



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN CÍCLICO DE
TRÁQUEA COMO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE UN
ANDAMIO NATURAL 3D PARA INGENIERÍA DE
ÓRGANOS**

T E S I S

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

**PRESENTA:
DAVID MAURICIO GIRALDO GOMEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
Dra. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**

**COMITÉ TUTOR:
Dra. AVELINA SOTRES VEGA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**

**Dr. DAVID GARCIADIEGO CAZARES
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN**

MÉXICO, D.F. ENERO DE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A las tres mujeres mas importantes en mi vida, mi esposa por todo tu amor, comprensión y dedicación. Te Amo; mi madre por todo el cariño y enseñanzas que solo una madre como tu nos ha dado y a mi hermana por tu amistad, las aventuras vividas y por estar siempre a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Cristina Piña por todos sus consejos y enseñanzas; 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 mi comité tutorial: Dr. David Garciadiego y la Dra. Avelina Sotres quienes sin sus invaluable aportes y colaboraciones no hubiese sido posible el desarrollo y culminación de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Biomateriales del IIM-UNAM: María Luisa del Prado, Karla Gómez, Nayeli Rodríguez, Héctor Martínez, Rodrigo Gonzales y Benjamín León.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada (CVU/Becario: 332801/235241). A DGAPA-UNAM y CONACyT por la financiación recibida a través de los proyectos: PAPIIT-IG100114 por parte de DGAPA-UNAM; y los proyectos: 214128 y CB-84683 por parte de CONACyT.

A cada una de las personas e instituciones que sin su apoyo técnico no hubiese sido posible este trabajo, como el personal de la unidad de de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa y el laboratorio de biotecnología del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), en especial a la Biol. Julieta Gracia y el Biol. Lenin Tamay; al Biol. Armando Zepeda y Francisco Pasos del laboratorio de microscopía electrónica de la facultad de medicina de la UNAM

por el apoyo con las imágenes de Microscopia electrónica de barrido; a Damaris Cabrero por la ayuda en las pruebas de análisis térmico, a la dermatóloga Liliana Muñoz por el apoyo con las histológicas e interpretación del experimento de respuesta *in vivo*. Y a todas las personas que de alguna forma colaboraron con este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	XI
INTRODUCCIÓN	XIII
OBJETIVO Y METAS	XV
1 TRÁQUEA	16
1.1 Anatomía	16
1.2 Patologías traqueales: Un problema sin resolver	17
1.3 Ingeniería de órganos aplicada a la tráquea: El concepto	18
1.4 Evaluación <i>in vitro</i> del andamio para sustitución de tráquea	20
1.5 Evaluación <i>in vivo</i> del andamio para sustitución de tráquea	22
1.6 Descelularización de órgano traqueal	23
1.7 Agentes de descelularización	24
1.7.1 Agentes físicos	25
1.7.2 Agentes químicos	25
1.7.3 Agentes biológicos	26
1.8 Caracterización del andamio traqueal descelularizado	26
2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	28
2.1 Procuración traqueal	28

2.2	Protocolo de descelularización cíclico de tráquea	30
2.3	Aislamiento y cultivo de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano	32
2.4	Citometría de flujo	33
2.5	Recelularización del andamio descelularizado (constructo)	33
2.6	Respuesta <i>in vivo</i> del andamio descelularizado	34
2.7	Histología	35
2.8	Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia	36
2.9	Microscopía electrónica de barrido	37
2.10	Comportamiento térmico del andamio descelularizado	37
2.11	Caracterización biomecánica del andamio descelularizado	38
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
3.1	Evaluación de la descelularización	39
3.2	Caracterización de la MEC: Inmunohistoquímica e histología	46
3.3	Caracterización biofísica de la MEC: Propiedades mecánicas y estructurales de la tráquea descelularizada	49
3.4	Respuesta <i>in vivo</i> de la tráquea descelularizada	54
3.5	Recelularización del andamio de tráquea descelularizado	60
	CONCLUSIONES	63
	BIBLIOGRAFÍA	65
	ANEXOS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Esquema de una tráquea normal y corte transversal.	16
2.1	Obtención de las muestras de tráquea de porcino.	29
2.2	Proceso de descelularización.	31
2.3	Proceso quirúrgico de la respuesta <i>in vivo</i> del andamio descelularizado, herida (grupo control negativo) e implante de tráquea nativa (grupo control positivo).	34
2.4	Montaje experimental usado para medir las propiedades mecánicas del cartílago traqueal.	38
3.1	Macrografías de un segmento traqueal nativo y después de ser sometido al proceso de descelularización.	40
3.2	Microfotografías de tinción de núcleos con DAPI y tinción de anillos de tráquea antes y después del proceso de descelularización.	41
3.3	Inmunofluorescencia contra complejos principales de histocompatibilidad de mucosa y submucosa de tráquea nativa y descelularizada. La señal en azul corresponde al marcaje de núcleos celulares con DAPI.	42
3.4	Cuantificación de MHC obtenida a partir de las imágenes de inmunofluorescencia.	43
3.5	Reacción de hidrólisis enzimática catalizada por tripsina.	44
3.6	Reacción de quelación con EDTA.	44
3.7	Reacción de hidrólisis enzimática del ADN catalizada por la DNasa-1.	46
3.8	Inmunofluorescencia contra colágena tipo II sobre muestras de anillo traqueal nativo y descelularizado. En marcaje azul se muestran los núcleos con DAPI.	47
3.9	Tinciones de tráquea nativa y descelularizada que muestra que la mayor parte de los componentes nativos se retuvieron después del proceso.	47

3.10 Microfotografías SEM que muestran la microarquitectura de la tráquea nativa y descelularizada.	50
3.11 Análisis termogravimétrico de MEC de tráquea nativa y descelularizada.	51
3.12 Termograma de calorimetría diferencial de barrido de MEC de tráquea nativa y descelularizada.	52
3.13 Módulo de almacenamiento con respecto a la temperatura del cartílago nativo y descelularizado.	53
3.14 Tinciones de H&E del ensayo de biocompatibilidad preliminar.	55
3.15 Microfotografías de los resultados de inmunofluorescencia contra $TNF\alpha$ de los ratones con implante subdérmico de tráquea descelularizada (grupo experimental).	57
3.16 Microfotografías de los resultados de inmunofluorescencia contra $TNF\alpha$ de los ratones que solo recibieron la herida (grupo control negativo).	58
3.17 Microfotografías de los resultados de inmunofluorescencia contra $TNF\alpha$ de los ratones con implante subdérmico de tráquea nativa (grupo control positivo).	59
3.18 Recelularización de la matriz de tráquea.	62

RESUMEN

Existen diferentes tipos patologías y lesiones traqueales (cáncer, estenosis, fracturas). Todas estas causan falla respiratoria y pueden llevar a la muerte del paciente. Se han planteado varias soluciones con la intención de recuperar la vía aérea, la única solución definitiva hasta el momento es la anastomosis. Sin embargo esta solo está disponible para lesiones menores, por lo que solo soluciones paliativas están disponibles para el resto de pacientes (prótesis sintéticas o naturales). Dado que el alotrasplante traqueal tampoco ha mostrado ser una alternativa viable debido a sus altas tasas de rechazo, la descelularización se ha mostrado como una solución con alto potencial de éxito. La descelularización implica remover todos los antígenos del órgano o tejido, dejando una matriz que puede ser usada como un andamio tridimensional. Aunque este proceso está siendo estudiado en tráquea, generalmente son protocolos que toman al menos dos meses, y dado que el tiempo es crítico para los pacientes se hace necesario encontrar un protocolo que no solamente sea efectivo sino al mismo tiempo rápido. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo de descelularización para longitudes críticas de tráquea (8cm) que conservara las características estructurales y biológicas del órgano nativo para servir como potencial reemplazo traqueal. Se diseñó un protocolo de descelularización cíclico de tráquea a partir de segmentos traqueales de porcino (8cm), evaluando la efectividad de la descelularización a través de marcaje de núcleos con DAPI, tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E), y cuantificación de los complejos principales de histocompatibilidad con inmunohistoquímica (IHC). Se evaluaron las características estructurales y biomecánicas del andamio obtenido a través de microscopia electrónica de barrido, termogravimetría (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis dinámico mecánico (DMA). La biocompatibilidad

preliminar del andamio se evaluó mediante implante subcutáneo en ratones llevando a cabo tinciones de H&E y análisis de expresión de citocina pro-inflamatoria del factor de necrosis tumoral α (TNF α) de la zona del implante a lo largo de 15 días. Para evaluar la capacidad inductiva del andamio se recelularizó con células mesenquimales humanas obtenidas de tejido adiposo humano durante 7 días, evaluando la pérdida de CD90 y la expresión de SOX9 y RUNX2. Nuestros resultados mostraron que se obtuvo un segmento traqueal descelularizado que retuvo los principales componentes de la matriz extracelular (MEC) de tráquea, sin afectar las características estructurales de la misma, además mostro ser biocompatible después de 15 días y una adecuada adherencia celular, aunque no hubo evidencia de diferenciación celular, los resultados sugieren que es un biomaterial con potencial para continuar siendo investigado como posible sustituto traqueal.

ABSTRACT

There are different types of tracheal disorders (e.g. cancer, stenosis and fractures). These can cause respiratory failure and lead to death of patients. Several attempts have been made for trachea replacement in order to restore the airway; the only current solution is anastomosis. However, this is available for short injuries, thus palliatives solutions are available for other patients (implants made from synthetic or natural materials). Tracheal allotransplantation has shown high rejection rates, and decellularization has emerged as a possible solution. Decellularization involves the removal of antigens from cells in the organ or tissue, leaving a matrix that can be used as 3D cell-scaffold. Although this process has been studied for tracheal replacement, it usually takes at least two months and time is critical for patients with tracheal disorders. Therefore, there is necessary to develop a tracheal replacement process, which is not only effective, but also quick to prepare. The aim of this research was to develop a trachea decellularization protocol for critical length (8cm) and remaining the biological and structural features of the whole native organ for trachea replacement. A decellularization protocol was designed from pig tracheal segments (8cm), the effectiveness of decellularization process was assessed by DAPI nuclei staining, Hematoxylin-Eosin (H&E) staining; and Major Histocompatibility Complex (MHC) quantification through immunohistochemistry (IHC). The structural and biomechanical features of the scaffold were assessed by Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetry (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Dynamic Mechanical Analysis (DMA). In this study, we investigate the biocompatibility of the scaffold through subcutaneous implant in mice; we carried out H&E staining and pro inflammatory Tumor Necrosis Factor α (TNF α) cytokine expression of the implanted area for 15 days. We

recellularized the scaffold with human adipose mesenchymal stem cells (hAMSC) to evaluate the inductive capability of the scaffold following the cultured cells for 7 days, we followed the loss of CD90 MSC marker and the expression of SOX9 and RUNX2 differential cells markers in the constructs. Our results suggest that the decellularized trachea scaffold retain the major components of the extracellular matrix (ECM), and remain the structural characteristic from the native trachea, furthermore the scaffold shown adequate biocompatibility and cell adhesion results after 15 implanted and 7 days cultured respectively. Although there was no evidence of cell differentiation, these findings support biological utility of whole trachea ECM as a biomaterials scaffold for supporting further research as a tracheal substitute

INTRODUCCIÓN

La tráquea, órgano del aparato respiratorio que comprende importantes funciones en la conducción del aire para que se realice de manera adecuada el proceso de respiración, puede verse afectada por un amplio espectro de patologías, que deterioran la calidad de vida del paciente provocando insuficiencia respiratoria. [1-3]

La reconstrucción de grandes defectos traqueales (50 % de la longitud traqueal en adultos y la tercera parte en niños, en promedio, lesiones mayores de 7 cm.) continúa siendo un reto médico importante que exige una solución quirúrgica inmediata, dado que los pacientes continuamente son sometidos a procedimientos recurrentes como traqueostomías, colocación de stents y dilataciones con rayo láser para tratar de paliar la insuficiencia respiratoria. La intervención convencional para reparar lesiones traqueales, incluye la resección del segmento dañado seguida de anastomosis término terminal, no obstante, este procedimiento es imposible de realizar cuando la lesión traqueal es extensa [1, 2], motivo por el cual, y dado que el trasplante traqueal “en fresco” no funciona, aún con el uso de colgajos de omento y músculo; se ha recurrido al uso de prótesis sintéticas de diferentes características (solidas o porosas), e incluso injertos tisulares como aorta e intestino; sin embargo, con estas alternativas se ha logrado un éxito parcial, debido a que todas ellas, generan problemas como la falta de una vascularización adecuada, reepitelización deficiente, respuestas inmunes y necrosis, entre otras [4], lo que demanda la búsqueda de una estrategia quirúrgica definitiva para los pacientes portadores de extensas lesiones en los que no es posible llevar a cabo una resección traqueal [3].

En la búsqueda de soluciones, el uso de estrategias de ingeniería de tejidos con andamios de origen natural, ha demostrado resultados promisorios, algunas de estas nuevas técnicas para obtención de los andamios incluyen métodos no convencionales como la descelularización [5–7], que incluye la remoción de los antígenos celulares responsables de desencadenar respuestas inmunes, conservando la matriz extracelular (MEC) viable, la cual se compone de una mezcla de moléculas estructurales y funcionales. Las estrategias de descelularización varían de acuerdo con la naturaleza del tejido, por lo que es preciso diseñarla adecuadamente a cada órgano o tejido en particular [8].

Los protocolos de descelularización involucran procesos químicos, físicos y enzimáticos que idealmente remueven los componentes celulares sin afectar adversamente la composición, organización, actividad biológica e integridad mecánica de la MEC nativa [8].

En esta disertación, se describe la propuesta de diseño de un protocolo de descelularización para segmentos traqueales en un tiempo menor que los reportados hasta el momento, ya que este factor es crítico para los pacientes que conllevan este tipo de lesiones. Se desarrolla la metodología experimental propuesta para llevar a cabo el protocolo de descelularización, así como la caracterización *in vitro* e *in vivo* del andamio tridimensional obtenido como propuesta alternativa ante la imposibilidad de realizar un trasplante traqueal “en fresco”.

OBJETIVO Y METAS

Objetivo

El objetivo fundamental de este trabajo es obtener un sustituto para tráquea a partir de tejidos biológicos, que tenga el potencial para servir como alternativa en aquellos pacientes que presentan lesiones traqueales en los que la resección no es una alternativa viable.

Metas

- Afinar el método para la obtención del andamio acelular de cartílago traqueal para obtener longitudes mínimas de 7cm.
- Demostrar que el andamio acelular de cartílago traqueal es un biomaterial llevando a cabo las pruebas características para este tipo de material: estudios histológicos, estudio de la microestructura, comportamiento térmico, análisis de proteínas y comportamiento biomecánico.
- Determinar la capacidad inductiva del andamio a partir de células mesenquimales, mediante el análisis de marcadores de diferenciación celular.

Capítulo 1

TRÁQUEA

1.1. Anatomía

La tráquea es un órgano del sistema respiratorio que se encuentra entre el límite inferior de la laringe (2 cm por debajo de las cuerdas vocales) y la carina donde se bifurca y 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 [3].

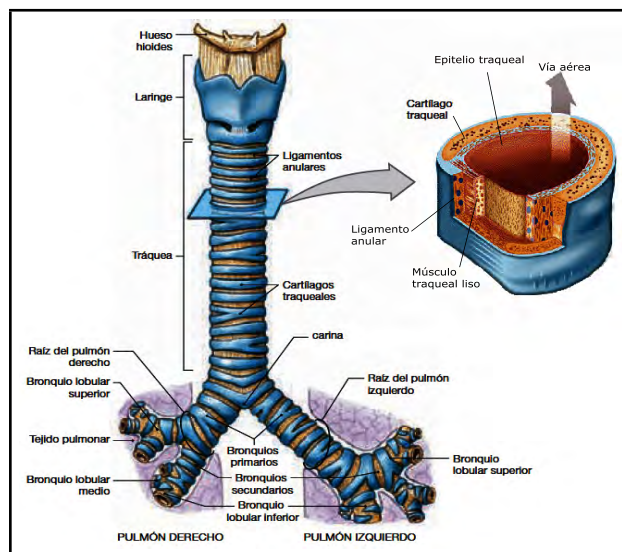


Figura 1.1: Esquema de una tráquea normal y corte transversal.

Desde el punto de vista fisiológico la tráquea además de ser una vía de conducción, también participa en el acondicionamiento (calentamiento y humidificación) y en la depuración del aire inspirado, posee función mucosilar, interviene en la protección de las vías aéreas bajas y en proceso de fonación ya que es el encargado de llevar el aire que hace vibrar las cuerdas vocales [1-3].

La tráquea está dispuesta en anillos en forma de “C”, los cuales a su vez se incluyen al interior de un tejido muscular de tipo liso, estos se unen en su parte posterior a una membrana elástica la cual es denominada porción membranosa, cada anillo de cartílago se une al subsiguiente a través de un tejido fibroelástico [1-3,9,10].

1.2. Patologías traqueales: Un problema sin resolver

Existe un amplio espectro de patologías que pueden afectar la tráquea, que van desde condiciones benignas hasta malignas, la mayoría de las anomalías llevan a una obstrucción de la vía aérea central, las cuales derivan en insuficiencia respiratoria [6].

Las lesiones benignas como la traqueomalacia congénita o adquirida así como la estenosis traqueal son las anomalías más comunes de la tráquea [6]. La traqueomalacia congénita se presenta cuando existe un desarrollo anormal de las paredes traqueales y puede asociarse a distintas anomalías como fistula traqueoesofágica o atresia esofágica. En el caso de la traqueomalacia adquirida esta puede presentarse como resultado de una herida que produce una pérdida del cartílago, como por ejemplo intubación prolongada, tubo endotraqueal, trauma de tórax, infecciones traqueales crónicas, o condiciones inflamatorias (policondritis recidivante).

En el caso de la estenosis traqueal, la cual se presenta como una reducción fibrótica de la vía aérea que puede involucrar toda o una sección de la longitud de la tráquea, resultando en una disnea severa. La estenosis congénita traqueal es casi siempre debido a un defecto en el desarrollo en el cual la porción membranosa de la tráquea es deficiente así como de la pared traqueal consistente anillos cartilagosos; la estenosis adquirida por su parte puede ser causada por diferentes procesos patológicos tales como heridas de post intubación, traumas o

traqueotomías [11].

Los tumores traqueales primarios son las lesiones neoplásicas aéreas menos comunes [12], sin embargo están asociados a una alta tasa de mortalidad, generando un efecto significativo sobre la vida y salud de miles de pacientes cada año [13]. El carcinoma adenoides quístico y el carcinoma de células escamosas son los más comunes, comprometiendo dos tercios de todos los tumores traqueales [6]. Otros tumores recurrentes son ampliamente variables e incluyen diferentes tipos celulares (histotipos) malignos y benignos. A pesar de su rareza, su usual incidencia lleva a menudo a un diagnóstico retardado, haciendo de estas lesiones potencialmente tratables difíciles de tratar y a menudo fatales [14–17]. La mayoría de los pacientes que presentan lesiones locales imposibles de resear deben ser tratados paliativamente (p.e. stents endoluminales, terapia de radiación externa, etc.) para estos pacientes la prognosis es pobre con una tasa de supervivencia a 5 años alrededor de 5 % [15], y no existe un consenso en cuanto a estos tratamientos debido a una media de supervivencia de menos de 12 meses [6, 18]. Para pacientes con tumores operables, la restricción para llevar a cabo una resección completa del tumor es en promedio de 60 % de la longitud traqueal, esto debido a la imposibilidad de una reconstrucción segura de la tráquea para longitudes mayores, con una consecuente baja tasa de supervivencia a 5 años.

Todos estos factores hacen del reemplazo traqueal una necesidad clínica actual que urge por ser atendida de manera que pueda asegurarse la vida del paciente.

1.3. Ingeniería de órganos aplicada a la tráquea: El concepto

El reemplazo traqueal ideal debe: (1) proveer un adecuado soporte estructural para mantener la permeabilidad de la vía aérea (2) ser hermético y favorecer una adecuada integración con los tejidos del receptor; (3) ser biocompatible, no requerir inmunosupresión y no generar una respuesta inflamatoria; (4) reepitelizarse rápidamente; y (5) estar fácilmente disponible y ser fácilmente implantable (clínicamente manejable) [19, 20].

En los últimos años ha habido un avance considerable primero en la ingeniería de tejidos y

más recientemente en ingeniería de órganos completos obtenidos y posteriormente implantados utilizando técnicas de bioingeniería con el uso de andamios sintéticos y naturales repoblados con células diferenciadas y células madre [21, 22]. Sin embargo en el caso de la tráquea los experimentos que incluyen bioingeniería de órganos requieren una larga y complicada rutina para aplicación clínica [23, 24], salvo un caso en particular ha reportado resultados satisfactorios [25], sin embargo este enfoque está limitado a donadores cadavéricos jóvenes, además de incluir procesos de obtención largos, lo cual puede conllevar a un incremento en el tiempo de espera del paciente.

El uso de polímeros sintéticos o naturales, o la combinación de estos para la fabricación de un andamio apropiado para solventar los problemas previamente descritos pueden ser considerados como un enfoque potencial los cuales deben cumplir con una serie de características valiosas. La selección del material adecuado es un factor clave hacia el desarrollo de un sustituto efectivo, lo cual está directamente relacionado con: (1) las características mecánicas, que deben ser lo más similares al tejido circundante; (2) el perfil de degradación, el cual afecta dramáticamente la estabilidad y respuesta biológica del implante; y (3) la posibilidad de adicionar un agente activo que después se pueda liberar como factores de crecimiento que mejoren el desempeño clínico del implante. En este aspecto los andamios derivados de matrices extracelulares (MECs) ofrecen una ventaja comparativa frente a otro tipo de andamios, debido a que estos ofrecen un ambiente con una arquitectura similar al estado nativo apto para las células y su reproducción [6].

El material ideal para la fabricación de un sustituto traqueal aún está por venir, varias soluciones han sido propuestas con el fin de combinar los aspectos positivos de cada material en un compuesto. La justificación de este enfoque está motivada por la necesidad de un andamio bioinspirado que sea similar a la tráquea nativa, la cual puede ser considerada como un órgano compuesto en el que diferentes células y tejidos tienen un rendimiento fisiológico específico y duradero.

1.4. Evaluación *in vitro* del andamio para sustitución de tráquea

El primer problema a resolver al desarrollar un andamio adecuado para aplicaciones de ingeniería de órganos se relaciona con la evaluación preliminar *in vitro* del material en términos de sus propiedades morfológicas, mecánicas y de citocompatibilidad. Se han evaluado tanto polímeros bioabsorbibles como bioestables de acuerdo con el paradigma de la ingeniería de tejidos, en el cual siempre es preferible un andamio temporal con el fin de promover la regeneración del tejido autólogo, el cual debe degradarse y excretarse de manera segura para evitar efectos adversos en el medio y corto plazo. Debido a la complejidad de este desafío, varios grupos de investigación han desarrollado andamios para el reemplazo de las vías respiratorias mediante el uso de materiales bioestables. En este caso los parámetros de degradación son altamente predecibles ya que el perfil de degradación de un polímero depende de parámetros relacionados con la naturaleza del material y las condiciones de trabajo.

Por otro lado en el caso de los polímeros bioabsorbibles la evaluación debe incluir el perfil de degradación temporal en condiciones experimentales similares a la fisiológica. Sin embargo, es muy difícil encontrar una prueba prolongada que resuelva este problema, algunos artículos reportan resultados de citocompatibilidad, ensayos mecánicos y microestructurales usando polímeros bioabsorbibles. Un ejemplo de esto es el trabajo reportado por Liu y col. [26] donde usando un copolímero de ácido poliglicólico y ácido láctico (PLGA) generaron un implante donde el PLGA sirvió como andamiaje temporal para el cultivo *in vitro* bajo condiciones dinámicas de capas de células mesenquimales, y después de 4 semanas mostraron la degradación completa del andamio de PLGA obteniendo una unión entre los agregados celulares. El implante obtenido se caracterizó mecánicamente, sin embargo este fue comparado contra muestras de cartílago elástico de oreja de conejo en lugar de cartílago traqueal. Este enfoque podría resultar interesante sin embargo debe escalarse para considerar longitudes mínimas a la longitud crítica para problemas traqueales, ya que el implante obtenido fue de 2.5 a 3 cm de longitud, además de considerar las características anatómicas del órgano nativo. En aras de obtener un implante anatómicamente similar a la tráquea algunos grupos han desarrollado implantes a través de técnicas de prototipado o fabricación aditiva, como el presentado por Moroni y col [27], donde ayudado de herramientas de tomografía computarizada diseñaron

diferentes implantes de un copolímeros sintéticos, este enfoque mostró el potencial de una estructura basada en los datos anatómicos del paciente, ya que los andamios anatómicamente diseñados ayudaron a una mejor generación de tejido, lo cual quedó demostrado a través de cultivos *in vitro* de condrocitos de rata durante 21 días. Sin embargo, al mismo tiempo, mostró la dificultad de reproducir la compleja estructura traqueal (en este caso solo fue posible probar un andamio homogéneo, sin considerar los anillos de cartílago y la porción membranosa) lo que podría afectar la función fisiológica de todo el órgano. Los mismos autores mencionan que la compliancia (o distensibilidad) es un parámetro clave que permite la deformación del órgano durante el movimiento y contribuye a la prevención de la estenosis.

