuentra en el núcleo mismo de la célula activa, a diferencia de la evaluación macroscópica es una caracterización más general, de modo que se tienen datos de manera aleatoria y no focalizados.

Esta caracterización cobra importancia, ya que dentro de los tratamientos se usó la **DNasa-1** enzima que hidroliza las cadenas de ADN, es decir que se ataca el núcleo de la célula dejándola desprovista de cualquier actividad metabólica.

Después de aislar el ADN de cada muestra con la ayuda del **TriZol**[®] se procedió a cuantificar la cantidad de ADN presente por medio de espectrofotometría, se tomaron cuatro lecturas por muestra de cada uno de los tratamientos y finalmente se hizo el promedio. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4.1.

Al observar los datos referentes a la cuantificación de ADN (Tabla 4.1) resulta indiscutible una disminución en la concentración, esta reducción, es debida al uso de la enzima **DNasa-1** en los tratamientos, ya que actúa hidrolizando las cadenas de ADN rompiendo la molécula,

Tabla 4.1: Cuantificación de ADN

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Control	45.46 ± 9.5
DNasa	1.78 ± 2.1
EDTA	0.76 ± 1.5
Tripsina	0.28 ± 0.2

dejando inactiva e inviable completamente la célula. Este resultado sumado a lo que se encontró por microscopía óptica es una clara evidencia de que los tratamientos usados resultaron efectivos para el objetivo final de disminuir una posible respuesta inmune de la matriz.

La evidencia encontrada con esta cuantificación sugiere que el proceso requirió de la ruptura de la membrana celular de las células, ya que el ADN presente en las muestras provendría del núcleo celular. Esto se debió a la acción del detergente, ya que el **Deoxicolato de Sodio** actúa rompiendo la membrana celular, liberando los contenidos intracelulares [37], lo que permitió entonces que la **DNasa-1** actuara, ejerciendo un efecto catalítico hidrolizante, que consiste en producir la ruptura de enlaces por agua (Fig. 4.10); La DNasa es una enzima de tipo hidrolasa, en particular es una nucleasa (o fosfodiesterasa ya que rompe enlaces fosfodiester); la DNasa-1 específicamente es una endonucleasa es decir que rompe enlaces fosfodiester en zonas intermedias del ADN. Además algunos autores [15] sugieren que la DNasa es la responsable de la fragmentación del ADN durante la apoptosis (muerte celular programada) hecho que ratifica la teoría de que las células aun observables carecían de viabilidad o actividad metabólica alguna.

Por último, cabe anotar que aunque en los procesos “*DNasa*” y “*EDTA*”, no se produjo una disminución significativa en el número de células como lo mostró la histología; la evidencia encontrada en la cuantificación de ADN permite deducir que la reacción inmune que pueda llegar presentar este tipo de matriz se vea disminuida, debido a que los antígenos leucocitarios humanos (HLA por su acrónimo en inglés), los responsables de la respuesta inmune, se en-

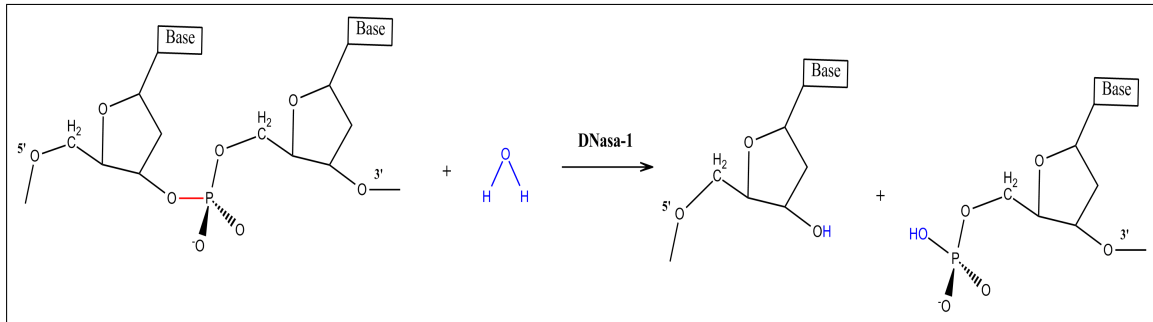


Figura 4.10: Reacción de hidrólisis enzimática del ADN catalizada por la DNasa-1

cuentran en las células (Sección 1.11) (ver Pag 36), de tal manera que al destruir las células es aceptable pensar que la respuesta inmune se vea disminuida. De cualquier forma este hecho debe ser demostrado con las pruebas pertinentes al caso.

