



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**Obtención de un Polvo de Matriz Extracelular
Descelularizada para un Andamio Traqueal**

TESIS

Que para optar por el grado de

**MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE
MATERIALES**

P R E S E N T A

Isaac Yamil Sánchez Fragoso

TUTORA PRINCIPAL

Dra. María Cristina Piña Barba

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

COMITÉ TUTOR

Dr. David Mauricio Giraldo Gómez

FACULTAD DE MEDICINA

Dra. Luz María López Marín

CENTRO DE FÍSICA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 mamá y a papá,
Seguiremos perseverando y
alcanzando nuestras metas.*

*La Ingeniería de Tejidos es el
camino hacia una medicina más
personalizada, más eficiente y más
humana.*

Índice

I. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	5
II. RESUMEN	8
III. ABSTRACT	10
IV. AGRADECIMIENTOS.....	11
1. INTRODUCCIÓN	13
Hipótesis de Investigación.....	15
Objetivo y Metas.....	15
Justificación.....	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Tráquea	16
2.1.1 Anatomía.....	16
2.1.2 Forma, Dirección y Dimensiones.....	17
2.2 Fisiología	17
2.3 Histología.....	22
2.3.1 Cartílago Hialino Traqueal y Matriz Extracelular.....	23
2.3.2 Reparación del Cartílago.....	25
2.3.3 Colágena.....	26
2.4 Patologías de la Tráquea.....	26
2.5 Ingeniería de Tejidos.....	28
2.6 Matriz Extracelular.....	30
2.7 Descelularización.....	31
2.8 Matriz Extracelular Descelularizada.....	32
3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN, FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	36
3.1 Caracterización Histológica del Tejido	36
3.1.1 DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).....	36
3.1.2 Hematoxilina y Eosina	37

3.1.3	Tinción Tricrómica de Masson.....	37
3.2	Caracterización por Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.....	37
4.	MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	39
4.1	Materiales.....	40
4.2	Recolección de Muestras	41
4.3	Descelularización del Tejido.....	41
4.3.1	Preparación del Tejido.....	41
4.3.2	Obtención de Muestras para Caracterización.....	42
4.3.3.	Descelularización.....	43
4.3.4.	Obtención de Muestras Post – Descelularización.....	44
4.4	Verificación del Protocolo de Descelularización.....	45
4.4.1.	Obtención de los cortes en Criostato.....	45
4.4.2.	Medio de Montaje DAPI.....	45
4.4.3.	Hematoxilina y Eosina (H&E)	45
4.4.4.	Tricrómica de Masson.....	47
4.5	Pulverización de la Matriz Extracelular Descelularizada	48
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	49
5.1	Evaluación Mediante Tinciones DAPI, H&E y Tricrómica de Masson.....	49
5.1.1.	Tinción H&E	50
5.1.2.	Tinción DAPI.....	52
5.1.3.	Análisis Cualitativo de la Tinción Tricrómica de Masson.....	54
5.2	Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	54
6.	DISCUSIÓN	60
7.	CONCLUSIONES.....	61
	REFERENCIAS	62

I. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. A) Vista lateral de la posición de la tráquea con referencia a las vértebras cervicales [21]. B) Morfología General. a: Tráquea cervical; b: Tráquea torácica. 1. Cartílago cricoides; 2. Impresión aórtica de Nicaise y Lejars; 3. Carina traqueal: estructura que separa las aberturas izquierda y derecha de los bronquios principales [19], [20].	16
Figura 2. Formas del calibre traqueal. (De izquierda a derecha): Circular; D; U invertida; Triangular; C (la más común); elíptica [24].	17
Figura 3. Diagrama para la deducción de la Ley de Hagen – Poiseuille en una tubería.	18
Figura 4. Mucosa traqueal. El epitelio traqueal está constituido por células ciliadas y células secretoras caliciformes. Los cilios son visibles y revisten la luz traqueal del epitelio pseudoestratificado (coloración Periodic Acid – Schiff (PAS)) [20].	23
Figura 5. Esquema de un corte histológico de la sección transversal de la tráquea en la que se muestran las capas características [32].	24
Figura 6. Lagunas en la MEC del cartílago traqueal (Tinción H&E), aumento 10X y 40X [35].	24
Figura 7. Estructura química de los glicosaminoglicanos (GAGs). Se ejemplifica un condroitin sulfato.	25
Figura 8. Estructura de la colágena.	26
Figura 9. Patologías traqueales. A) Estenosis postintubación. B) Tejido de granulación secundario a stent de silicona. C) Traqueobroncomalacia. D) Estenosis secundaria a granulomatosis de Wegener. E) Estenosis secundaria a tuberculosis. F) Traqueobroncopatía osteocondroplástica. G) Estenosis idiopática. H) Hamartoma. I) Papiloma solitario. J) Papilomatosis [42].	27
Figura 10. Representación esquemática de la Ingeniería de Tejidos [49].	29
Figura 11. Materiales basados en matriz extracelular descelularizada, desde su obtención hasta las posibles aplicaciones. La adquisición de biomateriales basados en MECd abarca desde la descelularización de los órganos o tejidos hasta el procesamiento posterior para optimizar las propiedades fisiológicas. La aplicación médica de biomateriales basados en MECd se puede clasificar en tres campos: regeneración de tejidos, modelaje celular y suministro de fármacos [65].	33

Figura 12. El esquema representa el proceso de conminución de la MEC y los pasos implicados en la fabricación del polvo. En este ejemplo, la MEC en polvo se obtiene mediante la descelularización del órgano hasta obtener el polvo [66].....	34
Figura 13. Métodos de caracterización propuestos.....	36
Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología del proyecto.....	39
Figura 15. A) Procedimiento quirúrgico para la obtención de la tráquea, B) Escala.....	41
Figura 16. Tráqueas sumergidas en 30 mL de agua destilada.....	42
Figura 17. Obtención de muestras para control y verificación del protocolo de descelularización. Tamaño promedio de los cortes realizados.....	43
Figura 18. Resultados de la serie de lavados en DOCNa en baño de ultrasonido, los asteriscos indican el lugar en donde se encuentran las tráqueas.	44
Figura 19. Esquema del proceso de pulverización de la MECd.....	48
Figura 20. Comparación entre tráquea nativa de rata (A) y tráquea descelularizada de rata; (B) aplicando el protocolo de descelularización propuesto; C) Polvo de MECd obtenido.....	49
Figura 21. Análisis del proceso de descelularización por tinción H&E.....	50
Figura 22. Análisis del proceso de descelularización mediante tinción DAPI.....	52
Figura 23. Análisis de la composición de la MEC utilizando la tinción Tricrómica de Masson.....	54
Figura 24. Equipo Nicolet 6700 FT-IR de Thermo Scientific en el IIM.	55
Figura 25. Comparación entre espectros FTIR de la muestra nativa y la muestra descelularizada.	57
Figura 26. Espectro FTIR de la muestra descelularizada.	58
Figura 27. Comparación entre espectros FTIR de la muestra descelularizada y el cartílago de tráquea bovino liofilizado.....	58
Figura 28. Comparación entre espectros FTIR de la muestra nativa, la muestra descelularizada y el cartílago de tráquea bovino liofilizado.....	59

Tablas

Tabla 1. Características del reemplazo ideal traqueal.....	14
Tabla 2. Características de las proteínas que conforman la matriz extracelular [53].	30
Tabla 3. Beneficios de usar Polvo de MEC.....	35
Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en el proyecto.....	40
Tabla 5. Tinción H&E.....	46
Tabla 6. Proceso de Deshidratación.....	46
Tabla 7. Tinción Tricrómica de Masson.	47
Tabla 8. Evaluación del protocolo de descelularización usando H&E.....	51
Tabla 9. Evaluación del protocolo de descelularización usando DAPI	53
Tabla 10. Relación del número de onda con el grupo funcional asociado.....	59

II. RESUMEN

La Ingeniería de Tejidos (IT) es un campo de investigación interdisciplinario que se enfoca en la creación de tejidos y órganos que puedan reemplazar o reparar tejidos dañados o perdidos debido a enfermedades, traumatismos o envejecimiento. En particular, los trastornos traqueales representan una importante problemática médica debido a su impacto en la calidad de vida de los pacientes. La tráquea es un órgano hueco que forma parte del sistema respiratorio y está compuesta por anillos cartilagosos. Las patologías de la tráquea pueden ser tanto benignas como malignas, y representan un peligro para la salud, especialmente cuando se desarrolla tejido cicatricial en la tráquea ya sea a consecuencia de una intubación prolongada o bien debido a una traqueotomía. Los tratamientos médicos actuales se clasifican de acuerdo con el daño o la lesión en la tráquea del paciente, siendo los pacientes más graves quienes requieren de procedimientos quirúrgicos que van desde plastias hasta el trasplante. En este contexto, la IT ofrece una alternativa prometedora para la regeneración de la tráquea y la reparación de sus tejidos dañados. A través de la combinación de andamios celulares, células y moléculas biológicamente activas, se puede crear tejidos funcionales que permitan restaurar la estructura y función de la tráquea.

El objetivo general de este estudio es obtener polvo de matriz extracelular (MEC) de tráquea de rata. Para lograr este objetivo, se establecen tres metas específicas. La primera meta es obtener la MEC a través del proceso de descelularización de tráqueas de rata. La segunda meta es realizar la caracterización histológica de las tráqueas descelularizadas utilizando las tinciones DAPI, Hematoxilina – Eosina (H&E) y Tricrómica de Masson. La tercera meta es pulverizar las MEC obtenidas y verificar su composición mediante la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

La metodología se llevó a cabo en cinco etapas, comenzando con la recolección de las muestras en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), continuando con la aplicación del protocolo de descelularización en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) seguido de la caracterización histológica en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y finalizando con la pulverización de la MEC y la caracterización mediante FTIR del polvo obtenido.

Mediante las caracterizaciones histológicas propuestas se encontró que se logró un porcentaje de descelularización cercano al 90%, además, mediante el análisis FTIR se

observó que se mantenían las estructuras bioquímicas que caracterizan al cartílago hialino, principalmente la colágena tipo II.

En conclusión, la IT se ha convertido en una alternativa prometedora para tratar las enfermedades de la tráquea que requieren cirugía, en particular, la MEC se ha convertido en un biomaterial de interés debido a su bioactividad y características similares a los tejidos vivos. En este estudio, se demostró que es posible obtener un biomaterial en polvo de MEC a través de un protocolo de descelularización eficaz que mantiene la MEC nativa.

III. ABSTRACT

Tissue Engineering (TE) is an interdisciplinary research field that focuses on the creation of tissues and organs that can replace or repair damaged or lost tissues due to diseases, trauma, or aging. Tracheal disorders represent an important medical problem due to their impact on the quality of life of patients. The trachea is a hollow organ that is part of the respiratory system and is composed of cartilaginous rings. Tracheal diseases can be both benign and malignant and represent a health hazard, especially when scar tissue develops in the trachea because of prolonged intubation or tracheotomy. Current medical treatments are classified according to the damage or injury in the patient's trachea, with the most severe patients requiring surgical procedures ranging from surgery to transplantation. In this context, TE offers a promising alternative for trachea regeneration and the repair of its damaged tissues. Through the combination of cellular scaffolds, cells, and biologically active molecules, functional tissues can be created that allow for the restoration of the structure and function of the trachea.

The general objective of this study is to obtain extracellular matrix (ECM) powder from rat trachea. To achieve this objective, three specific goals are established. The first goal is to obtain ECM through the decellularization process of rat tracheas. The second goal is to perform histological characterization of the decellularized tracheas using DAPI, H&E, and Masson's trichrome stains. The third goal is to pulverize the obtained ECM and verify its composition using FTIR. The methodology was carried out in five stages, starting with the sample collection at the National Institute of Respiratory Diseases (INER), followed by the application of the decellularization protocol at the Materials Research Institute (IIM), histological characterization at the National Rehabilitation Institute (INR), and ending with the pulverization of the ECM and the characterization of the obtained powder using FTIR. Through the proposed histological characterizations, it was found that a decellularization percentage close to 90% was achieved. Furthermore, FTIR analysis showed that the biochemical structures that characterize hyaline cartilage, mainly type II collagen, were maintained.

In conclusion, TE has become a promising alternative for treating tracheal diseases that require surgery. ECM has become an interesting biomaterial due to its bioactivity and characteristics like living tissues. In this study, it was demonstrated that it is possible to obtain an ECM powder biomaterial through an effective decellularization protocol that maintains the native ECM.

IV. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi mamá y a mi papá por su amor incondicional, su apoyo constante y su dedicación incansable en mi educación. Nunca olvidaré el sacrificio y la paciencia que han tenido durante todo este proceso, gracias a ustedes he logrado alcanzar mis metas. A mis hermanos Iván, Isabel e Iker, por estar siempre presentes en cada etapa de mi vida, por ser mi fuente de inspiración y motivación. A mi tía Narda por todos sus consejos, a mi familia y todas sus ramas, agradezco su apoyo, su compañía y su amor, han sido un pilar fundamental en este lindo camino.

Agradezco sinceramente a la Dra. María Cristina Piña Barba por su guía, apoyo y orientación durante todo el proceso de investigación. Sus consejos expertos, críticas constructivas y compromiso con mi trabajo han sido fundamentales para el éxito de esta tesis.

Quiero expresar mi gratitud a los miembros de mi comité tutorial, el Dr. David Mauricio Giraldo Gómez y la Dra. Luz María López Marín por su tiempo, experiencia y aportes invaluable que me permitieron mejorar mi investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Biomateriales: Angela, Cesar, Daniel, David, Israel, Jimena, Karen, Luis y Mercurio, chicos, muchas gracias por todo su apoyo y su amistad, con sus consejos y preguntas obtuve un mejor panorama de este trabajo. Quiero hacer una mención especial a Angela, Isra y David Abad quienes además fueron un apoyo invaluable. Al Dr. David y la Dra. Karla por motivarme siempre a mejorar.

A mis amigos de la primera generación de Ingenieros en Sistemas Biomédicos de la UNAM: Gerardo y José, ¡muchachos, vamos por más!

A los técnicos e investigadores por su gran trabajo y el apoyo que me brindaron siempre, a la Biol. Ivonne Sánchez de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM. Al Quím. Miguel Ángel Canseco Martínez por la ayuda en la espectroscopia infrarroja. A la Biol. Sandra Julieta García López y al M. en C. Valentín Martínez López ambos del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra por sus consejos en la caracterización histológica. A la M en C. Mariana Silva Martínez del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias por su apoyo en la obtención de las muestras. Y a todas las personas que colaboraron en algún momento en este proyecto.

Agradezco sinceramente al distinguido jurado que me fue asignado por su tiempo, dedicación y valiosa contribución por la revisión de mi tesis de maestría:

Presidente: Dr. Gabriel Jorge Torres Villaseñor

Primer Vocal: Dra. María Cristina Piña Barba

Segundo Vocal: Dr. Arturo Barba Pingarrón

Tercer Vocal: Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez

Secretario: Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría. Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la Dirección General de asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM a través del proyecto con clave PAPIIT IT100222.

A la coordinación y al personal administrativo del Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales por su apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones en Materiales por brindarme una excelente educación profesional.

1. INTRODUCCIÓN

La Medicina Regenerativa es un campo en desarrollo que tiene el potencial de mejorar significativamente el tratamiento de pacientes con tráqueas dañadas o defectuosas a través de la Ingeniería de Tejidos (IT). Los trastornos y daños que afectan a la tráquea suelen dar lugar a estenosis traqueales (estrechamiento del diámetro interno de la tráquea) [1], un problema que tiene un gran impacto en la salud, ya que las enfermedades de las vías respiratorias no transmisibles son la sexta causa de defunción en el mundo y en México son la décima causa de defunción provocando más de 40 muertes por cada 100,000 habitantes [2]. Los procedimientos quirúrgicos vitales para la reconstrucción y sustitución de la tráquea son complejos, y actualmente son indicados para tratar numerosas patologías entre las que se incluyen la neoplasia traqueal primaria (carcinoma quístico y carcinoma de células escamosas), cáncer de la tiroides, cirugías previas sin éxito para enfermedades traqueales benignas reestenosis, estenosis a largo plazo que no se ha reparado quirúrgicamente, estenosis debida a una intubación prolongada y con menor frecuencia, la estenosis traqueal congénita [3]. En estos casos la sección dañada se extirpa quirúrgicamente y los extremos restantes se unen mediante una anastomosis directa término – terminal la cual es insuficiente cuando la longitud de tejido reseado es superior a la mitad de la tráquea en adultos o un tercio en niños [4]. Por lo que es necesario un reemplazo traqueal que permita una reparación saludable de las vías respiratorias.