La necesidad de encontrar un andamio adecuado, que se asemeje a la microestructura del tejido fisiológico, se considera un punto de partida clave para el desarrollo de un dispositivo viable capaz de reemplazar la función deteriorada o perdida de un órgano. Para este fin, una estructura fibrosa que se asemeje a la matriz extracelular natural (MEC) puede ser una premisa intuitiva a ensayar. Sin embargo, la replicación de una arquitectura tridimensional es una respuesta parcial al problema, ya que la MEC es una mezcla compleja de proteínas estructurales y funcionales, glicoproteínas, y proteoglicanos dispuestos en un microambiente dinámico y específico de tejido que proporcionan un soporte mecánico, que son además sitios de unión para receptores de la superficie celular, y al mismo tiempo contienen una cascada de factores que modulan varios procesos de señalización. Los polímeros sintéticos no pueden suministrar todas estas características, sin embargo algunos autores han propuesto una modificación superficial de estos con el fin de promover una respuesta celular eficaz. Un claro ejemplo de esto es el trabajo propuesto Gustafsson y col [28], donde obtuvieron andamios porosos por electrohilado de polímeros sintéticos (emulando las fibras y porosidad de la matriz de cartílago) modificados superficialmente con diferentes proteínas de adhesión celular (laminina, gelatina, fibronectina, colágena), sembrando *in vitro* en estos andamios células mesenquimales de rata. Los autores concluyen que las moléculas de adhesión no generan alteración significativa en parámetros celulares como la adhesión, proliferación, o fenotipo, lo que sugiere que estos andamios obtenidos por electrohilado provee una matriz que favorece la adhesión celular sin necesidad de ser recubiertas con proteínas de adhesión celular.

1.5. Evaluación *in vivo* del andamio para sustitución de tráquea

Otro de los retos sumamente importante a la hora de desarrollar sustitutos biológicos para cualquier órgano es la respuesta del dispositivo ante la suma de todas las condiciones fisiológicas que debe soportar. Emular dichas condiciones en un ambiente controlado *ex vivo* o *in vitro* es sumamente complicado, por lo que es indispensable llevar a cabo para ello pruebas *in vivo* seleccionando el modelo adecuado para cumplir con los requerimientos que el órgano debe cumplir una vez implantado.

Diferentes materiales han sido utilizados para la investigación *in vivo* de defectos traqueales, desde materiales sintéticos, hasta naturales y la combinación de estos. La ingeniería de tejidos traqueal ha utilizado una amplia gama de tipos de celulares, desde condrocitos hasta células mesenquimales, obtenidos a partir de diferentes tejidos y donantes. Un ejemplo de esto es el uso de condrocitos pre sembrados sobre un hidrogel degradable que a su vez se sembraron sobre polietileno de alta densidad [29] permitiendo la reducción de la reacción inflamatoria post-implantación, y la mejora de la formación de tejido cartilaginoso (con propiedades biomecánicas similares al tejido nativo).

Para crear constructos biomiméticos análogos a la pluricelularidad del órgano traqueal, se han evaluado andamios de tipo multicelular (sobre una matriz de ácido poliglicólico-PGA-) se sembraron condrocitos (obtenido de tabique nasal) y se envolvieron alrededor de un tubo de silicio, estos constructos se implantaron por vía subcutánea en ratones. Después de 6 semanas, las células epiteliales nasales (suspendidas en un hidrogel) se inyectaron en el cilindro cartilaginoso previamente implantado, después de la retirada del tubo de silicio, el constructo fue nuevamente implantado. Después de 4 semanas, la morfología de los implantes se parecía a la de la tráquea nativa, lo que sugiere la posibilidad de regenerar tanto el cartílago y las porciones epiteliales de la tráquea. A pesar de que la morfología del tejido y la composición fueron similares al tejido de tráquea nativa, los constructos implantados colapsaron con bastante facilidad, y se observó traqueomalacia en los animales después de la anastomosis [30].

La evaluación *in vivo* del primer caso humano de la ingeniería de tejidos *in situ* de la tráquea (definido así por los propios autores), fue reportado por Omori y col [31]. Una malla de

Marlex cubierta con esponja de colágena, a partir de dermis porcina, fue implantado en una mujer de 78 años de edad, afectada por cáncer de tiroides. La mitad derecha de tres anillos de la tráquea se resecó, y el andamio fue recortado para reparar el defecto. El material artificial fue cubierto por epitelio después de 2 meses, y estaba completamente cubierta después de 20 meses sin complicaciones, aunque se ve como un resultado promisorio este tipo de enfoques debe tenerse resultados más consistentes a largo y plazo y teniendo en cuenta la tasa de éxito en un número representativo de pacientes [31].

1.6. Descelularización de órgano traqueal

La descelularización es un método que involucra la remoción de los componentes celulares de un tejido u órgano para generar andamios de matriz extracelular (MEC) los cuales se componen de una compleja mezcla de proteínas estructurales y funcionales con el fin de preservar entidades organizadas estructuralmente tales como colágena, elastina, glucosaminoglicanos (GAGs) y fibronectina [32]. El uso de andamios descelularizados en ingeniería de tejidos y más recientemente en ingeniería de órganos completos provee varios beneficios. Primero la remoción de los antígenos celulares alogénicos o xenogénicos no solo minimiza la antigenicidad del tejido/órgano fuente a la hora de ser implantado, sino que también preserva los componentes de la MEC, los cuales son altamente conservados entre las especies lo que permite el uso de materiales xenogénicos [8, 33]. Además los andamios descelularizados pueden retener una mayor parte de la composición fisiológica relevante, así como el microambiente de la MEC nativa. Por ejemplo la ultraestructura y la arquitectura 3D del órgano o tejido puede ser preservado a través del proceso de descelularización lo cual es importante para la actividad biológica del andamio [34, 35]. Consecuentemente la funcionalidad y estabilidad mecánica del andamio descelularizado es mucho más cercana a la del tejido u órgano nativo [36]. Este tipo de resultados se evidencian en los resultados preliminares que se obtuvieron en esta investigación donde se obtuvieron matrices acelulares de tráquea de porcinos mediante una metodología de descelularización manteniéndose la integridad estructural de la matriz, sin embargo es necesario establecer que los tiempos de descelularización así como la integridad y las características biológicas de la MEC se mantienen para longitudes críticas mínimas (8cm) ya que en dichos resultados se reportan para longitudes cortas (3 a 5 cm) [37].

Los andamios descelularizados también pueden funcionar como materiales bioabsorbibles, es decir matrices provisionales cuyos productos de degradación liberan péptidos importantes tales como la endostatina, angiostatina, y canstatina las cuales participan activamente en el remodelado del tejido u órgano a largo plazo [38,39]. Por último los andamios descelularizados se presentan como una opción económica para las aplicaciones clínicas.

Aunque este tipo de andamios cuentan con enormes beneficios existen aún algunos desafíos por resolver. Primero, el proceso de descelularización necesita ser optimizado para cada tejido u órgano fuente, debido a que la MEC es de una composición de un arreglo único y específico para cada órgano o tejido en particular [40]. Como resultado una descelularización incompleta puede resultar en una respuesta inmune del implante. Además puede existir una variabilidad del tejido u órgano en términos del espesor y la edad lo cual tiene importantes implicaciones en la efectividad de la descelularización [33,38,40–42]. De la misma manera, los agentes o reactivos usados durante el proceso de manufactura pueden alterar la bioactividad y la integridad estructural del andamio.

1.7. Agentes de descelularización

En 1975, Meezan y col [43]. describieron la primera estrategia de descelularización para extraer células de MEC a través de un proceso químico y enzimático que incluía múltiples pasos a partir de membranas basales de diferentes tejidos. Recientemente se han desarrollado diversos métodos para la obtención de este tipo de andamios derivados de tejidos y órganos. Los protocolos de descelularización más robustos y efectivos incluyen la combinación de tratamientos (llamados también agentes) físicos, químicos y biológicos [40]. En términos generales un protocolo típico de descelularización puede contener los siguientes pasos: (1) lisis de la membrana celular por medio de tratamientos físicos o soluciones iónicas, (2) separación de los componentes celulares de la MEC usando tratamientos enzimáticos, (3) solubilización de los componentes citoplasmáticos y nucleares de la célula a través de tratamientos con detergentes, y finalmente (4) lavado y remoción de los remanentes celulares de la MEC. Cada uno de estos pasos puede ser complementado con agitación mecánica y repetido un número de veces para

incrementar la efectividad del proceso [8]. Es importante conocer la manera en que actúan estos agentes dentro de un protocolo de descelularización ya que la estrategia debe ser optimizada en función del tejido/órgano controlando la duración o concentración de cada agente utilizado y subsecuentemente analizar no solo la efectividad de la descelularización sino también los efectos en la composición, arquitectura y funcionalidad de la MEC descelularizada obtenida.

1.7.1. Agentes físicos

El uso de agentes físicos en los procedimientos de descelularización consiste en la modulación de características físicas tales como temperatura, fuerza y presión sobre el tejido u órgano con el objeto de romper las membranas celulares promoviendo la lisis celular. Los agentes físicos pueden incluir: devastado, agitación de la solución, sonicación, gradientes de presión, ciclos de congelación y descongelación, electroporación y el uso de fluidos supercríticos [32]. Se han reportado métodos de descelularización con el uso de agentes físicos convencionales, como en el caso de Hung y col. en el cual obtuvieron laringes descelularizadas con la combinación de liofilización y sonicación. En esta publicación se sometieron a ciclos de descelularización laringes de cerdo las cuales incluyeron liofilización toda la noche y descongelación en PBS durante 30 min. Un tratamiento de sonicación fue adicionado durante el proceso de descongelación. El estudio confirmó que la modalidad de ciclos de liofilización no tuvo un efecto significativo en la descelularización, mientras que cuando la sonicación fue adicionada durante la descongelación, se observó un decremento significativo en la cantidad de células. Sin embargo este método induce un daño estructural en el andamio obtenido [44].

1.7.2. Agentes químicos

Para la remoción de los componentes celulares los agentes químicos incluyen el uso de ácidos y bases, soluciones hipotónicas e hipertónicas, detergentes, alcoholes y otras soluciones. Ácidos y bases catalizan la degradación hidrolítica de biomoléculas, componentes del citoplasma y ácidos nucleicos; sin embargo esto puede llevar a efectos adversos en el contenido de GAGs [32]. Las soluciones hipotónicas e hipertónicas pueden causar la lisis celular por efecto osmótico. Los detergentes iónicos, no iónicos o zwitteriones, pueden solubilizar las membranas

celulares, sin embargo también podrían disociar las proteínas de la MEC [32]. El uso de alcoholes facilita la delipidación deshidratando el tejido y llevando a la lisis celular [45].

1.7.3. Agentes biológicos

Los agentes biológicos pueden incluir dos tipos, los enzimáticos y los no enzimáticos (como los agentes quelantes). Las enzimas de descelularización comúnmente usadas incluyen nucleasas, tripsina, colagenasas, lipasas, dispasas y termolinasa. Estas enzimas pueden proveer alta especificidad en la remoción de residuos celulares o de constituyentes indeseables de la MEC, incluso enzimas como la tripsina se sugiere que tiene un efecto positivo en la velocidad de descelularización de matrices traqueales, este efecto quedó evidenciado en los resultados preliminares de esta investigación [37]. Sin embargo puede ocurrir que residuos de estas enzimas dificulten la posterior recelularización del andamio o que generen algún tipo de reacción inmune en el receptor [45]. Además de los agentes enzimáticos, también se han venido usando los agentes no enzimáticos para mejorar la efectividad de la descelularización. Los agentes quelantes ayudan en la disociación de las células de las proteínas de MEC interrumpiendo la unión de la colágena y la fibronectina al receptor Arg-Gly-Asp, por medio de la quelación de cationes divalentes [32]. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido tetraacético etilenglicol son los agentes quelantes más comúnmente usados para interrumpir las interacciones proteína–proteína para la remoción de las células de la superficie de la MEC [45]. Sin embargo nuestros resultados preliminares pudieron confirmar lo que han reportado otros autores donde el uso del este tipo de agentes quelantes específicamente el EDTA, como agente de descelularización solo no resulta efectivo para remover las células de MEC densas como las del cartílago [37].

1.8. Caracterización del andamio traqueal descelularizado

Como ya se mencionó la evaluación de un andamio para fines de reemplazo traqueal puede dividirse en dos grandes grupos (evaluación *in vitro* y evaluación *in vivo* del andamio). Este tipo de caracterización aplica para cualquier tipo de andamio sin importar su naturaleza. Sin embargo para el caso de andamios naturales obtenidos por métodos de descelularización

existen retos adicionales en la caracterización de los mismos; en términos de identificar y cuantificar tanto componentes bioactivos en la matriz, como agentes residuales de descelularización [33, 40], por lo tanto es necesario evaluar la biocompatibilidad preliminar de este tipo de implantes (en especial cuando se trata de xenoimplantes), para esto, es preciso llevar a cabo implantes subcutáneos y establecer el tipo de reacción inflamatoria que desencadena el implante dentro del hospedero y descartar una posible reacción a cuerpo extraño [46]. Además las propiedades del andamio descelularizado están inherentemente ceñidas a las características del tejido u órgano fuente, incluyendo forma y comportamiento mecánico [47]. Debido a esto es posible que el andamio descelularizado requiera de procesamiento adicional como entrecruzamiento para introducir una mejora en la versatilidad del andamio. Por definición, se confía en que los andamios descelularizados sean infiltrados por las células del huésped, sin embargo la disponibilidad de las mismas *in vivo* puede estar limitada o la infiltración puede ser no homogénea, por lo cual es preciso llevar a cabo estudios para evaluar la velocidad de repoblación de los andamios o llevar a cabo recelularización *in vitro* antes de proceder a la implantación.

Resultados preliminares de esta investigación sugieren que los andamios traqueales obtenidos por medio de protocolos cíclicos de descelularización han demostrado mantener la capacidad de andamiaje después de someter el órgano nativo al protocolo de descelularización usándose para ello condrocitos obtenidos de rodilla de cerdo, obteniéndose una tasa de viabilidad celular por encima del 80% después de 8 días de sembrados sobre el andamio descelularizado [37]. Sin embargo es preciso demostrar que esto se mantiene a mayores tiempos y si la capacidad inductiva que tiene la matriz nativa se mantiene después del someterla a al protocolo de descelularización. Esto con el fin de que el reemplazo traqueal obtenido pueda usarse en cualquier patología traqueal que se requiera.

Capítulo 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este capítulo, se describe una nueva metodología propuesta para la obtención de una matriz de tráquea descelularizada. De igual manera, se describen las técnicas utilizadas para comprobar la descelularización de las matrices, así como la caracterización del andamio obtenido.

2.1. Procuración traqueal

Se decidió trabajar con tráqueas de porcino ya que es un modelo anatómico muy similar al ser humano, se obtuvieron 10 ($n=10$) porcinos de 3 meses de edad. Se escogieron animales de rastros TIFF debido a que se garantiza que se encuentran sanos y se mantuvieron en condiciones de bioterio hasta su sacrificio. Las tráqueas se obtuvieron mediante las técnicas quirúrgicas habituales y el procedimiento se llevó a cabo en el quirófano experimental de la Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INERICV), de acuerdo con las normas bioéticas para este tipo de procedimientos (Fig. 2.1). Se resecaron secciones de 15 cm aproximadamente, las cuales fueron mantenidas en refrigeración a 4°C.

Todo el trabajo experimental con animales se llevó a cabo siguiendo la norma oficial mexicana para el cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999 [48].

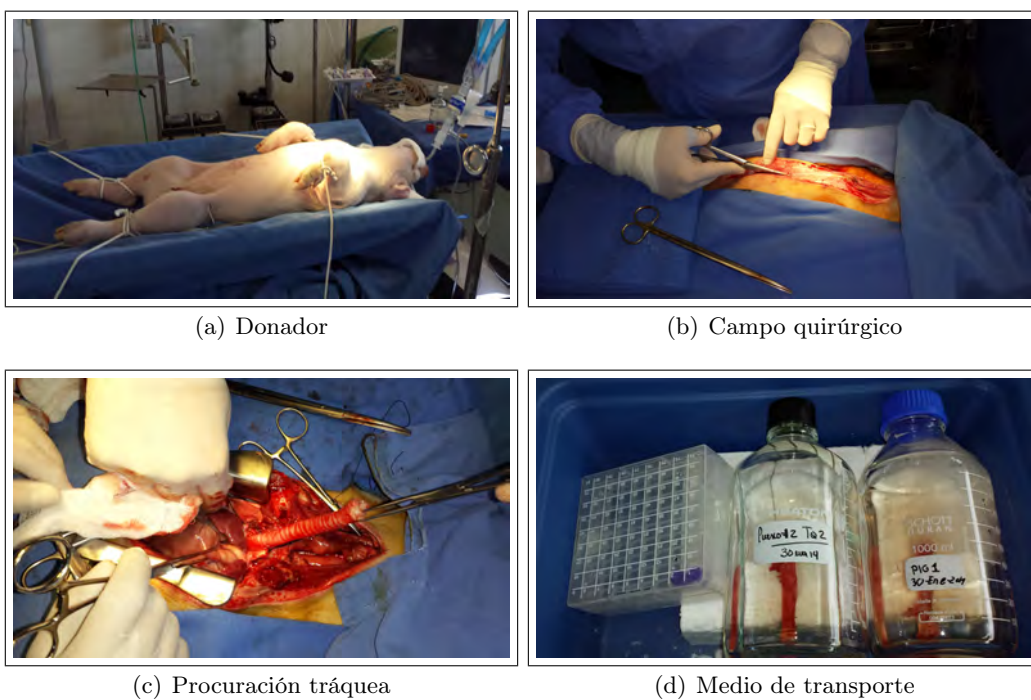


Figura 2.1: Obtención de las muestras de tráquea de porcino.

2.2. Protocolo de descelularización cíclico de tráquea

Resultados preliminares de esta investigación demostraron que el uso de tripsina dentro de los protocolos cíclicos de descelularización de segmentos traqueales menores de 5cm de longitud tiene un efecto significativo en la disminución del tiempo de descelularización [37]. Con base en estos resultados e incrementando la longitud del segmento traqueal hasta 8cm, se diseñó un protocolo de descelularización de menor tiempo (2 semanas), para lograr disminuir el tiempo de espera de los pacientes, que es crítico en la patología traqueal. El protocolo se describe a continuación:

Inmediatamente después de la procuración, la tráquea se colocó en un contenedor de cristal, estéril y se sumergió en una solución amortiguada salina-fosfato (PBS) adicionada con 10 % de una solución antibiótica-antimicótica (SIGMA) para su transporte desde el quirófano del INERICV hasta el laboratorio de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” para su descelularización (Fig. 2.1 d).

La tráquea se colocó sobre una charola de mayo, se removió el tejido conectivo con ayuda de bisturí y se enjuagó con agua desionizada. La tráquea se cortó en segmentos de 8 cm de longitud que se introdujeron en tubos de vidrio de 150 ml de capacidad donde se llevó a cabo el protocolo que se describe a continuación:

1. Se incubó en solución de 1 % Tripsina-EDTA (Gibco) en PBS por 7 horas a 37°C.
2. Se enjuagó con agua Mili-Q en agitación por 2 min, repitiendo tres veces el enjuague (X3).
3. Se llevó a cabo una incubación en una solución de 10 % de Hidrocloruro de Guanidina (GndHCl) en Buffer Tris (Tris-HCl 0.8 %, 1 % NaCl) toda la noche a 4°C en agitación orbital.

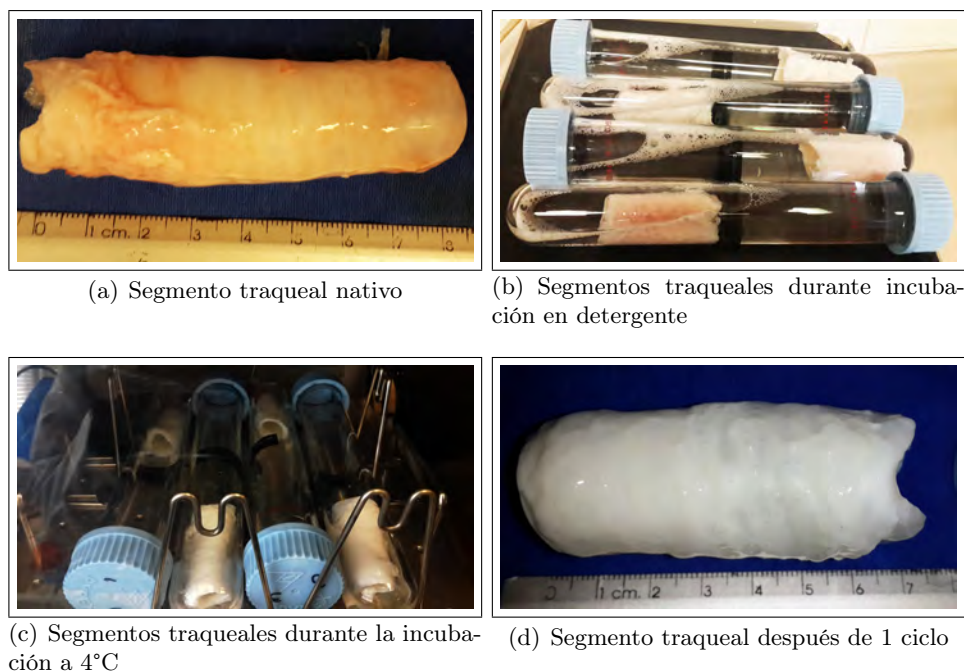


Figura 2.2: Proceso de descelularización.

4. Se enjuagó con agua Mili-Q en agitación por 2 min. (X3) o hasta eliminar los precipitados.
5. A continuación se procedió a incubar en solución de 4% de Desoxicolato de sodio (Sigma) en agua Mili-Q durante 7 horas a temperatura ambiente en baño de ultrasonido, realizando recambio de la solución cada hora y enjuagando con agua Mili-Q en agitación por 30 seg. (X3). NOTA: Se debe de estar atento a la temperatura del baño en caso de que se incremente esto se puede controlar con hielo o haciendo recambio del agua del baño.
6. Se enjuagó con agua Mili-Q en agitación por 30 seg. (X3).
7. Luego, se continuó con una incubación en solución de 1% de SDS en agua Mili-Q por 12 horas en agitación orbital a temperatura ambiente (Fig. 2.2 b).
8. Se enjuagó con agua Mili-Q en agitación por 30 seg. (X3).
9. Paso seguido se incubó en solución de 2% de Tributyl fosfato en Buffer Tris (Tris-HCl 0.8%, 1% NaCl) por 24 horas en agitación orbital a temperatura ambiente.

10. Se enjuagó con agua Mili-Q en agitación por 30 seg. (X3).
11. Se incubó en etanol 70 % por 24 horas a 4°C en agitación orbital (Fig. 2.2 c).
12. Se enjuagó con agua Mili-Q en agitación por 30 seg. (X3).
13. Finalmente se procedió a incubar el segmento por 72 horas en solución DNAasa en NaCl 1M pH 7 (15 U/ml) a 37°C en agitación orbital.

Se usó una relación de volumen de tejido/volumen de solución de 1:10 (Fig. 2.2). El protocolo se repitió por un segundo ciclo.

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

2.3. Aislamiento y cultivo de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano

El consentimiento y el protocolo experimental de los ensayos celulares en este estudio fueron revisados y aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Rehabilitación (México, D.F.). Se obtuvo el tejido adiposo subcutáneo resultante de cirugías estéticas mediante el uso de jeringa de liposucción con un diámetro interno de 4mm. Se digirieron las muestras de lipoaspirado durante 45 min a 37°C, con una agitación continua de 200rpm en medio DMEM (Gibco) conteniendo 0.1 % de Colagenasa tipo I (Worthington Biochemical). Las células se filtraron a través de un separador celular (BD Falcon) de 70 μ m y se centrifugaron a 1200rpm por 5 min, posteriormente, se sembraron en frascos de cultivo (BD Falcon) a una densidad de 50000 células/cm². Después de 24 horas, se cambió el medio y las células adheridas se dejaron expandir hasta obtener una confluencia del 80 %. Las células se mantuvieron con medio DMEM (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) y 1 % de penicilina/estreptomicina (Gibco).