4.4. Electroforesis

Para llevar a cabo esta técnica, se realizó primero la cuantificación de proteínas por el método de Lowry, como se mencionó en la sección 3.2.4 (ver Pag. 71). con el objeto de generar la curva patrón (Fig. 4.11).

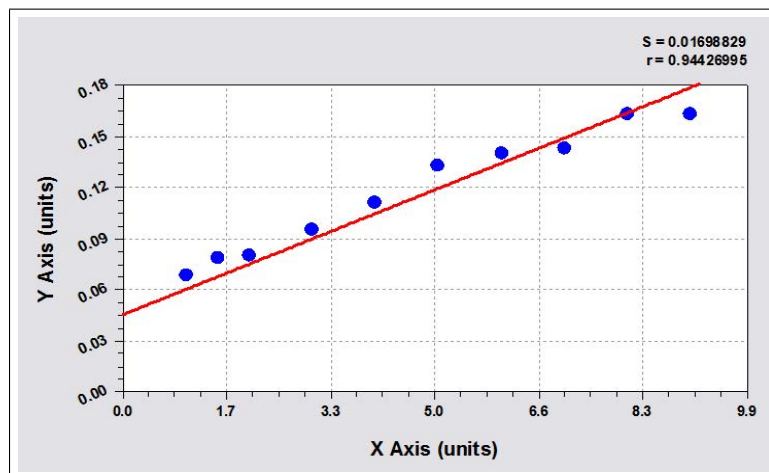


Figura 4.11: Curva patrón cuantificación de proteínas

La curva indica que grado de precisión tiene las medidas de cuantificación tomada, esta medida está dada por la desviación estándar “ r ” de la curva, la cual es una medida de la centralización o dispersión de los datos respecto a una media aritmética; donde un valor de r cercano a 1 indica poca variabilidad de los datos, es decir que se tiene un buen modelo que se ajusta a la recta.

En el procedimiento como se indicó se obtuvo la cuantificación de proteínas totales para cada una de las muestras tratadas, así como de la muestra control (sin tratamiento alguno). Los resultados de dicha cuantificación se muestran en la tabla 4.2

Tabla 4.2: Cuantificación de Proteínas

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
EDTA	1.244
DNasa	1.724
Tripsina	1.861
Control	3.714

Los resultados mostrados en la tabla muestran una concentración baja de proteína en las muestras tratadas con respecto a la muestra, esto se debe a la naturaleza misma de la muestra, ya que la muestra control es una muestra que no fue sometida a ningún tratamiento y posee todo el material propio de su entorno biológico (tejido fibroconectivo, células, componentes de matriz extracelular) lo que da como resultado obvio, una mayor cantidad de proteínas.

Por otro lado una vez hecha la corrida de electroforesis y realizado el respectivo teñido y posterior desteñido del gel, fue posible obtener el patrón electroforético correspondiente (Fig. 4.12).

El resultado del patrón de electroforesis es un patrón típico de colágena II ya que se observa la banda $\alpha 1(\text{II})$ esta es típica para este tipo de colágena, pues esta se compone de tres

cadenas de este mismo tipo (Sección 1.5.3) (ver Pag. 23), el peso reportado en otros estudios de colágena tipo II como el de *Cao H. y col.* establece un peso de 110 kD para las cadenas $\alpha_1(\text{II})$ [54], lo cual concuerda con lo encontrado en esta investigación por lo tanto es correcto afirmar que las bandas encontradas en las muestras tratadas (E,D,T) corresponden a cadenas $\alpha_1(\text{II})$, lo que confirma la presencia esperada de colágena tipo II.