Las técnicas de reemplazo traqueal han sido estudiadas y practicadas desde el siglo pasado, fueron descritas por primera vez por el Dr. Belsey en 1950 en donde destacan las características del reemplazo ideal de tráquea las cuales se encuentran resumidas en la Tabla 1 [5]. Actualmente son numerosas las técnicas en la práctica clínica que intentan crear u obtener el sustituto ideal traqueal que de acuerdo con la revisión del Dr. Grillo [6] han sido clasificadas en cinco categorías: materiales sintéticos, aloinjertos, autoinjertos, xenoinjertos y trasplante traqueal de origen humano.

En la ingeniería de tejidos (IT) se han desarrollado alternativas para la obtención de andamios utilizando varias técnicas como el electrospinning, la descelularización de órganos y tejidos y la impresión 3D que a su vez dio paso a la bioimpresión 3D, técnica que utiliza una biotinta compuesta por biomateriales, comúnmente en forma de hidrogeles y células para la fabricación de constructos tridimensionales y que ha sido posible gracias a los avances recientes en la tecnología de impresión 3D, la biología celular y la ciencia de los materiales [7]. Las biotintas son un componente esencial, y se entrecruzan o estabilizan durante o inmediatamente después de la bioimpresión para crear las formas finales de las

construcciones tisulares; la selección de la biotinta depende de la aplicación específica, del tipo de células, y de la bioimpresora que se vaya a utilizar [8]. Además se han investigado andamios biológicos derivados del tejido de la tráquea como la matriz extracelular (MEC) para su uso en el reemplazo traqueal debido a su similitud mecánica y bioquímica con el tejido nativo, la cual ha mostrado un gran rendimiento como posible sustituto biológico, promoviendo la adhesión, proliferación y diferenciación celular [9], [10]. Para el caso específico de la tráquea se han reportado los intentos de crear los modelos in vitro mediante técnicas de bioimpresión utilizando biotintas compuestas de hidrogeles con distintos biomateriales [11]–[13], sin embargo, aún hacen falta investigaciones de las posibles aplicaciones de la MEC en combinación con hidrogeles para la creación de andamios tridimensionales de tráquea.

Tabla 1. Características del reemplazo ideal traqueal.

Características del Sustituto
Rigidez lateral
Flexibilidad longitudinal
Lumen hermético
Sin necesidad de inmunosupresores
Técnica fiable, factible y reproducible
Biocompatible: integración en los tejidos adyacentes y cicatrización, de modo que no se produzca una inflamación crónica, tejido de granulación, infección ni erosión

Nuestra hipótesis es que es posible obtener un polvo de MEC que pueda conservar los grupos funcionales que serán responsables de interacciones involucradas en la adherencia de células, con el cual se puedan desarrollar andamios acelulares de tráquea. En este proyecto se ha realizado la descelularización, pulverización y caracterización de la MEC de tejido traqueal de rata con la intención de obtener los parámetros que nos servirán para determinar si se conservó la composición del tejido nativo posterior al proceso de descelularización.

Este enfoque de IT utilizando MEC ofrecerá una variable para continuar intentando superar la brecha que existe entre la falta de constructos adecuados y la cantidad de pacientes que requieren un trasplante traqueal, además de mostrar los alcances que tiene la

MEC como biomaterial, que, aunque es específica para cada tejido, puede adaptarse a casi todos ellos.

Hipótesis de Investigación

Es posible obtener polvo de Matriz Extracelular (MEC) de tráquea de rata preservando las propiedades de alta adherencia.

Objetivo y Metas

Objetivo General

Obtener polvo de matriz extracelular de tráquea de rata.

Metas

- Obtener MEC a través del proceso de descelularización de tráqueas de rata.
- Realizar la caracterización histológica de las tráqueas descelularizadas mediante las tinciones DAPI, H&E y Tricrómica de Masson.
- Pulverizar las MEC obtenidas y verificar su composición mediante FTIR.

Justificación

En este proyecto se utiliza MEC de tráquea para la obtención de un biomaterial en polvo mediante la técnica de descelularización; los tejidos descelularizados han sido ampliamente utilizados en la IT. La MEC desempeña dos funciones críticas:

- 1) como estructura de soporte de los tejidos y
- 2) como fuente de señales bioquímicas y biofísicas para las células que residen en ella.

La MEC proporciona un microambiente único y específico para las células residentes, dependiendo del tipo de tejido, y promueven funciones celulares como la supervivencia, la diferenciación, la migración, maduración y reproducción. Por lo tanto, los materiales tisulares descelularizados podrían proporcionar una plataforma adecuada para controlar el comportamiento celular y las terapias regenerativas [14], [15]. Imitar la estructura 3D de la MEC es complicado, en los últimos avances en materia de biotintas, la MEC se ha considerado un nuevo biomaterial para la bioimpresión 3D [16], [17]. Las biotintas que contienen este biomaterial han demostrado tener una capacidad regenerativa superior en comparación con las que no lo contienen [16], [18]. Debido a su capacidad para proporcionar

elementos bioquímicos esenciales y preservar las características estructurales cruciales para la viabilidad celular [17], consideramos que la MEC en forma de polvo es un biomaterial prometedor y fundamental en la ingeniería de tejidos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Tráquea

2.1.1 Anatomía

La tráquea es un conducto del tracto respiratorio inferior que sigue a la laringe y termina en el tórax, se bifurca en dos ramas dando origen a los bronquios principales derecho e izquierdo [19]. Se ha descrito que se extiende desde el borde inferior de la sexta vertebra cervical (C6) hasta la cuarta o quinta vertebra torácica (T4, T5) (ver Figura 1) [20].

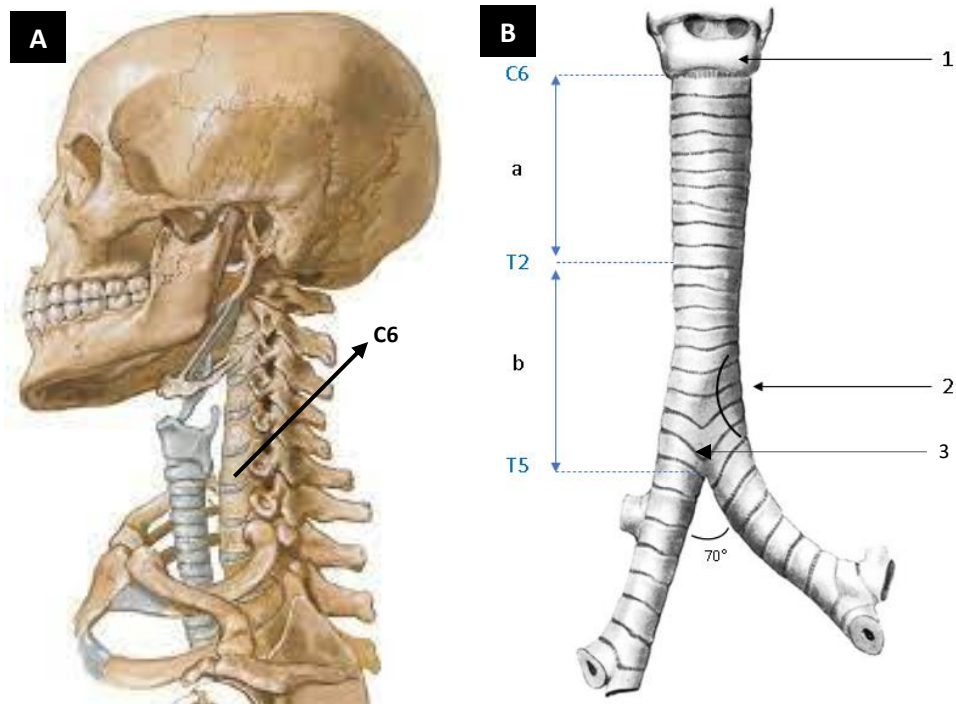


Figura 1. A) Vista lateral de la posición de la tráquea con referencia a las vértebras cervicales [21]. B) Morfología General. a: Tráquea cervical; b: Tráquea torácica. 1. Cartílago cricoides; 2. Impresión aórtica de Nicaise y Lejars; 3. Carina traqueal: estructura que separa las aberturas izquierda y derecha de los bronquios principales [19], [20].

2.1.2 Forma, Dirección y Dimensiones

La forma que presenta la tráquea es la de un tubo cilíndrico aplanado en su parte posterior, lo que ocupa entre una cuarta y una quinta parte de su circunferencia, la parte cilíndrica presenta salientes transversales superpuestos debidos a los anillos cartilagosos que la constituyen [19]. La tráquea desciende oblicuamente sobre la línea media en sentido inferior y posterior, alejándose progresivamente de la piel, se encuentra a 18 mm del tejido cutáneo en la zona infracricoidea, a 40 – 50 mm a la altura del orificio de entrada del tórax y a 70 mm a la altura de la bifurcación traqueal [20]. La longitud y el diámetro de la tráquea son variables de acuerdo con el individuo, por lo general los diámetros externos de la tráquea miden 2.3 cm en sentido coronario y 1.8 cm en sentido sagital en los hombres, mientras que en mujeres los valores correspondientes son de 2.0 cm y 1.4 cm respectivamente. La tráquea de un hombre adulto mide 11.8 cm (siendo un rango normal entre 10 – 13 cm). Hay aproximadamente dos anillos cartilagosos por centímetro de tráquea; cada anillo cartilaginoso tiene un promedio de 4 mm, esto corresponde a entre 18 y 22 anillos cartilagosos dentro de la longitud de la tráquea. La pared de la tráquea tiene un grosor de 3 mm [22]. El calibre traqueal también varía según la edad y sexo del individuo y se ha reportado que es un poco mayor en el hombre cuyo promedio en el adulto es de 16 a 18 mm [23]. Este calibre traqueal es uniforme a lo largo de ambos segmentos cervical y torácico y su forma está determinada por los anillos cartilagosos siendo la forma en “C” la más común de acuerdo con el estudio realizado por el Dr. Colin F. Mackenzie y colaboradores, en donde se analizó la forma de la sección transversal de 111 tráqueas provenientes de humanos (ver Figura 2) [24].

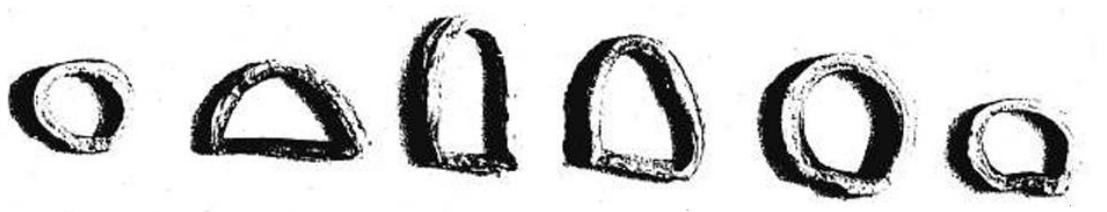


Figura 2. Formas del calibre traqueal. (De izquierda a derecha): Circular; D; U invertida; Triangular; C (la más común); elíptica [24].

2.2 Fisiología

En la literatura se han descrito las principales funciones de la tráquea [20]:

- Biomecánicas: conducir el aire entre la laringe y los bronquios, intercambiar calor y proveer de humedad al aire circulante, además de ser participe en menor medida en la fonación y deglución.
- Drenaje: por su revestimiento mucoso ciliado, permite la evacuación de las secreciones hacia la laringe, ya sea de manera espontánea o a través de reflejos.
- Inmunitaria: por la presencia de masas linfoides parietales, participa en la defensa específica de las vías respiratorias.

2.2.1 Transporte de Aire en la Tráquea

La tráquea no es un conducto inerte, es la única vía de paso del aire hacia los alvéolos pulmonares (hematosis), el transporte del aire depende del diámetro interno de la tráquea. La resistencia al flujo a través de un tubo, siempre y cuando el flujo sea laminar y Newtoniano, está representada por la ley de Hagen – Poiseuille (ecuación 1) [25].

$$Q = \frac{\Delta P \pi R^4}{8 \mu L} \quad (1)$$

Deducción de la ecuación 1:

En una tubería por la cual circula un fluido se considera un trozo de ésta delimitado por los puntos (ABDC), de longitud (L) y radio interno (R) (ver Figura 3). En el fluido circulante se considera un cilindro coaxial interno delimitado por los puntos (abdc) de radio (r), con áreas transversales: $A_b = \pi r^2$ y $A_L = 2\pi rL$.

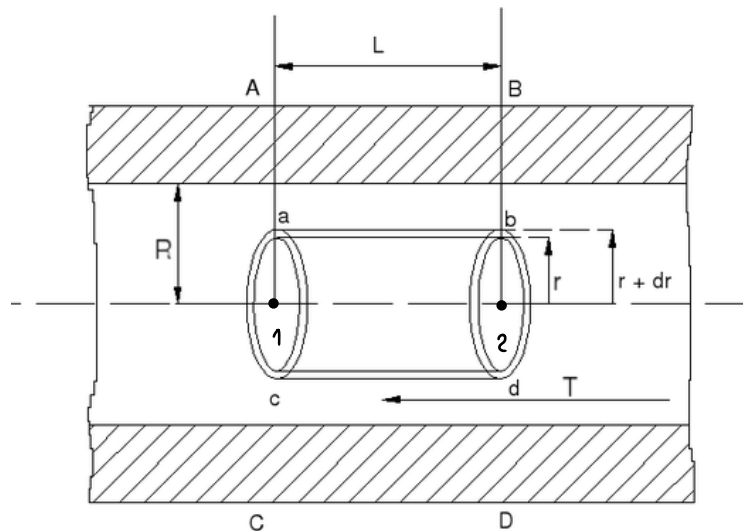


Figura 3. Diagrama para la deducción de la Ley de Hagen – Poiseuille en una tubería.