2.4. Citometría de flujo

Para verificar la presencia de marcadores de células mesenquimales, se utilizó un citómetro de flujo (FACS; Becton Dickinson). Se analizaron dos marcadores positivos y dos marcadores negativos para células mesenquimales. CD90 (Thy-1) y CD73 (ecto-5'-nucleotidase), mientras que como marcadores negativos se usaron dos marcadores para células hematopoyéticas CD34 y CD45 (LCA). Las células previamente aisladas de acuerdo al procedimiento descrito, después del primer pase y 80% de confluencia se recolectaron, contaron y resuspendieron a una concentración de 2×10^5 células por anticuerpo en buffer de incubación (PBS-0.5% de Suero fetal bovino sin complemento). Se transfirieron alícuotas de 50 μ l a los tubos del citómetro de flujo y se incubaron por 45 minutos a 4°C con cada uno de los anticuerpos monoclonales antes mencionados (CD34-PE (Becton Dickinson), CD45-FITC (Becton Dickinson) CD73-APC (BD Pharmingen) y CD90-FITC (BD Pharmingen)). Como control negativo de la tinción se usaron anticuerpos isotipo FITC-conjugated mouse IgG1, PE-conjugated mouse IgG1 y APC-conjugated mouse IgG1 (todos de BD Biosciences). Subsecuentemente las células se lavaron con PBS y se diluyeron en 500 μ l de PBS. Finalmente los datos se adquirieron con el citómetro previamente descrito equipado con láser BLUE 488nm. El análisis de datos se llevó a cabo con el software Cell Quest Pro (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

2.5. Recelularización del andamio descelularizado (constructo)

Las células mesenquimales aisladas y caracterizadas por citometría de flujo, se sembraron sobre los anillos de cartílago de la tráquea descelularizada. Se resuspendieron 50000 células en 10 μ l y estas se sembraron sobre el andamio estéril y seco durante 1 hora (50000 células/cm²). Después de este periodo, los constructos se cultivaron con medio para células mesenquimales humanas STEMPRO® MSC SFM (Gibco) a 37°C y 90% de humedad relativa durante el tiempo que duró el ensayo. Los constructos se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) después de 24 horas y 7 días de cultivo para analizar la expresión celular de CD90.

2.6. Respuesta *in vivo* del andamio descelularizado

Es importante establecer la respuesta *in vivo* del andamio una vez implantado, de este modo se establece si es biocompatible o lo que es lo mismo, la bioseguridad del implante para el receptor u hospedero.

Para evaluar este parámetro se tomaron muestras de dos anillos de los segmentos previamente descelularizados y se implantaron sobre ratones de manera subcutánea (xenoimplante) en el dorso y se evaluó la respuesta inflamatoria a lo largo de dos semanas (Fig. 2.3).

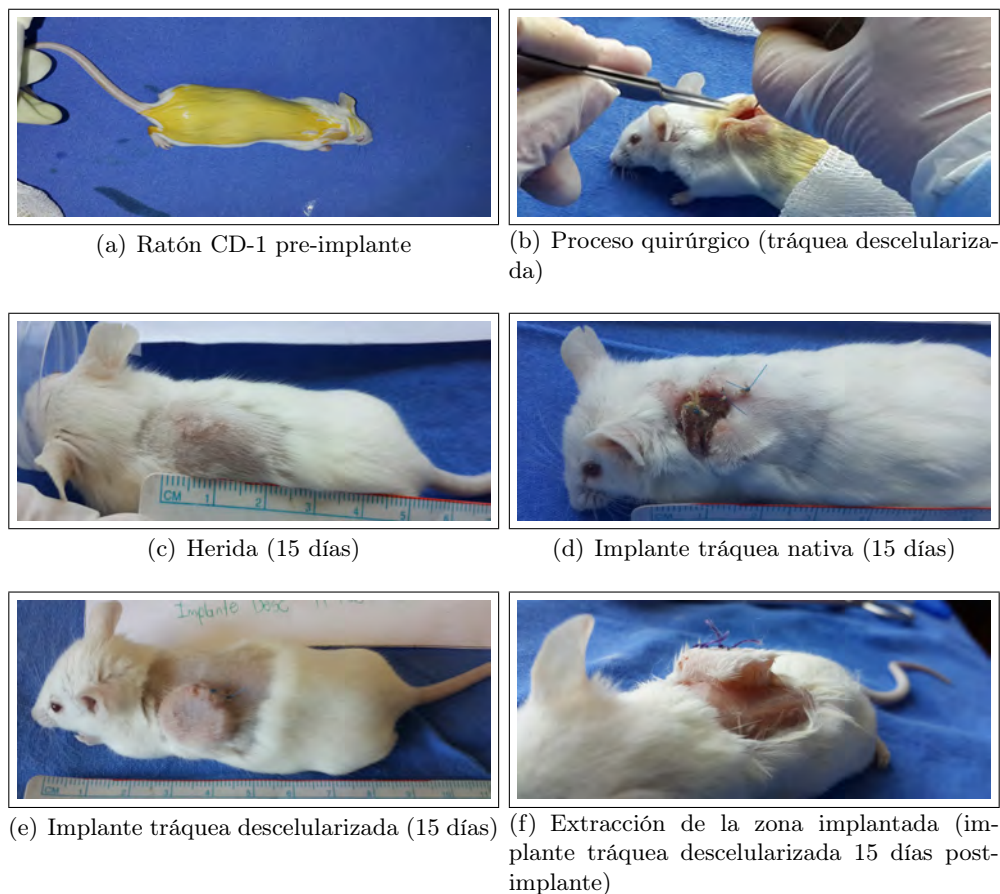


Figura 2.3: Proceso quirúrgico de la respuesta *in vivo* del andamio descelularizado, herida (grupo control negativo) e implante de tráquea nativa (grupo control positivo).

Para llevar a cabo este ensayo se contó con la aprobación del Comité de Ética y de uso y cuidado de animales del Instituto Nacional de Rehabilitación donde se llevó a cabo el experimento. Se operaron 36 ratones CD-1, con edades entre 6-8 semanas (Fig. 2.3 a). Los animales se dividieron en tres grupos de manera aleatoria de la siguiente manera: un primer grupo (n=12) recibió un implante de una sección de dos anillos de tráquea descelularizada (se usaron tres tráqueas diferentes) (Fig. 2.3 b). Un segundo grupo (n=12) no recibió implante, solo se llevó a cabo la cirugía y se realizó el bolsillo subcutáneo (grupo control negativo) (Fig. 2.3 c). El tercer grupo, control positivo (n=12) recibió un implante subcutáneo de dos anillos de tráquea nativa (se usaron tres tráqueas diferentes) (Fig. 2.3 d). Los ratones fueron anestesiados con 1.5-2.5 % de isofluorano en oxígeno, el procedimiento quirúrgico se realizó en área sanitizada previamente y se utilizó una sutura (Prolene 5-0) para cerrar la zona quirúrgica. Todos los animales sobrevivieron a la cirugía y a lo largo del experimento. Los animales recibieron eutanasia después de 1, 2, 7 y 15 días con 5 % de isofluorano en oxígeno. Seguido a la eutanasia se extrajo la zona del implante con el tejido epitelial y muscular adyacente en el caso de los animales que recibieron implante y para el grupo control negativo se extrajo la zona de piel y subdérmica afectada (Fig. 2.3 f). En todos los casos la muestra se fijó en 4 % de PFA para evaluación histológica e inmunohistoquímica por inmunofluorescencia de la citocina proinflamatoria Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α).

2.7. Histología

Fragmentos de 1cm³ aproximadamente de tráquea nativa, descelularizada y secciones de herida (del ensayo de respuesta *in vivo*) con el tejido circundante se colocaron en moldes de aluminio y se embebieron con medio de montaje Tissuetek, se congelaron a -30°C. Los bloques congelados de Tissuetek conteniendo las muestras se seccionaron en criostato (Leica) a un espesor de 6 μ m y se montaron en laminillas de vidrio (SuperFrostPlus). Las muestras se descongelaron en PBS durante 10 minutos antes de cada ensayo. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para evaluar la efectividad de la descelularización en las muestras sometidas al protocolo y para evaluación histológica de la biocompatibilidad en el caso de las muestras implantadas. La elastina, colágena y el contenido de glicosaminoglicanos (GAG)

en las muestras de tráquea nativa y descelularizada se evaluaron cualitativamente mediante tinción de Herovici, Tricrómica de Masson y Safranina-O respectivamente.

2.8. Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia

La técnica de inmunohistoquímica por inmunofluorescencia es una técnica muy útil para búsqueda de proteínas y diferentes moléculas de interés en una muestra de tejido o célula, por lo que se usa para revelar la presencia de estas a lo largo de los diferentes experimentos propuestos, como se describe a continuación.

La presencia de los marcadores de histocompatibilidad MHC-I y MHC-II después del proceso de descelularización se evaluó mediante la técnica de inmunohistoquímica con inmunofluorescencia usando los anticuerpos para HLA-A [EP1395Y] (ab52922, Abcam) y para HLA DR+DP+DQ [CR3/43] (ab7856, Abcam) respectivamente. Los anticuerpos primarios se usaron a una dilución de 1:100. Se usaron anticuerpos para IgG de conejo acoplados a tiocianato de fluoresceína (IgG-FITC, Santa cruz, 1:200) y para IgG de ratón acoplados a Rojo Texas (IgG-TR, Santa Cruz, 1:100) respectivamente, para revelar la presencia de los marcadores.

El efecto del proceso de descelularización sobre la colágena tipo II fue evaluada mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo monoclonal para Colágena II [5B2.5] (ab3092, Abcam), se usó una dilución de 1:200. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo para IgG de ratón acoplado a tiocianato fluoresceína (IgG (H+L) FITC, Gibco) a una dilución de 1:200.

La presencia de la citocina proinflamatoria $TNF\alpha$ de las muestras de estudio *in vivo* se siguió mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo policlonal para conejo (H-156; Santa Cruz). El anticuerpo primario se usó a una dilución de 1:25. Como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo para IgG de burro acoplado a tiocianato fluoresceína (IgG-FITC, Santa cruz, 1:200).

Los constructos (células mesenquimales sembradas sobre el andamio descelularizado) se lavaron y fijaron con PFA al 4%. Las células presentes en los mismos se marcaron con anti-

cuerpo primario contra CD90 humano (1:100, BectonDickinson). Los constructos se lavaron con solución de tritón al 0.3% en PBS, paso seguido se incubaron con anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 (1:500). Esto con el fin de evaluar la presencia o pérdida del marcador de superficie evaluado a lo largo del tiempo de siembra de las células sobre el andamio descelularizado, de manera que fuera posible establecer la diferenciación de dichas células por efecto del andamio.

En cada uno de los experimentos de inmunofluorescencia descritos anteriormente se llevó a cabo bloqueo para evitar una unión inespecífica usando albúmina sérica bovina (BSA) (SIGMA). La incubación con cada uno de los anticuerpos primarios se realizó a 4°C durante toda la noche. La tinción de los núcleos se realizó usando 4',6-diamidino-2-phenylidole-dihydrochloride (DAPI) a una concentración de 1mg/ml durante 10 minutos. En el caso de los anticuerpos secundarios estos fueron incubados durante 2 horas a 37°C. Las imágenes se obtuvieron con microscopio confocal LSM 800 (Zeiss).

2.9. Microscopía electrónica de barrido

Se evaluó la topografía del andamio descelularizado por medio de microscopía electrónica de barrido, para realizar la observación, se llevó a cabo el proceso previamente reportado por Rodríguez-Fuentes y col. [49]. El procedimiento se describe brevemente a continuación: muestras de tráquea nativa y tráquea descelularizada se fijaron usando buffer de 3% (V/V) de glutaraldehído en 0.1M de cacodilato de sodio (pH 7.2). Después las muestras se deshidrataron con etanol (desde 30% hasta 100%), finalmente las muestras se secaron usando un secador por punto crítico en cámara de CO₂. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio electrónico de barrido DSM-950 (Zeiss) a 15 kV.

2.10. Comportamiento térmico del andamio descelularizado

Se llevó a cabo el estudio del comportamiento térmico de la matriz de tráquea descelularizada mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC),

de establecer si las características macromoleculares que componen la tráquea se alteraron y son detectables a partir de los cambios térmicos que se producen. Para llevar a cabo el experimento, muestras de tráquea nativa y descelularizada ($n=3$) se liofilizaron a una presión de 3.6Pa y -47°C durante 24 horas en liofilizadora (Labconco FreeZone 1). La calorimetría diferencial de barrido se llevó a cabo en un calorímetro diferencial (TA Instruments Q100) y la termogravimetría en un analizador termogravimétrico (TA Instruments Q500). En los dos casos se usó una rampa de calentamiento de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ en atmósfera de nitrógeno y un rango de temperatura de 25°C a 300°C .

2.11. Caracterización biomecánica del andamio descelularizado

Para establecer el efecto del proceso de descelularización sobre las propiedades biomecánicas del andamio obtenido se midió el módulo de almacenamiento de las muestras tanto nativa como descelularizada en equipo DMA (TA Instruments Q800) (Fig. 2.4) operando en modo de tensión a un porcentaje de deformación del 5%, frecuencia de 1Hz, incrementando la temperatura a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Desde 35°C hasta 150°C . Esto último con el objeto de correlacionar las propiedades mecánicas con los cambios térmicos asociados a las matrices.



Figura 2.4: Montaje experimental usado para medir las propiedades mecánicas del cartilago traqueal.

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se muestran en este capítulo se refieren a la evaluación y caracterización de la matriz descelularizada. Los resultados y análisis de estos se hicieron siguiendo la secuencia lógica propuesta en la mayoría de las publicaciones para este tipo de materiales. Primero se muestra y analiza la efectividad de la descelularización, luego se aborda la evaluación *in vitro* de la matriz descelularizada, para continuar con la evaluación de la respuesta *in vivo* y por último se muestra y discuten los resultados obtenidos de la recelularización del andamio obtenido.

3.1. Evaluación de la descelularización

Las tráqueas de cerdo se sometieron al protocolo descrito en la sección 2.2 (Pag. 30) para remover el contenido celular. Macroscópicamente se observó el cambio de coloración a lo largo del proceso de descelularización. El proceso continuó hasta que se observó la tráquea completamente blanca y se completaron 2 ciclos de descelularización (durante dos semanas), como se aprecia en la figura 3.1, esto generó un andamio que retuvo su estructura anatómica desde el punto vista macroscópico.

Un protocolo de descelularización ideal remueve todos los componentes celulares mientras deja los componentes de la matriz extracelular (MEC) intactos. El marcaje de los núcleos



Figura 3.1: Macrografías de un segmento traqueal nativo y después de ser sometido al proceso de descelularización.

con DAPI (Fig. 3.2 a,b) muestra la disminución del material celular después de someter los segmentos traqueales al proceso de descelularización, de igual modo la tinción de H&E (Fig. 3.2 c,d) mostró la remoción del material nuclear. En la tráquea nativa se apreció la presencia de las estructuras del órgano traqueal normal: epitelio ciliado pseudoestratificado, submucosa, cartílago hialino y la musculatura lisa (Fig. 3.2 c). Después de someter el segmento traqueal al protocolo de descelularización se observó que las estructuras principales se retuvieron (Fig. 3.2 d), sin embargo la submucosa así como la musculatura lisa están mas laxas que en la tráquea nativa.

Existen reportes de métodos de descelularización cíclicos que en teoría disminuyen la respuesta inmune [13, 50], sin embargo estos no se enfocan en las moléculas que generan dicha respuesta. En nuestros resultados de inmunohistoquímica por inmunofluorescencia hechos sobre las tráqueas nativa y descelularizada (Fig. 3.3) resulta evidente la disminución de expresión de los Principales Complejos de Histocompatibilidad MHC-I y MHC-II en la submucosa de la tráquea. Este es un parámetro importante a tener en cuenta en la descelularización de la tráquea, ya que estos complejos son los principales responsables de la respuesta inmune, así como lo confirmaron los resultados de Haykal y col. donde comparan tres protocolos cíclicos

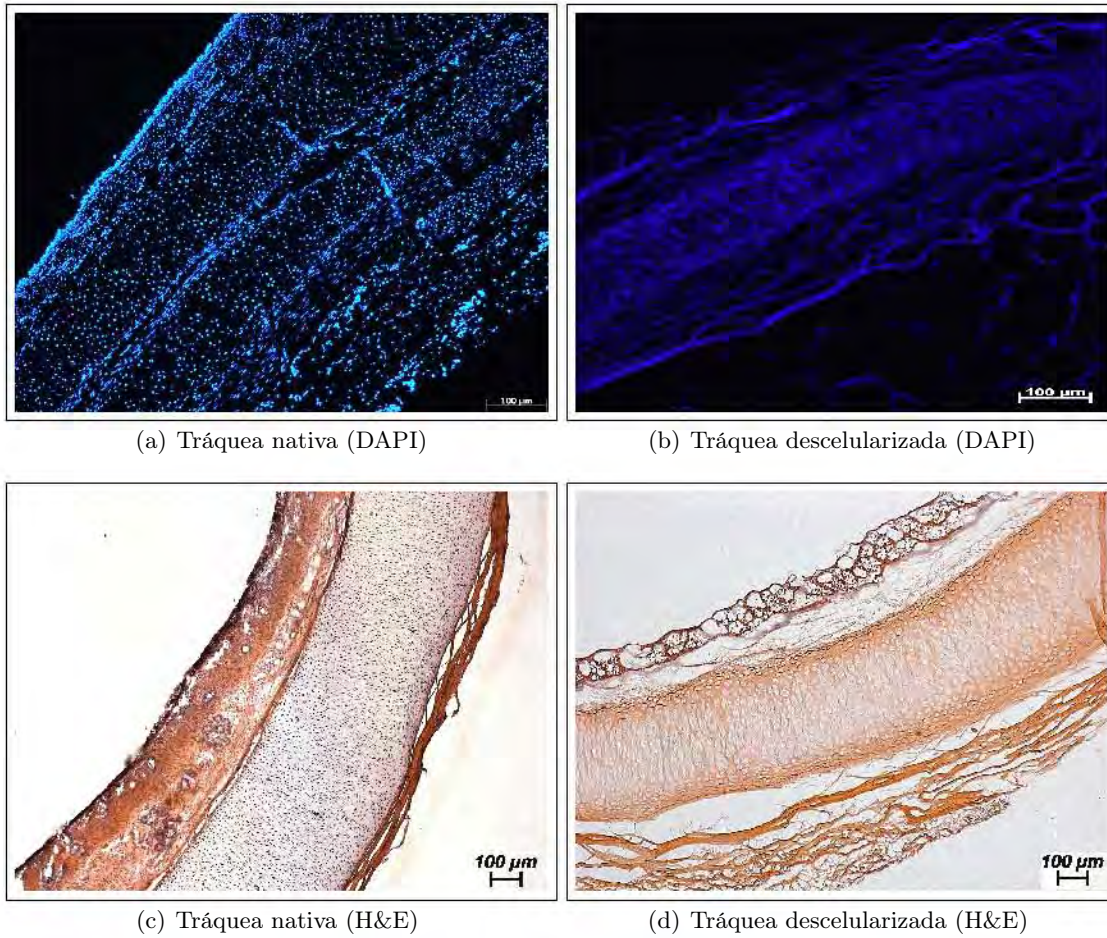


Figura 3.2: Microfotografías de tinción de núcleos con DAPI y tinción de anillos de tráquea antes y después del proceso de descelularización.

de descelularización de tráquea y establecen este parámetro para definir la descelularización completa y adecuada del órgano traqueal [51].

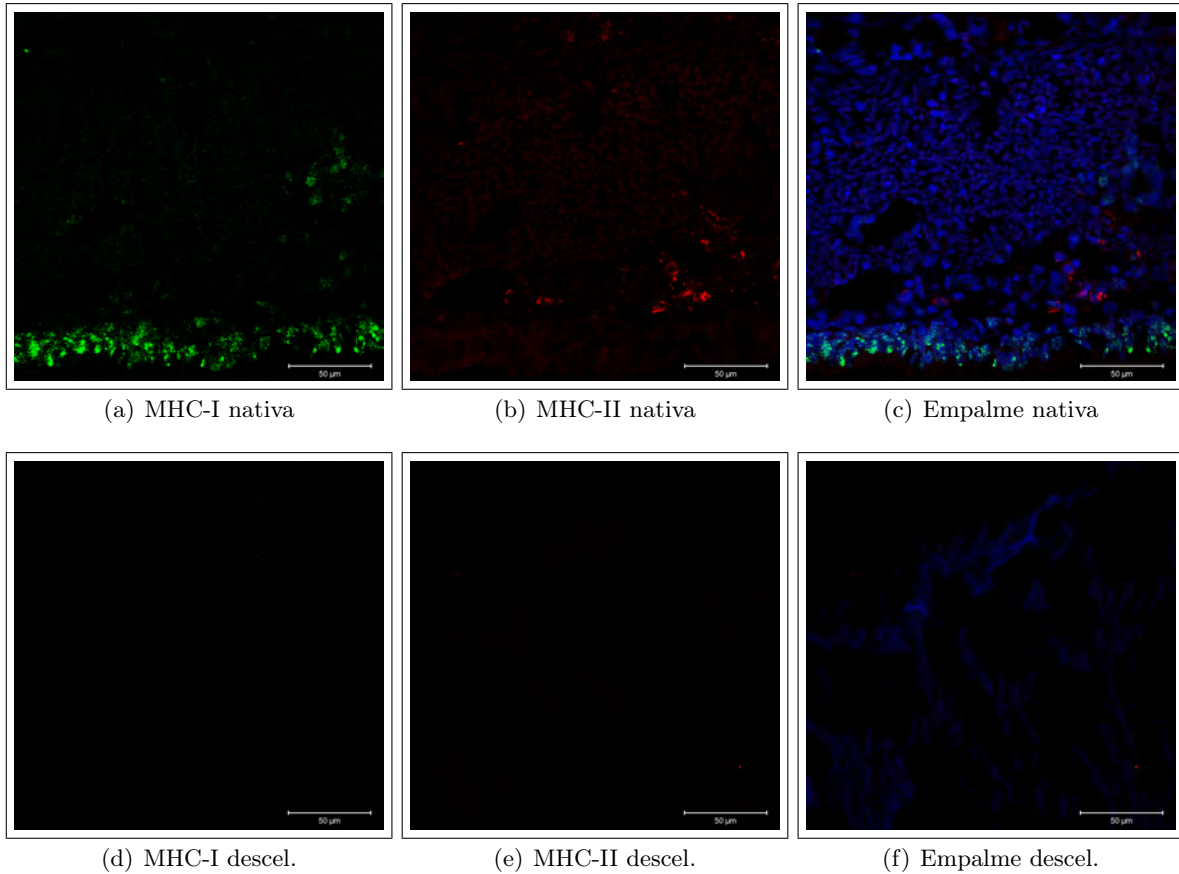


Figura 3.3: Inmunofluorescencia contra complejos principales de histocompatibilidad de mucosa y submucosa de tráquea nativa y descelularizada. La señal en azul corresponde al marcaje de núcleos celulares con DAPI.

Para establecer una medida cuantitativa de la efectividad de la descelularización con los resultados obtenidos de las imágenes de inmunohistoquímica contra los MHCs se llevó a cabo la cuantificación del área positiva al marcaje, con la ayuda del programa ImageJ, se tomaron 10 campos en 4 segmentos traqueales diferentes que fueron sometidos a descelularización y el mismo número para segmentos traqueales nativos. Con el promedio de los datos obtenidos y a través del programa GraphPad Prism6 (San Diego) se llevó a cabo una prueba de comparación

múltiple de Sirak con un intervalo de confianza del 95 %. Los resultados mostraron diferencia significativa entre las muestras de tráquea nativa y descelularizada (Fig. 3.4). Este resultado sugiere que se obtuvo la descelularización efectiva de la tráquea y la disminución o eliminación de los principales componentes que podrían inducir la respuesta inmune a cuerpo extraño del potencial implante.

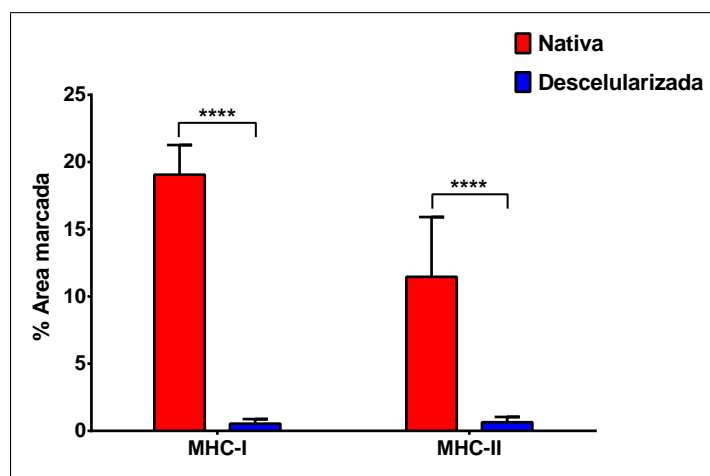


Figura 3.4: Cuantificación de MHC obtenida a partir de las imágenes de inmunofluorescencia.