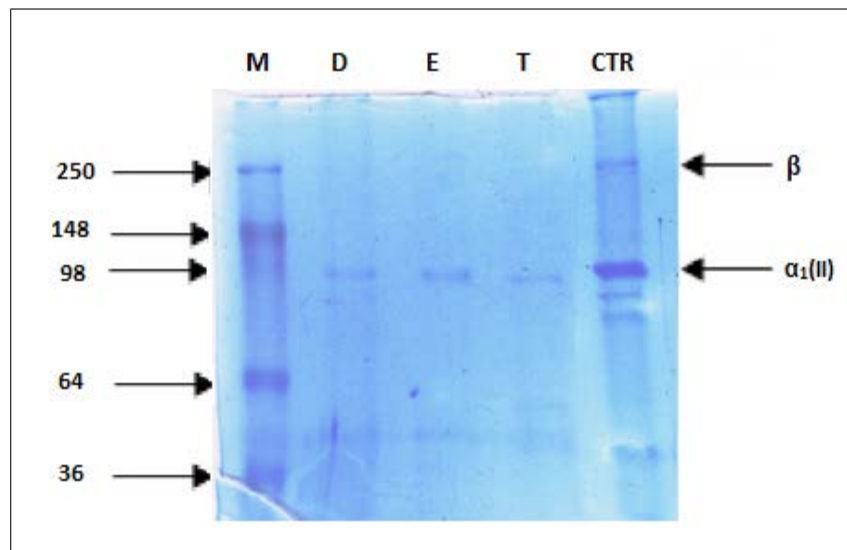


Figura 4.12: Patrón de SDS-PAGE electroforesis (M) Marcador *SeeBlue*[®] Plus2 Pre-Stained Standard - *Invitrogen*[®] (D) tratamiento “*DNasa*” (E) tratamiento “*EDTA*” (T) tratamiento “*Tripsina*” (CTR) *Control*

Por otro lado la investigación de *Cao H* [54]. reporta la presencia de los dímeros cadenas- β ; el peso reportado para estos dímeros es alrededor de 200 kD. En esta investigación se encontró las bandas de las cadenas- β cercano a los 250 kD. Estas diferencias en los pesos no son significativas, ya que incluso algunos autores como *Lirong He. Y col.* [55], aunque no reportan un peso exacto para estas cadenas puede verse en sus resultados que el peso de las mismas es ligeramente superior a 200kD. Por lo tanto es posible afirmar que la banda que aparece ~ 250 kD efectivamente corresponde a cadenas- β .

Al observar los carriles de las muestras tratadas resulta evidente una menor concentración de las proteínas este hecho se debe a que aunque se calculó el volumen necesario para cargar

igual cantidad de proteína la capacidad de los pozos del gel no lo permitió y debido a que dichas muestras contenían una menor cantidad de proteína como lo mostró la cuantificación inicial y esto dió como resultado un patrón más claro con respecto a la muestra control. Podría sugerirse que este resultado también se deba a degradación de las muestras, pero este hecho queda descartado pues una degradación de las proteínas mostraría muchas bandas, es decir una especie de “barrido” sobre el carril de la muestra, correspondiente a moléculas que corren a diferentes pesos; esto no fue lo que se observó en el patrón de electroforesis.

Por otro lado la muestra “Control” revela además otras bandas, las cuales pueden ser atribuidas a proteínas de tejidos diferentes al cartílago tales como cilios y tejido conectivo, que no corresponden a colágena tipo II.

Por ultimo, un factor que se evidencia en el patrón es una alta pureza de las matrices obtenidas, es decir que el patrón de electroforesis no evidencia presencia de proteínas de una naturaleza distinta a la colágena tipo II propia del cartílago. Esto es una clara evidencia que las matrices obtenidas son en gran porcentaje compuestas por Colágena II.

4.5. Análisis Térmico

La Calorimetría diferencial de barrido y el análisis termogravimétrico fueron usados para detectar cambios en parámetros propios de estas macromoléculas, como la temperatura de desnaturalización (T_d), así como evaluar cambios la estabilidad térmica de las matrices.

Después de obtener los termogramas se graficaron las curvas promedios de las tres mediciones realizadas por cada muestra. En el caso de la calorimetría diferencial de barrido se observan tres picos endotérmicos importantes después de los 70°C para las diferentes muestras (Fig. 4.13), sin embargo aparece un pequeño pico endotérmico en la curva de la muestra control alrededor de los 30°C, esto corresponde a la eliminación de agua adsorbida sobre su superficie, esto lo confirma la primera pendiente que aparece en el perfil termogravimétrico (Fig. 4.14).