Debido a la viscosidad, sobre este cilindro actúa un esfuerzo cortante (τ) provocado por una fuerza cortante (F). Esta fuerza tiene el sentido del desplazamiento del fluido, producido por un gradiente de presión ($P_2 > P_1$). De acuerdo con la segunda ley de Newton, si (P_1) y (P_2) son las presiones aplicadas en el centro de gravedad del área transversal se cumple:

$$P_1 A_b - P_2 A_b + F = 0 \quad (2)$$

El esfuerzo de corte en un fluido se deforma continuamente mientras se aplique el esfuerzo cortante, el cual en este caso es ($\tau = \frac{F}{A_L}$), además de que es proporcional a la velocidad de corte ($\frac{du}{dr}$) y a la viscosidad (μ):

$$\tau = \frac{F}{A_L} = \frac{du}{dr} \mu \quad (3)$$

Despejando F y sustituyendo A_L

$$F = 2 \pi r L \mu \frac{du}{dr} \quad (4)$$

Sustituyendo F en la ecuación (2) y sustituyendo $A_b = \pi r^2$ tenemos

$$P_2 \pi r^2 - P_1 \pi r^2 + 2 \pi r L \mu \frac{du}{dr} = 0 \quad (5)$$

Simplificando (5)

$$\Delta P r + 2 L \mu \frac{du}{dr} = 0 \quad (6)$$

Obteniendo el diferencial du de (6) para obtener el perfil de velocidades en la tubería

$$du = -\frac{\Delta P}{2 L \mu} r dr \quad (7)$$

Integrando (7)

$$\int du = \int -\frac{\Delta P}{2 L \mu} r dr \quad (8)$$

$$u(r) = -\frac{\Delta P}{4 L \mu} r^2 + C \quad (9)$$

Evalutando (9) para $r = R$ y $u = 0$

$$C = \frac{\Delta P}{4 L \mu} R^2 \quad (10)$$

Sustituyendo (10) en (9)

$$u = -\frac{\Delta P}{4 L \mu} r^2 + \frac{\Delta P}{4 L \mu} R^2 \quad (11)$$

Simplificando se obtiene la expresión para calcular la distribución de velocidades en una tubería

$$u = \frac{\Delta P}{4 L \mu} (R^2 - r^2) \quad (12)$$

Para calcular el caudal en la tubería se debe considerar un anillo diferencial de espesor (dr) entre dos circunferencias concéntricas con el eje de la tubería (ver Figura 3). Considerando que el volumen del fluido que circula a través de una superficie en un tiempo determinado se denomina caudal y se representa por Q , se puede determinar que $Q = \frac{V}{t}$, en el caso del cilindro que se está considerando el volumen V es: $V = A_b L$, sustituyendo V en Q : $Q = \frac{A_b L}{t}$. Siendo que $\frac{L}{t}$ es la definición de velocidad (u) por lo que también se puede calcular el caudal en función de la velocidad y el área de la sección transversal a la cual el flujo es normal.

$$Q = u A_b = u \pi r^2 \quad (13)$$

Derivando (13) respecto de “ r ”

$$dQ = 2 u \pi r dr \quad (14)$$

Sustituyendo (12) en (14) y simplificando

$$dQ = \frac{\Delta P \pi}{2 L \mu} (R^2 - r^2) r dr \quad (15)$$

Integrando (15)

$$\int_0^Q dQ = \frac{\Delta P \pi}{2 L \mu} \int_0^R (R^2 - r^2) r dr \quad (16)$$

$$Q = \frac{\Delta P \pi}{2 L \mu} \left(\frac{1}{2} R^2 (r^2) - \frac{1}{4} r^4 \right) \Big|_0^R = \frac{\Delta P \pi}{2 L \mu} \left(\frac{1}{2} R^4 - \frac{1}{4} R^4 \right) \quad (17)$$

Simplificando (17) obtenemos la ecuación de Hagen – Poiseuille:

$$Q = \Delta P \frac{\pi R^4}{8 L \mu} \quad (18)$$

Donde Q = flujo volumétrico o caudal volumétrico; ΔP = gradiente de presión entre los dos extremos de la tubería; R = radio de la tubería; L = longitud de la tubería; μ = viscosidad del fluido [23], [25]–[28].

Uno de los factores más importantes que influyen en la resistencia de las vías respiratorias es el diámetro de éstas. En general, la oposición al flujo puede describirse como el gradiente de presión dividido por el flujo volumétrico $R_{resistencia} = \frac{\Delta P}{Q}$, es sabido que, factores como el flujo turbulento influye en la resistencia al flujo en las vías áreas, en las cuales, el flujo de aire es principalmente laminar, lo que nos permite utilizar la Ley de Hagen – Poiseuille (ecuación 18). Basándonos en esta ecuación, es fácil ver cómo el diámetro de la vía aérea puede tener un impacto significativo, cambiando el flujo volumétrico del aire por una potencia de cuatro. Debido a estos cambios rápidos y drásticos, es por lo que los médicos se preocupan por los pacientes que tienen las vías respiratorias ocluidas ya sea debido a la inflamación de la mucosa, la constricción de los músculos de las vías respiratorias, los tumores que reducen el espacio de las vías respiratorias, o bien los tubos endotraqueales que bloquean la vía y aumentan considerablemente la resistencia al flujo de aire llegando a crear flujos turbulentos lo que conduciría a un colapso pulmonar [25], [29], [30].

2.2.2 Acondicionamiento del Aire y Deglución

Durante la inhalación, las vías áreas superiores calientan y humidifican el aire inhalado, durante una respiración en reposo y a temperatura ambiente el aire es calentado hasta la temperatura corporal y saturado al 100% de humedad hasta antes de la carina (ver Figura 1B) en el que es llamado punto de saturación isotérmica [23], [25]. Durante el proceso de

deglución se distinguen tres tiempos: tiempo labio – bucal, tiempo faríngeo y el tiempo esofágico. En el tiempo faríngeo ascienden la laringofaringe y la tráquea por contracción de los músculos elevadores de la laringe [20].

2.2.3 Función Inmunitaria

El tejido linfático asociado a los bronquios (BALT) por sus siglas en inglés, formado por ganglios linfáticos peri bronquiales, los cúmulos linfoides de la mucosa y de la submucosa bronquial, y las glándulas traqueobronquiales que producen una secreción rica en mucina forman una barrera protectora entre el epitelio y el entorno, esta secreción está controlada en gran medida por el sistema nervioso autónomo y es modulada por numerosos mediadores inflamatorios [20], [25], [31]. La secreción mucosa recoge las impurezas y los microorganismos inhalados y los transporta por las vías respiratorias aéreas mediante el flujo de aire durante la espiración y los movimientos mecánicos coordinados de las células ciliadas dando así a la tráquea una función inmunitaria celular y humoral [20], [25].

2.3 Histología

La tráquea está constituida por dos capas: una externa de tejido conjuntivo fibroelástico y cartílago, motivo por el cual posee una gran flexibilidad, y una capa interna mucosa. Los anillos no son completos y están compuestos de cartílago hialino, se encuentran abiertos por detrás y son la estructura por la cual la tráquea no colapsa durante la inspiración, su altura varía entre 2 y 5 mm y están situados uno sobre otro separados por una pequeña capa de músculo liso. Las fibras musculares lisas, que reúnen por detrás los extremos libres de los anillos, forman el músculo traqueal [20], [32].

En los cortes histológicos se pueden distinguir cuatro capas traqueales (ver Figuras 4 y 5):

1. Mucosa o túnica mucosa, compuesta por un epitelio pseudocilíndrico estratificado ciliado y una lámina propia con fibras elásticas abundantes y el tejido linfático asociado a los bronquios (ver Figura 4).
2. Submucosa, compuesta por tejido conjuntivo ligeramente más denso que el de la lámina propia.
3. Cartílago hialino, compuesta por los cartílagos hialinos de los anillos.
4. Capa o túnica adventicia, compuesta por tejido conjuntivo que adhiere la tráquea a las estructuras contiguas.

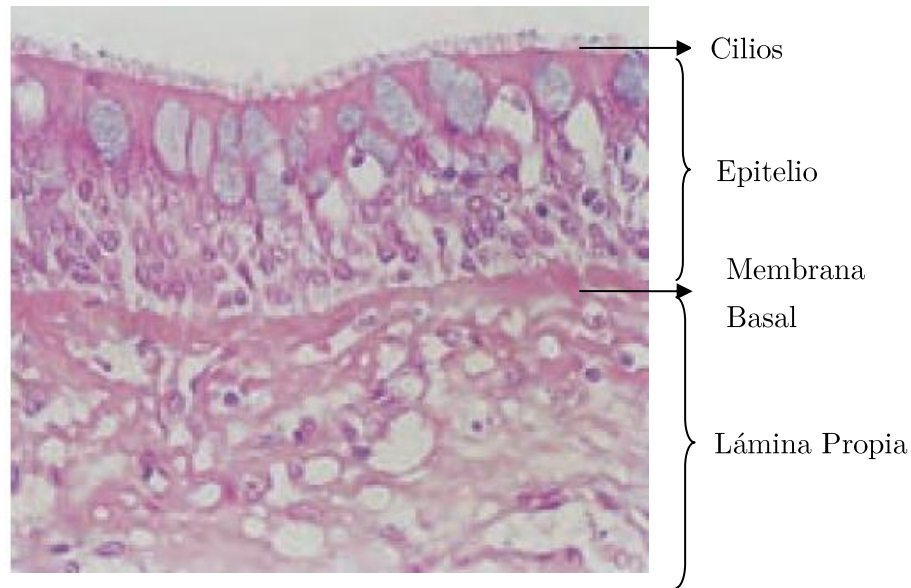


Figura 4. Mucosa traqueal. El epitelio traqueal está constituido por células ciliadas y células secretoras caliciformes. Los cilios son visibles y revisten la luz traqueal del epitelio pseudoestratificado (coloración Periodic Acid – Schiff (PAS)) [20].

2.3.1 Cartílago Hialino Traqueal y Matriz Extracelular

El cartílago hialino es un tejido blanquecino azulado, semitransparente y tiene un aspecto vitreo, es el cartílago más abundante en el cuerpo humano adulto [33]. Es de consistencia firme, avascular y carece de vasos linfáticos y nervios, al ser hialino se encuentra cubierto por una capa de tejido conjuntivo denso denominado pericondrio el cual es el responsable del intercambio de nutrientes por difusión a través de la matriz [34]. El cartílago está conformado por tres tipos células: condrogénicas, condroblastos y condrocitos, y MEC. La MEC es un gel compuesto por moléculas de colágena, proteoglicanos y glicoproteínas estructurales adhesivas. Los condrocitos renuevan las macromoléculas de la matriz cartilaginosa además de sintetizar colágena tipo II, proteoglicanos y condronectina [35]. En las imágenes de histología del cartílago traqueal se observan “lagunas” que son cavidades en la MEC ocupadas por los condrocitos (ver Figura 6) [33].

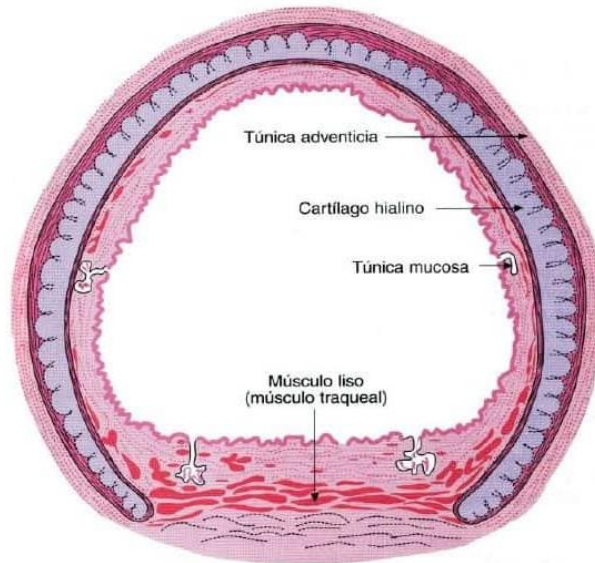


Figura 5. Esquema de un corte histológico de la sección transversal de la tráquea en la que se muestran las capas características [32].

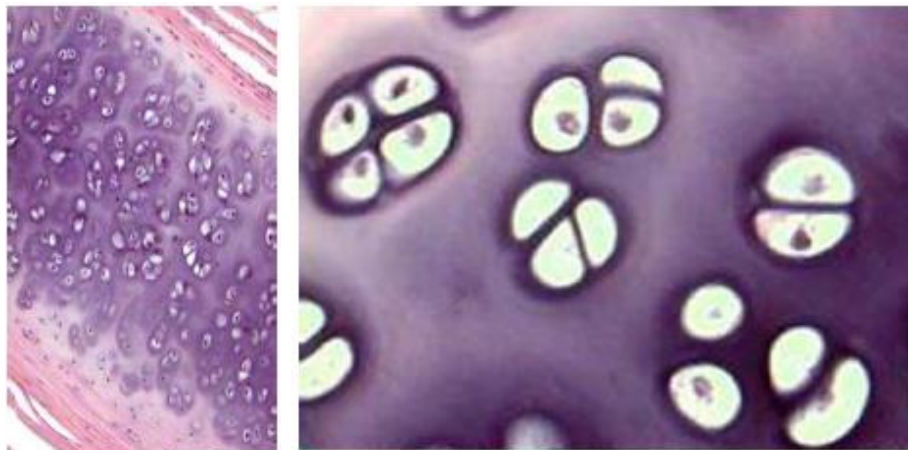


Figura 6. Lagunas en la MEC del cartílago traqueal (Tinción H&E), aumento 10X y 40X [35].

Proteoglicanos

El cartílago hialino está compuesto principalmente por tres tipos de glicosaminoglicanos (GAGs): ácido hialurónico, sulfato de condroitina y queratán sulfato. Estos se combinan con una proteína central para formar un proteoglicano. El componente más importante del cartílago hialino es el agregano. Debido a la gran cantidad de grupos sulfato en los proteoglicanos, la molécula tiene una carga negativa que le permite atraer cationes como el sodio, lo que hidrata la matriz. El ácido hialurónico se une a un gran número de agreganos,

que se adhieren a la matriz a través de interacciones con proteínas multi-adhesivas. Las agrupaciones de agreganos quedan atrapadas entre las fibras de colágeno, esta configuración permite que los agreganos se unan a las fibras de colágeno y proporcionen una matriz cartilaginosa resistente y flexible, lo que permite al cartílago resistir las fuerzas mecánicas de compresión y tensión [33].

Glicosaminoglicanos

Los GAGs son polímeros lineales formados por dos monómeros (ver Figura 7). Los GAGs son mucopolisacáridos largos, no ramificados, compuestos por regiones disacáridas repetidas de ácido urónico (ácido D – glucurónico o ácido L – idurónico) y un amino azúcar (D – galactosamina o D – glucosamina). Se distinguen entre sí por el tipo de unidad de hexosa, hexosamina o ácido hexurónico presente y por la geometría del enlace glucosídico entre las unidades repetidas. Cada dímero está unido al siguiente por otro enlace glucosídico, pero en este caso en posición beta 1-4. Este tipo de conformación confiere una estructura resistente [36].

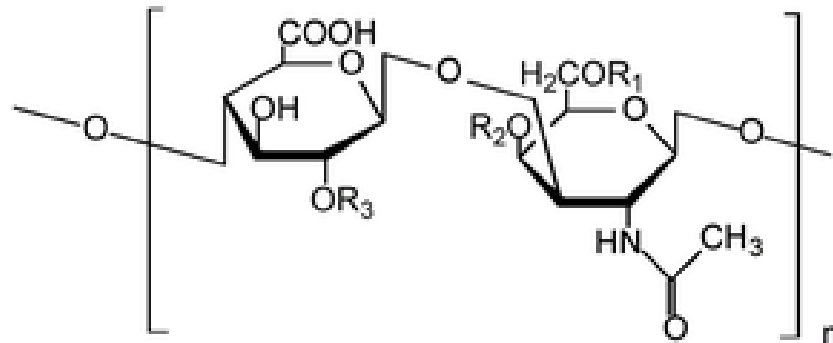


Figura 7. Estructura química de los glicosaminoglicanos (GAGs). Se ejemplifica un condroitin sulfato.

2.3.2 Reparación del Cartílago

Como ya se mencionó, el cartílago puede soportar las fuerzas mecánicas que actúen sobre él, sin embargo, cuando se degrada o daña no puede repararse por completo [34]. Los principales factores por los que no ocurre una reparación completa son: 1) el tejido es avascular, 2) los condrocitos maduros son células inmóviles (están atrapados en las lagunas) y 3) los condrocitos maduros tienen una capacidad limitada de proliferación [33].

2.3.3 Colágena

La colágena es la proteína más común en los mamíferos, está compuesta por una secuencia repetitiva de aminoácidos y es un componente fibroso clave de estructuras como la piel, huesos, dientes, tendones y cartilago. Es el componente principal de estos tejidos, proporcionando resistencia y soporte estructural [35]. La estructura primaria de la colágena está conformada principalmente por glicina (33% aproximadamente), prolina 12%, hidroxiprolina 9%, lisina e hidroxilisina formando la unidad repetitiva: Gly – Pro – Y y Gly – X – Hyp en donde X e Y son cualquier otro aminoácido [35], [37].

La matriz cartilaginosa está compuesta principalmente por colágena, hasta 40% de su peso seco corresponde a esta proteína, siendo la más abundante la tipo II [33].

La presencia de una glicina cada tres aminoácidos es necesaria para que las tres cadenas se puedan empaquetar de manera densa y muy próximas al eje central estabilizando la triple hélice mediante interacciones apolares. La Pro y la Hyp suelen ocupar las posiciones X e Y. Estos aminoácidos con cadena lateral cíclica limitan la rotación de la cadena y le proporcionan la estructura secundaria helicoidal que queda estabilizada por la repulsión estérica de su anillo [38] (ver Figura 8).