Los resultados de la efectividad de la descelularización indican que el protocolo propuesto resultó efectivo para obtener un segmento de tráquea descelularizada que retuvo la mayor cantidad de los componentes nativos de la matriz extracelular, ese resultado obedeció a la sinergia generada por los agentes de descelularización empleados.

En primer lugar la tripsina la cual generó hidrólisis enzimática de los enlaces peptídicos que componen las integrinas (Fig. 3.5), estas son proteínas de superficie celular que unen los condrocitos a la matriz extracelular [52], por lo tanto esto favoreció el desprendimiento celular. Sin embargo dicha hidrólisis en teoría también pudo haberse generado en otras proteínas de la MEC que son importantes para el soporte estructural de la tráquea como es el caso de la colágena tipo II, sin embargo estudios previos sugieren que tiempos cortos de incubación en esta enzima no tienen efecto adverso sobre las propiedades estructurales [3,37]. Lo cual sugiere por lo tanto que la tripsina no favorece la hidrólisis enzimática de los enlaces peptídicos del colágeno tipo II.

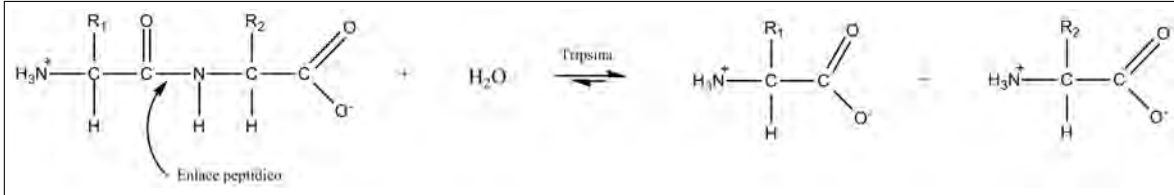


Figura 3.5: Reacción de hidrólisis enzimática catalizada por tripsina.

Otro agente de descelularización que generó un efecto sinérgico particularmente con la tripsina [3, 37], fue el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pues este tiene la capacidad de combinarse con iones metálicos polivalentes, -para formar complejos coordinados cíclicos de anillo (no iónicos)-, solubles en agua y virtualmente no disociables (quelatos), dado que las uniones célula-MEC se dan principalmente a través de proteínas transmembrana llamadas integrinas [53]. La unión de las integrinas a sus ligandos y su activación depende de cationes divalentes que interactúan con la región extracelular de las integrinas (Ca^{2+} o Mg^{2+}) [53], de tal modo que la reacción presente en este caso fue la formación de complejos con cationes (Fig. 3.6). Ya que el EDTA actúa como ligando del átomo metálico coordinante (Ca^{2+} o Mg^{2+}), y así secuestran a estos cationes divalentes imposibilitando la activación de las integrinas y debilitando las uniones célula-matriz extracelular.

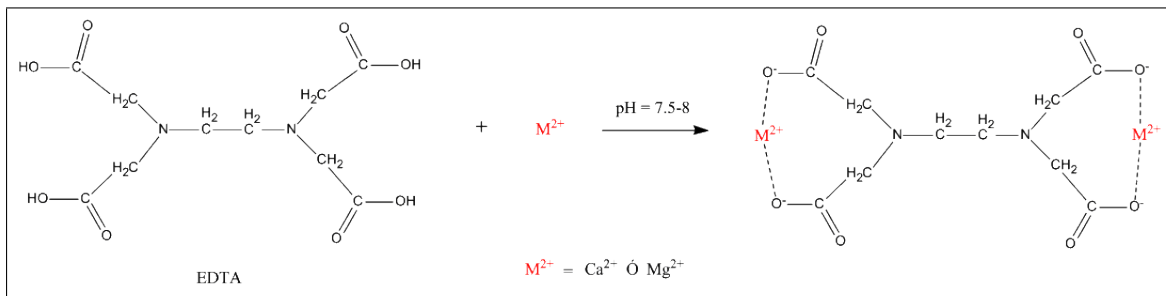


Figura 3.6: Reacción de quelación con EDTA.

Por otro lado, el uso de agua Milli-Q además de usarse para enjuague de algunas soluciones tiene la doble función de ser un medio hipotónico que genera un cambio en la turgencia de la célula ocasionando la lisis celular como se mencionó en la sección 1.7.2 (Pag. 25).

Los detergentes usados en el protocolo de descelularización (SDS y desoxicolato de sodio) solubilizaron la membrana plasmática. Dada la naturaleza tensoactiva de los detergentes al entrar en contacto con las células estos tienden a orientarse hacia las moléculas fosfolipídicas que componen la membrana celular, tendiendo a formar micelas de manera que destruyen la membrana plasmática [54], además interactúan con las proteínas presentes en la membrana y las desnaturalizan, esto ocurre porque los detergentes se unen a las zonas no polares del polipéptido lo que proporciona a este una carga neta negativa, la cual es sustancialmente mayor a la carga original de la proteína. La repulsión electrostática creada por la unión del detergente con la proteína es una de las causas para que la proteína pierda su conformación nativa [43].

El hidrocloreuro de guanidina, no se ha reportado extensivamente como un agente de descelularización, aunque se han publicado resultados relacionados a sus características antimicrobianas y antibacteriales [55–57], por lo que se ha usado como antiséptico [58], además algunos autores reportan baja toxicidad hacia células de mamíferos [59–61]. El uso más frecuente de esta sal es como agente desnaturizante o agente caotrópico en el estudio del desdoblamiento de proteínas, ya que induce la pérdida de la estructura terciaria y/o cuaternaria de ciertas proteínas sin interacción con los enlaces covalentes [62], por esta razón se propuso el uso de esta sal como agente de descelularización para permeabilizar la matriz y de esta manera incrementar la efectividad del protocolo de descelularización a menores tiempos.

El tributil fosfato es un solvente orgánico que interrumpe las interacciones proteína–proteína [8, 40], ha sido reportado como agente de descelularización especialmente en tejidos densos como tendón, y cartílago articular [63, 64].

Por otro lado la DNAasa hidroliza enzimáticamente los ácidos nucleicos celulares (Fig. 3.7), razón por la cual debe utilizarse como uno de los últimos pasos en el protocolo ya que primero debe promoverse la lisis celular para que este agente pueda actuar. Este tipo de enzimas han sido comúnmente usadas dentro de protocolos de descelularización con el fin de eliminar los restos del material nuclear que se libera al romper las membranas plasmáticas [8]

Por último el ultrasonido fue otra de las propuestas en este trabajo, ya que no se encuentran muchos reportes en la literatura del uso de este elemento dentro de los protocolos, sin

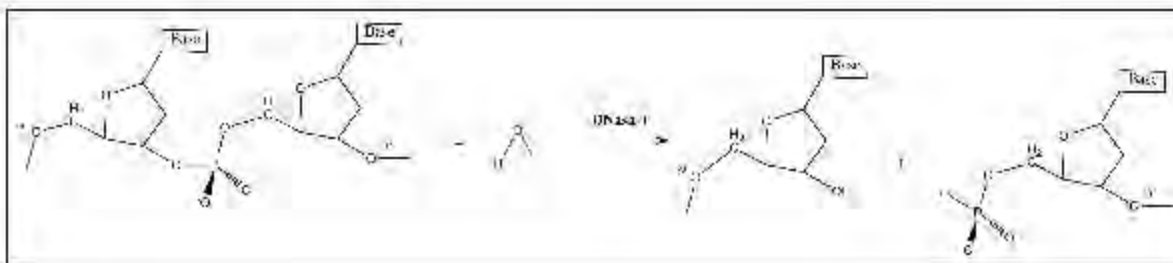


Figura 3.7: Reacción de hidrólisis enzimática del ADN catalizada por la DNasa-1.

embargo si se menciona que los efectos físicos como la presión, rompen la célula y ayudan en la remoción de estas de los tejidos [8], de hecho muchas de las técnicas de solubilización de células con fines de liberación de material intracelular utilizan este principio físico, debido a que la intensa agitación producida destruye las membranas celulares. El ultrasonido genera millones de burbujas microscópicas, las cuales se expanden y colapsan contra las células causando la ruptura de su membrana, favoreciendo el proceso de descelerización, fenómeno que se conoce como cavitación. [65,66]

3.2. Caracterización de la MEC: Inmunohistoquímica e histología

La evaluación de los componentes de la MEC se llevó a cabo con inmunohistoquímica por inmunofluorescencia contra colágena tipo II como se describió en la sección 2.8 (Pag. 36). El resultado (Fig. 3.8) mostró que no hubo pérdida de colágena lo cual sugiere que el proceso de descelerización llevado a cabo conserva las propiedades estructurales de la matriz nativa.

En el caso de la evaluación histológica de la matriz de tráquea descelerizada, esta se realizó empleando las tinciones de Safranina-O, Masson y Herovici, se evaluaron los componentes principales de la MEC, llevándose a cabo el proceso descrito en la sección 2.7 (Pag. 35).

La tinción de Safranina-O muestra la presencia de los glicosaminoglicanos (GAG) en tonalidad rojiza (Fig. 3.9 a,d), dichas moléculas son importantes para mantener hidratado el cartílago y favorecer su resistencia a la compresión [1–3], sin embargo los GAG también interactúan con

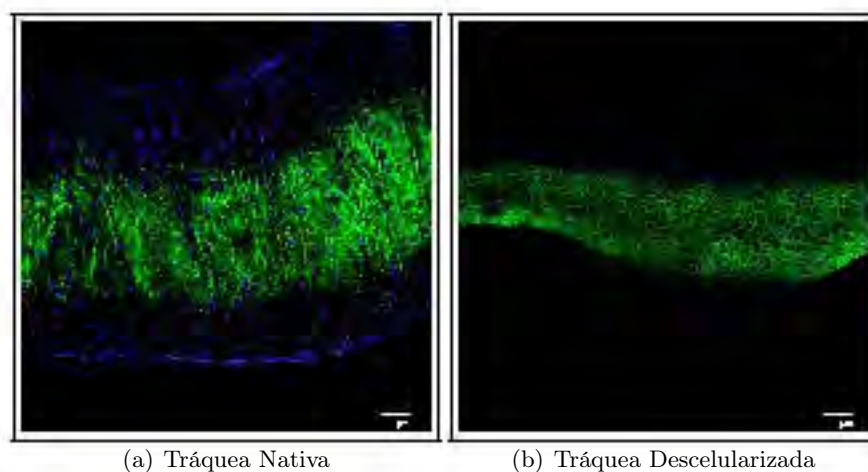


Figura 3.8: Inmunofluorescencia contra colágena tipo II sobre muestras de anillo traqueal nativo y descelularizado. En marcaje azul se muestran los núcleos con DAPI.

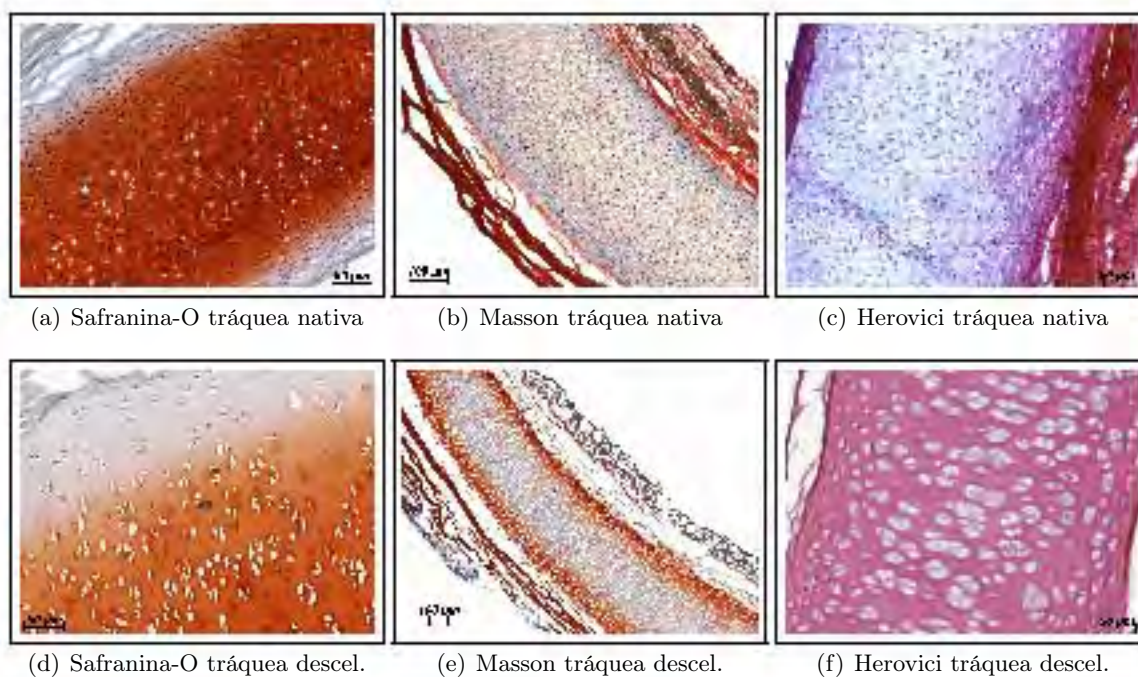


Figura 3.9: Tinciones de tráquea nativa y descelularizada que muestra que la mayor parte de los componentes nativos se retuvieron después del proceso.

el ácido hialurónico y forman estructuras agregadas que intervienen en las interacciones entre los condrocitos y la MEC [53]. La evaluación de estas macromoléculas mediante esta tinción sugiere que hubo pérdida parcial de los GAG por efecto del protocolo de descelularización (Fig. 3.9 d), este resultado es debido al efecto del Hidrocloruro de Guanidina (GndHCl) como agente de descelularización, pues precisamente lo que se buscó con el uso de dicho agente fue favorecer la permeabilización del cartílago traqueal mediante la disolución parcial de los GAG para coadyuvar en la remoción de los condrocitos al interior de la matriz de cartílago. El GndHCl es conocido como un agente caotrópico que genera el desdoblamiento de las proteínas desde su estado nativo a un estado desordenado o aleatorio [67], generando así una matriz de cartílago menos compacta incrementando la efectividad del proceso de descelularización para una matriz densa como el cartílago, sin embargo este agente tiene un efecto importante sobre los GAG, ya que estos por tratarse de glicoproteínas polares que son altamente afines por el agua [68], hace que además del efecto caotrópico del GndHCl de desdoblarse se disuelvan en la solución de descelularización.

En el caso de la tinción Tricrómica de Masson (Fig. 3.9 b,e) se tiñe de azul la colágena, en rojo las fibras musculares, el citoplasma y las estructuras oxidadas, y en lila o marrón el núcleo celular [51]. Para la tinción de Herovici esta tiñe en color azul fibras de colágena nueva o menos empaquetada y en un tono rojizo las fibras de colágena madura o mas empaquetada [69]. El resultado de la evaluación de los componentes de la MEC de la tráquea obtenido por medio de estas tinciones sugiere que se perdió el epitelio ciliado (Fig. 3.9 e), resultado que es de esperarse ya que este epitelio pseudoestratificado lo componen células adosadas por lo que la descelularización implicaría la pérdida del mismo. Por otro lado aunque se conservaron los principales componentes de la tráquea (cartílago, mucosa, submucosa y musculatura lisa) (Fig. 3.9 y Fig. 3.2), en la tinción de Masson en el cartílago se observa una oxidación hacia la parte perimetral del mismo (Fig. 3.9 e), y en el caso de la tinción de Herovici se observa de color rojizo lo que sugiere que hubo un empaquetamiento en las fibras de colágena que componen el cartílago traqueal por efecto del proceso de descelularización este efecto se puede atribuir a dos fenómenos, por un lado el tributil fosfato usado como agente de descelularización, ya que se ha reportado que este agente puede incrementar ligeramente la rigidez de la MEC, de acuerdo con los resultados de Cartmell [63], también es posible atribuirlo al entrecruzamiento causado por el método de esterilización usado como parte final del protocolo de descelularización, donde se

usó radiación UV para esterilizar el andamio. Este resultado fue consistente con lo observado por Davidenko y col. donde encontraron que andamios tridimensionales de colágena pueden ser entrecruzados con uso de radiación UV incrementando su resistencia mecánica sin afectar sus propiedades biológicas [70].

3.3. Caracterización biofísica de la MEC: Propiedades mecánicas y estructurales de la tráquea descelularizada

La microscopía electrónica de barrido (SEM) se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.9 (Pag. 37) para evaluar el efecto del proceso de descelularización sobre la arquitectura tridimensional así como la morfología de la MEC en la tráquea descelularizada. La evaluación de la morfología sobre la tráquea nativa mostró la presencia de los tejidos característicos de esta, donde se apreciaron la fibras de colágena que componen la musculatura que rodea el cartílago con la presencia de células con morfología de eritrocitos provenientes de sangre por efecto de la procuración (Fig. 3.10 a). Un corte transversal de la matriz de cartílago nativa (Fig. 3.10 b) develó las características morfológicas del mismo observándose la matriz densa de colágena, las lagunas y al interior de estas los condrocitos. Después de llevar a cabo el proceso de descelularización se observó la matriz de cartílago con la presencia de tejido de submucosa laxo sobre este (Fig. 3.10 c), al mismo tiempo no se apreció un cambio en la matriz de cartílago traqueal donde además se conservaron de las estructuras porosas (lagunas) sin la presencia de material celular al interior de las mismas (Fig. 3.10 d).

El análisis térmico de la MEC se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.10 (Pag. 37) para establecer posibles cambios en la estabilidad térmica del material por efecto del proceso, ya que cambios en la estabilidad térmica pueden ser asociados a degradaciones sobre las moléculas que componen el material [71]. Debido al uso de la enzima tripsina dentro del protocolo de descelularización es preciso asegurarse que no se generó una degradación en la MEC. Los resultados preliminares de esta investigación sugieren que tiempos cortos de incubación de un segmento traqueal de (3-5)cm no generan una degradación sobre la matriz [37], sin embargo en este caso por tratarse de un protocolo diferente y de mayores longitudes es preciso corroborar que no existió alteración.

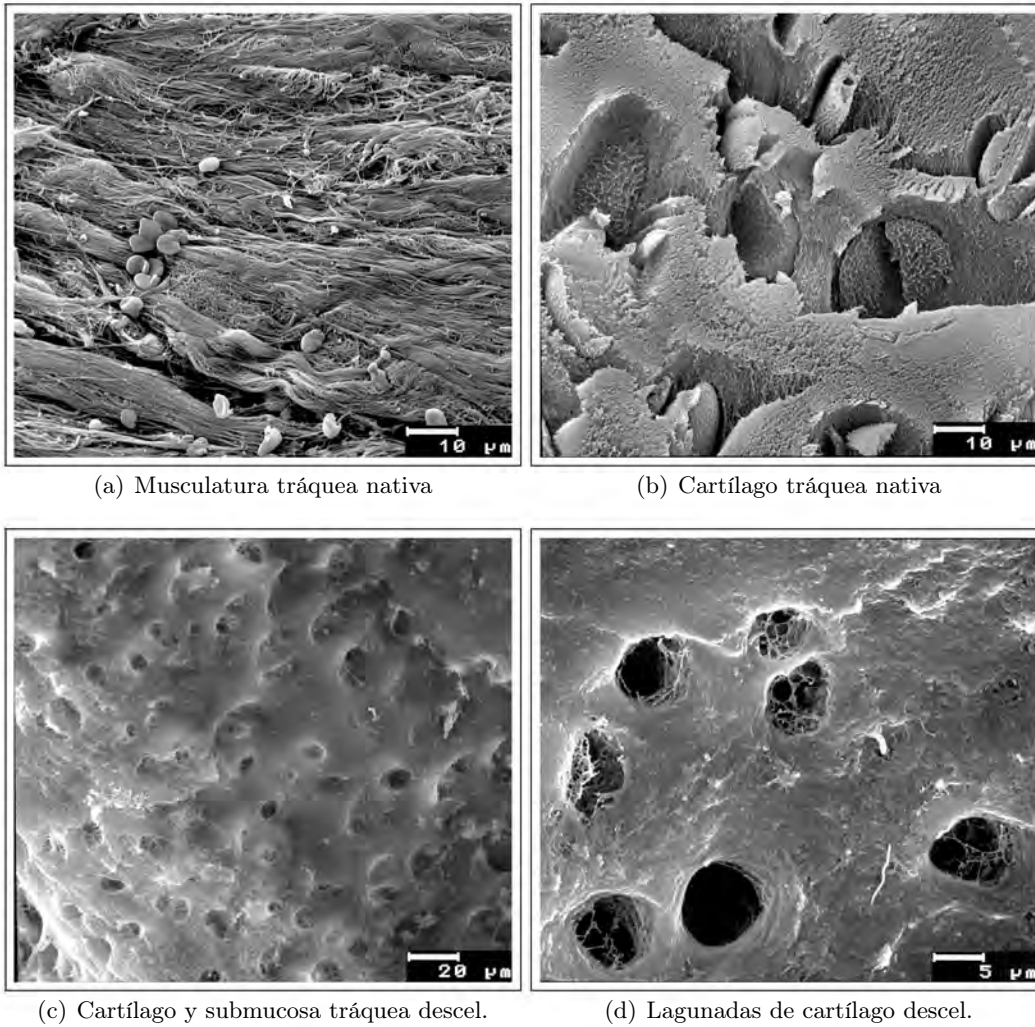


Figura 3.10: Microfotografías SEM que muestran la microarquitectura de la tráquea nativa y descelularizada.

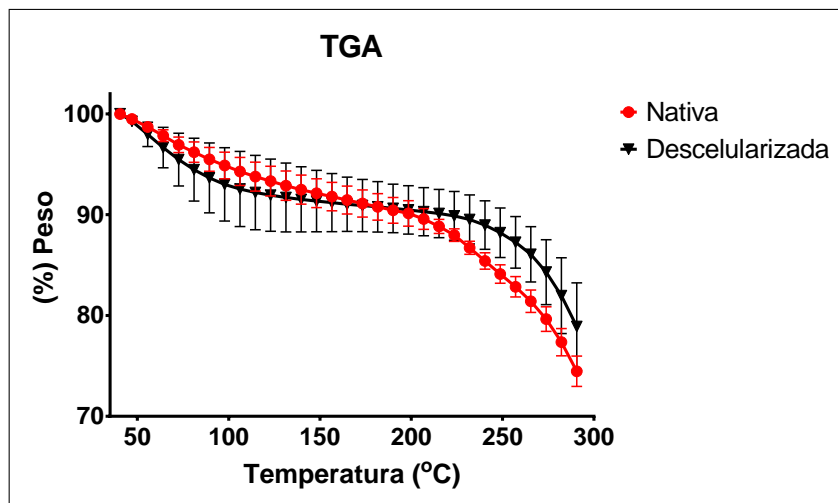


Figura 3.11: Análisis termogravimétrico de MEC de tráquea nativa y descelularizada.

Las muestras evaluadas mostraron el comportamiento típico de la colágena de acuerdo con resultados de otros estudios [71, 72]. Estas curvas mostraron dos pérdidas de peso importantes (Fig. 3.11). la primera ocurre hasta los 105 °C y es debido a la pérdida de agua absorbida dada la naturaleza higroscópica de las moléculas de la MEC [73]. la muestra de matriz acelular exhibió una pérdida de peso mayor que la muestra nativa, sin embargo esta pérdida no fue estadísticamente significativa, al igual que en los resultados preliminares de esta investigación [37]. La mayor pérdida de agua por parte de la muestra descelularizada puede explicarse por efecto del proceso llevado a cabo, ya que la muestra permanece hidratada a lo largo de todo el protocolo y se usan soluciones hipotónicas lo que ocasionan una hidratación mayor que en condiciones fisiológicas. La segunda pérdida importante de peso ocurre después de los 200 °C y es debida a la descomposición de las moléculas de colágena [73, 74]. los resultados también mostraron que no hubo una diferencia significativa entre el comportamiento térmico de la matriz nativa y la descelularizada. Por encima de los 200 °C se observó un decaimiento de peso mayor en la matriz nativa que en la acelular, esto puede ser asociado al efecto de entrecruzamiento provocado por la radiación UV usada dentro del protocolo de descelularización como parte de la esterilización de la matriz.