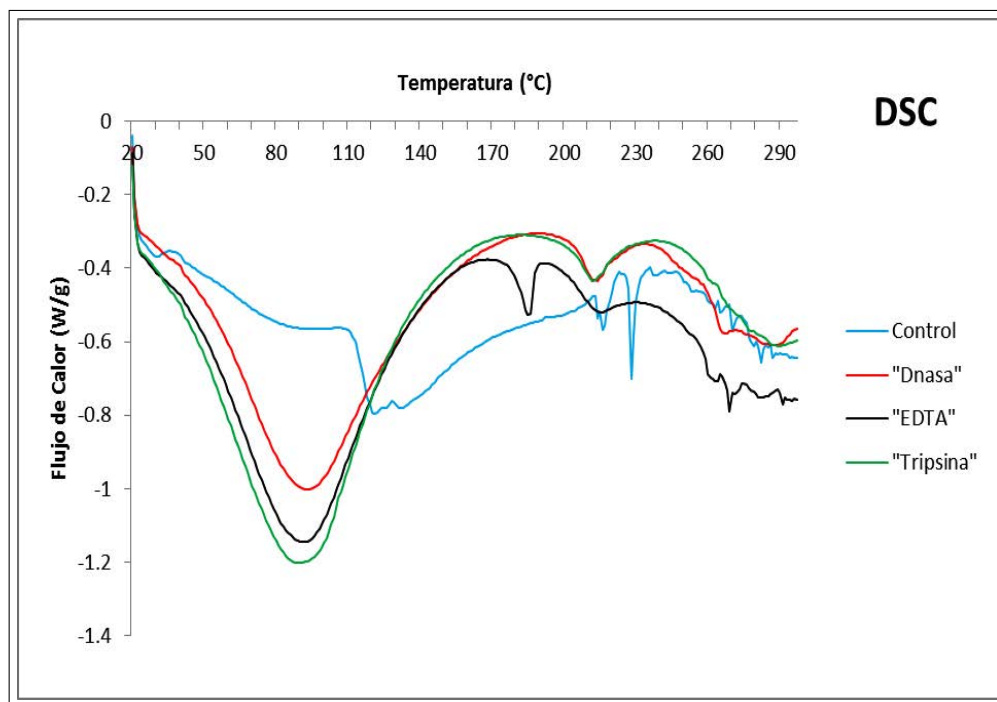


Figura 4.13: Perfil de calorimetría diferencial de barrido de las muestras + control

El primer pico endotérmico importante aparece cercano a los 80 °C para las muestras sometidas a los tratamientos de descelularización, los cuales muestran un comportamiento muy similar, por otro lado la muestra control mostró un comportamiento bastante disímil en comparación con las muestras tratadas y su primer pico endotérmico importante aparece alrededor de los 115°C. Este cambio endotérmico corresponde a las T_d de la colágena. En el caso de la muestra control esta concuerda con los resultados reportados por otros autores, los cuales reportan una temperatura de desnaturalización para colágenas entre 104 °C y 112°C [56, 57]. Se sabe que la temperatura de desnaturalización está relacionada con la transición de la estructura de triple hélice de la colágena a una estructura de espiral al azar (modificación de la estructura terciaria) [58, 59], lo cual no implica una pérdida de moléculas o masa del material, razón por la cual no se ve reflejado dicho cambio en el patrón termogravimétrico.

El hecho de que la T_d sea menor en las muestras tratadas indica una desnaturalización reversible, producto de la deshidratación y rehidratación periódica de las muestras durante la

metodología experimental. Este efecto quedó demostrado en los trabajos de *A. Bigi y col.* [57], donde se sometieron muestras de colágena a deshidratación y rehidratación, y se les realizó DSC antes y después del proceso dando como resultado una T_d inicial de 112°C y T_d final de 51°C después de haber sido deshidratadas. Sin embargo, este hecho no implica una degradación propia de la matriz, ya que se trata de una desnaturalización reversible; esto debido a que el proceso de desnaturalización como tal es una reacción en estado de equilibrio, en este caso es originado debido a que el proceso de deshidratación y posterior rehidratación por efecto del agua atrapada genera un estado de desorden al interior de la molécula de colágena lo que origina una desnaturalización parcial de la molécula, lo que implica una pérdida parcial de actividad enzimática de la misma [57], esto concuerda con datos de T_d hallados en otras investigaciones para colágenas puras donde dicha temperatura estuvo entre 51°C y 81.89°C [14, 55, 57, 59, 60].