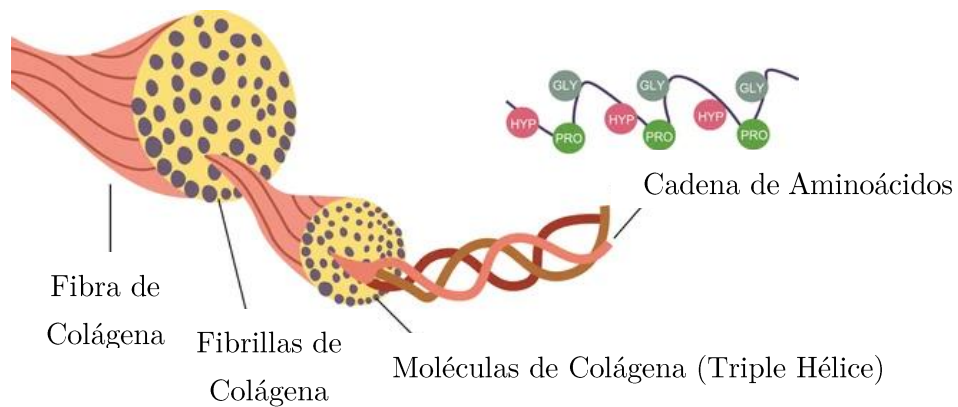


Figura 8. Estructura de la colágena.

2.4 Patologías de la Tráquea

Pese a que las enfermedades de la tráquea se consideran infrecuentes, representan un peligro para la vida y afectan la calidad de vida [39]. Estas enfermedades pueden ser tanto benignas como malignas y entre las principales se encuentran la estenosis traqueal (estrechamiento del diámetro interno de la tráquea), la traqueomalacia (que se caracteriza por el daño del tejido de las paredes cartilaginosas que provoca debilidad o ablandamiento

en la tráquea) y los tumores tanto benignos como malignos por ejemplo carcinomas (ver Figura 9) [40], [41].

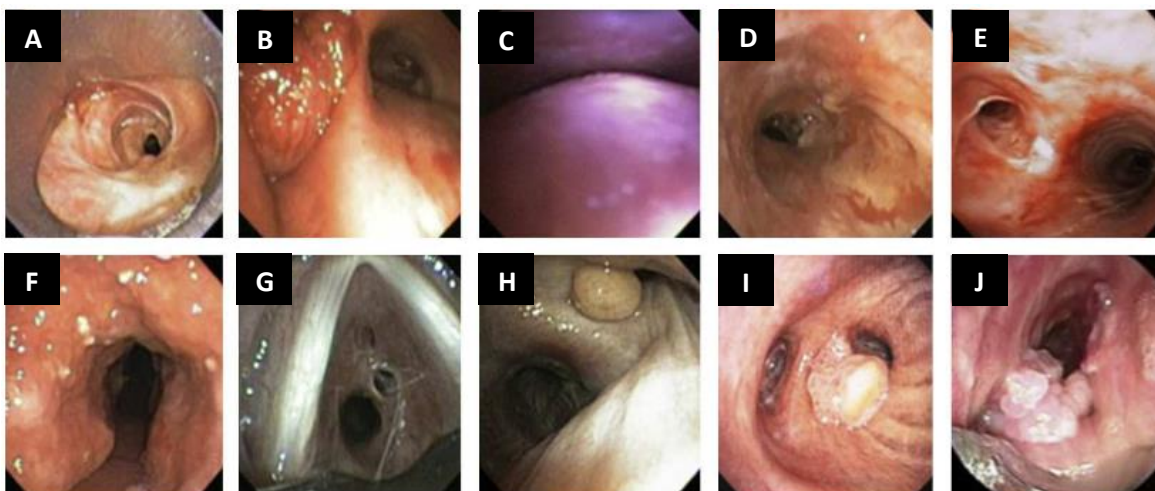


Figura 9. Patologías traqueales. A) Estenosis postintubación. B) Tejido de granulación secundario a stent de silicona. C) Traqueobroncomalacia. D) Estenosis secundaria a granulomatosis de Wegener. E) Estenosis secundaria a tuberculosis. F) Traqueobroncopatía osteocondroplástica. G) Estenosis idiopática. H) Hamartoma. I) Papiloma solitario. J) Papilomatosis [42].

Recientemente, a finales del 2019, un brote de neumonía de etiología desconocida comenzó desde Wuhan, Hubei, China y posteriormente se extendió por todo el mundo [43]. Un nuevo beta – coronavirus, denominado Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-COV-2) por sus siglas en inglés, fue identificado como la causa de la epidemia, y la enfermedad resultante se denominó enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19). La COVID-19 tiene un amplio espectro de presentaciones clínicas, que van desde las formas asintomáticas hasta las extremadamente graves, se trata de una infección que normalmente es asintomática, pero que en un 14 – 20% de los pacientes puede complicarse y en un 5% de estos casos puede llegar a presentar síndrome de dificultad respiratorio agudo, sepsis, shock séptico y fracaso multiorgánico, requiriendo ingreso en la unidad de cuidados intensivos, intubación orotraqueal y ventilación mecánica invasiva [43], [44]. Esta situación cobra relevancia puesto que se ha reportado que la gran mayoría de los casos se origina cuando se desarrolla tejido cicatricial debido a una intubación prolongada o a una traqueostomía, aunque también se han reportado lesiones por golpes, daños causados por objetos punzocortantes o por la ingesta de sustancias tóxicas y por enfermedades congénitas [39], [42], [45].

Tratamiento

El tratamiento es variable y depende de la patología, el daño y la lesión en la tráquea del paciente. En el trabajo realizado por el Dr. Valadez y cols. [41] se realizó un estudio retrospectivo de 50 pacientes con estenosis que fueron clasificados en tres grupos:

- I, estenosis leve: grupo de pacientes asintomáticos o de sintomatología ocasional.
- II, estenosis moderada: grupo de pacientes sintomáticos con estridor, infecciones de vías respiratorias altas frecuentes y/o disnea de esfuerzo.
- III, estenosis grave: grupo de pacientes muy sintomáticos con dificultad severa para respirar, con estridor intenso y/o disnea en reposo.

De los grupos anteriores, el grupo de pacientes I fue tratado solamente con medicamentos, mientras que para los grupos II y III el tratamiento consistió en técnicas endoscópicas y cirugías que dependieron de la magnitud de la obstrucción. De acuerdo con el estudio, 25 pacientes requirieron plastia traqueal. De estos, a todos los pacientes se les realizó resección del segmento afectado (de 2 a 7 anillos traqueales) y reconstrucción mediante plastia traqueal con anastomosis término – terminal, [35], [41], [46].

Lamentablemente, este procedimiento requiere condiciones específicas para poder ser considerado: se necesita suficiente tejido sano para unir los segmentos. Por lo tanto, solo es útil en reparaciones que comprometen menos de la mitad de la longitud traqueal en pacientes adultos y hasta una tercera parte en niños [35]. Ha sido necesario buscar estrategias quirúrgicas para la reparación de defectos traqueales mayores a 7 cm. Se han utilizado recursos de la Ingeniería de Tejidos para proponer soluciones, ya sea mediante el uso de "stents" o membranas biológicas y sintéticas. Estos materiales incluyen silicón de grado médico, poliuretano, policaprolactona, dacrón y aleaciones de metales en el caso de los materiales sintéticos. Entre los materiales biológicos se encuentran los autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, matriz extracelular descelularizada, colágena, gelatina, quitosano y seda. Además, se han explorado combinaciones de estos materiales para abordar este desafío. [35], [40], [47].

2.5 Ingeniería de Tejidos

La Ingeniería de Tejidos (IT) es una disciplina multidisciplinaria que combina principios de la ingeniería, biología y medicina, con el objetivo de desarrollar y diseñar estructuras y sistemas biológicos para la reparación o sustitución de tejidos dañados o defectuosos. Según el National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, la IT evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se basa en la utilización de andamios, que son

elementos que actúan como plantilla y soporte estructural para la interacción celular y la formación de tejidos nuevos, en conjunto con células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. (ver Figura 10) [48].

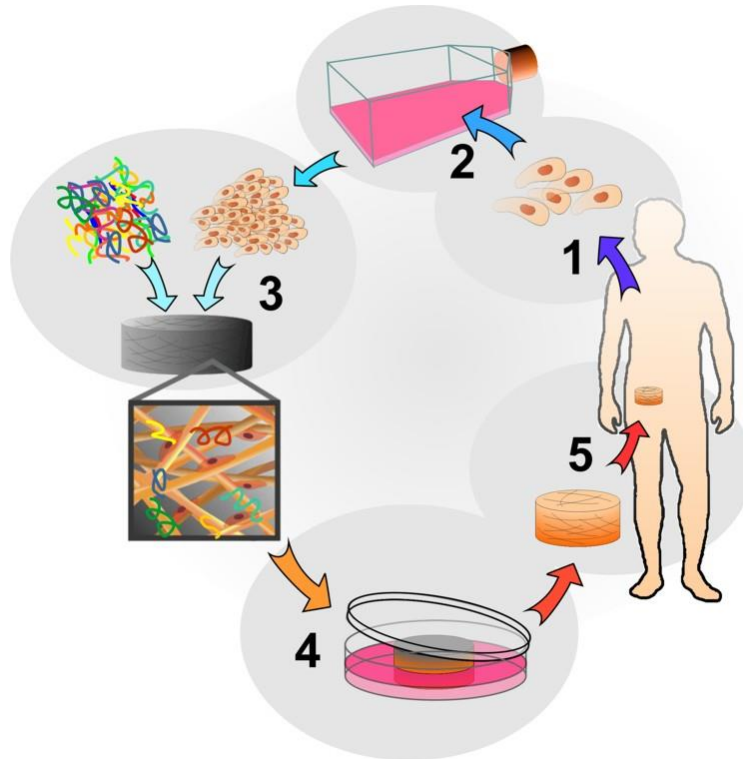


Figura 10. Representación esquemática de la Ingeniería de Tejidos [49].

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa son campos de investigación que abarcan varias disciplinas como la medicina, la ingeniería mecánica, la genética, las ciencias de la vida, la biotecnología y la ciencia de los materiales. Sus objetivos son reparar, regenerar, mantener, mejorar o modelar la función normal de células, tejidos y órganos humanos [40], [50]–[52].

El enfoque en este trabajo es el desarrollo de un biomaterial en polvo compuesto por el tejido traqueal descelularizado que mantenga sus propiedades bioquímicas y pueda ser utilizado en la obtención de andamios acelulares.

Los andamios proveen una estructura tridimensional para el crecimiento, desarrollo y diferenciación de las células, están hechos de biomateriales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, colágena y matrices descelularizadas de cartílago, siendo éstas últimas una gran promesa como el andamio ideal para la reconstrucción, sustitución y reparación del

cartílago ya que contiene los principales elementos que constituyen al cartílago además de mostrar biocompatibilidad para el crecimiento de condrocitos [35], [53].

2.6 Matriz Extracelular

La MEC es un componente esencial de los tejidos que proporciona soporte estructural y funcional a las células. Esta matriz está compuesta por una variedad de moléculas como proteoglicanos, y proteínas (ver Tabla 2), que juegan un papel importante en la regulación de las interacciones celulares, la orientación y migración celular, y en el control de la diferenciación celular. La MEC es esencial para el mantenimiento de la integridad y función de los tejidos, ya que permite el intercambio de señales y nutrientes entre las células y su entorno, y es fundamental para el desarrollo y cicatrización de heridas. [54].

Tabla 2. Características de las proteínas que conforman la matriz extracelular [54].

Nombre	Peso Molecular	Características	Ref.
Colágena	900 kDa	Triple hélice, en forma de espiral enroscada, delgada, compuesta por tres subunidades de proteínas.	[55]
Elastina	60 – 70 kDa	Codificada en un gen único en mamíferos, secretada como un monómero denominado tropoelastina, donde unidades individuales se entrecruzan.	[56]
Fibronectina	220 – 250 kDa	Dímero que une colágena y heparán sulfato	[74], [75]
Fibrilina	350 kDa	Las unidades funcionales son multiproteínas de alto peso molecular, denominadas microfibrillas, que sirven como andamiaje para la biogénesis de fibras elásticas.	[59]
Laminina	820 kDa	Con apariencia de “T”, se encuentra formada por un heterodímero compuesto de	[60]

	tres subunidades, en una configuración enrollada, producto de diferentes genes clasificados en tres grupos: α , β , γ .	
	Consiste en dos isoformas, una de cadena simple y la otra formada por dos subunidades.	[61]

2.7 Descelularización

La descelularización es un proceso de la IT que busca eliminar los componentes celulares, ya sean alogénicos o xenogénicos, de un tejido para evitar una respuesta inmunitaria. El objetivo es dejar intacta la MEC, que contiene una mezcla de moléculas estructurales y funcionales. El proceso de descelularización varía dependiendo del tipo de tejido y puede incluir una combinación de tratamientos físicos, químicos y enzimáticos. La eficacia de la descelularización depende tanto de la metodología de procesamiento como de la naturaleza del tejido. El resultado esperado de este proceso es la obtención de una MEC íntegra y funcional, que puede ser utilizada en aplicaciones terapéuticas y regenerativas. [10], [62].

Entre los principales beneficios de obtener andamios para la ingeniería de tejidos mediante descelularización se encuentra que la MEC no genera una respuesta inmunológica y favorece el crecimiento celular tras la implantación, se conserva la composición bioquímica y mecánica del tejido nativo y la capacidad de almacenamiento es a largo plazo, mientras que entre los principales retos se encuentra que se debe obtener un proceso óptimo de descelularización para cada tejido [62]. Aunque también se han presentado controversias respecto a que se conservan las propiedades mecánicas de la MEC durante el proceso de descelularización, en el estudio realizado por el Dr. Partington y colaboradores, se encontró que durante el proceso químico – enzimático de descelularización, las propiedades biomecánicas de la tráquea se ven comprometidas debido a la disminución de la colágena soluble y del contenido de glicosaminoglicanos de los anillos de cartílago [63].

En este trabajo se emplean protocolos de descelularización que incluyen una combinación de tratamientos físicos, químicos y enzimáticos con el objetivo de obtener un MECd que pueda ser pulverizada y que mantenga sus propiedades bioquímicas para posteriormente ser utilizado como complemento en la fabricación de andamios celulares; se comienza con la lisis de las membranas celulares mediante tratamientos físicos y soluciones iónicas,

posteriormente la separación o eliminación de los componentes celulares de la MEC usando tratamientos enzimáticos como el de la enzima DNasa cuyo uso hidroliza las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) solubilizando los contenidos nucleares y degradando el ADN y finalmente, el enjuague con agua destilada para la eliminación de los restos celulares de la MEC.

Cada uno de estos pasos puede combinarse con la agitación mecánica continua, sonicación o liofilización y repetirse varias veces para aumentar la eficacia del proceso [35], [62].

2.8 Matriz Extracelular Descelularizada

Como ya se mencionó en el apartado anterior, el proceso de descelularización consiste en la remoción del material celular, por lo que el resultado es una matriz que mantiene los componentes bioquímicos estructurales, proteínas (ver Tabla 2), macromoléculas propias de la matriz y factores de crecimiento asociados que usualmente recrean, hasta cierto punto, la composición y organización de los microambientes nativos de la MEC, además estas matrices brindan el soporte mecánico y biológico que permite la unión, migración y proliferación celular con la ventaja de que se mantiene la especificidad de los tejidos, las funciones celulares y los fenotipos [64].

Debido a la importancia de la MEC en el comportamiento celular, la homeostasis tisular y la progresión de las enfermedades, se ha vuelto una práctica habitual utilizar los biomateriales derivados de la MEC, de diferentes tejidos para ser usados en diversos campos médicos [65] (ver Figura 11).

La preparación del polvo de MEC implica un amplio procesamiento que puede alterar la integridad biológica de la misma. Este procesamiento puede afectar la composición, la resistencia mecánica, la ultraestructura y la microestructura de la MEC, la preparación del polvo suele implicar la separación de los tejidos no deseados de la MEC mediante procesos como descelularización, congelación, liofilización y pulverización (ver Figura 12). Es posible que los componentes de la MEC se alteren en cada paso de la fabricación y el proceso puede alterar la respuesta del huésped en la implantación in vivo [66].