El análisis de las características térmicas de la matriz hecho a través de los termogramas

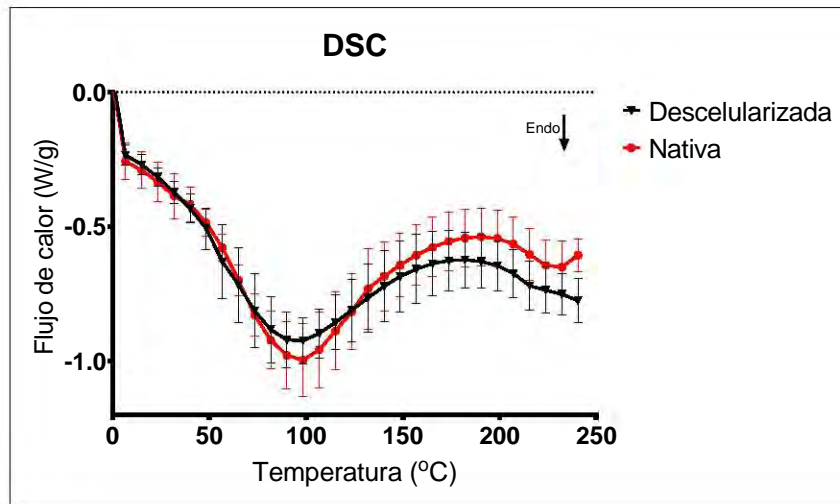


Figura 3.12: Termograma de calorimetría diferencial de barrido de MEC de tráquea nativa y descelularizada.

obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Fig. 3.12) confirmó lo que mostró el análisis termogravimétrico, es decir que la primera pérdida de peso en el TGA está asociada a la pérdida de agua como lo muestra el primer pico endotérmico alrededor de los 100 °C, comportamiento típico de moléculas de colágena de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores [74,75]. Este cambio endotérmico es asociado también a la temperatura de desnaturalización o desdoblamiento de cadenas por el efecto caotrópico de la ruptura de puentes de hidrógeno al eliminar toda el agua presente en la molécula [76], ya que el doblamiento de triple hélice de colágena es estabilizado por puentes de hidrógeno [77], por lo tanto en este punto se está afectando la estructura de triple hélice de la molécula de colágena. El segundo pico endotérmico que se aprecia por encima de los 200 °C el cual concuerda con la segunda pérdida importante de masa en los termogramas de TGA (Fig. 3.11) corresponde a la degradación de la molécula, debido a que este cambio tiene asociado una pérdida de peso es posible afirmar que se deba a la ruptura de los enlaces peptídicos en la estructura primaria de la molécula.

En el caso del DSC al igual que en el TGA no se observan diferencias significativas en las curvas lo que indica que el proceso de descelularización no modificó la estructura del principal componente estructural de la matriz (la colágena).

En los andamios obtenidos por métodos de descelularización es de suma importancia asegurar la conservación de las propiedades mecánicas del andamio, debido a que algunos de los agentes de descelularización son de naturaleza desnaturalizante, tales como el SDS [8, 78], o incluso algunos pueden generar la degradación de las proteínas por efecto de la hidrólisis como la tripsina [45], lo que podría comprometer la integridad estructural del andamio.

Aunque se han llevado a cabo diferentes estudios mecánicos de la tráquea, la mayoría de estos son de tipo estáticos [79–84], y este es un enfoque parcial dada la naturaleza viscoelástica de la misma, como quedó demostrado en los resultados de Teng y col [84]. Por lo cual el ensayo propuesto pretendió simular los esfuerzos fisiológicos a los que está sometido el anillo traqueal. Además por tratarse de un ensayo dinámico se tiene en cuenta las características viscoelásticas del material.

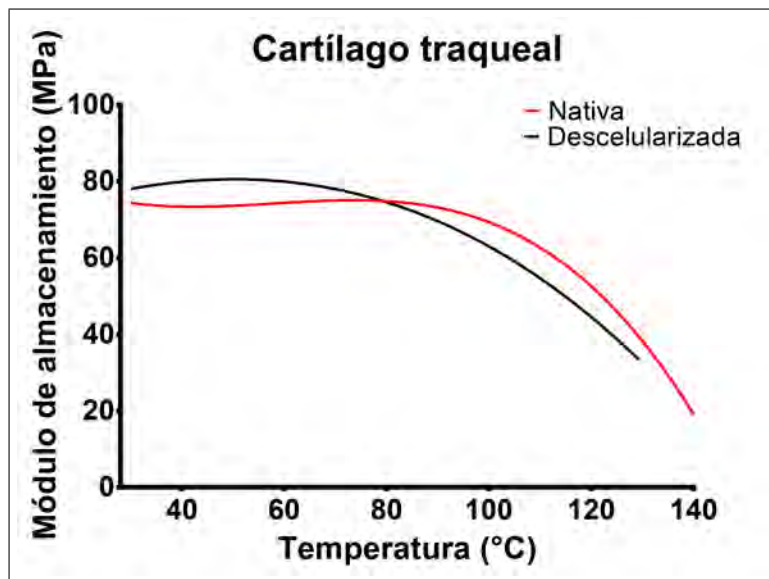


Figura 3.13: Módulo de almacenamiento con respecto a la temperatura del cartilago nativo y descelularizado.

Del análisis dinámico mecánico (DMA) se obtuvo la variación del módulo de almacenamiento con respecto a la temperatura (Fig. 3.13). Este módulo indica la capacidad del material para restablecer la energía suministrada mecánicamente es decir la rigidez del material. las curvas obtenidas arrojaron un resultado del módulo de 73 MPa y 80 MPa para el cartilago de

tráquea nativa y descelularizada respectivamente, por debajo de los 80 °C. El incremento en la rigidez del cartílago descelularizado puede explicarse por efecto de algunos de los agentes de descelularización como por ejemplo el uso del tributil fosfato que puede generar un ligero incremento en la rigidez de la MEC, este resultado fue también observado por Cartmell en matrices densas como el tendón [63], otro de los factores pudo ser generado por el entrecruzamiento de las moléculas de colágena ocasionado durante el protocolo de esterilización por efecto de la radiación UV. Un resultado importante es que los agentes desnaturalizantes (SDS y tripsina) no tuvieron un efecto significativo sobre las propiedades mecánicas y estructurales de la MEC, este resultado también fue consistente con los resultados de Cartmell y col. y los resultados preliminares de esta investigación [37, 63].

El efecto del decaimiento en la rigidez del material después de los 80 °C, es debido al proceso de desdoblamiento de las hélices de colágena, que como se vio en los resultados de análisis térmico ocurre cercano a los 100 °C, sin embargo debido a la energía suministrada al sistema por el efecto dinámico del ensayo, la cinética de la reacción ocurre a menores temperaturas. Esto último sugiere que la máxima velocidad de la reacción del primer desdoblamiento de las moléculas de colágena se encuentra alrededor de los 80 °C.

3.4. Respuesta *in vivo* de la tráquea descelularizada

Es importante establecer la biocompatibilidad del implante, ya que se ha reportado que los residuos de algunos agentes de descelularización tienen efectos citotóxicos, como es el caso del SDS [85]. Para establecer esto los anillos de matrices descelularizadas de tráquea fueron implantados de manera subcutánea sobre ratones, con el fin de llevar a cabo una evaluación preliminar de la biocompatibilidad del andamio descelularizado obtenido. El implante fue seguido durante 15 días post-implantación (se tomaron muestras después de 1, 2, 7 y 15 días). Se llevó a cabo el análisis de la citocina pro inflamatoria $TNF\alpha$, de igual modo se realizó análisis histológico por medio de tinción de H&E del implante y la zona alrededor del mismo.

El primer día en las muestras de piel donde solo se llevó a cabo la herida se observó edema, hemorragia, infiltrados y presencia de células polimorfonucleares (Fig. 3.14 a). El segundo día

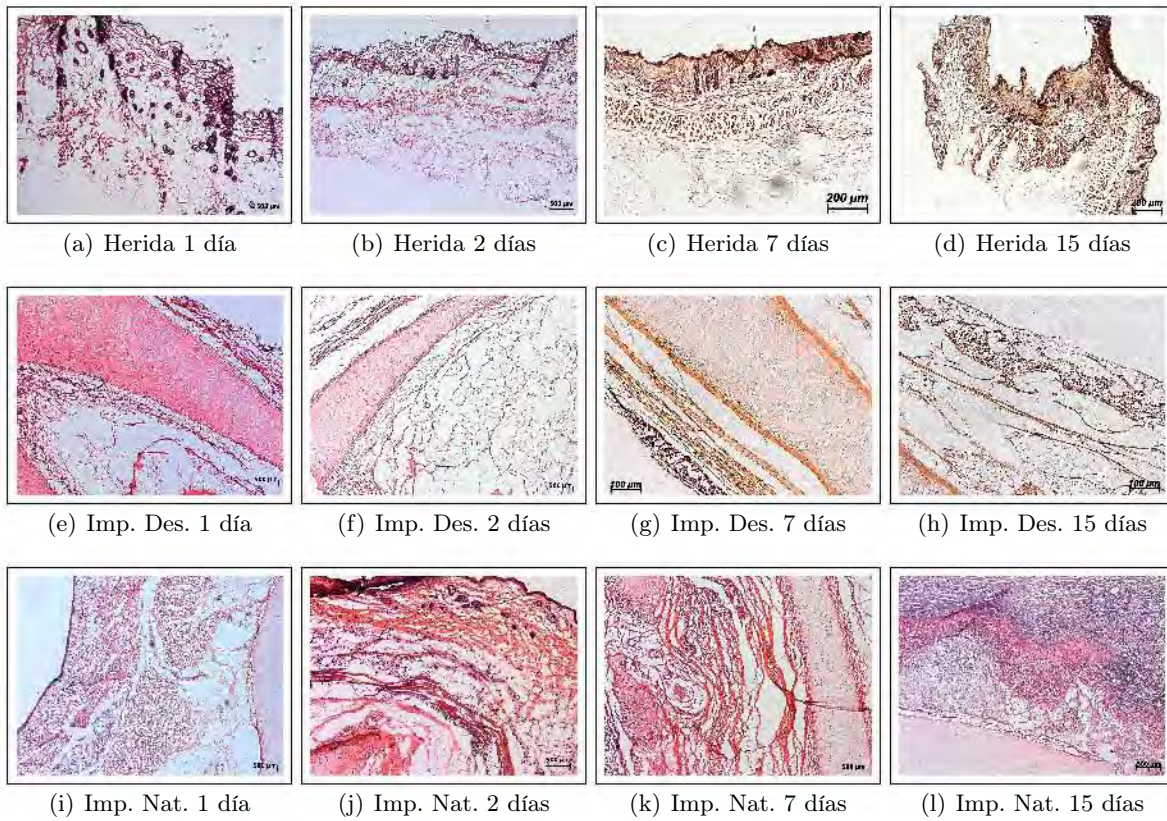


Figura 3.14: Tinciones de H&E del ensayo de biocompatibilidad preliminar.

se observó infiltrados con la presencia de células polimorfonucleares (Fig. 3.14 b). El séptimo día se observó la disminución de edema, no hubo hemorragia, hubo remodelamiento de la herida y presencia de fibroblastos (Fig. 3.14 c). En el día quince se observó que hubo remodelamiento de la piel con sobreexpresión de colágena (fibrosis) se vio disminuida la presencia de células polimorfonucleares (Fig. 3.14 d).

En el caso del implante descelularizado se observó el primer día la presencia de infiltrado y células polimorfonucleares (Fig. 3.14 e). El segundo día se vio un incremento en la presencia de tejido fibroso alrededor del implante (Fig. 3.14 f). En el séptimo no hubo variación en la cantidad de fibrosis alrededor del implante (Fig. 3.14 g). En el día quince se observó menos infiltrado y la fibrosis no se incrementó (Fig. 3.14 h).

En el implante nativo, el primer día se observó la presencia de infiltrado y hemorragia, así como inflamación (Fig. 3.14 i), el segundo día se incrementó la presencia de infiltrado y de células inflamatorias (polimorfonucleares) (Fig. 3.14 j), el séptimo día se observó la presencia de infiltrado y fibrosis, así como de indicios de hipodermatitis (Fig. 3.14 k), en el día quince hubo una expresión exacerbada de fibrosis rodeando el implante, indicios de necrosis y células inflamatorias rodeando el implante (Fig. 3.14 l). Lo anterior confirma una reacción a cuerpo extraño producida por el implante nativo.

La inmunohistoquímica (IHC) contra el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) en implantes de tráquea descelularizada (Fig. 3.15) mostró un patrón de expresión donde no hubo una diferencia significativa en comparación con la inflamación proveniente del procedimiento quirúrgico (muestras con herida)(Fig. 3.16), mientras sí hubo una diferencia apreciable con el grupo control positivo (Fig. 3.17), donde los resultados mostraron la expresión exacerbada de dicha citocina la cual se mantuvo a lo largo de los 15 días.

La citocina pro-inflamatoria $TNF\alpha$ es una defensa del huésped, cuya producción exagerada puede llevar a enfermedades inflamatorias crónicas [86]. Esta es producida principalmente por macrófagos en respuesta al daño tisular o infección [87–89], por lo cual en procesos inflamatorios y de daño tisular es normal que se presente en los estadios tempranos como se observó en todos los grupos. La $TNF\alpha$ pertenece a una familia de ligandos que activan una familia corres-

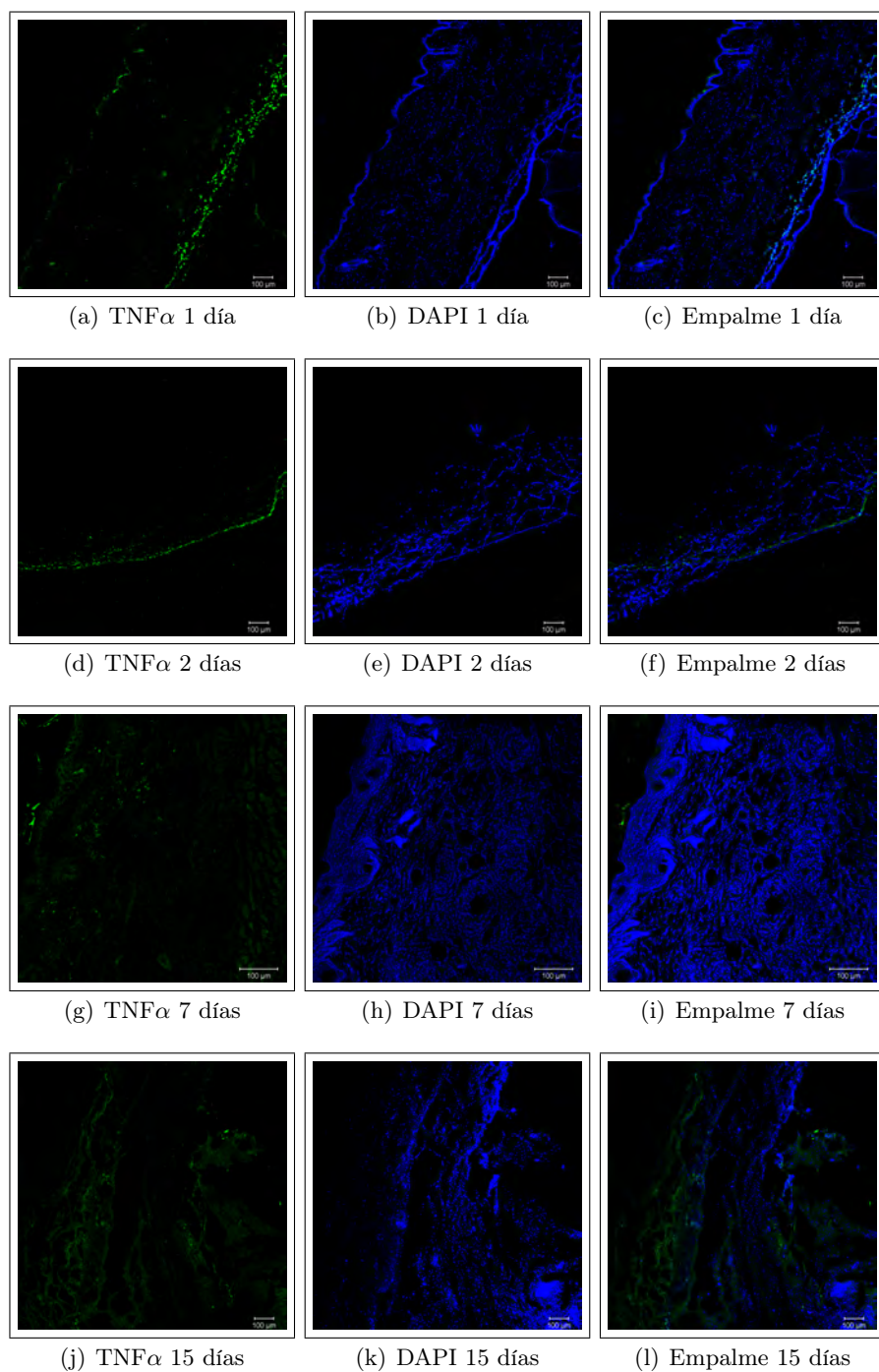


Figura 3.15: Microfotografías de los resultados de inmunofluorescencia contra $\text{TNF}\alpha$ de los ratones con implante subdérmico de tráquea descelularizada (grupo experimental).

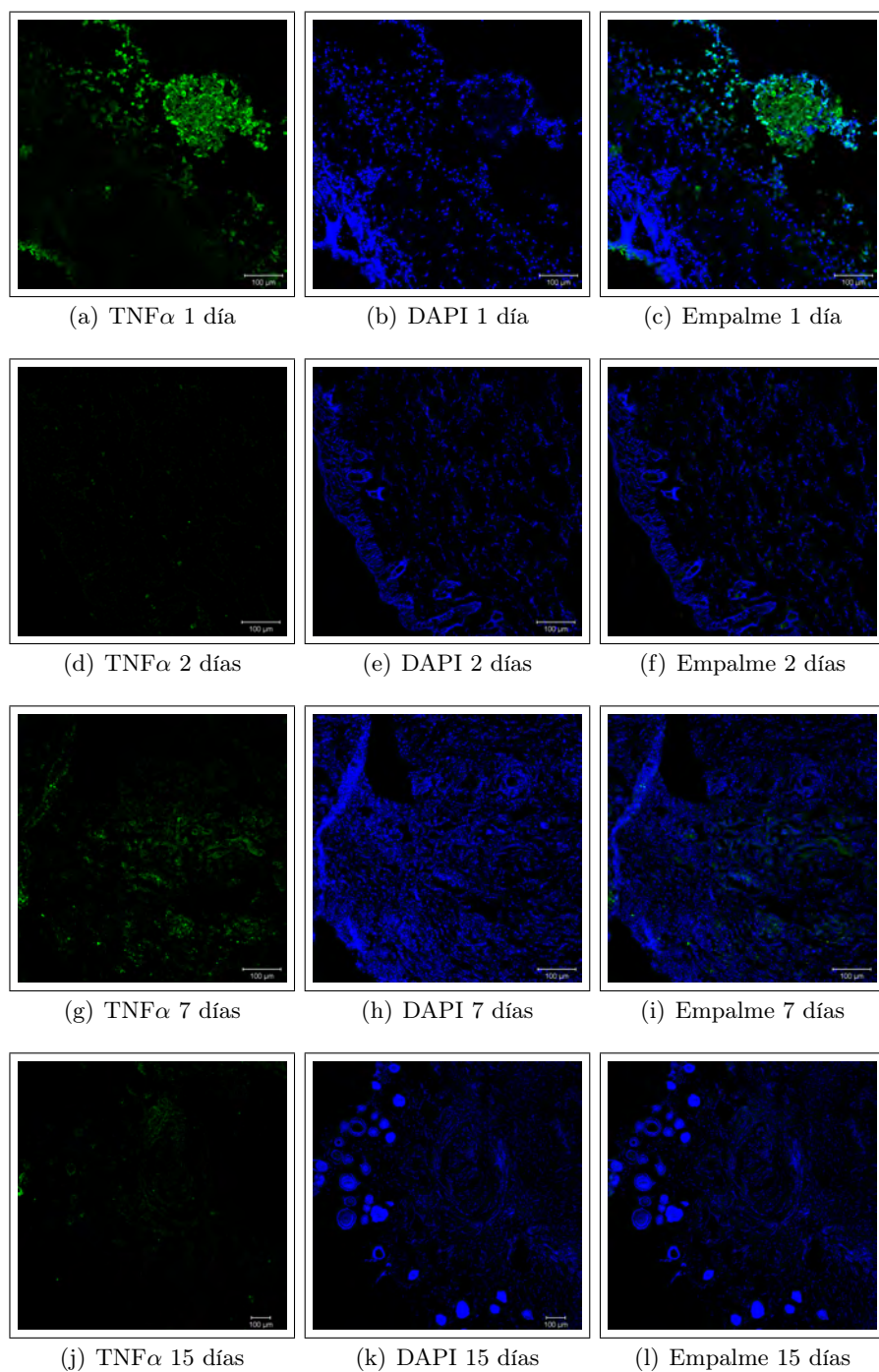


Figura 3.16: Microfotografías de los resultados de inmunofluorescencia contra TNF α de los ratones que solo recibieron la herida (grupo control negativo).

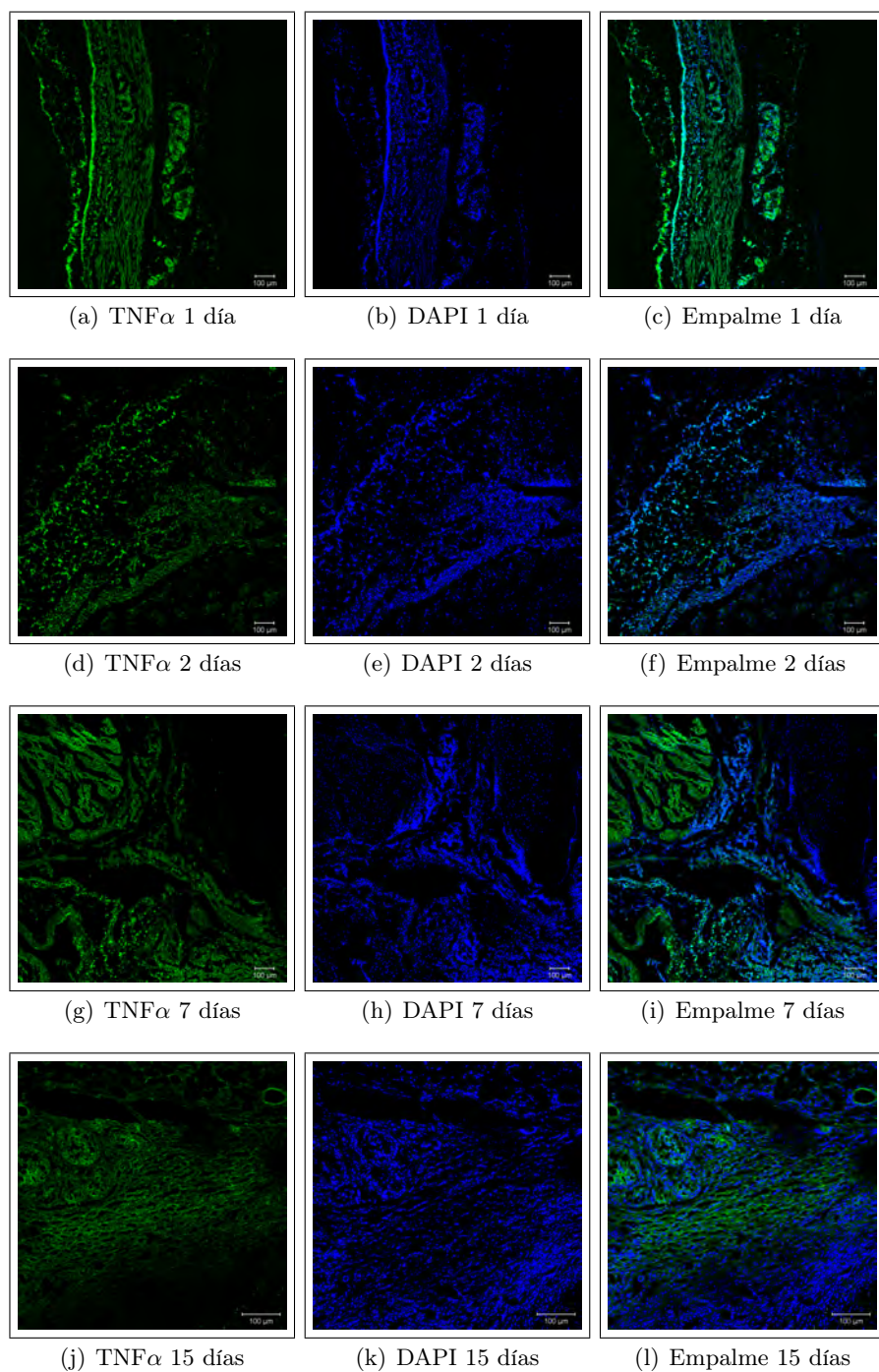


Figura 3.17: Microfotografías de los resultados de inmunofluorescencia contra $\text{TNF}\alpha$ de los ratones con implante subdérmico de tráquea nativa (grupo control positivo).

pondiente de receptores celulares (presente en casi todas las células) que inician señales para la proliferación y apoptosis [86]. Hay estudios que reportan que una producción exagerada lleva a inflamación severa, daño tisular y choque cardiovascular [86,89], de igual manera también se reporta que una producción lenta y continua de esta citocina lleva a inflamación crónica [86], lo que concuerda con el resultado del grupo control positivo (implante de tráquea nativa).