Estas variaciones en la T_d se deben a que dicha transición implica la ruptura de enlaces débiles para las colágenas de estructura fibrilar y que contienen hlices α . pues como se mencionó, la T_d implica la modificación de la estructura terciaria de esta molécula, dicha estructura se mantiene gracias a puentes de hidrógeno entre cadenas (Sección 1.5.3), lo que implica que al deshidratar la molécula se pierden estos enlaces, es por esto que la reacción del estado nativo de la molécula de colágena al estado desnaturalizado es una reacción en equilibrio que estará desplazada hacia el lado donde se encuentre mayor número de moléculas (estado nativo o desnaturalizado) [61]. Lo cual es favorecido o impulsado por las condiciones del sistema (Temperatura, Humedad relativa, Presión). Esto explica porque una molécula de colágena deshidratada una vez es rehidratada favorece la formación de puentes de hidrógeno y su regreso al estado nativo [57]. siempre y cuando no se afecte la estructura secundaria de la cológena.

Por último, los picos endotérmicos posteriores corresponden a la descomposición de la molécula de colágena, es decir una pérdida de estructura secundaria y primaria la cual ocurrió para la muestra control a $\sim 215^\circ\text{C}$ y $\sim 230^\circ\text{C}$ respectivamente. Mientras que para la muestra “EDTA” dichos cambios ocurrieron a $\sim 190^\circ\text{C}$ y $\sim 220^\circ\text{C}$. Por otra parte para las muestras “DNasa” y “Tripsina” el segundo pico endotérmico correspondiente a la pérdida de la estruc-

tura secundaria aparece a $\sim 210^{\circ}\text{C}$ para las dos muestras y su última transición o destrucción total de la estructura es poco visible en el termograma. Sin embargo, parece estar después de los 260°C , aunque dicha lectura no es confiable ya que como puede apreciarse en el termograma para todas las muestras después de los 250°C las lecturas son muy variables debido a que corresponde a la destrucción completa de la estructura.

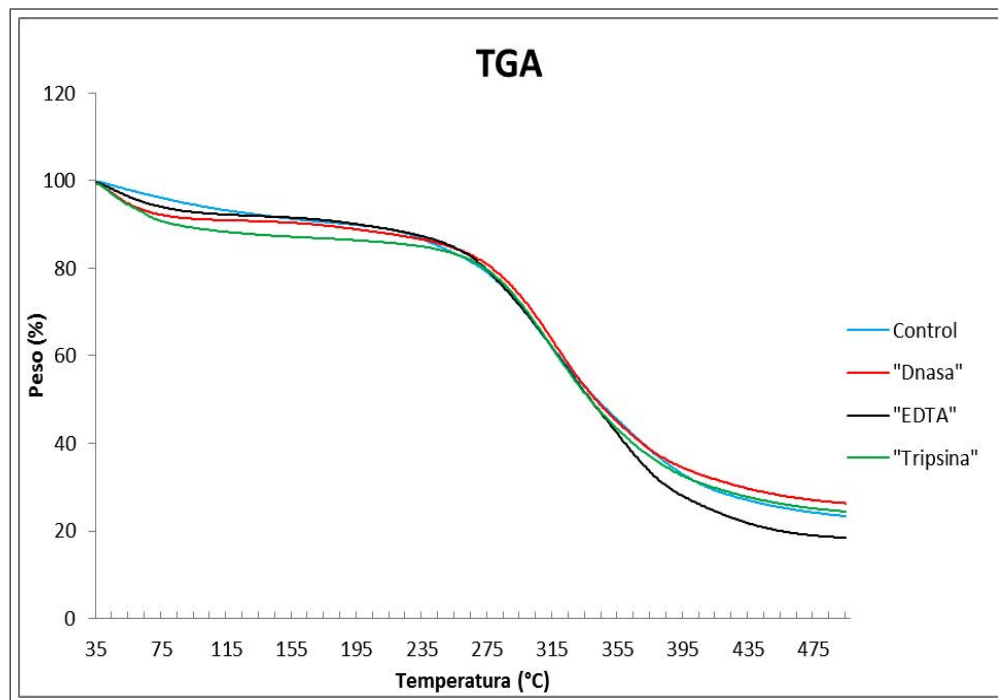


Figura 4.14: Perfil de termogravimetría de las muestras + control

En el caso de las curvas termogravimétricas se observa un comportamiento casi idéntico en todas las curvas, esto implica que la estabilidad térmica de las muestras después de los tratamientos no se vio afectada. Por otro lado, en la curva se observan dos cambios importantes. El primero se da hasta un máximo $\sim 75^{\circ}\text{C}$ este corresponde a la eliminación de agua adsorbida o físicamente absorbida (agua que puede enlazar la molécula del ambiente dada su naturaleza higroscópica) [56], ésta pérdida corresponde a alrededor de 10% de masa. La segunda pérdida importante de masa se presenta hasta un máximo de $\sim 450^{\circ}\text{C}$ y corresponde a una pérdida de $\sim 65\%$ de la masa lo cual se debe la descomposición total de las cadenas de colágena [56, 60].