Para la generación de andamios que utilizan la MEC, por ejemplo, las biotintas, las proteínas de la MEC, como la fibronectina y la colágena, facilitan el proceso de gelificación, con capacidad de respuesta a las alteraciones de la temperatura, e inician la construcción de una red reticulada siempre que se incuba a 37 °C, lo que da lugar a un entrecruzamiento de la biotinta sin requerir de un agente entrecruzante. Los polvos de MEC han ganado popularidad por su alta eficacia, accesibilidad y conservación de las

moléculas de señalización (ver Tabla 3). Las partículas de tejido descelularizado se utilizan para mejorar los biomateriales con baja biocompatibilidad en la bioimpresión 3D, además, se sabe que los polvos de MEC poseen algunas características distintivas, como una eficiencia significativa [17].

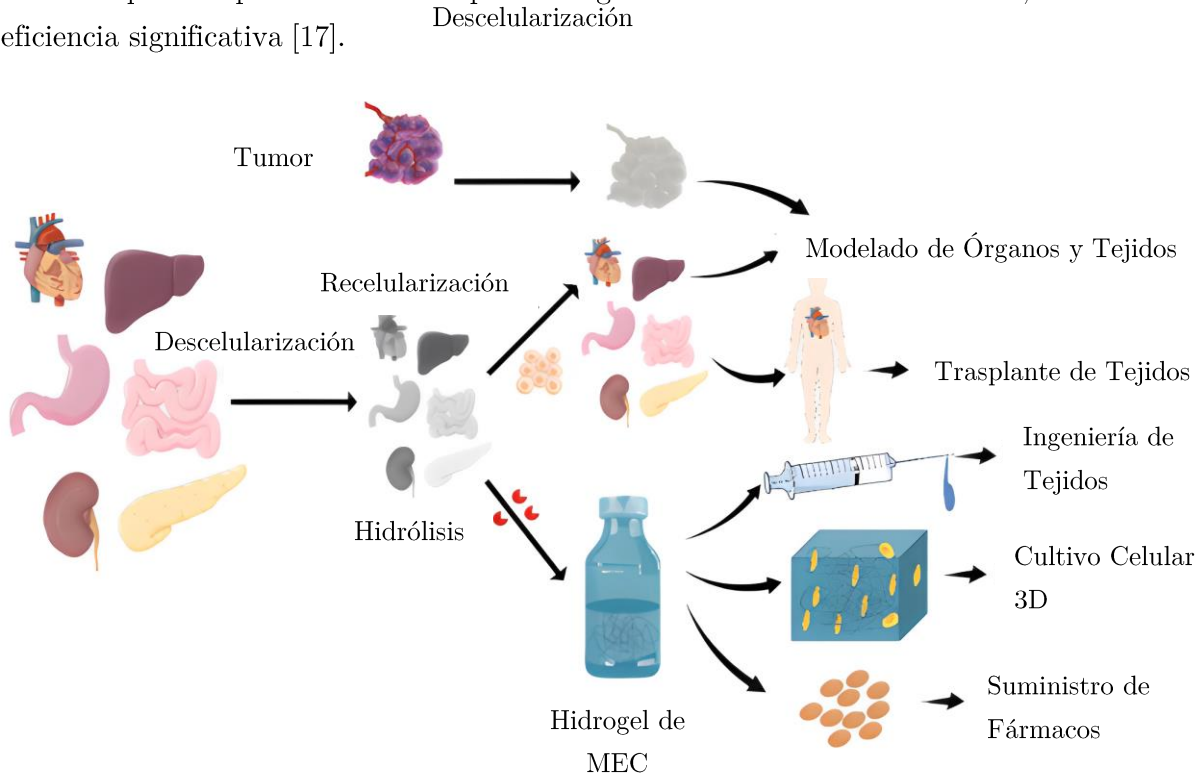


Figura 11. Materiales basados en matriz extracelular descelularizada, desde su obtención hasta las posibles aplicaciones. La adquisición de biomateriales basados en MECd abarca desde la descelularización de los órganos o tejidos hasta el procesamiento posterior para optimizar las propiedades fisiológicas. La aplicación médica de biomateriales basados en MECd se puede clasificar en tres campos: regeneración de tejidos, modelaje celular y suministro de fármacos [65].

La aplicación de biomateriales en forma de polvo y materiales biodegradables ha sido probada en varios tejidos [67]. Se han utilizado con éxito diferentes biomateriales en forma de partículas, polvos y gránulos como rellenos, estabilizadores, agentes de lixiviación y factores bioactivos para acelerar la regeneración de los tejidos [68]. Recientemente, las partículas y polvos derivados de tejidos descelularizados han captado más atención debido a su facilidad de acceso, su alta eficiencia y su reserva de señales, péptidos bioactivos y metaloproteinasas de la matriz [66]. Los polvos y partículas de MEC pueden ser empaquetados, rociados o solubilizados, y se pueden utilizar técnicas mínimamente invasivas para entregarlos de manera eficiente a los defectos irregulares [66]. La

bioactividad, la accesibilidad, la mayor eficiencia y la menor intervención invasiva son características distintivas de los polvos de MEC [69].

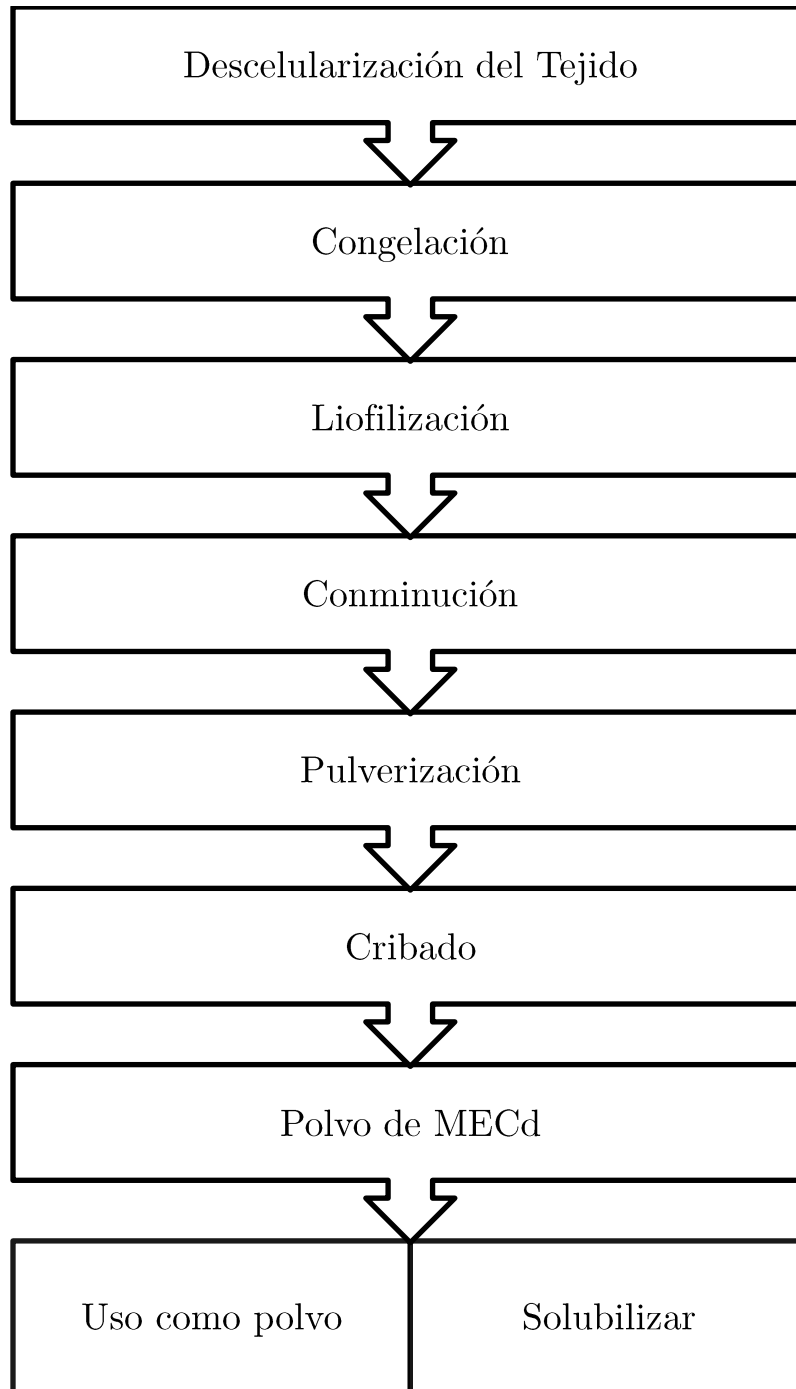


Figura 12. El esquema representa el proceso de conminución de la MEC y los pasos implicados en la fabricación del polvo. En este ejemplo, la MEC en polvo se obtiene mediante la descelularización del órgano hasta obtener el polvo [66].

Tabla 3. Beneficios de usar Polvo de MEC.

Tejido u Órgano	Aplicación del polvo de MEC	Observaciones	Ref.
Vejiga	Se evaluó la posibilidad de inducir una diferenciación osteogénica.	Se logró mantener con éxito la morfología y la viabilidad de las células e inducir marcadores osteoblásticos típicos.	[70]
Corazón	Partículas de MEC como sustituto biológico.	Mejoró la función cardíaca y aumentó la proliferación celular cuando se inyectó en dispositivos de asistencia ventricular izquierda.	[71]
Tejido adiposo	Los tejidos adiposos humanos que contienen células madre (ASC) tienen una mayor aplicación en la administración de células madre.	Los resultados de un estudio in vivo en el que se utilizó polvo de MEC sembrado con células mostraron una excelente regeneración del tejido, sin necrosis ni tejido fibroso después de 8 semanas.	[67]

3. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN, FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Con la finalidad de validar esta propuesta de biomaterial se realizaron los métodos de caracterización que se muestran en la Figura 13.

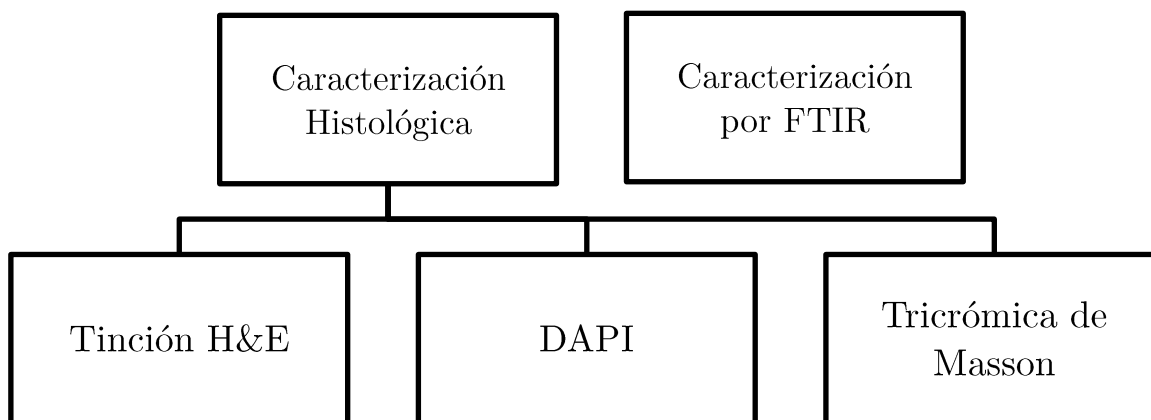


Figura 13. Métodos de caracterización propuestos.

3.1 Caracterización Histológica del Tejido

La evaluación de la eficacia del protocolo de descelularización es un aspecto fundamental en este proyecto, dicha evaluación se llevó a cabo mediante diferentes técnicas de tinción como la tinción con 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para identificar la presencia de ácidos nucleicos en el epitelio de la tráquea, mucosa y tejidos submucosos; la tinción H&E (Hematoxilina y Eosina), la cual permite visualizar las estructuras celulares y la tinción Tricrómica de Masson, que se utiliza para analizar la preservación de la colágena después del proceso de descelularización. Las muestras descelularizadas serán comparadas con las muestras nativas para evaluar la eficacia del protocolo de descelularización. En las tráqueas nativas, la MEC está compuesta principalmente por anillos de cartílago de colágena tipo II y otras proteínas estructurales llenas de proteoglicanos. El protocolo de descelularización debe garantizar la preservación de la bioquímica y eliminar entre un 70% y 80% del material celular. [72].

3.1.1 DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol)

El colorante de viabilidad DAPI es una tinción de ácido nucleico fluorescente azul que se une al ADN, se asocia con el surco menor de la molécula de ADN de doble cadena, con preferencia por los grupos de adenina – timina [73]. Es un colorante de ADN no permeable,

pero puede entrar en una membrana dañada, en donde el colorante puede interactuar con el ADN en la célula [74].

3.1.2 Hematoxilina y Eosina

La tinción Hematoxilina – Eosina (H&E), es el método de las tinciones más utilizado en investigación. Se basa en la combinación de dos colorantes: la hematoxilina que, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma [33], [75].

3.1.3 Tinción Tricrómica de Masson

La técnica histoquímica de coloración tricrómica de Masson es un método utilizado para diferenciar las estructuras celulares y del tejido conjuntivo en las secciones histológicas. Se basa en el uso de tres colorantes distintos para diferenciar tres tipos de estructuras: núcleos, citoplasma y tejido conjuntivo. El procedimiento consiste en teñir primero las secciones con un reactivo ácido de fucsina, como el ácido escarlata de Biebrich, el cual tiñe de color rojo elementos acidófilos como el citoplasma y el músculo. Luego se utilizan el ácido fosfotúngstico y el ácido fosfomolíbico, los cuales diferencian la colágena, tiñéndola de color azul, pero no el citoplasma. Por último, se utiliza la hematoxilina férrica de Weigert, que tiñe componentes basófilos, sirve para diferenciar el núcleo celular el cual se tiñe de color marrón o negro [76].

3.2 Caracterización por Espectroscopia Infrarroja por

Transformada de Fourier (FTIR)

La Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) está basada en el principio de funcionamiento del interferómetro de Michelson. Al momento en que un haz de radiación infrarroja alcanza una muestra, parte de la radiación es absorbida por la muestra y otra parte la atraviesa (se transmite). La señal resultante en el detector es un espectro que representa la huella molecular de la muestra. La utilidad de la espectroscopía de infrarrojos se debe a que distintas moléculas producen distintas huellas espectrales. La transformada de Fourier convierte la salida del detector en un espectro interpretable, ya que se obtienen interferogramas que proporcionan información estructural que facilitan la identificación de la muestra, ya que las moléculas tienen huellas específicas [77].

El método de análisis FTIR utiliza la luz infrarroja para escanear las muestras de prueba y observar las propiedades químicas. El instrumento FTIR envía una radiación infrarroja de

entre 10,000 y 100 cm^{-1} a través de una muestra. Las moléculas de la muestra convierten la radiación absorbida en energía rotacional y/o vibracional. La señal resultante en el detector se presenta como un espectro, normalmente de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , que representa una huella molecular de la muestra. Cada molécula o estructura química producirá una huella espectral única, lo que hace del análisis FTIR una gran herramienta para la identificación química [78], [79]. Con esto, es posible realizar una comparación entre los tejidos nativos y descelularizados, de tal forma que se pueda concluir si hubo daños o cambios estructurales en la MEC después de haber sido descelularizada. En el estudio actual se investiga el origen de estos posibles cambios espectrales mediante los análisis espectroscópicos e histológicos.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

EXPERIMENTAL

En este capítulo se explica a detalle el procedimiento desarrollado para la obtención del polvo. El proceso está constituido por cinco etapas, comienza con la recolección de las muestras y termina en la caracterización del polvo obtenido (ver Figura 14). Los materiales y el equipo que se utilizaron en este proyecto se muestran en la Tabla 4.