Los resultados de histología no mostraron indicios de formación de tejido fibroso o hipodermis en el implante descelularizado, como si ocurrió en el grupo control positivo, además el análisis de la presencia de la citocina pro-inflamatoria $TNF\alpha$ para el implante de tráquea descelularizada mostró un comportamiento muy similar a las muestras del grupo control negativo (sin implante), lo cual sugiere que tráquea descelularizada mostró ser biocompatible después de 15 días de implantación.

3.5. Recelularización del andamio de tráquea descelularizado

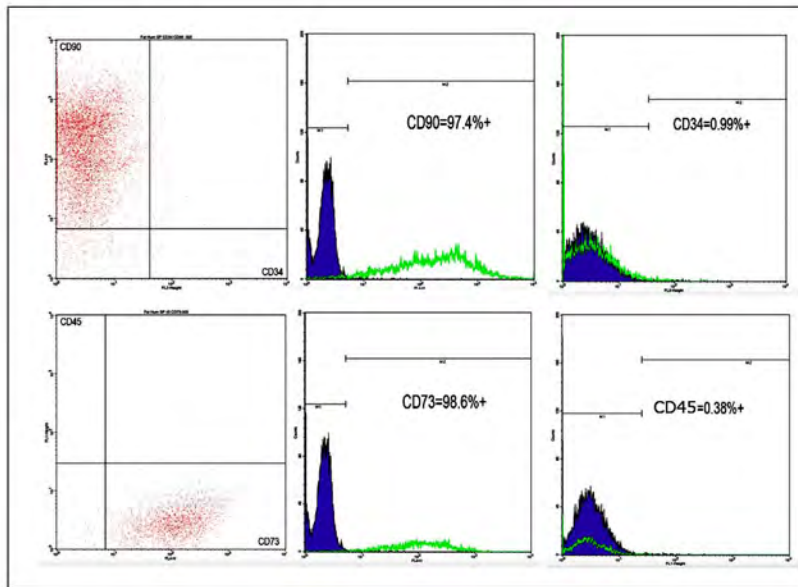
El resultado de la citometría de flujo (Fig. 3.18 a) realizada de acuerdo a la sección 2.4 (Pag. 33) sobre las células extraídas de tejido adiposo como se mencionó en la sección 2.3 (Pag. 32), confirmó que la población mayoritaria de las células que se adhirieron al frasco de cultivo resultaron positivas a los marcadores de superficie para células mesenquimales con un porcentaje de 97.4% y 98.6% para CD90 y CD73 respectivamente, al mismo tiempo dicha población celular mostró ser negativo contra los marcadores de células hematopoyéticas, arrojando un resultado de 0.99% y 0.38% para CD34 y CD45 respectivamente, lo cual confirma que las células sembradas sobre el andamio cumplen con las características de células mesenquimales, estos mismos resultados también concuerdan con los de otros investigadores para este tipo de ensayo para poblaciones celulares obtenidas por este método [90].

Los constructos evaluados se siguieron a través de inmunohistoquímica por inmunofluorescencia (IHC/IF) después de 24 horas y una semana de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 2.5 (Pag. 33), en cada caso se evaluó la expresión de CD90, para establecer si la pérdida de uno de los marcadores característicos de células mesenquimales concordaba con la expresión del marcadores característicos de diferenciación a linaje condral, evaluando para

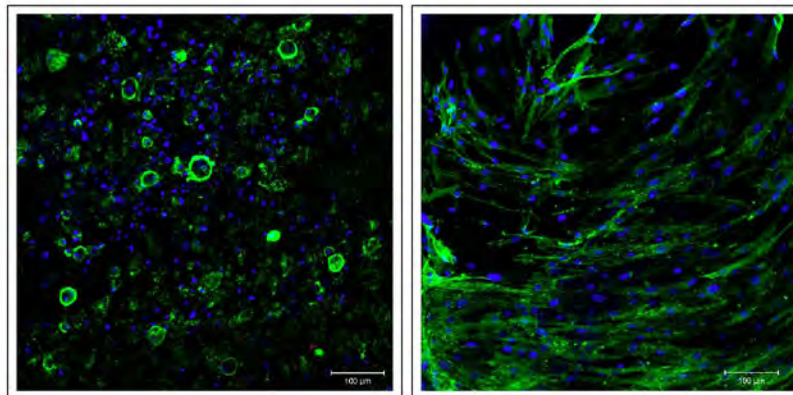
ello a través de esta misma técnica la expresión de SOX9, sin embargo debido al potencial mesenquimal de las células fue preciso descartar la expresión de marcadores característicos de osteoblastos por lo cual también se realizó la inmunotinción contra RUNX2. Con lo cual se esperaba establecer la diferenciación celular sobre el andamio obtenido.

Los resultados de la (IHC/IF) para los constructos después de 24 horas (Fig. 3.18 b) mostraron una morfología celular de tipo esférica lo que sugiere que las células aún no se encontraban completamente adheridas al andamio o que se encontraban en proceso de adherirse al mismo. Después de 1 semana y evaluar los constructos mediante la misma técnica (Fig. 3.18 c), los resultados mostraron una morfología de las células alargadas, lo que sugiere que las células reconocieron como un material adecuado para adherirse y posteriormente proliferar, lo que indica que es un andamio celular adecuado y que no resultó citotóxico por efecto de algún agente de descelularización remanente sobre las matrices descelularizadas.

En ningún caso se observó la expresión de SOX9 o de RUNX2 después de los 7 días, sin embargo los resultados mostraron que después de 7 días las células sembradas sobre el andamio descelularizado seguían expresando el marcador de superficie característico para células mesenquimales CD90 (Fig. 3.18 c), lo cual sugiere que el material mantiene el fenotipo característico para este tipo de células después de una semana y que probablemente la diferenciación se pueda apreciar después de estos periodos.



(a) Resultados de citometría de flujo de las células pre-siembra



(b) Constructo después de 24 horas (CD90) (c) Constructo después de 7 días (CD90)

Figura 3.18: Recelularización de la matriz de tráquea.

CONCLUSIONES

La producción de un órgano acelular como la tráquea a través de descelularización cíclica ofrece un enfoque alternativo promisorio para un reemplazo funcional de este importante órgano. Los resultados de esta investigación demuestran que el protocolo de descelularización propuesto para segmentos de tráquea de 8 cm resultó en la generación de un andamio natural con una arquitectura 3D virtualmente sin modificación con respecto a la matriz nativa, la cual tiene el potencial de servir como modelo de sustitución o reemplazo traqueal, para aquellas lesiones traqueales en los que la resección no es una alternativa viable.

La exhaustiva caracterización llevada a cabo mostró que se obtuvo un biomaterial viable para la aplicación particular, dada la preservación de los principales componentes de la MEC, la orientación tridimensional de sus proteínas, así como la microestructura de la misma, y al mismo tiempo la conservación de la estabilidad mecánica de dicha matriz.

La matriz descelularizada mostró ser biocompatible como lo demostraron los implantes subcutáneos en ratones, la repoblación del andamio descelularizado con células mesenquimales humanas de tejido adiposo demostró la citocompatibilidad del andamio así como que el andamio favorece la retención del fenotipo de estas a lo largo de 7 días, sin embargo no se observó la capacidad inductiva del andamio.

Perspectivas

Aunque los resultados del ensayo *in vivo* mostraron que no hubo una respuesta inflamatoria exacerbada, ni indicios de una respuesta a cuerpo extraño es preciso llevar a cabo este experimento a mayores tiempos para establecer el comportamiento del andamio en condiciones fisiológicas a tiempos mayores, para esto es factible desarrollar un ensayo similar al de la respuesta *in vivo* sobre alguna especie menor como ratón u otro roedor llevando a cabo el implante subcutáneo de la matriz descelularizada y seguir el implante a 21, 30 e incluso 40 días a través de tinciones de H&E y ensayos de ELISA para cuantificar la respuesta de otras citocinas pro-inflamatorias como la Interleucina 1 α o Interleucina 6 α .

Por otro lado aunque no se observó una diferenciación de las células mesenquimales después de 7 días de siembra sobre el andamio descelularizado es preciso llevar a cabo este estudio a tiempos mayores a una semana para establecer si posterior a 7 días el andamio promueve la diferenciación celular, o llevar a cabo la recelularización del andamio con diferentes enfoques como por ejemplo la siembra de células con la ayuda de factores de crecimientos adicionados durante el cultivo, para esto sería preciso evaluar los factores de crecimiento presentes en la matriz nativa y verificar si se mantienen después del protocolo de descelularización, en caso de que no se encuentren en la matriz descelularizada sería preciso adicionarlos dentro el medio de cultivo a lo largo del ensayo de diferenciación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Sotres-Vega, “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,” Doctorado en ciencias biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, 2010.
- [2] J. Villalba-Caloca, “Respuesta tisular del aloinjerto traqueal liofilizado y criopreservado combinado con terapia de inmunosupresión y aplicación tópica del factor de crecimiento del endotelio vascular,” Doctorado en investigación en medicina, Instituto Politécnico Nacional, 2007.
- [3] D. M. Giraldo-Gomez, “Obtención de un andamio acelular para sustitución de tráquea,” Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2011. [Online]. Available: <http://132.248.9.195/ptd2012/marzo/0677969/Index.html>
- [4] J. R. Olmos-Zuniga, J. Villalba-Caloca, A. Sotres-Vega, M. Gaxiola-Gaxiola, A. Santibanez-Salgado, M. Baltazares-Lipp, M. Bunuelos-Moreno, C. Hernandez-Jimenez, and R. Jasso-Victoria, “Reemplazo traqueal con aorta bovina criopreservada. Estudio experimental,” *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, vol. 22, no. 3, pp. 171–181, 2009.
- [5] S. Baiguera, P. Jungebluth, A. Burns, C. Mavilia, J. Haag, P. De Coppi, and P. Macchiarini, “Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 34, pp. 8931–8938, dec 2010. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961210010112>
- [6] S. Baiguera, C. D. Gaudio, A. Bianco, and P. Macchiarini, “The Bio-Artificial Trachea,” in *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, A. V. S. S. B. T. S. C. B. Ramalingam and T. E. in Dental Sciences, Eds. Boston: Elsevier, 2015, pp. 641–651. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123971579000527>

- [7] S. Baiguera and P. Macchiarini, "Upper Airways Regeneration and Bioengineering," in *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, G. O. L. S. J. B. T. R. M. A. i. O. T. Stratta, Ed. Boston: Elsevier, 2014, pp. 747–759. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123985231000537>
- [8] E. Srokowski and K. Woodhouse, "Decellularized Scaffolds," in *Comprehensive Biomaterials*, P. B. T. C. B. Ducheyne, Ed. Oxford: Elsevier, 2011, pp. 369–386. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552941000787>
- [9] C. G. Plopper, A. T. Mariassy, and L. O. Lollini, "Structure as Revealed by Airway Dissection," *American Review of Respiratory Disease*, vol. 128, no. 2P2, pp. S4–S7, aug 1983. [Online]. Available: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/arrd.1983.128.2P2.S4>
- [10] J. R. Salassa, B. W. Pearson, and W. S. Payne, "Gross and microscopical blood supply of the trachea." *The Annals of thoracic surgery*, vol. 24, no. 2, pp. 100–107, 1977. [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975\(10\)63716-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(10)63716-2)
- [11] S. Nouraei, E. Ma, A. Patel, D. Howard, and G. Sandhu, "Estimating the population incidence of adult post-intubation laryngotracheal stenosis," *Clinical Otolaryngology*, vol. 32, no. 5, pp. 411–412, sep 2007. [Online]. Available: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-4486.2007.01484.x>
- [12] J. Honings, H. A. Gaissert, H. F. M. van der Heijden, A. F. T. M. Verhagen, J. H. A. M. Kaanders, and H. A. M. Marres, "Clinical aspects and treatment of primary tracheal malignancies," *Acta Oto-Laryngologica*, vol. 130, no. 7, pp. 763–772, jul 2010. [Online]. Available: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00016480903403005>
- [13] P. Macchiarini, "Primary tracheal tumours," *The Lancet Oncology*, vol. 7, no. 1, pp. 83–91, jan 2006. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204505705416>
- [14] C. M. Gelder and M. R. Hetzel, "Primary tracheal tumours: a national survey." *Thorax*, vol. 48, no. 7, pp. 688–692, jul 1993. [Online]. Available: <http://thorax.bmj.com/content/48/7/688.abstract>
- [15] P. B. Licht, S. Friis, and G. Pettersson, "Tracheal cancer in Denmark: a nationwide study." *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, vol. 19, no. 3, pp. 339–345, mar 2001. [Online]. Available: <http://ejcts.oxfordjournals.org/content/19/3/339.long>
- [16] N. Bhattacharyya, "Contemporary Staging and Prognosis for Primary Tracheal Malignancies: A Population-Based Analysis," *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*, vol. 131, no. 5, pp. 639–642, nov 2004. [Online]. Available: <http://oto.sagepub.com/content/131/5/639.abstract>

- [17] K.-Y. Yang, Y.-M. Chen, M.-H. Huang, and R.-P. Perng, "Revisit of Primary Malignant Neoplasms of the Trachea: Clinical Characteristics and Survival Analysis," *Japanese Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 5, pp. 305–309, oct 1997. [Online]. Available: <http://jjco.oxfordjournals.org/content/27/5/305.abstract>
- [18] M. W. T. Chao, J. G. Smith, C. Laidlaw, D. L. Joon, and D. Ball, "Results of treating primary tumors of the trachea with radiotherapy," *International Journal of Radiation Oncology · Biology · Physics*, vol. 41, no. 4, pp. 779–785, 1998. [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016\(98\)00120-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0360-3016(98)00120-5)
- [19] K. A. Kucera, A. E. Doss, S. S. Dunn, L. A. Clemson, and J. B. Zwischenberger, "Tracheal Replacements: Part 1," *ASAIO Journal*, vol. 53, no. 4, 2007. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667239>
- [20] R. Belsey, "Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea," *British Journal of Surgery*, vol. 38, no. 150, pp. 200–205, 1950. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1002/bjs.18003815008>
- [21] C. Pham, J. Greenwood, H. Cleland, P. Woodruff, and G. Maddern, "Bioengineered skin substitutes for the management of burns: A systematic review," *Burns*, vol. 33, no. 8, pp. 946–957, 2007. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2007.03.020>
- [22] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik, "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty," *The Lancet*, vol. 367, no. 9518, pp. 1241–1246, apr 2006. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606684389>
- [23] H. C. Grillo, "Tracheal replacement: a critical review," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 73, no. 6, pp. 1995–2004, nov 2015. [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975\(02\)03564-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(02)03564-6)
- [24] T. Sato, H. Tao, M. Araki, H. Ueda, K. Omori, and T. Nakamura, "Replacement of the Left Main Bronchus With a Tissue-Engineered Prosthesis in a Canine Model," *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 86, no. 2, pp. 422–428, nov 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.04.015>
- [25] P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go, M. A. Asnaghi, L. E. Rees, T. a. Cogan, A. Dodson, J. Martorell, S. Bellini, P. P. Parnigotto, S. C. Dickinson, A. P. Hollander, S. Mantero, M. T. Conconi, and M. a. Birchall, "Clinical transplantation of a tissue-engineered airway," *The Lancet*, vol. 372, no. 9655, pp. 2023–2030, 2008. [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61598-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61598-6)
- [26] L. Liu, W. Wu, X. Tuo, W. Geng, J. Zhao, J. Wei, X. Yan, W. Yang, L. Li, and F. Chen, "Novel Strategy to Engineer Trachea Cartilage Graft With Marrow Mesenchymal Stem

- Cell Macroaggregate and Hydrolyzable Scaffold,” *Artificial Organs*, vol. 34, no. 5, pp. 426–433, 2010. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00884.x>
- [27] L. Moroni, M. Curti, M. Welti, S. Korom, W. Weder, J. R. de Wijn, and C. A. van Blitterswijk, “Anatomical 3D Fiber-Deposited Scaffolds for Tissue Engineering: Designing a Neotrachea,” *Tissue Engineering*, vol. 13, no. 10, pp. 2483–2493, oct 2007. [Online]. Available: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.2006.0385>
- [28] Y. Gustafsson, J. Haag, P. Jungebluth, V. Lundin, M. L. Lim, S. Baiguera, F. Ajallouean, C. D. Gaudio, A. Bianco, G. Moll, S. Sjöqvist, G. Lemon, A. I. Teixeira, and P. Macchiarini, “Viability and proliferation of rat MSCs on adhesion protein-modified PET and PU scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 32, pp. 8094–8103, 2012. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212008551>
- [29] B. H. I. Ruszymah, K. Chua, M. A. Latif, F. N. Hussein, and A. B. Saim, “Formation of in vivo tissue engineered human hyaline cartilage in the shape of a trachea with internal support,” *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, vol. 69, no. 11, pp. 1489–1495, nov 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2005.04.026>
- [30] K. Kojima, L. J. Bonassar, A. K. Roy, H. Mizuno, J. Cortiella, and C. A. Vacanti, “A composite tissue-engineered trachea using sheep nasal chondrocyte and epithelial cells,” *The FASEB Journal*, vol. 17, no. 8, pp. 823–828, may 2003. [Online]. Available: <http://www.fasebj.org/content/17/8/823.abstract>
- [31] K. Omori, Y. Tada, T. Suzuki, Y. Nomoto, T. Matsuzuka, K. Kobayashi, T. Nakamura, S. Kanemaru, M. Yamashita, and R. Asato, “Clinical Application of in Situ Tissue Engineering Using a Scaffolding Technique for Reconstruction of the Larynx and Trachea,” *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, vol. 117, no. 9, pp. 673–678, sep 2008. [Online]. Available: <http://aor.sagepub.com/content/117/9/673.abstract>
- [32] D. Rana, H. Zreiqat, N. Benkirane-Jessel, S. Ramakrishna, and M. Ramalingam, “Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering,” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, pp. n/a–n/a, jun 2015. [Online]. Available: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.2061>
- [33] M. E. Furth, A. Atala, and M. E. Van Dyke, “Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, pp. 5068–5073, dec 2007. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207005625>
- [34] M. T. Hinds, R. C. Rowe, Z. Ren, J. Teach, P.-C. Wu, S. J. Kirkpatrick, K. D. Breneman, K. W. Gregory, and D. W. Courtman, “Development of a reinforced porcine elastin composite vascular scaffold,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 77A, no. 3, pp. 458–469, jun 2006. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30571>

- [35] S. K. Karnik, B. S. Brooke, A. Bayes-Genis, L. Sorensen, J. D. Wythe, R. S. Schwartz, M. T. Keating, and D. Y. Li, "A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease," *Development*, vol. 130, no. 2, pp. 411–423, 2003. [Online]. Available: <http://dev.biologists.org/content/130/2/411.long>
- [36] P. F. Gratzner, R. D. Harrison, and T. Woods, "Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix." *Tissue Engineering*, vol. 12, no. 10, pp. 2975–2983, oct 2006. [Online]. Available: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.2006.12.2975>
- [37] D. M. Giraldo-Gomez, B. Leon-Mancilla, M. L. Del Prado-Audelo, A. Sotres-Vega, J. Villalba-Caloca, D. Garciadiego-Cazares, and M. C. Piña-Barba, "Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 59, pp. 930–937, feb 2016. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115305294>
- [38] S. F. Badylak, "The extracellular matrix as a biologic scaffold material," *Biomaterials*, vol. 28, no. 25, pp. 3587–3593, sep 2007. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961207003456>
- [39] T. W. Gilbert, A. M. Stewart-Akers, and S. F. Badylak, "A quantitative method for evaluating the degradation of biologic scaffold materials," *Biomaterials*, vol. 28, no. 2, pp. 147–150, jan 2007. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206007253>
- [40] T. Gilbert, T. Sellaro, and S. Badylak, "Decellularization of tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3675–3683, mar 2006. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206001682>
- [41] P. S. McFetridge, J. W. Daniel, T. Bodamyali, M. Horrocks, and J. B. Chaudhuri, "Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 70A, no. 2, pp. 224–234, aug 2004. [Online]. Available: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30060>
- [42] G. Chan and D. J. Mooney, "New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response," *Trends in Biotechnology*, vol. 26, no. 7, pp. 382–392, jul 2008. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779908001352>
- [43] E. Meezan, J. Hjelle, K. Brendel, and E. C. Carlson, "A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues," *Life Sciences*, vol. 17, no. 11, pp. 1721 – 1732, 1975. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0024320575901198>

- [44] S.-H. Hung, C.-H. Su, F.-P. Lee, and H. Tseng, "Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method," *Journal of voice : official journal of the Voice Foundation*, vol. 27, no. 3, pp. 289–294, May 2013. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvoice.2013.01.018>
- [45] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–43, 2011. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211000895>
- [46] S.-K. Goh, S. Bertera, P. Olsen, J. E. Candiello, W. Halfter, G. Uechi, M. Balasubramani, S. a. Johnson, B. M. Sicari, E. Kollar, S. F. Badylak, and I. Banerjee, "Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering," *Biomaterials*, vol. 34, no. 28, pp. 6760–6772, sep 2013. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961213006583>
- [47] S. F. Badylak, D. O. Freytes, and T. W. Gilbert, "Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 1, pp. 1–13, jan 2009. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706108002821>
- [48] L. Ochoa, "Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio," pp. 1–58, 1999. [Online]. Available: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- [49] N. Rodríguez-Fuentes, A. G. Rodríguez-Hernández, J. Enríquez-Jiménez, L. E. Alcántara-Quintana, L. Fuentes-Mera, M. C. Piña-Barba, A. Zepeda-Rodríguez, and J. R. Ambrosio, "Nukbone® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 434, no. 3, pp. 676–680, 2013. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X13006220>
- [50] P. Jungebluth, T. Go, A. Asnaghi, S. Bellini, J. Martorell, C. Calore, L. Urbani, H. Ostertag, S. Mantero, M. T. Conconi, and P. Macchiarini, "Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix," *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 138, no. 3, pp. 586–593, sep 2009. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022522309007727>
- [51] S. Haykal, J. P. Soleas, M. Salna, S. O. Hofer, and T. K. Waddell, "Evaluation of the Structural Integrity and Extracellular Matrix Components of Tracheal Allografts Following Cyclical Decellularization Techniques: Comparison of Three Protocols," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 18, no. 8, pp. 614–623, aug 2012. [Online]. Available: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tec.2011.0579>
- [52] D. Garciadiego-Cázares, H. I. Aguirre-Sánchez, R. F. Abarca-Buis, J. B. Kouri, C. Velasquillo, and C. Ibarra, "Regulation of $\alpha 5$ and αV Integrin Expression by GDF-5

- and BMP-7 in Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis,” *Plos One*, vol. 10, no. 5, p. e0127166, may 2015. [Online]. Available: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0127166>
- [53] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed., G. Science, Ed., New York, 2002. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- [54] M. R. Cabrera, P. G. Fernández, and J. V. Bayolo, “Caracterización Preliminar del Desoxicolato de Sodio de los Proveedores Merck y Fluka,” *Revista CENIC Ciencias Químicas*, vol. 36, no. E, pp. 17–25, 2005. [Online]. Available: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181620511021>
- [55] Y. Zhang, J. Jiang, and Y. Chen, “Synthesis and antimicrobial activity of polymeric guanidine and biguanidine salts,” *Polymer*, vol. 40, no. 22, pp. 6189 – 6198, 1999. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386198008283>
- [56] L. Feng, F. Wu, J. Li, Y. Jiang, and X. Duan, “Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* in vitro and in vivo,” *Postharvest Biology and Technology*, vol. 61, no. 2-3, pp. 160 – 164, 2011. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092552141100072X>
- [57] Z. Zhou, D. Wei, Y. Guan, A. Zheng, and J.-J. Zhong, “Extensive in vitro activity of guanidine hydrochloride polymer analogs against antibiotics-resistant clinically isolated strains,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 31, no. 8, pp. 1836 – 1843, 2011. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493111002402>
- [58] M. Sahraro, H. Yeganeh, and M. Sorayya, “Guanidine hydrochloride embedded polyurethanes as antimicrobial and absorptive wound dressing membranes with promising cytocompatibility,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 59, pp. 1025 – 1037, 2016. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115305695>
- [59] D. Wei, Q. Ma, Y. Guan, F. Hu, A. Zheng, X. Zhang, Z. Teng, and H. Jiang, “Structural characterization and antibacterial activity of oligoguanidine (polyhexamethylene guanidine hydrochloride),” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 29, no. 6, pp. 1776 – 1780, 2009. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493109000459>
- [60] L. Qian, Y. Guan, B. He, and H. Xiao, “Modified guanidine polymers: Synthesis and antimicrobial mechanism revealed by AFM,” *Polymer*, vol. 49, no. 10, pp. 2471 – 2475, 2008. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386108002681>