CONCLUSIONES

Con base en los objetivos planteados y con base en los tiempos de obtención reportados hasta el momento, con la metodología experimental empleada fue posible obtener una matriz descelularizada en un menor tiempo (no mayor a una semana) al optimizar cada uno de los pasos de los que se integra el proceso. Esta matriz tiene el potencial para utilizarse como un andamio acelular en ingeniería de tejidos .

La cuantificación de ADN confirmó una disminución de la actividad celular y los procesos con los que no se obtuvo una descelularización completa del tejido no deben ser descartados, los resultados indican una reducción en la concentración de ADN, lo cual implica la destrucción celular y supone una disminución de la respuesta inmune de la matriz.

De acuerdo con los resultados de de la evaluación histológica, fue posible establecer que el tratamiento de descelularización del tejido cartilaginoso depende de la constante de difusión del tejido dada la naturaleza compacta del mismo.

Los resultados de los análisis térmicos demostraron que los procesos no tuvieron un efecto adverso mayor sobre las características estructurales de la matriz ya que aunque se presentó una desnaturalización parcial de la colágena que compone la matriz, esta no afecta la actividad enzimática de las proteínas, efecto que no es posible evitar dado que los procesos de descelularización de matrices reportados hasta el momento incluyen en algún grado deshidratación y

rehidratación de las matrices, lo que también es confirmado por los resultados obtenidos en otros trabajos.

Recomendaciones

Aunque los primeros resultados de la caracterización obtenida después de llevar a cabo los procesos de descelularización resultaron ser satisfactorios cabe anotar que es preciso contar datos adicionales de otras caracterizaciones que permitan inferir de manera precisa las posibilidades de éxito del implante; por lo tanto es importante realizar la caracterización biomecánica del órgano y la matriz descelularizada, también es preciso realizar una cuantificación de los complejos de histocompatibilidad antes y después del proceso.

Por otro lado, es de interés estudiar con mayor detalle el proceso difusivo de la matriz de colágena que compone el cartílago ya que esto podría dar las pautas para predecir los fenómenos físicos que intervienen en el proceso de descelularización.

Finalmente, se hace necesario llevar a cabo pruebas biológicas bien sea in vitro o in vivo que determinen de qué manera reaccionaria el posible huésped al implante.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Westneat, Mark W.; Betz, Oliver; Blob, Richard W.; Fezzaa, Kamel; Cooper, James W.; Lee, Wah-Keat . “Tracheal Respiration in Insects Visualized with Synchrotron X-ray Imaging”. *Science* 2003; (299): 558-560.
- [2] Sotres Vega Avelina. Tesis Doctoral. “Evaluación de las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal criopreservado por efecto de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación”. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Enero 29, 2010.
- [3] Villalba Caloca. Jaime, “Respuesta tisular del aloinjerto traqueal liofilizado y criopreservado combinado con terapia de inmunosupresión y aplicación tópica del factor de crecimiento del endotelio vascular”, Tesis doctoral. Escuela Superior de Medicina. Sección de estudios de posgrado en investigación. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. (2007).
- [4] Sotres Vega. A, Villalba Caloca. J, Jasso. Victoria, Olmos Zuñiga. J, Gaxiola Gaxiola. M, Baltazares Lipp. M, Santibañes Salgado. A, Santillán Doherty P, “Cryopreserved Tracheal Grafts: A review of Literature”, *J Invest Surg* 2006)19 (2): 129-135 .
- [5] Lanza Robert, Langer Robert, Vacanti Joseph. “ Principles of Tissue Engineering”. Elsevier Academic Press Publications. 3ª Ed. USA. 2007.
- [6] Haro M., Calderón J.C., Rodríguez F. “Enfermedades de la Tráquea”. *Siete días médicos* 2007; 762: 47-50