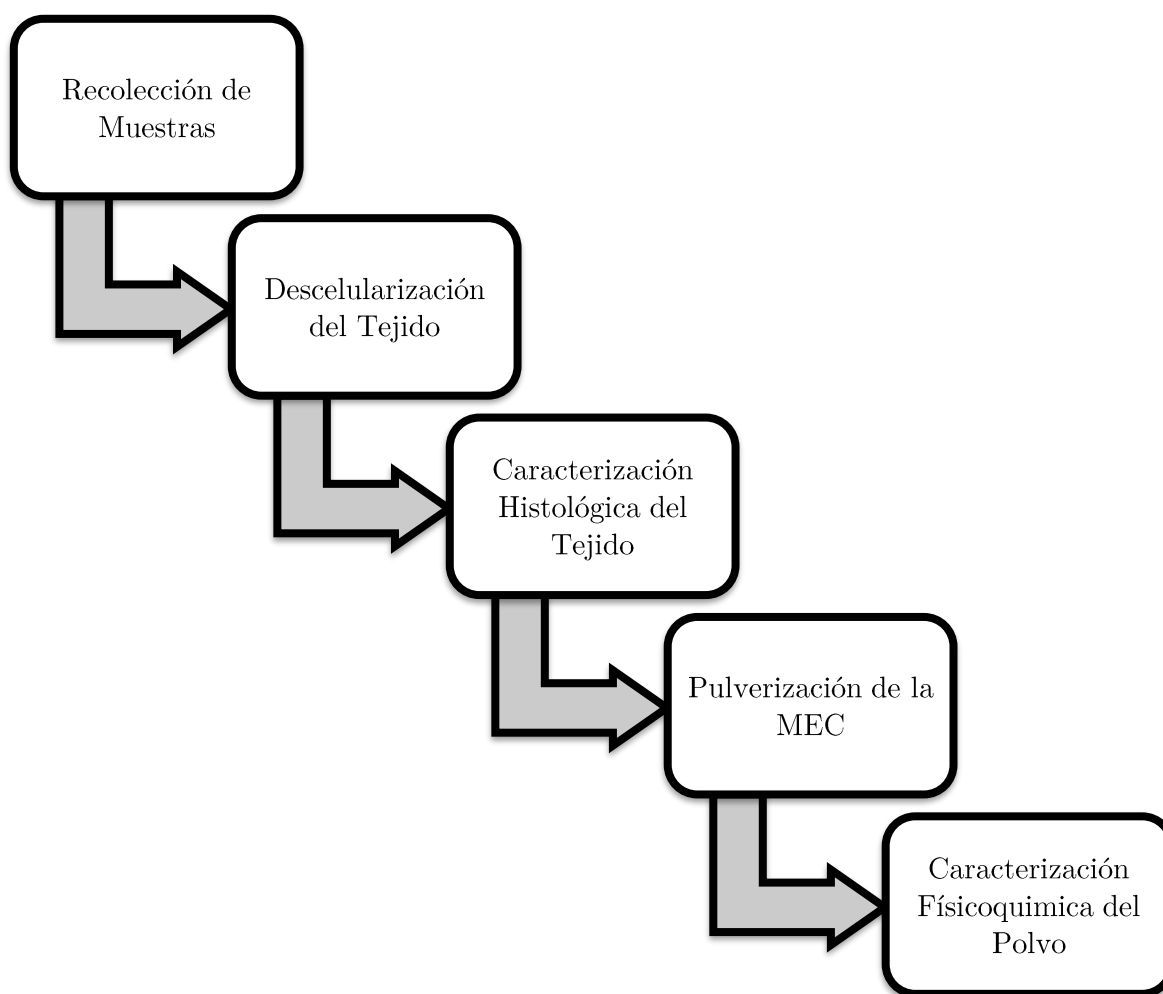


Figura 14. Diagrama de flujo de la metodología del proyecto.

4.1 Materiales

Tabla 4. Materiales y equipos utilizados en el proyecto.

Proceso	Reactivos y Equipo
Recolección de muestras de tejido traqueal	Buffer de Fosfato Salino 1X (PBS)
Descelularización del Tejido (Todas las soluciones fueron preparadas en Agua Desionizada: DIH ₂ O)	Agua Destilada Estéril Agua Desionizada (DIH ₂ O) Solución de Desoxicolato de Sodio (DOCNa) DOCNa (4% w/v) Solución de Dodecilsulfato Sódico (SDS) SDS (1% w/v) PBS 1X Solución de DNasa-I DNasa (1 µg/mL) en solución salina fosfatada de Dulbecco (DPBS)
Obtención de Muestras para Caracterización	Glutaraldehído 2.5% v/v Sacarosa 30% w/v en PBS Tissue – Tek ®
Pulverización de la MEC	Aspas extractoras de 600W Tamiz de malla número 200
Equipo	Pinzas y Tijeras Tubos de centrifuga 15 y 50 mL Agitador Oscilante Ultra congelador Placa de Petri Vasos de precipitado 50, 100, 250, 500 mL Baño ultrasónico

4.2 Recolección de Muestras

Las muestras de tráquea de rata fueron recolectadas en el departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Se disecciona la tráquea, de ser posible desde la laringe hasta los bronquios (ver Figura 15) e inmediatamente son conservadas en Buffer de Fosfato Salino 1X (PBS) para ser trasladadas al Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) en donde se descelularizará el tejido.

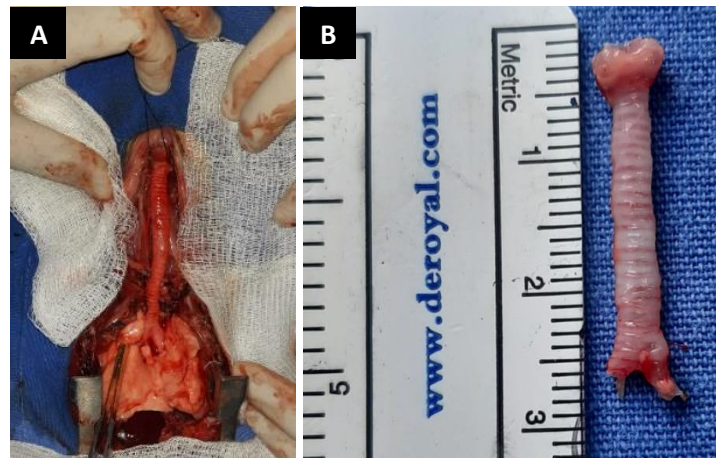


Figura 15. A) Procedimiento quirúrgico para la obtención de la tráquea, B) Escala

4.3 Descelularización del Tejido

Como ya se mencionó en el Capítulo 2, la descelularización es el proceso para aislar a la MEC de un tejido de las células que lo habitan, dejando un andamio de matriz extracelular del tejido original. El protocolo para descelularizar la tráquea de rata que se utilizó en este proyecto es una adaptación de la metodología del Dr. Meezan [80] y del Dr. Giraldo [10].

4.3.1 Preparación del Tejido

Una vez que las tráqueas están en laboratorio de biomateriales se realiza todo el proceso como se indica a continuación:

- a) Pesaje en húmedo de la muestra (500 mg)
- b) Enjuague de tráqueas con agua destilada estéril para remover el tejido conectivo circundante
- c) Remoción de las capas epiteliales y el músculo liso con el uso de pinzas y tijeras

- d) Inmersión de la muestra en 30 mL de agua desionizada estéril y en agitación por 60 minutos hasta obtener las muestras para caracterización (ver Figura 16)



Figura 16. Tráqueas sumergidas en 30 mL de agua destilada.

4.3.2 Obtención de Muestras para Caracterización

Después de concluir el proceso de preparación del tejido se realiza la toma de muestras para control y para la verificación del protocolo de descelularización por pruebas de inmunohistoquímica mediante tinción DAPI, H&E y tricrómica de Masson con el siguiente procedimiento:

- a) Obtención de un conjunto de anillos (2 o 3) como control y se conserva en PBS 1X a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$
- b) Para las pruebas de histología (H&E y Masson) y cortes en frío en criostato se obtienen dos anillos y se colocan en 15 mL de paraformaldehído 4% por 24 horas a 4°C .
 - i. Se realizan 3 lavados en PBS 1X de 60 segundos cada uno.
 - ii. Se coloca la muestra en solución de PBS y azida de sodio hasta saturarse (aproximadamente 24 horas) a 4°C .
 - iii. Una vez que se precipitó el anillo se coloca directamente en un cm^3 de medio de montaje para tejidos “Tissue – Tek ®” y se deja conservando a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- c) Para las pruebas de inmunohistoquímica se obtiene un anillo y se coloca en 15 mL de glutaraldehído 2.5% por 2 horas a 4°C (ver Figura 17).
- i. Posteriormente se realiza un enjuague con PBS y se deja en una solución de PBS y sacarosa al 30% hasta saturarse (2 horas) a 4°C.
 - ii. Una vez que se precipitó el anillo en la sacarosa se coloca directamente en un cm³ de medio de montaje para tejidos “Tissue – Tek ®” y se deja conservando a -40 °C.



Figura 17. Obtención de muestras para control y verificación del protocolo de descelularización. Tamaño promedio de los cortes realizados para cada prueba que se realizará.

4.3.3. Descelularización

Después de que se obtienen las muestras se somete todo el tejido restante al proceso de descelularización mediante lavados con detergentes y enjuagues con agua destilada estéril tal como se describe a continuación:

- a) Se colocan las tráqueas en 50 mL de desoxicolato de sodio 4X (SIGMA®) en baño de ultrasonido haciendo recambio de la solución cada hora por cuatro veces a temperatura ambiente (ver Figura 18).
- b) Se realiza un enjuague colocando la muestra en 30 mL de agua destilada estéril agitando por un minuto a temperatura ambiente (se repite por tres veces este procedimiento).
- c) Se deja la muestra en solución de SDS 1X (SIGMA®) por 12 horas a temperatura ambiente y en agitación continua.

- d) Se realiza un segundo enjuague colocando la muestra en 30 mL de agua destilada estéril agitando por un minuto a temperatura ambiente (se repite por tres veces este procedimiento).
- e) En campana de flujo laminar se realiza el cambio de solución a DNasa – I a una concentración de 0.01 mg/mL; se disuelve una alícuota de 5 μ L en 50 mL de DPBS a temperatura ambiente por 24 horas para eliminar el resto de cualquier material celular e intercelular.
- f) Finalmente, se realiza un tercer enjuague colocando la muestra en 30 mL de PBS estéril en agitación continua por una hora a temperatura ambiente para eliminar el resto de cualquier detergente (se repite cinco veces este enjuague haciendo recambio de la solución).

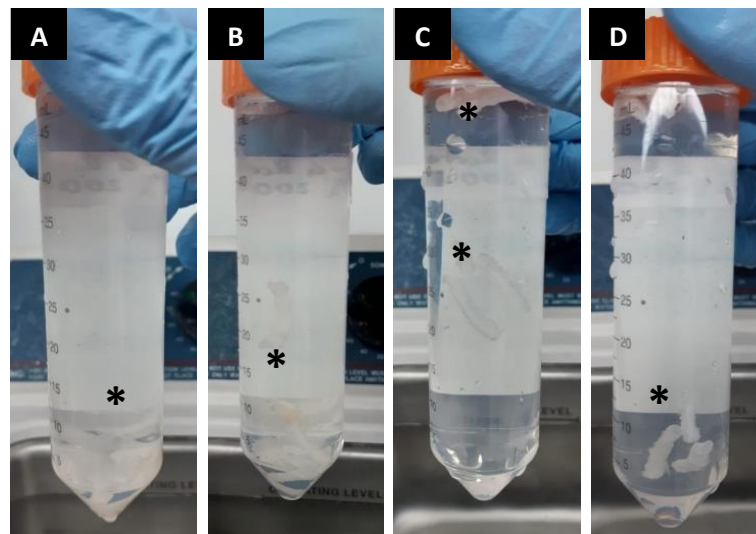


Figura 18. Resultados de la serie de lavados en DOCNa en baño de ultrasonido, los asteriscos indican el lugar en donde se encuentran las tráqueas.

4.3.4. Obtención de Muestras Post – Descelularización

Una vez que se descelularizó todo el tejido se obtienen las muestras que servirán para compararlas con los tejidos nativos (muestras obtenidas en el proceso 4.3.2). El procedimiento que se realiza se enlista a continuación:

- a) Para comprobación de descelularización por DAPI se obtiene un anillo que se fija en 15 mL de glutaraldehído 2.5% por 2 horas.

- i. Posteriormente se realiza un enjuague con PBS y se coloca en una solución de PBS y sacarosa al 30% hasta saturarse (aproximadamente 2 horas).
 - ii. Una vez que precipita el anillo en la sacarosa se coloca directamente en medio de montaje para tejidos “Tissue – Tek ®” y se conserva a -40 °C.
- b) El tejido descelularizado restante se deja conservando a -40 °C por al menos 12 horas.
- c) Finalmente, se liofiliza el tejido restante y se deja conservando a -40°C.

4.4 Verificación del Protocolo de Descelularización

La caracterización histológica se realizó de la misma manera para todas las tinciones utilizadas en este trabajo de investigación, asegurando así un proceso uniforme para todas las muestras. Los procesos de deshidratación y de inclusión se realizaron en el departamento de Ingeniería de Tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación.

4.4.1. Obtención de los Cortes en Criostato

Los cortes se realizaron en un criostato (Leica), se obtuvieron 3 cortes con un grosor de 5 µm por cada muestra tanto nativa como descelularizada y se montaron en laminillas cargadas.

4.4.2. Medio de Montaje DAPI

Para realizar el marcaje con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (abcam®), la cual es una marca fluorescente nuclear, se colocaron de 2 a 3 gotas encima de la muestra, y se movió el portaobjetos de abajo hacia arriba para que se cubriera toda la zona de la muestra, se esperaron 5 minutos y, finalmente, se colocó un cubreobjetos. Para tomar microfotografías en un microscopio Axio Zoom. V16 con Apotome.2 (Zeiss®).

4.4.3. Hematoxilina y Eosina (H&E)

Tal como se mencionó antes, todos los cortes se trabajaron en frío por lo que no fue necesario el proceso de rehidratación en los cortes tal como se haría si se hubiesen trabajado en parafina, por lo que se fijan las muestras con un lavado de etanol y se continúa directamente con el proceso de tinción (ver Tabla 5) y se finaliza con el proceso de deshidratación (ver Tabla 6). Con dicha tinción se espera observar las estructuras basófilas, como los núcleos celulares en todo azul, gracias a la hematoxilina, mientras que la eosina teñirá las estructuras acidófilas de color rosa o rojo, tales como el citoplasma y la mayoría de los tejidos.

Tabla 5. Tinción H&E.

Solución	Tiempo
Hematoxilina de Harris	6 minutos
Enjuague con agua corriente a flujo constante	5 minutos
Etanol con ácido clorhídrico al 1% v/v	2 inmersiones (al menos 2 segundos)
Enjuague con agua corriente a flujo constante	1 minutos
Disolución Saturada de carbonato de Litio	2 inmersiones (al menos 2 segundos)
Enjuague con agua corriente a flujo constante	10 minutos
Etanol 80% pre – eosina	2 minutos
Eosina solución de trabajo	2 minutos
Etanol 96% (1) tinción	30 segundos
Etanol 96% (2) tinción	30 segundos

Tabla 6. Proceso de Deshidratación.

Solución	Tiempo
ETOH 96% 1	30 segundos
ETOH 96% 2	30 segundos
ETOH 100% anhidro 1	30 segundos
ETOH 100% anhidro 2	30 segundos
Xilol 1	2 minutos
Xilol 2	5 minutos
Montar las laminillas con resina y cubre objetos	

4.4.4. Tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson toma su nombre de los tres colorantes que se utilizan en esta técnica, hematoxilina férrica, azul de anilina y fucsina, que se caracterizan por teñir los elementos acidófilos como el músculo, el citoplasma y la queratina de color rojo, los núcleos celulares de azul oscuro o negro y la colágena de color azul (ver Tabla 7) [81]. El proceso de deshidratación corresponde con el descrito en la Tabla 6.

Tabla 7. Tinción Tricrómica de Masson.