- [61] L. Bromberg and T. A. Hatton, "Poly(n-vinylguanidine): Characterization, and catalytic and bactericidal properties," *Polymer*, vol. 48, no. 26, pp. 7490 – 7498, 2007. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386107010336>
- [62] M. Francisco-Marquez, "Desnaturalización de proteínas inducida por temperatura y desestabilizantes químicos," Licenciatura en Química, Universidad Autónoma Metropolitana, 1999. [Online]. Available: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAM5750.pdf>
- [63] J. S. Cartmell and M. G. Dunn, "Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 49, no. 1, pp. 134–140, 2000. [Online]. Available: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200001\)49:1<134::AID-JBM17>3.0.CO;2-D](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200001)49:1<134::AID-JBM17>3.0.CO;2-D)
- [64] B. D. Elder, S. V. Eleswarapu, and K. A. Athanasiou, "Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs," *Biomaterials*, vol. 30, no. 22, pp. 3749 – 3756, 2009. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961209003172>
- [65] A. P. Duryea, H. A. Tamaddoni, C. A. Cain, W. W. Roberts, and T. L. Hall, "Removal of Residual Nuclei Following a Cavitation Event: A Parametric Study," *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, vol. 62, no. 9, pp. 1605–1614, sep 2015. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4698903/>
- [66] E. Vlasisavljevich, O. Aydin, K.-W. Lin, Y. Y. Durmaz, B. Fowlkes, M. ElSayed, and Z. Xu, "The role of positive and negative pressure on cavitation nucleation in nanodroplet-mediated histotripsy," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 61, no. 2, p. 663, 2016. [Online]. Available: <http://stacks.iop.org/0031-9155/61/i=2/a=663>
- [67] L. Bian and X. Ji, "Distribution, Transition and Thermodynamic Stability of Protein Conformations in the Denaturant-Induced Unfolding of Proteins," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, p. e91129, mar 2014. [Online]. Available: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0091129>
- [68] J. Esko, K. Kimata, and I. U. Lindah, "Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans," in *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Santley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, and M. E. Etzler, Eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/>
- [69] M. R. Curiel-Salgado, "Fundamentos de una técnica poligráfica : Tinción de Herovici," *Investigación en Discapacidad*, vol. 1, no. 1, pp. 35–36, 2012. [Online]. Available: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2012/ir121f.pdf>
- [70] N. Davidenko, D. V. Bax, C. F. Schuster, R. W. Farndale, S. W. Hamaia, S. M. Best, and R. E. Cameron, "Optimisation of UV irradiation as a binding site

- conserving method for crosslinking collagen-based scaffolds,” *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 27, no. 1, p. 14, jan 2016. [Online]. Available: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-015-5627-8>
- [71] K. Pietrucha, “Changes in denaturation and rheological properties of collagen-hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 36, no. 5, pp. 299–304, sep 2005. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813005001352>
- [72] L. He, C. Mu, J. Shi, Q. Zhang, B. Shi, and W. Lin, “Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 48, no. 2, pp. 354–359, mar 2011. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813010003739>
- [73] V. Mano and M. E. S. Ribeiro e Silva, “Bioartificial polymeric materials based on collagen and poly(N-isopropylacrylamide),” *Materials Research*, vol. 10, no. 2, pp. 165–170, jun 2007. [Online]. Available: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392007000200012&nrm=iso
- [74] M. V. Jose, V. Thomas, D. R. Dean, and E. Nyairo, “Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds,” *Polymer*, vol. 50, no. 15, pp. 3778–3785, jul 2009. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386109004595>
- [75] A. Bigi, G. Cojazzi, N. Roveri, and M. Koch, “Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 9, no. 6, pp. 363–367, dec 1987. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141813087900109>
- [76] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Bioquímica*, 6th ed., J. M. Macaruya, Ed. Barcelona: Editorial Reverté, 2008.
- [77] A. Blanco, *Química Biológica*, 7th ed., Ateneo, Ed. Barcelona: Grupo Ilhsa S.A., 2006.
- [78] C. V. Montoya and P. S. McFetridge, “Preparation of Ex Vivo–Based Biomaterials Using Convective Flow Decellularization,” *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 15, no. 2, pp. 191–200, jun 2009. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0372>
- [79] J. H. Park, J. M. Hong, Y. M. Ju, J. W. Jung, H.-W. Kang, S. J. Lee, J. J. Yoo, S. W. Kim, S. H. Kim, and D.-W. Cho, “A novel tissue-engineered trachea with a mechanical behavior similar to native trachea,” *Biomaterials*, vol. 62, pp. 106–115, sep 2015. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961215004585>
- [80] J. Haag, S. Baiguera, P. Jungebluth, D. Barale, C. Del Gaudio, F. Castiglione, A. Bianco, C. E. Comin, D. Ribatti, and P. Macchiarini, “Biomechanical and

- angiogenic properties of tissue-engineered rat trachea using genipin cross-linked decellularized tissue,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 3, pp. 780–789, 2012. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211012117>
- [81] M. C. Jones, F. a. Rueggeberg, A. J. Cunningham, H. a. Faircloth, T. Jana, D. Mettenburg, J. L. Waller, G. N. Postma, and P. M. Weinberger, “Biomechanical changes from long-term freezer storage and cellular reduction of tracheal scaffolds,” *The Laryngoscope*, vol. 125, no. 1, pp. E16–E22, jan 2015. [Online]. Available: <http://doi.wiley.com/10.1002/lary.24853>
- [82] O. Trabelsi, a. P. del Palomar, J. López-villalobos, A. Ginel, and M. Doblare, “Experimental characterization and constitutive modeling of the mechanical behavior of the human trachea,” *Medical Engineering & Physics*, vol. 32, no. 1, pp. 76–82, jan 2010. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350453309002161>
- [83] S. Baiguera, C. Del Gaudio, M. O. Jaus, L. Polizzi, A. Gonfiotti, C. E. Comin, A. Bianco, D. Ribatti, D. a. Taylor, and P. Macchiarini, “Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 14, pp. 3662–3672, may 2012. [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212001640>
- [84] Z. Teng, O. Trabelsi, I. Ochoa, J. He, J. H. Gillard, and M. Doblare, “Anisotropic material behaviours of soft tissues in human trachea: An experimental study,” *Journal of Biomechanics*, vol. 45, no. 9, pp. 1717 – 1723, 2012. [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929012002205>
- [85] Y. Wang, J. Bao, Q. Wu, Y. Zhou, Y. Li, X. Wu, Y. Shi, L. Li, and H. Bu, “Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts,” *Xenotransplantation*, vol. 22, no. 1, pp. 48–61, 2015. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1111/xen.12141>
- [86] M. A. Vargas-Salazar, “EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA (FNT- α) EN LA TUBERCULOSIS CON INFLIXIMAB (UN AGENTE ANTI-FNT- α) (Revisión Bibliográfica),” *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, vol. 67, no. 590, pp. 345–351, 2009. [Online]. Available: <http://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/590/art4.pdf>
- [87] F. Bazzoni and B. Beutler, “The tumor necrosis factor ligand and receptor families,” *New England Journal of Medicine*, vol. 334, no. 26, pp. 1717–1725, 1996. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199606273342607>
- [88] E. H. Choy and G. S. Panayi, “Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 12, pp. 907–916, 2001, pMID: 11259725. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200103223441207>

- [89] S. Ehlers, "Role of tumour necrosis factor (tnf) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting tnf," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 62, no. suppl 2, pp. ii37–ii42, 2003. [Online]. Available: http://ard.bmj.com/content/62/suppl_2/ii37.abstract
- [90] R. Sánchez-Sánchez, A. Brena-Molina, V. Martínez-López, Y. Melgarejo-Ramírez, L. Tamay de Dios, R. Gómez-García, M. d. L. Reyes-Frías, L. Rodríguez-Rodríguez, D. Garcíadieago-Cázares, H. Lugo-Martínez, C. Ibarra, M. E. Martínez-Pardo, and C. Velasquillo-Martínez, "Generation of Two Biological Wound Dressings as a Potential Delivery System of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells," *ASAIO Journal*, vol. 61, no. 6, pp. 718–725, 2015. [Online]. Available: http://journals.lww.com/asaiojournal/Fulltext/2015/11000/Generation_of_Two_Biological_Wound_Dressings_as_a.16.aspx

ANEXOS

A continuación se incluye la publicación derivada de los resultados preliminares de esta investigación.



Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization

D.M. Giraldo-Gomez^{a,b,*}, B. Leon-Mancilla^c, M.L. Del Prado-Audelo^b, A. Sotres-Vega^d, J. Villalba-Caloca^d, D. Garciadiego-Cazares^e, M.C. Piña-Barba^b

^a Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Unidad de Posgrado Edificio "C" 1er Piso, Circuito de Posgrados, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México D. F., México

^b Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., México

^c Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Edificio "D" Planta Baja, Circuito Interior, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., México

^d Unidad de Trasplante Pulmonar Experimental, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Calzada de Tlalpan 4502, Sección XVI, Tlalpan, C.P. 14080, México D.F., México

^e Unidad de Ingeniería de Tejidos Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra", Calzada México Xochimilco 289, Arenal de Guadalupe, Tlalpan, C.P. 14389, México D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 June 2015

Received in revised form 2 October 2015

Accepted 29 October 2015

Available online 30 October 2015

Keywords:

Decellularization

Trachea

ECM

Cartilage

Trypsin

EDTA

ABSTRACT

There are different types of tracheal disorders (e.g. cancer, stenosis and fractures). These can cause respiratory failure and lead to death of patients. Several attempts have been made for trachea replacement in order to restore the airway, including anastomosis and implants made from synthetic or natural materials. Tracheal allotransplantation has shown high rejection rates, and decellularization has emerged as a possible solution. Decellularization involves the removal of antigens from cells in the organ or tissue, leaving a matrix that can be used as 3D cell-scaffold. Although this process has been used for tracheal replacement, it usually takes at least two months and time is critical for patients with tracheal disorders. Therefore, there is necessary to develop a tracheal replacement process, which is not only effective, but also quick to prepare. The aim of this research was to develop a faster trachea decellularization protocol using Trypsin enzyme and Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as decellularization agents. Three protocols of cyclic trachea decellularization (Protocols A, B, and C) were compared. Following Protocol A (previously described in the literature), 15 consecutive cycles were performed over 32 days. Protocol B (a variation of Protocol A) – EDTA being added – with 15 consecutive cycles performed over 60 days. Finally, Protocol C, with the addition of Trypsin as a decellularization agent, 5 consecutive cycles being performed over 10 days. For the three protocols, hematoxylin–eosin (H&E) staining and DNA residual content quantification were performed to establish the effectiveness of the decellularization process. Scanning Electron Microscopy (SEM) was used to observe the changes in porosity and microarrays. To evaluate the structural matrices integrity, Thermogravimetric Analysis (TGA) and biomechanical test were used. None of the protocols showed significant alteration or degradation in the components of the extracellular matrix (ECM). However, in Protocol C, more cellular components were removed in less time, making it the most efficient process. In addition, the cell tracking and viability was evaluated with chondrocytes seeding on the scaffold obtained by Protocol C, which showed an adequate cell scaffolding ability of this matrix.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There are different types of tracheal disorders (e.g. cancer, stenosis and fractures), all of which can cause a dynamic collapse with airway

obstruction and respiratory failure in the patient [1]. The common treatment for these patients is to remove the damaged tracheal segment. Other palliative solutions include tracheostomy; laser application, tracheal dilation or stent implantation [2,3]. Due to palliative character of these treatments, decellularization has emerged as a complete treatment for tracheal disorders including tumors and malacias [1].

Decellularization is a process to obtain scaffolds of natural origin to replace organs and tissues. The process removes the allogeneic or xenogeneic antigens from cells in the tissue or the organ that could lead to an immune response in the host body. This generates a natural three-

* Corresponding author at: Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México D.F., México.

E-mail address: davidmauro2008@gmail.com (D.M. Giraldo-Gomez).

dimensional scaffold containing all the elements of the extracellular matrix, which can be repopulated with host cells [4].

The first transplant of a partially decellularized human trachea was conducted in 2008, using a trachea from a cadaveric donor. Decellularization was carried out using an enzymatic method [1]. In 2010, Baiguera et al. published a cyclic decellularization protocol for human trachea, where a complete decellularization of the organ was reported after completing 25 cycles. However, this protocol takes around 51 days to perform and time is critical for the patients due to the above-mentioned consequences of trachea disorders. It is therefore important to develop a faster decellularization protocol.

The objective of this research was to determine the effect of Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and Trypsin on the speed and effectiveness of cyclical decellularization protocols for tracheas. We compared three protocols. First, we reproduced the protocol reported by Baiguera et al. [5] for only 15 cycles. Then, we added EDTA as a step in a second decellularization protocol and carried it out for 15 cycles as comparison [5]. In a third protocol, we added Trypsin and it was performed by 5 cycles. The results of the first two protocols were similar and no degradation was observed in any of the protocols. The addition of Trypsin, however, showed an increase in the speed and effectiveness of decellularization, further the cell tracking marking and the cell viability assay showed a good performance of this matrix as a 3D cell scaffold.

2. Materials and methods

2.1. Trachea harvest

We obtained 6 tracheas from pigs according to the Standard NOM-062-ZOO-1999 [6]. The Ethics Committee of the Medicine Faculty from UNAM authorized these studies.

The tracheas were harvested from 6-month-old (40–50 kg) pigs, and later, the tracheas were cut in four cylinders of 3 to 5 cm in length. Four groups of six trachea segments each were prepared ($n = 6$), one group was used as a control group, and the rest were the experimental groups.

2.2. Decellularization protocols

We carried out three different decellularization protocols: A, B and C. Protocol A corresponds to a protocol described by Baiguera et al. [5], but we changed the total number of cycles from 25 to 15. Protocol B is a variation of Protocol A, where we added incubation in EDTA solution as an extra step, also for 15 cycles. Finally, we designed a third protocol (C), where we added a Trypsin incubation step, but only for 5 cycles to prevent possible adverse effects of the Trypsin on the ECM.

2.2.1. Protocol A

We followed the protocol proposed by Baiguera et al. briefly described as follows: the connective tissue was removed and rinsed with a solution of 1% povidone-iodine in PBS. Then, two rinses were done with a solution of 1% antibiotic-antimycotic (Gibco). Later on, the trachea segment was incubated for 4 h with a solution of 4% sodium deoxycholate (Sigma) at room temperature with continuous stirring. The tissue was rinsed twice with distilled water, and subsequently incubated in 2000 KU DNase-I (Sigma) dissolved in 1 M NaCl for 3 h at room temperature with continuous stirring. Finally, another two more rinses with distilled water were carried out, and later the trachea segments were stored in 1% antibiotic-antimycotic (Gibco) in PBS at 4 °C for 15 cycles.

2.2.2. Protocol B

This protocol is a modification of Protocol A, with an added incubation step in a 10 mM EDTA (Sigma) for 3 h at room temperature. This step was carried out between the first rinse with 1% antibiotic-

antimycotic (Gibco) and the incubation in 4% deoxycholate (Sigma). The rest of the process followed as Protocol A for 15 cycles.

2.2.3. Protocol C

We started by removing the connective tissue around the trachea, soaking it in 1% povidone-iodine in Milli-Q water at 4 °C and rinsing it twice with deionized water. We then rinsed the trachea with deionized water, and incubated it in 1% Trypsin (Gibco) in PBS for 3 h at 4 °C. We continued with two rinses in deionized water and then we incubated the tissue in 4% sodium deoxycholate (Sigma) for 4 h at room temperature. We followed with an incubation of trachea with 2000 KU DNase-I (Sigma) in 1 M NaCl, stirring for 3 h at room temperature. Finally, after two rinses with deionized water, we stored the trachea in 1% antibiotic-antimycotic (Gibco) in PBS at 4 °C. We repeated the process 5 times.

2.3. Verification of decellularization trachea protocols

We evaluated the effectiveness of the decellularization protocols through hematoxylin-eosin (H&E) staining and DNA residual content quantification in each sample. We compared the mean measures in decellularized samples with native sample to complete the quantitative evaluation of the decellularization protocols.

To carry out the H&E staining, we performed a gradual dehydration from 70% ethyl alcohol to absolute alcohol in the tissues. Then, we fixed the tissues in Xylene (Merck) and embedded them in paraffin (Sigma). Afterwards, we obtained 5 μ m sections of each sample using a rotary microtome (Leica). Finally, we stained the samples with hematoxylin and eosin (Merck).

To quantify the DNA present in the samples, we isolated the DNA of the cells with TRizol (Invitrogen), and then measured the concentration with an absorbance spectrophotometer (GeneQuant). We used 260 nm wavelength to measure and 260/280 nm wavelength ratio to determine sample purity.

2.4. Biophysical characterization of the decellularized matrices

We used Scanning Electron Microscopy (SEM) for the qualitative assessment of topography samples. To carry out this observation, we fixed the samples using a buffer of 3% (V/V) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.2). Then, we dehydrated samples with ethanol (from 30% to 100%), and, finally, we dried the samples using a critical point dryer CO₂ chamber as previously reported by Rodríguez-Fuentes et al. and Rivera et al. [7,8]. We observed the samples in a SEM DSM-950 (Zeiss) at 15 kV.

We carried out Thermogravimetric Analysis (TGA) to characterize the thermal behavior of the samples and to find any possible degradation in the matrices due to decellularization protocols. To carry out the TGA processes, we freeze-dried all samples at 3.6 Pa and -47 °C in a Freeze Dryer (Labconco FreeZone 1). We used a Thermogravimetric Analyzer (TA Instruments Q500) with a heating rate of 10 °C/min under an argon atmosphere with a temperature range from 35 °C to 500 °C.

We used uniaxial tension test to assess the no alteration on the mechanical properties on trachea ring cartilage due to Trypsin used in Protocol C. We compared the Young's modulus of the decellularized cartilage trachea through the Protocol C with the native trachea cartilage; we performed the test in a Dynamic Mechanical Analyzer (TA Instruments Q800) in displacement ramp mode with tension clamps mounted. We used 1 mm/min deformation rate and 37 °C constant temperature. We conserved the samples of native cartilage tracheas in a 10% antibiotic-antimitotic in PBS solution and stored at 4 °C for a week changing the solution even 2 days until the test performing for native trachea and 3 days for decellularized samples. We bound the cartilage pieces of sandpaper to facilitate a predefined clamping and to avoid sliding between the tips of the samples and the clamps (Fig. 1). The specimens of the cartilage measured 1.6 \pm 0.2 mm in thickness, 5.3 \pm 0.9 mm in width and 25 \pm 1.5 mm in length. The distance between

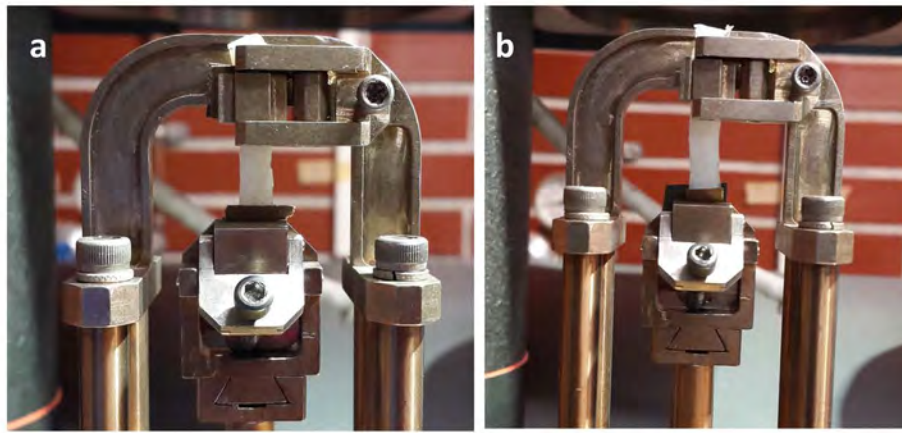


Fig. 1. Experimental setting used to perform the biomechanical test. Tracheal native cartilage ring (a). Tracheal ring decellularized by protocol C (b).

the two reference points was about 18.1 ± 1.7 mm. At least four measurements were performed per each condition.

2.5. Cell-scaffolding ability of the decellularized matrix

We evaluated the answer of the cells to the decellularized matrix with cell tracking and cell viability assays in chondrocytes. We used three samples of decellularized matrices through the Protocol C to carry out the assay.

2.5.1. Isolation of chondrocytes

We isolated porcine articular chondrocytes from the femoral condyles of 4–6 months old. We isolated cartilage, minced to $3 \times 3 \times 3$ mm pieces and digested with 3 mg/ml collagenase-I. We passed the isolated chondrocytes through a 100- μ m nylon cell strainer and centrifuged to obtain a pellet. We plated the chondrocytes at 2×10^4 cells/cm² for cell expansion in DMEM-F12 (Gibco) with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin, and incubated at 37 °C with 5% CO₂. We changed culture medium every 36 h. We cultured these cells until the 90% confluence. Then, we lifted the cells using 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco), after first passage, we seeded the chondrocytes in the decellularized matrix a second passage.

2.5.2. Cell seeding

We sterilized nine decellularized matrices of 2 rings trachea segments through UV cross linker during 30 min, then we impregnated the matrices in DMEM-F12 (Gibco) with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin during 30 min, then, we seeding 100,000 cell/cm² in the matrices (Fig. 2).

2.5.3. Cell tracking

We selected three matrices to follow the cells through the matrix. Before the cell seeding, we marked these chondrocytes with Cell Tracker (Invitrogen). We followed the cells during 8 days.

2.5.4. Viability assay

We evaluated viability of monolayer culture as well as constructs of articular chondrocytes and matrices with a Live/Dead viability/cytotoxicity kit for mammalian cells (Molecular Probes), according to the manufacturer's instructions. Fluorescent calcein green signal is positive for viable cells and EthD-1 red signal is positive for dead cells. We captured and analyzed the images with fluorescence microscopy (Axiovision Observer A.1 microscope, Zeiss). We evaluated the constructs (matrix plus cell seeding) after 4 days and 8 days. Three samples each day.

2.6. Statistical analysis

We performed statistical analysis using GraphPad Prism 6.05 statistical software (San Diego). The decellularized groups were compared with a native sample as a control using Dunnett's multiple comparison test analysis of variance. We considered a p-value of <0.05 significant.

3. Results

3.1. Effectiveness of decellularization protocols

The H&E staining results (Fig. 3) showed differences between the native and the decellularized samples. In the native trachea (Fig. 3a), chondrocytes with nuclei were observed inside the lacunae. In Protocol A and Protocol B (Fig. 3b and c, respectively), the presence of some cellular elements was observed in the cartilage matrices, but no nucleus was distinguished. In Protocol C (Fig. 3d), there were no cellular elements inside the lacunae.

The result of DNA residual content quantification (Fig. 4) showed a significant difference in decrease of DNA content between the native trachea and each sample after the decellularization protocols.



Fig. 2. Decellularized trachea rings seeded with chondrocytes (constructs).

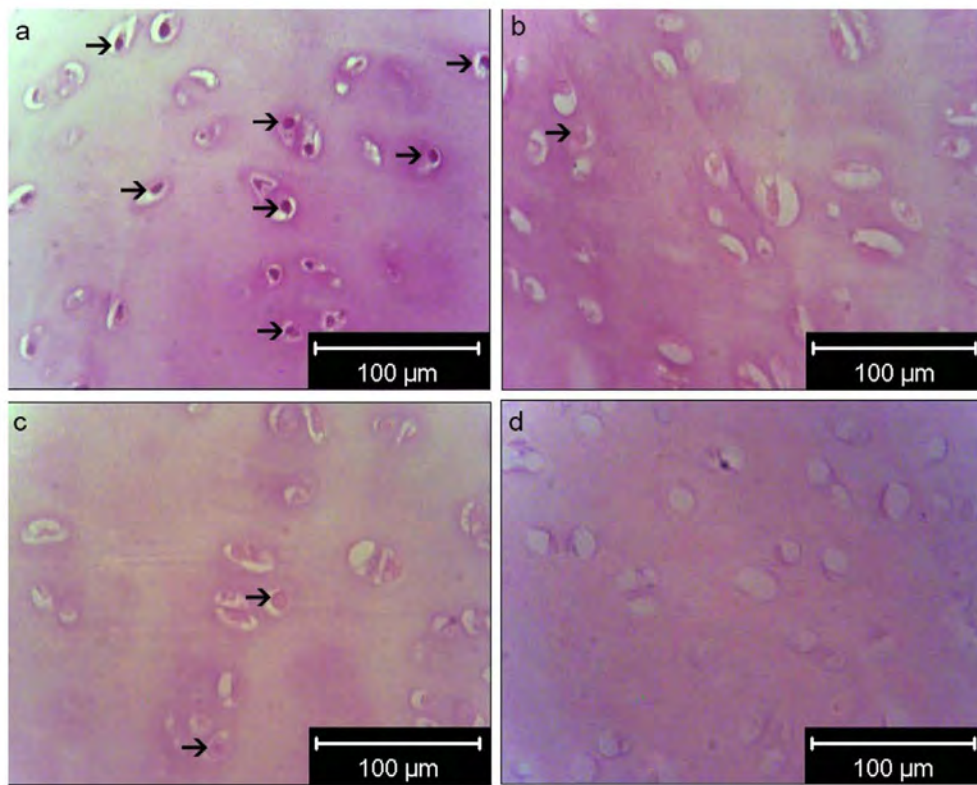


Fig. 3. The micrographs show the tracheal cartilage stained with hematoxylin–eosin (H&E). Chondrocytes with nuclei inside the lacunae of the cartilage matrix in the native sample (a), tracheal cartilage showing some cell structures without nuclei after being subjected to 15 cycles of the decellularization Protocol A (b) and Protocol B (c), sample of tracheal cartilage after 5 cycles of Protocol C, where there is no evidence of cellular material (d). Arrows indicate the presence of chondrocytes embedded in the matrix.