-
- [7] Plopper CG., Mariassy AT., and Lollini LO.*et al*, "Structure as Revealed by Airway Dissection: A Comparison of Mammalian Lungs.", *Am Rev Respir Dis.* 1993;28:S4.
- [8] Salassa JR, Pearson BW, Payne WS. "Gross and Microscopical Blood Supply of Trachea". *Ann Thorac Surg* 1997, 24(2), 100-107.
- [9] Arthur C. Guyton., John E. Hall " Tratado de Fisiología Médica". México. McGrawHill - Interamericana. Décima Edición. México. 2005; 534-536.
- [10] Junqueira J., "Histología Básica Texto y Atlas". Barcelona, España. Masson. Quinta Reimpresión. 2001; 83-111, 119-126, 331-348.
- [11] Kiani C., Wu YJ., Yee AJ., Yang BB., *Structure and Function of Aggrecan*, *Cell Res* 2002;12(1):19-32.
- [12] Schwartz S. Principios de Cirugía. México. Mc Graw-Hill. Interamericana. Séptima Edición. 1999: 824-829.
- [13] Blanco. A., "Química biológica", Barcelona. Editorial El Ateneo. 7a Ed. **71 (4)** 1997: , 22-47
- [14] Gómez Lizárraga. Karla, "Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino", Tesis de maestría. Instituto de Investigaciones en Materiales. Posgrado en ciencias e ingeniería de materiales. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (2010)
- [15] Stryer Lupert. Bioquímica, Tomo I. 3ª Ed. Barcelona. Editorial Reverté. 1988: 267-280
- [16] Miller E., Gay S. "Collagen: an Overview" *Methods in enzymology.* 1982; 82: 3-32
- [17] Frost E. Tracing the tracheostomy. *Ann Otol* 1976;85:618-24.
- [18] Jackson TL., Lefkin P., Tuttle W. An Experimental Study in Bronchial Anastomosis. *J Thorac Surg* 1949;19:630-42.
- [19] Grillo HC. The Development of Tracheal Surgery: An Historical Review. *Techniques of Tracheal Surgery.* *Ann Thorac Surg* 2003;75:610-9.

-
- [20] Mulliken JB., Grillo HC. The Limits of Tracheal Resection with Primary Anastomosis: Further Anatomical Studies in Man. *J Thorac Cardioasc Surg* 1968;55:418-21.
- [21] Pacheco CR., Rivero O., Porter JK. Experimental Reconstructive Surgery of Trachea. *J Thorac Surg* 1954;27:554-64
- [22] Zworykin V.K., Hillier J., Snyder R. L. A scanning electron microscope. *ASTM Bull* 117(1942):15-23
- [23] Pease R. F. W. and Nixon W. C., High resolution scanning electron microscopy. *Journal of Scientific Instruments*. 1965; **42**: 81-85.
- [24] Hoboken, Characterization and Analysis of polimers. New jersey: wiley-Interscience. 2008: 333-335, 627-637
- [25] Harris Daniel C. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª Edición. Editorial Reverté. 2001: 499-509.
- [26] Seymour R. Introducción a la química de polímeros. Editorial Reverté. Barcelona, 1998. pp. 160-163.
- [27] Freire E. Differential scanning calorimetry. *Methods Mol. Biol.* **40** (1995): 191-218.
- [28] Sánchez-Ruiz, J.M. Theoretical analysis if Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys. J.* **61** (1992): 921-35.
- [29] Skoog. Douglas A. Principios de análisis instrumental. 5ª Edición. Editorial Mc Graw Hill. 2001: 864-867.
- [30] Especificaciones Técnicas para la Producción Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Diario Oficial de la Federación* 1999:Diciembre 6. Estados Unidos Mexicanos.
- [31] Murakawa T, Nakajima J, Motomura N, Murakami A, Takamoto S. Successful Allotransplantation of Cryopreserved Tracheal Grafts with Preservation of the Pars Membranacea in Nonhuman Primates. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2002;123:153-160.