Solución	Tiempo
Solución de Bouin	12 horas a temperatura ambiente
Enjuague con agua corriente a flujo constante	3 minutos o hasta aclarar las secciones
Enjuague con agua destilada	30 segundos
Hematoxilina de hierro de Weigert	10 minutos
Enjuague con agua corriente a flujo constante	10 minutos
Enjuague con agua estilada	30 segundos
Fucsina ácida – escarlata de Biebrich	15 minutos
Enjuague con agua destilada	10 inmersiones (al menos 20 segundos)
Sol. Ácido fosfotúngstico – fosfomolibdico	15 minutos
Solución azul de anilina	10 minutos
Enjuague con agua destilada	10 inmersiones (al menos 20 segundos)
Ácido acético al 1%	3 – 5 minutos
ETOH 96% 1 tinción Masson	30 segundos
ETOH 96% 2 tinción Masson	30 segundos

Una vez que se realizaron todas las tinciones y los procesos de deshidratación de las laminillas se fijaron con resina y se dejaron secar por 24 horas antes de proceder a la

observación en microscopio Axio Zoom tanto del Departamento de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM como del mismo Instituto Nacional de Rehabilitación.

4.5 Pulverización de la Matriz Extracelular Descelularizada

Una vez que se ha descelularizado al tejido, se debe pulverizar la MECd, el método que se realizará se describe en la Figura 19.

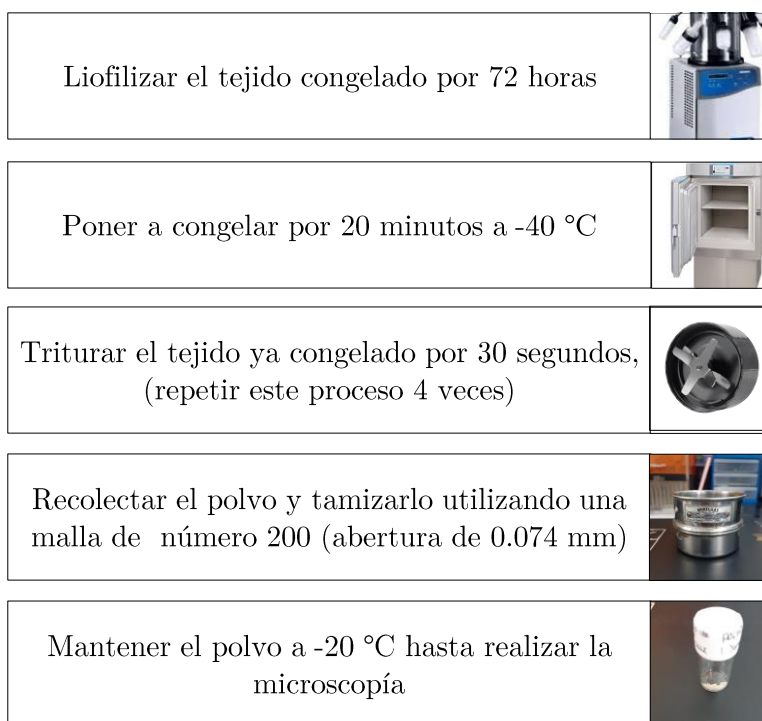


Figura 19. Esquema del proceso de pulverización de la MECd.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 Evaluación Mediante Tinciones DAPI, H&E y Tricrómica de Masson

Este trabajo contempla diversas caracterizaciones que prueban la eficacia del protocolo de descelularización empleado. Macroscópicamente se observó un cambio gradual de color durante el proceso de descelularización hasta llegar a estar completamente en un tono blanco semitransparente, reteniendo su estructura anatómica macroscópica (ver Figura 20).

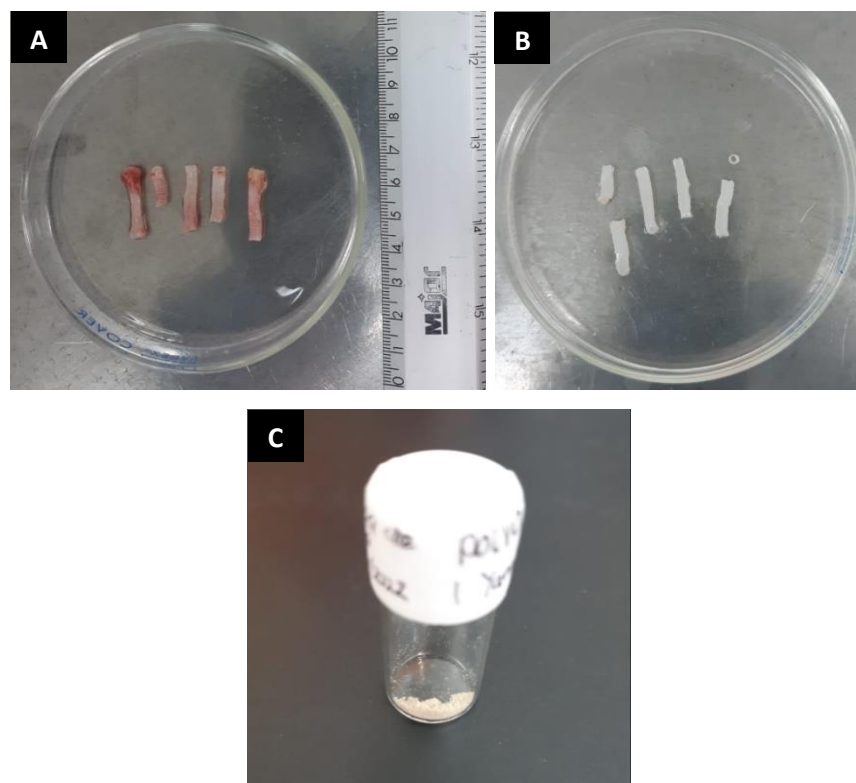


Figura 20. Comparación entre tráquea nativa de rata (A) y tráquea descelularizada de rata; (B) aplicando el protocolo de descelularización propuesto; C) Polvo de MECd obtenido.

Posterior a las tinciones con H&E y DAPI, se midió la efectividad del proceso de descelularización utilizando el software de análisis de imágenes Image J para cuantificar los núcleos celulares en las micrografías observadas y obtenidas con el microscopio Axio Zoom (ver Figuras 21 y 22). Se tomó en cuenta la medida mínima del diámetro de los núcleos celulares de los condrocitos $5\ \mu\text{m}$ y su equivalencia en pixeles de acuerdo con el aumento de la imagen (10X y 20X) [32], [33].

5.1.1. Tinción H&E

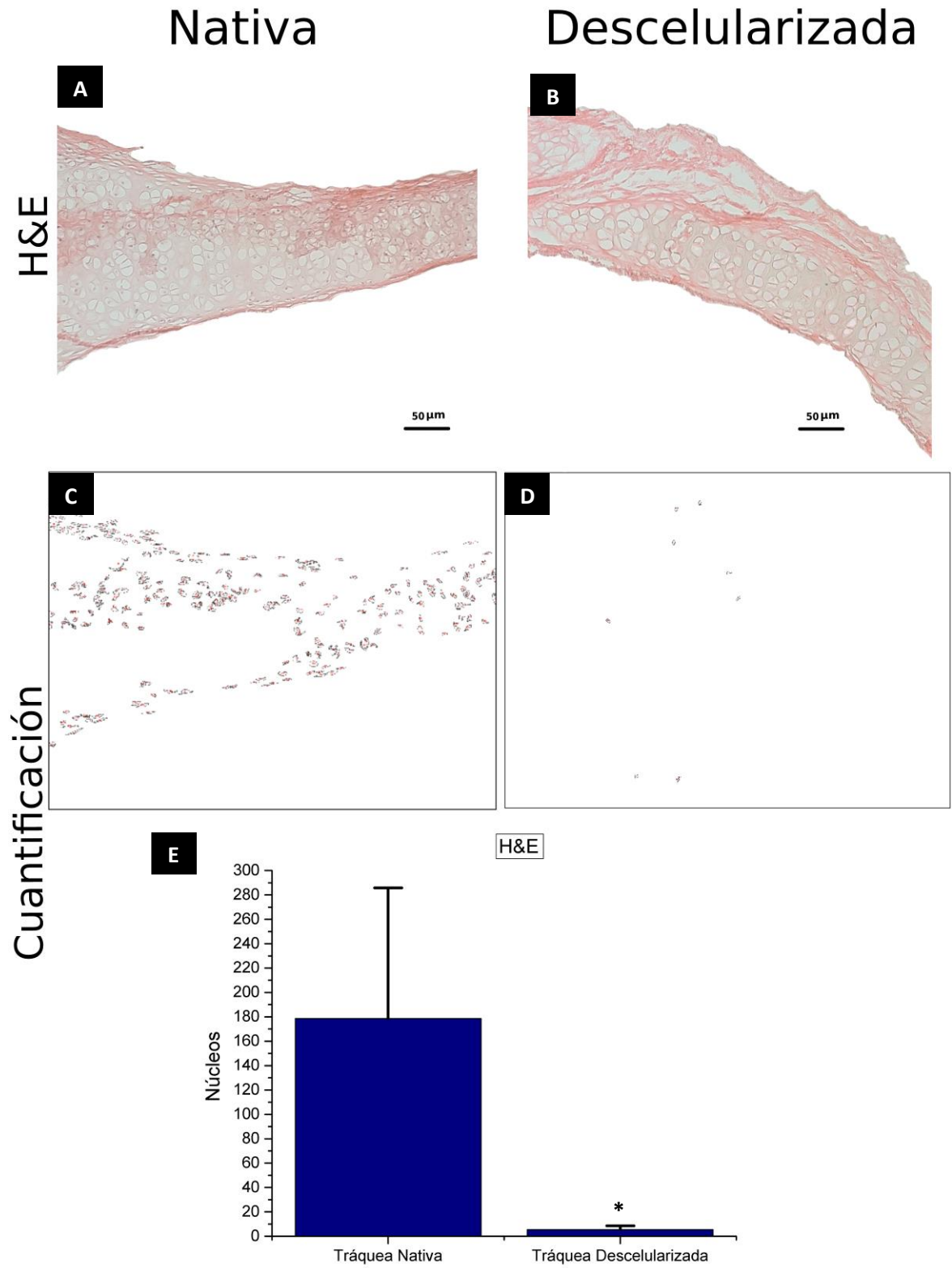


Figura 21. Análisis del proceso de descellularización por tinción H&E.

Se observan las micrografías de las muestras de los cortes de tráquea tras el proceso de tinción H&E (A y B), en donde se observa la remoción del material nuclear posterior a la aplicación del protocolo de descelularización propuesto, se aplicó un aumento mayor a dichas micrografías de tal forma que los núcleos celulares puedan ser reconocidos y cuantificados por el software Image J, como resultado del procesamiento de las microfotografías se muestran las imágenes C y D. Para obtener estos resultados de cuantificación se utilizaron 5 muestras y 25 micrografías tanto de tráquea nativa como descelularizada, se mostró una diferencia significativa de la cantidad de núcleos celulares presentes ($*p < 0.05$) realizando una prueba t de student pareada (E).

Para conocer la efectividad del protocolo de descelularización, se calculó el promedio de descelularización de los cortes histológicos de tráquea tanto nativa como descelularizada, los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, en la que se menciona que el porcentaje de descelularización mínimo para poder utilizar los andamios en las aplicaciones de Ingeniería de Tejidos debe ser entre 70% y 80%, la evaluación utilizando la tinción H&E se encuentran por encima de este rango tal como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Evaluación del protocolo de descelularización usando H&E.

Efectividad del Protocolo de Descelularización Utilizando la Tinción H&E		
Tejido	Porcentaje de Descelularización	Desviación Estándar
Tráquea de rata	90.35%	±3.17%

5.1.2. Tinción DAPI

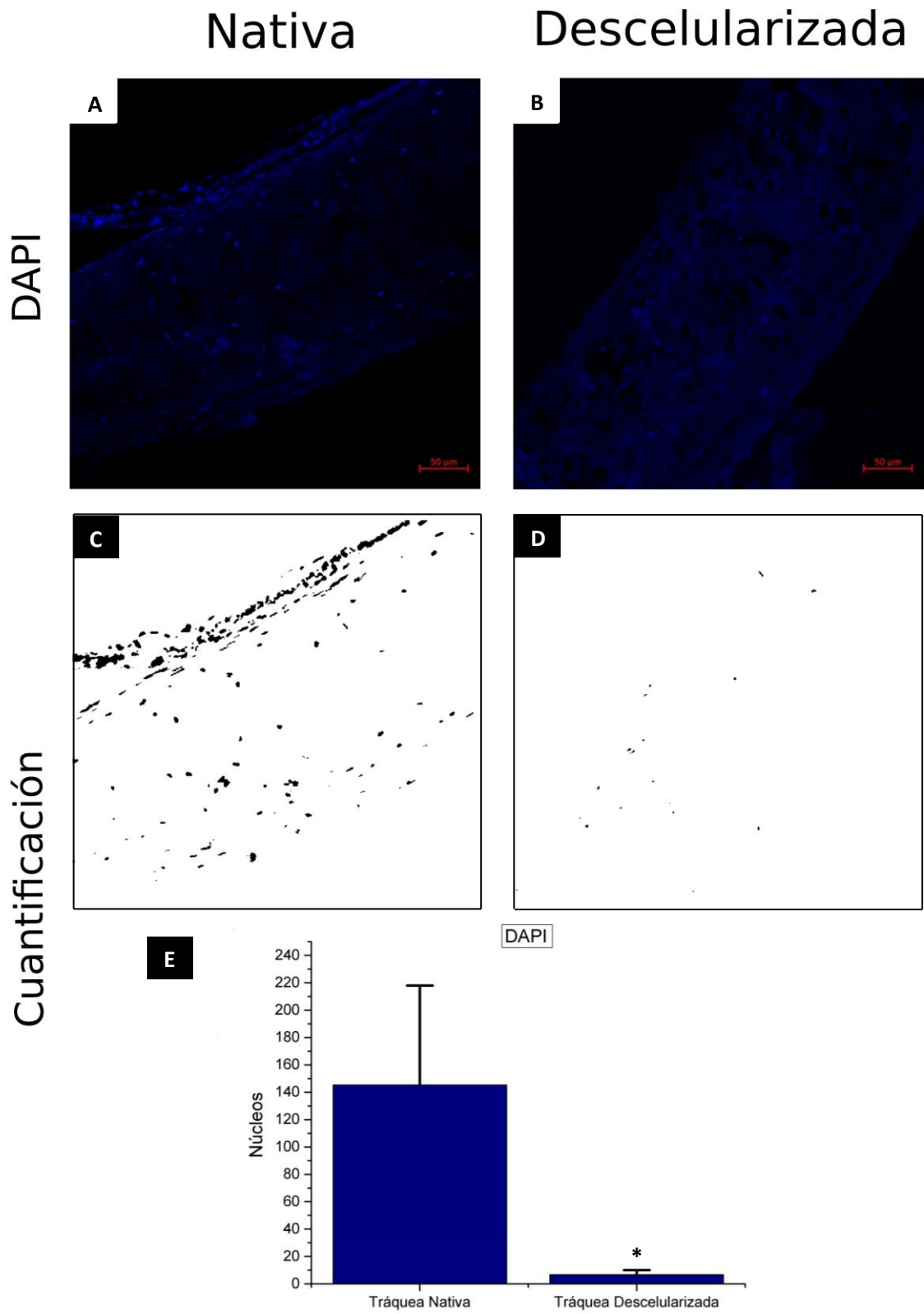


Figura 22. Análisis del proceso de descelerización mediante tinción DAPI.

Se observan las micrografías de las muestras de los cortes de tráquea tras el proceso de tinción DAPI (A y B), en donde al igual que en la tinción H&E se observa la remoción del material nuclear posterior a la aplicación del protocolo de descelularización, en este caso no fue necesario realizar un aumento a las microfotografías, ya que con ese aumento los núcleos eran detectables para el software Image J, como resultado del procesamiento de las microfotografías se muestran las imágenes C y D. Con los resultados de la cuantificación de 5 muestras y 10 microfotografías de tráquea tanto nativa como descelularizada se mostró una diferencia significativa de la cantidad de núcleos celulares presentes (*p < 0.05) realizando una prueba t de student pareada (E).