3.2. Morphological and structural integrity of decellularized matrices

The SEM micrographs (Fig. 5) showed the tracheal cartilage of the native and decellularized samples. The native cartilage cross section (Fig. 5a) showed a typical arrangement of this type of matrix, this is, an ECM with chondrocyte cells inside the lacunae. No alteration in the matrices was detected after the protocols and there were no cells present inside the lacunae (Lc) after completion of decellularization protocols (Fig. 5b, c, d, Protocol A, B and C respectively). However, in the Protocol B sample (Fig. 5c) there was some cellular material on the matrix outside the lacunae. The Protocol C micrograph (Fig. 5d) showed that the Collagen fibers (Fr) were preserved from the surrounding tissue of the cartilage.

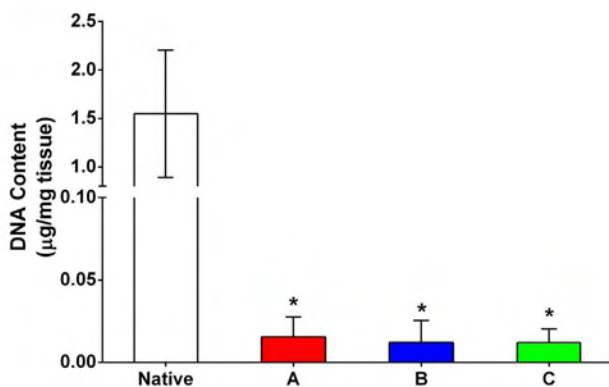


Fig. 4. Quantification of residual DNA. Decellularized groups are compared with a native control using Dunnett's multiple comparison test analysis of variance. A p-value of <0.05 is considered significant. Mean results are shown. Error bars: standard deviation (SD).

The TGA profiles (Fig. 6) obtained from the native and decellularized samples were typical of Collagen (the main component of the matrix) and showed no significant difference between the native trachea and the decellularized samples. These curves (Fig. 6) show a weight loss of all samples of 5% to 10% up to 105 °C. After this temperature, the weight remained virtually constant up until 230 °C. The largest weight loss rate occurred between 230 °C and 380 °C. After this temperature, the weight loss rate decreased again until 500 °C.

The biomechanical result (Fig. 7) obtained from the uniaxial tension tests from native and decellularized samples (only for Protocol C) shown the elastic behavior of the cartilage ring (Fig. 7a) with these plots Young's modulus were calculated from all samples and there was not significance difference after decellularized protocol.

3.3. Cell scaffolding ability

With the cell-tracking assay, there was possible to follow the cell seeding into the scaffold. After 4 days in the matrix (Fig. 8a), the cells retain the characteristic morphology for chondrocytes, furthermore, after 8 days the cell tracking results showed increase in the cell number (Fig. 8b).

In the viability assay, the calcein AM is a cell-permeable molecule, which was turned into fluorescent calcein by esterase activity within live cells and the EthD-1 red signal was positive for dead cells after 4 and 8 days (Fig. 9a and b respectively). After counting individual cells in different fields, viability of chondrocytes after 4 days was found to be about 83%, and 87% after 8 days (Fig. 9c). There are not significant differences between both days.

4. Discussion

EDTA and Trypsin were evaluated as separate decellularization agents in cyclical decellularization protocols for trachea in order to

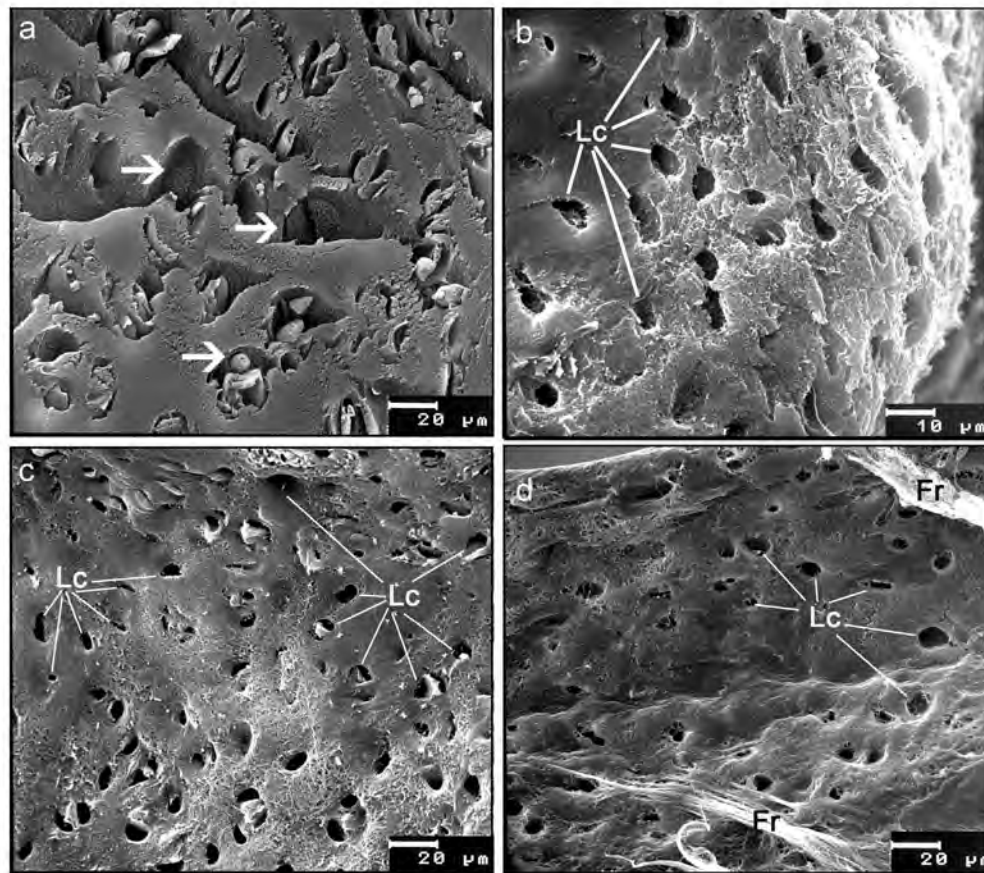


Fig. 5. SEM micrographs of trachea cartilage from native and decellularized samples. Cross section of native trachea where arrows show the chondrocyte cells inside the lacunae (a). Cartilage end section after Protocol A, where lacunae (Lc) are shown without cells (b). It shows the trachea cartilage after following Protocol B, shown presence of some cells in the matrix but not in the lacunae (Lc) (c). Trachea cartilage post-Protocol C, with visible collagen fibers (Fr); there are no cells in the matrix or inside the lacunae (Lc) (d).

determine their effect on the speed and effectiveness of this process. The H&E staining (Fig. 3) showed a decrease in the number of cells after performing each protocol. This histological result was confirmed by residual DNA quantification (Fig. 4), as a significant difference was observed between the native sample and the decellularized samples. This result can be attributed to the synergy generated between the agents used in each decellularization protocol. Sodium deoxycholate, used in three protocols, produced a rupture of the phospholipid cell membrane [9]. DNase-I enzyme, also used in all three protocols, hydrolyzed the DNA chain present in the cell tissue. However, when we used EDTA, no significant difference in the decellularization process was

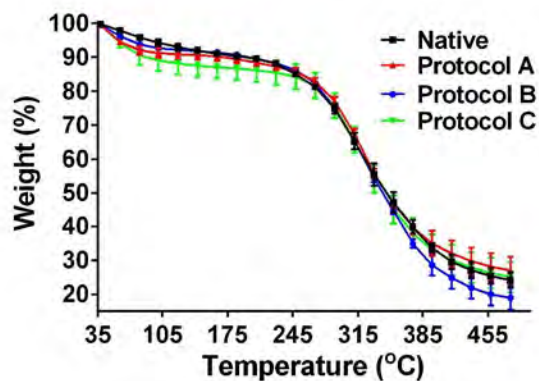


Fig. 6. Analysis of the thermal changes associated with structural changes in the ECMs. The TGA profile shows the evaluation of thermal behavior of native trachea and three decellularization protocols. Mean profile of the all samples is shown. Error bars: standard deviation (SD).

observed between Protocols A and B. This confirms the reports of other authors that this acid is insufficient when used alone [9,10].

The effectiveness of decellularization process was improved with Trypsin, which was used only in Protocol C. This can be attributed to the loss of attachment activity in Chondronectin [11], because the Chondronectin play an important role in the binding of cells to the extracellular matrix [11,12]. It has been reported that Trypsin can break the bonds of the extracellular matrix and this promotes the degradation of Collagen in the ECM [9,13,14]. However, the observations of porosity and microarchitecture made through SEM (Fig. 5) did not show any alteration in the decellularized samples, even in Protocol C.

The TGA of the ECM's structural integrity (Fig. 6) of all evaluated samples showed a typical curve for Collagen in accordance with previous studies [15,16]. These curves showed two important weight losses. The first one occurred up until 105 °C due to the elimination of absorbed water (water from the environment that a molecule can absorb due to its hygroscopic nature) [17]. The decellularized samples showed more water loss than the native sample, but this difference was not a statistical one. The second significant weight loss occurred between the temperatures of 105 °C and 230 °C due to the decomposition of collagen chains [17,18]. The superposition of the four curves shows that there was no alteration of the thermal stability. This suggests that there was no degradation of decellularized matrices with respect to the native trachea.

Biomechanical evaluation of decellularized scaffolds is an important assessment for the rate of preservation of functional integrity. Numerous studies have shown that biomechanical properties change after decellularization of tissues [19,20,21]. Although the morphology and the thermal behavior of the decellularized matrices did not show any appreciable alteration or modification, there is important to assess the

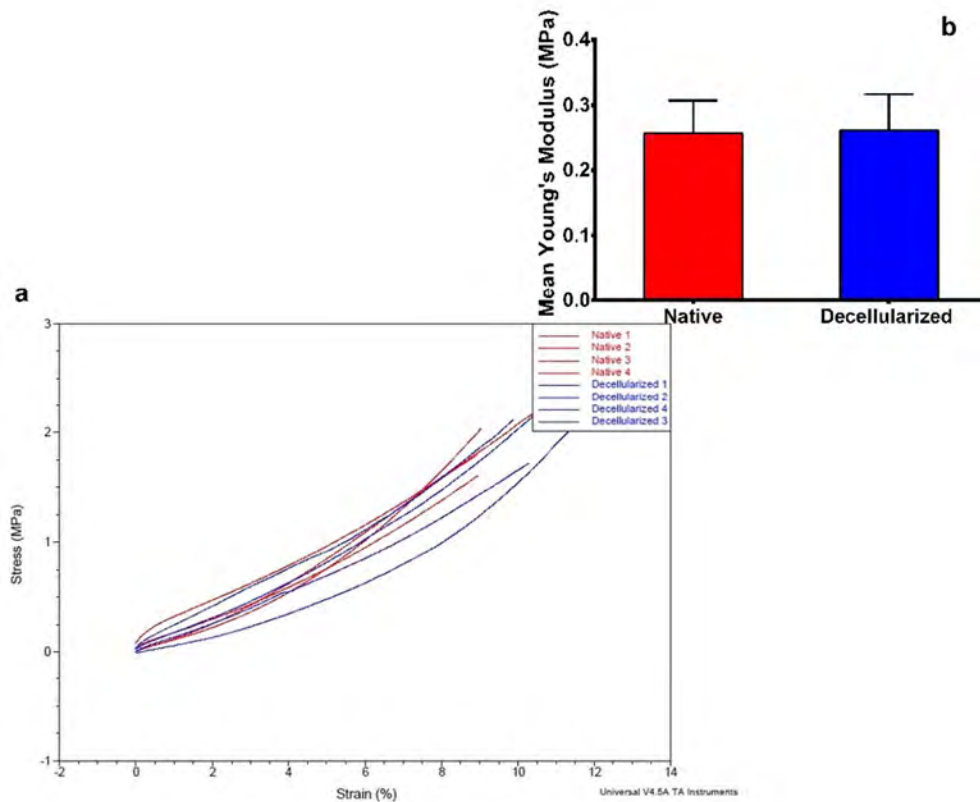


Fig. 7. Biomechanical assessment of the native and Protocol C decellularized trachea rings. Stress–strain curves from the uniaxial tension tests (a). Mean Yung's modulus obtained from the curves of the all samples is shown (b). Error bars: standard deviation (SD). No significant difference. A p-value of <0.05 is considered significant.

biomechanical properties of the decellularized matrix, this is critical in the Protocol C where the Trypsin was used as decellularization agent. By using uniaxial tension test, we measured the elasticity of the decellularized trachea cartilage ECM. Our results demonstrated that in Young's modulus of decellularized trachea cartilage (Fig. 7) there was no modification of the elastic properties of the trachea cartilage after decellularization. Young's modulus as determined from the stress–strain curves was found to be 0.25 ± 0.04 MPa for native trachea cartilage, while the Young's modulus for the decellularized samples (Protocol C) was 0.26 ± 0.05 MPa. This result confirmed the SEM and TGA results, since this showed no significant differences between the

tested groups. The fact that no degradation was observed in Protocol C can be attributed to the short periods of incubation in Trypsin.

The ECM of organs is a complex system with fibrous networks of structural and functional molecules including proteins, glycoproteins, and growth factors. The advantage of using decellularized organs as scaffolds is that it is possible to use ECM for not only structural proposes but also for signals that can be exchanged with cells to induce their migration and normal development.

To assess the potential scaffold of acellular trachea matrix for airway regeneration, we performed the cell tracking and viability assays (Figs. 8 and 9 respectively). The decellularized matrix trough Protocol C, which

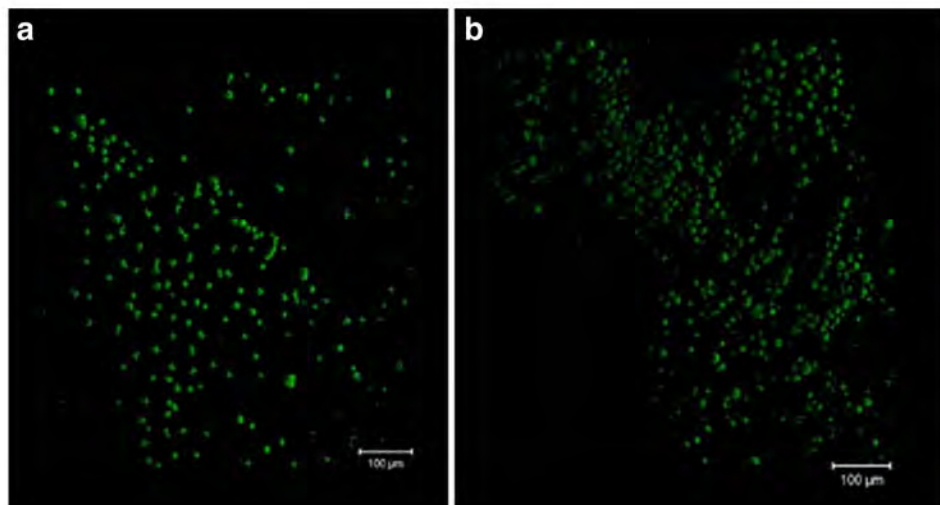


Fig. 8. Chondrocytes presteined with cell tracker and seeded in the decellularized trachea trough Protocol C. After 4 days (a), and after 8 days (b).

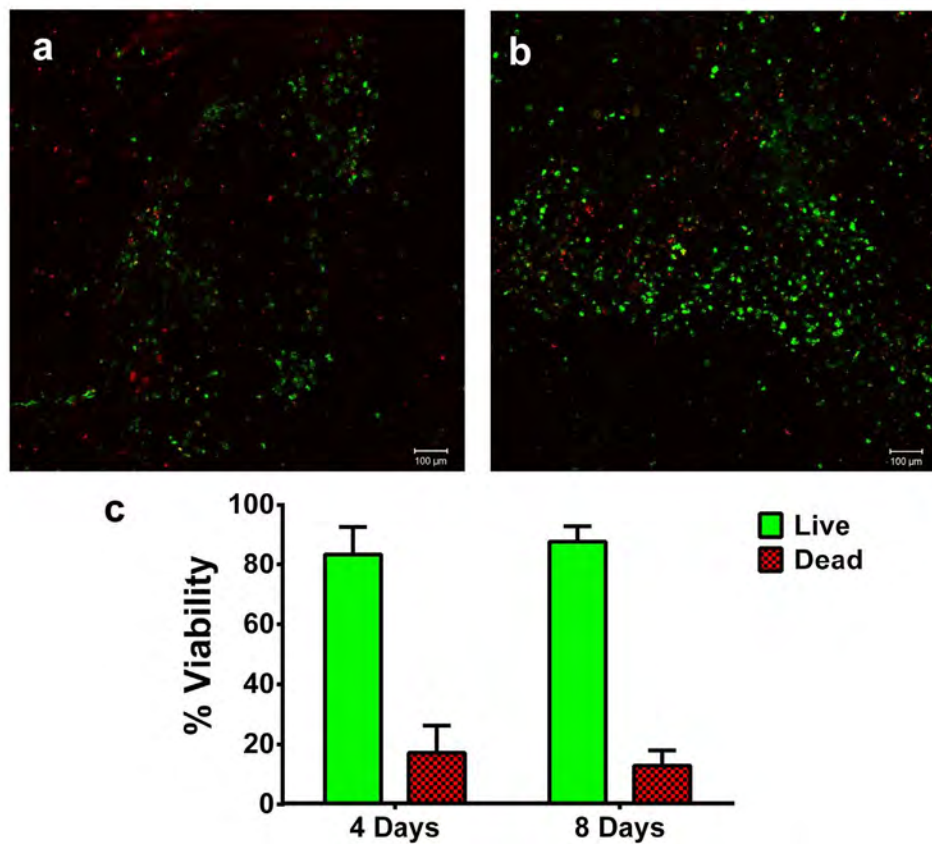


Fig. 9. Cell viability assay in the decellularized trachea trough Protocol C. Chondrocytes after 4 days seeding (a), chondrocytes after 8 days seeding (b), and cell viability was determined to be around 87% for both days evaluated without significant statistical differences between them (c).

were decellularized with Trypsin aid, retained almost the same features as the native trachea. This provides support and biochemical cues for cellular attachment, proliferation, and migration.

Cytocompatibility is one of the main features of a successful in any biomaterial and it is closely related to its chemical composition and structure. The biomaterial surface will interact with chondrocyte promoting cell attachment, as shown by cell tracking analysis (Fig. 8). Furthermore, this result revealed that the chondrocytes remained their characteristic morphology (Fig. 8) and were able to survive, as demonstrated through calcein assay (Fig. 9).

The present study provides an alternative and fast decellularization protocol as a possible platform for trachea regeneration. This study suggests that the basic structural characteristics of decellularized trachea matrix were preserved. The features of the matrix, which are benefit for the reseeded cells to attach and remain viable, were well conserved. In our future studies, we will focus on differentiation of stem cells on decellularized long trachea segments.

5. Conclusions

In summary, the thermal analysis showed that none of the three compared processes had a significantly adverse effect on the structure of ECMs. We confirmed that the use of EDTA has no relevance in decellularization protocols when used alone. The results of H&E staining and DNA residual content quantification showed that Protocol C, where Trypsin was used, was the fastest, requiring only 5 cycles for a complete decellularization process, the Protocol C furthermore remain the biomechanical properties of the ECM, and the chondrocytes assays demonstrated well performance as a cell scaffold.

This study showed that under specific conditions the use of Trypsin as a decellularization agent can allow for a faster complete cyclical tracheal decellularization. These results may aid in the development of a

fast working and effective trachea replacement method, which is important because tracheal disorders can swiftly cause respiratory failure and lead to the death of patients. The findings of this study are limited to the effect of EDTA and Trypsin as decellularization agents. Furthermore, they are a starting point and should be verified with longer trachea segments.

Acknowledgments

The authors would like to thank Alfredo Santibañez, Lenin Tamay de Dios, Armando Zepeda Rodríguez, Francisco Pasos Nájera, Omar Novelo Peralta and Damaris Cabrero Palomino for their invaluable technical assistance. This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Materials Science and Engineering at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). D.M. Giraldo-Gomez acknowledges the scholarship provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No.332859). This research received financial support provided by DGAPA-UNAM through the project: PAPIIT-IG100114 and CONACyT through the projects N°: 214128 and CB-84683.

References

- [1] P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go, M.A. Asnaghi, L.E. Rees, T.a. Cogan, et al., Clinical transplantation of a tissue-engineered airway, *Lancet* 372 (2008) 2023–2030, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61598-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61598-6).
- [2] J. Villalba-Caloca, Respuesta tisular del aloinjerto traqueal liofilizado y criopreservado combinado con terapia de inmunosupresion y aplicacion topica del factor de crecimiento del endotelio vascular, Instituto Politécnico Nacional, 2007.
- [3] A. Sotres-Vega, 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, 2010.
- [4] E.M. Srokowski, K.a. Woodhouse, Decellularized Scaffolds, Elsevier Ltd., 2011 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00078-7>.

- [5] S. Baiguera, P. Jungebluth, A. Burns, C. Mavilia, J. Haag, P. De Coppi, et al., Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation, *Biomaterials* 31 (2010) 8931–8938, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.005>.
- [6] L. Ochoa, Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, 1999 (<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062Z00.PDF>).
- [7] N. Rodríguez-Fuentes, A.G. Rodríguez-Hernández, J. Enríquez-Jiménez, L.E. Alcántara-Quintana, L. Fuentes-Mera, M.C. Piña-Barba, et al., Nukbone® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434 (2013) 676–680, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.007>.
- [8] N. Rivera, S.E. Romero, A. Menchaca, A. Zepeda, L.E. García, G. Salas, et al., Blackwater fever like in murine malaria, *Parasitol. Res.* 112 (2013) 1021–1029, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3224-z>.
- [9] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials* 32 (2011) 3233–3243, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>.
- [10] A. Hopkinson, V.A. Shanmuganathan, T. Gray, A.M. Yeung, J. Lowe, D.K. James, et al., Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering, *Tissue Eng. Part C Methods* 14 (2008) 371–381, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0315>.
- [11] H.H. Varner, H. Furthmayr, B. Nilsson, P.P. Fietzek, J.C. Osborne Jr., S. De Luca, et al., Chondronectin: physical and chemical properties, *Arch. Biochem. Biophys.* 243 (1985) 579–585 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4083902>).
- [12] H.H. Varner, V.J. Horn, G.R. Martin, A.T. Hewitt, Chondronectin interactions with proteoglycan, *Arch. Biochem. Biophys.* 244 (1986) 824–830 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2418787>).
- [13] K. Schenke-Layland, O. Vasilevski, F. Opitz, K. König, I. Riemann, K.J. Halbhuber, et al., Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves, *J. Struct. Biol.* 143 (2003) 201–208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2003.08.002>.
- [14] I. Tudorache, S. Cebotari, G. Sturz, L. Kirsch, C. Hurschler, A. Hilfiker, et al., Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves, *J. Heart Valve Dis.* 16 (2007) 567–573.
- [15] L. He, C. Mu, J. Shi, Q. Zhang, B. Shi, W. Lin, Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin, *Int. J. Biol. Macromol.* 48 (2011) 354–359, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.12.012>.
- [16] K. Pietrucha, Changes in denaturation and rheological properties of collagen-hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies, *Int. J. Biol. Macromol.* 36 (2005) 299–304, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.07.004>.
- [17] V. Mano, M.E.S. Ribeiro e Silva, Bioartificial polymeric materials based on collagen and poly(N-isopropylacrylamide), *Mater. Res.* 10 (2007) 165–170, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-14392007000200012>.
- [18] M.V. Jose, V. Thomas, D.R. Dean, E. Nyairo, Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/collagen blends as bone tissue scaffolds, *Polymer (Guildf)* 50 (2009) 3778–3785, <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2009.05.035>.
- [19] J.M. Wallis, Z.D. Borg, A.B. Daly, B. Deng, B.A. Ballif, G.B. Allen, et al., Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung de-cellularization and recellularization, *Tissue Eng. Part C Methods* 18 (2012) 420–432, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0567>.
- [20] C. Williams, J. Liao, E.M. Joyce, B. Wang, J.B. Leach, M.S. Sacks, et al., Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries, *Acta Biomater.* 5 (2009) 993–1005, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.028>.
- [21] P.F. Gratzner, R.D. Harrison, T. Woods, Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix, *Tissue Eng.* 12 (2006) 2975–2983.