-
- [32] Fush J., Nasser B., and Vacanti J. Tissue Engineering: A 21st century Solution to Surgical Reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001;72:577-91
- [33] Sakata J, Vacanti CA, Schloo B, Healy GB, Langer R, Vacanti JP. Tracheal Composites Tissue Engineered from Chondrocytes, Tracheal Epithelial Cells, and Synthetic Degradable Scaffolding. *Transplantation Proc* 1994 ;26:3309-3310.
- [34] Mabrut JY, Adham M, Bourgeot JP, Eljaafari A, DelaRoche E, Ducerf C, Baulieux J, Rigal D. Mechanical and Histological Characteristics of Human Trachea Before and After Cryopreservation: An Opportunity for Tracheal Tissue Banking. *Transplantation Proc* 2001;33:609-611.
- [35] Zhao H, Hua TC, Zhou YZ, Wang QF, Yang Y, Bao LL. Cryopreservation and Transplantation of Dog Trachea. *Ann NY Acad Sci* 1998;118:270-275.
- [36] Inutsuka K, Kawahara K, Takachi T, Okabayashi K, Shiraishi T, Shirakusa T. Reconstruction of Trachea and Carina with Immediate or Cryopreserved Allografts in Dogs. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1480-1484.
- [37] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008;372 (9655):2023-30.
- [38] Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997;100 (2):297e302. discussion 3e4.
- [39] Ciorba A, Martini A. Tissue engineering and cartilage regeneration for auricular reconstruction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70(9):1507-15.
- [40] Vacanti CA, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti JP. Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. *Am J Sports Med* 1994;22 (4):485-8.
- [41] Hui TY, Cheung KM, Cheung WL, Chan D, Chan BP. In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials* 2008;29(22):3201-12.

- [42] Schmal H, Mehlhorn AT, Kurze C, Zwingmann J, Niemeyer P, Finkenzeller G, et al. In vitro study on the influence of fibrin in cartilage constructs based on PGA fleece materials. *Orthopade* 2008;37(5):424-34.
- [43] Conconi MT, De Coppi P, Di Liddo R, Vigolo S, Zanon GF, Parnigotto PP, et al. Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int* 2005; 18 (6): 727-34.
- [44] Gong Y, et al. A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. *Biomaterials* 32; 2011: 2265-2273
- [45] Yang Q, Peng J, Guo Q, Huang J, Zhang L, Yao J, et al. A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2008; 29 (15) :2378-87.
- [46] Alberts Bruce., Bray. Dennis “ *Biología molecular de la célula*”. Barcelona. Ediciones Omega. Tercera Edición. 2002; 1067-1072.
- [47] Vacanti Ch, Paige K, Seob Kim W, et al. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg* 29 (2) 1994: 201-205.
- [48] Atala A, Nyberg LM. Tissue engineering. *World J Urol* 2000; 18 (1):67-71,.
- [49] Dres. G. Falke, M. Boglione, M. Siminovich, M. Cadario, L. Korman, M. Asprea, G. Williams, R. Rubio, D. Aguilar. Reemplazo traqueal con matriz de colágeno. *Rev. de Cir. Infantil* 14 (1, 2, 3, 4) 2004.
- [50] Meezan E, Hjelle JT, Brendel K. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci* 1975;17:1721-32.
- [51] Baiguera S. , Jungebluth P., Burns A., Mavilia C., J. Haag J., De Coppi P., Macchiarini P. Tissue engineered human tracheas for *in vivo* implantation. *Biomaterials* 31; 2010: 8931-8938.

- [52] De Gorodner O. Z., De Godoy R. R., “Histología Métodos e instrumentos de estudio de la Histología Parte I Técnica Histológica”, Guía de Actividad N°1 2005. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Noreste.
- [53] Berth M, Moser FM, Kolbe M, et al: “The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images”. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76(6):1223–43.
- [54] Cao H., Xu S., “Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage” *Food Chemistry* 2008; 108: 439–445
- [55] Lirong He, Changdao Mu, Jiabo Shi, Qian Zhang, Bi Shi, Wei Lin “Modification of collagen with a natural crosslinker, procyanidin” *International Journal of Biological Macromolecules* 2011; 48: 354–359
- [56] Mano V., Ribeiro e Silva M., “Bioartificial Polymeric Materials Based on Collagen and Poly(N isopropylacrylamide)” *Materials Research*, Vol. 10, No. 2, 165-170, 2007.
- [57] Bigi A., “Differential scanning calorimetric and x-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturalization” *Int. J. Biol. Macromol.*, 1987 vol 9: 363-367.
- [58] Pietrucha K. “Changes in denaturation and rheological properties of collagen– hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependences.” *Int J Biol Macromol* 2005;36:299–304.
- [59] Davidenko N. et al. “Collagen–hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering”. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 3957–3968.
- [60] Moncy J. et al. “Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds” *Polymer* 50 (2009) 3778–3785.
- [61] Beldarraín A. “Aplicaciones de la calorimetría diferencial de barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas”. *Bioteología Aplicada*, Vol. 18, No. 1, March 2001, pp. 10-16.