Los resultados obtenidos en esta tinción también concuerdan con lo reportado en la literatura, puesto que se obtiene un porcentaje de descelularización del $90.26 \pm 5.49\%$, (ver Tabla 9).

Tabla 9. Evaluación del protocolo de descelularización usando DAPI

Efectividad del Protocolo de Descelularización Utilizando la Tinción DAPI		
Tejido	Porcentaje de Descelularización	Desviación Estándar
Tráquea de rata	90.26%	$\pm 5.49\%$

5.1.3. Análisis Cualitativo de la Tinción Tricrómica de Masson

La tinción de Tricrómica de Masson permite distinguir el citoplasma en coloración violeta, mientras que las fibras de colágena se muestran en color azul. Al comparar las muestras nativas con las muestras descelularizadas, es posible observar la pérdida de material celular casi por completo, mientras que las fibras de colágena de la MEC se mantienen con la morfología y densidad de las muestras nativas (ver Figura 23) [33], [82].

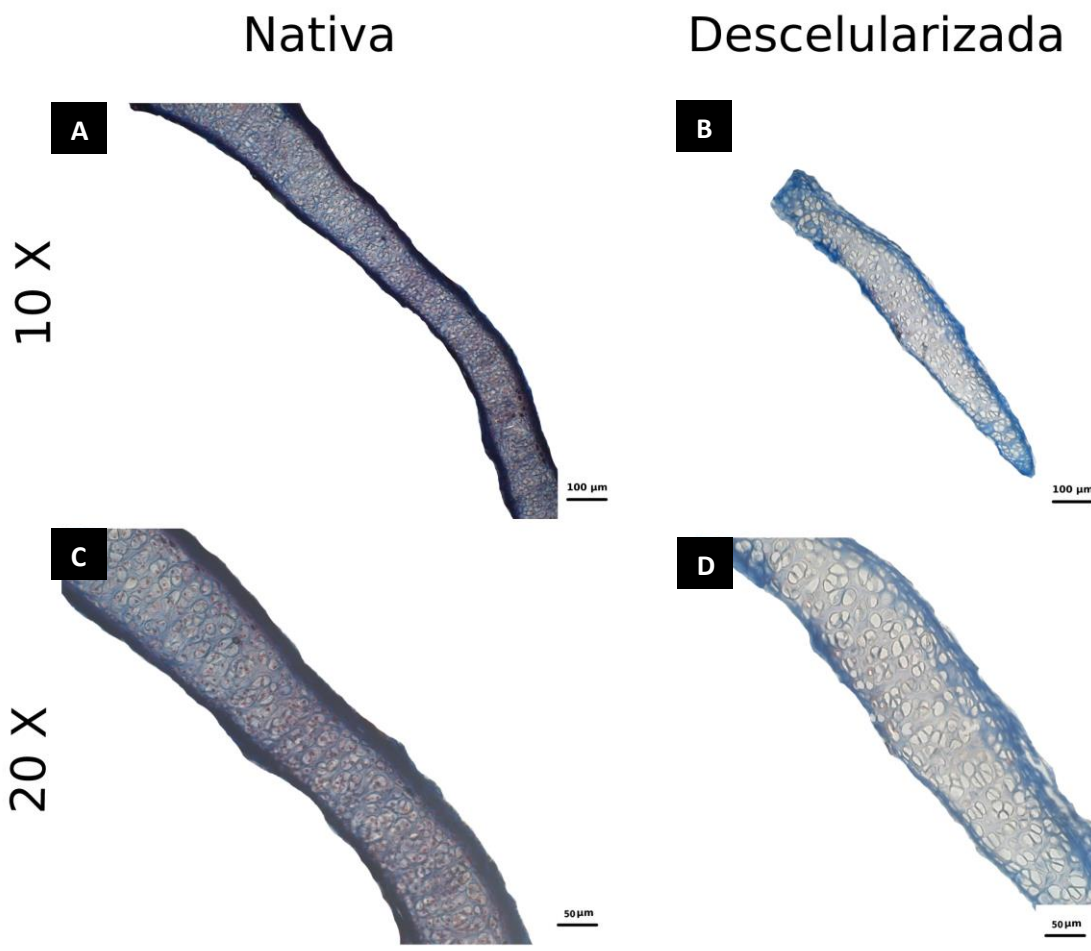


Figura 23. Análisis de la composición de la MEC utilizando la tinción Tricrómica de Masson.

5.2 Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Para poder realizar el análisis fisicoquímico de la MECd mediante la espectrometría FTIR se preparó la muestra como se indica a continuación.

Una vez que el tejido ha sido descelularizado y se ha comprobado mediante la caracterización histológica, se debe de quedar conservando a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, se liofiliza por 48 horas y se pesan 10 mg de tejido que serán utilizados para obtener el espectro infrarrojo por transformada de Fourier; el resto del tejido se debe de quedar conservando a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para obtener los espectros se utilizó el espectrómetro de Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), Nicolet 6700 FT-IR de Thermo Scientific del Instituto de Investigaciones en Materiales (ver Figura 24), el cual al contar con el accesorio de Reflectancia Total Atenuada (ATR) nos permite obtener los espectros infrarrojos de muestras sin ningún tipo de preparación, por lo que es posible analizar el polvo obtenido.

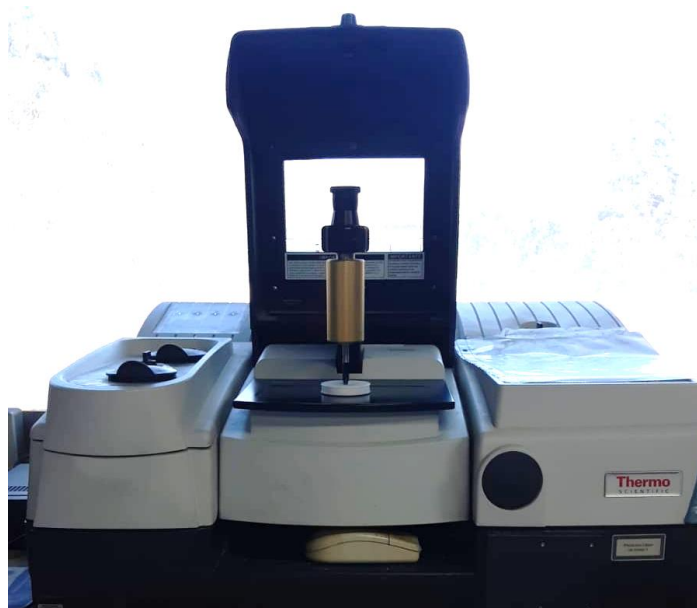


Figura 24. Equipo Nicolet 6700 FT-IR de Thermo Scientific en el IIM.

El espectro FTIR del polvo de MECd de tráquea de rata obtenido por esta técnica revela los picos típicos característicos de las amidas A, B, I, II y III (ver Figura 25) los cuales están asociados con la conformación especial de triple hélice de la colágena fibrilar intacta [83].

Un grupo funcional es un tipo de enlace atómico que caracteriza a una clase de compuesto químico. Cada grupo funcional determina las propiedades químicas específicas de cada una de las sustancias que lo poseen, en otras palabras, determina su función química. En un espectro de FTIR existe una región, entre $4,000$ y $1,500\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la región media en el intervalo IR del espectro electromagnético en la cual se hallan los grupos

funcionales, por lo tanto, en esa zona es posible identificar picos provenientes de grupos funcionales [79].

A continuación, se presenta una descripción de las bandas de los espectros obtenidos que se muestran en las Figuras 25, 26, 27 y 28.

La banda de amida A está asociada a la frecuencia del estiramiento N – H a aproximadamente un número de onda de 3300 cm^{-1} . La banda amida B aparece en un número de onda de 3068 cm^{-1} y está asociada al estiramiento N – H libre. A un número de onda de 2924 cm^{-1} aparece la banda asociada al estiramiento C – H. A 1750 cm^{-1} se perciben bandas de intensidad media asociadas a estiramientos del grupo éster C = O de lípidos, siendo más intenso en la muestra nativa respecto de la descelularizada. A 1644 cm^{-1} se encuentra la banda amida I asociada mayoritariamente a las vibraciones del grupo carbonilo del enlace peptídico C = O. A 1550 cm^{-1} se observa la banda amida II. Aproximadamente a 1450 cm^{-1} se encuentra la banda de prolina. Entre 1400 y 1300 cm^{-1} se perciben bandas de intensidad media asociadas a estiramientos C – N. A 1250 cm^{-1} se encuentra la banda característica amida III correspondiente a la deformación N – H asociada a aminas terciarias y aminas cíclicas. Finalmente, entre 1100 y 1005 cm^{-1} se encuentran bandas de baja intensidad asociadas a las deformaciones C – O – H, C – O y C – O – C de restos de carbohidratos y torsiones fuera de plano de ácidos carboxílicos comúnmente asociado a los GAGs (ver Figura 7) [79], [84].

Comparando la muestra nativa y la muestra descelularizada es posible observar que se mantienen los mismos grupos funcionales (ver Figura 25), y considerando los resultados obtenidos de la caracterización biológica se puede observar que se ha conservado la MEC de la tráquea después de los tratamientos realizados para descelularizarla. Otra manera semicuantitativa de demostrar esta conservación es mediante la relación entre las bandas amida III/prolina. Riaz y colaboradores en su revisión sobre la aplicación de FTIR a colágenos naturales y sintéticos reportaron la relación entre la intensidad de algunas bandas, entre ellas la relación entre la amida III/prolina, con el fin de establecer la desnaturalización de las proteínas por efectos térmicos cuando se reduce la estructura helicoidal [85]. En el estudio realizado por la Dra. Vitale y colaboradores, utilizaron esta misma relación como indicador de que la estructura helicoidal de la colágena se encuentra bien conservada lo cual ocurre cuando el valor del cociente tiende a ser cercano a la unidad [84]. En la Figura 26 se observa que el valor de absorbancia que corresponde con la amida III es aproximadamente 11.6 y el valor de la absorbancia correspondiente con la banda asociada a la prolina es 13 por lo que la relación queda:

$$\frac{\text{Amida III}}{\text{Prolina}} = \frac{11.6}{13} = 0.9$$

Siendo 0.9 un valor cercano a uno corroborando que la MECd es similar en comparación a la MEC nativa.

La prolina es uno de los aminoácidos que se encuentra en mayor cantidad y también es el que se ve más afectado cuando la estructura helicoidal se rompe. La pérdida de este aminoácido se ve reflejada como reducciones en la intensidad de ese pico [84]. Esto fue reportado por Stafford et al, en un trabajo en el cual comparó la composición de aminoácidos en la colágena extraída de diversas fuentes y con distintos métodos de conservación [86].

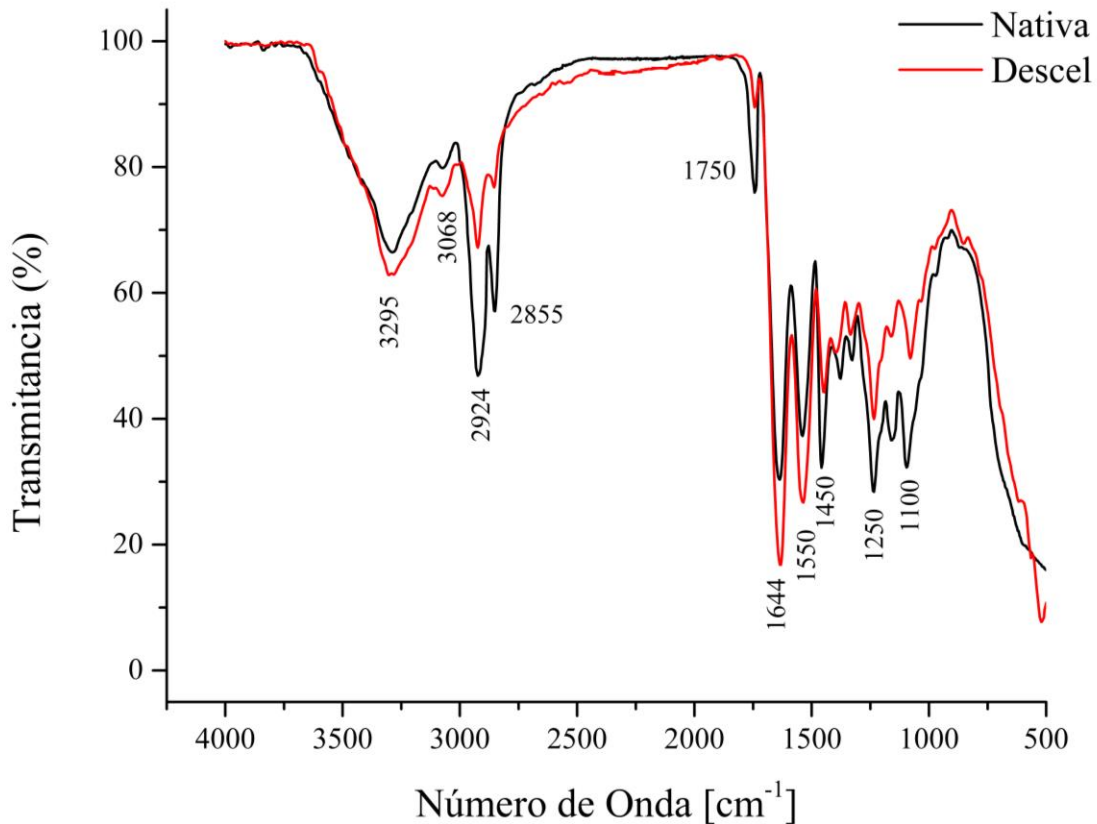


Figura 25. Comparación entre espectros FTIR de la muestra nativa y la muestra descelularizada.

En este estudio también se realizó una comparación de nuestra muestra descelularizada con cartílago de tráquea bovina liofilizado de la marca Sigma Aldrich (ver Figura 27). Se encontró que los espectros son similares.

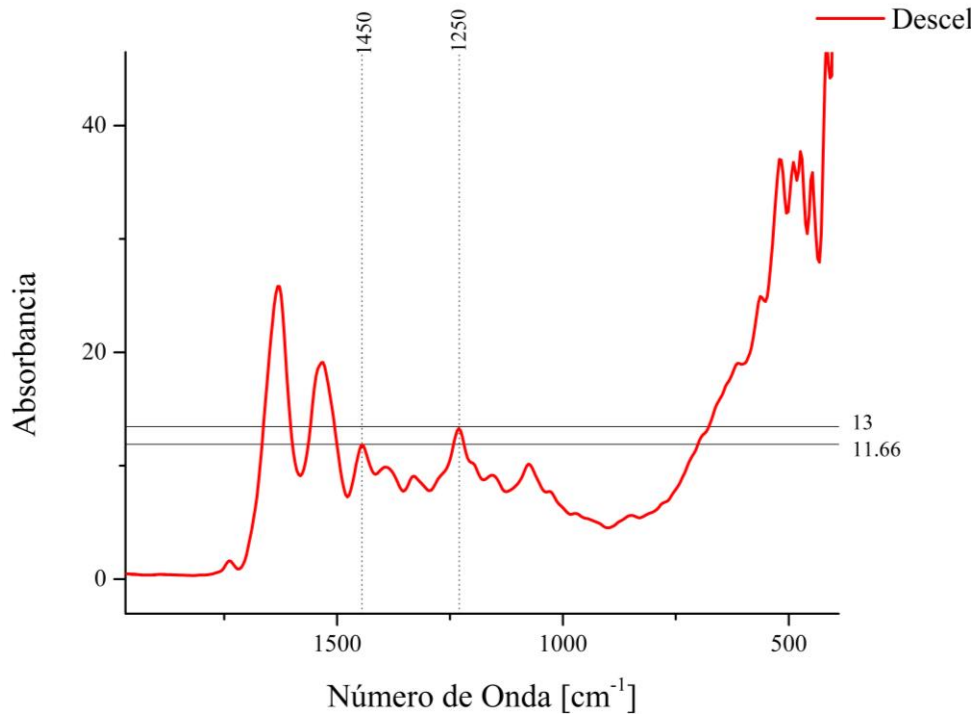


Figura 26. Espectro FTIR de la muestra descelularizada.

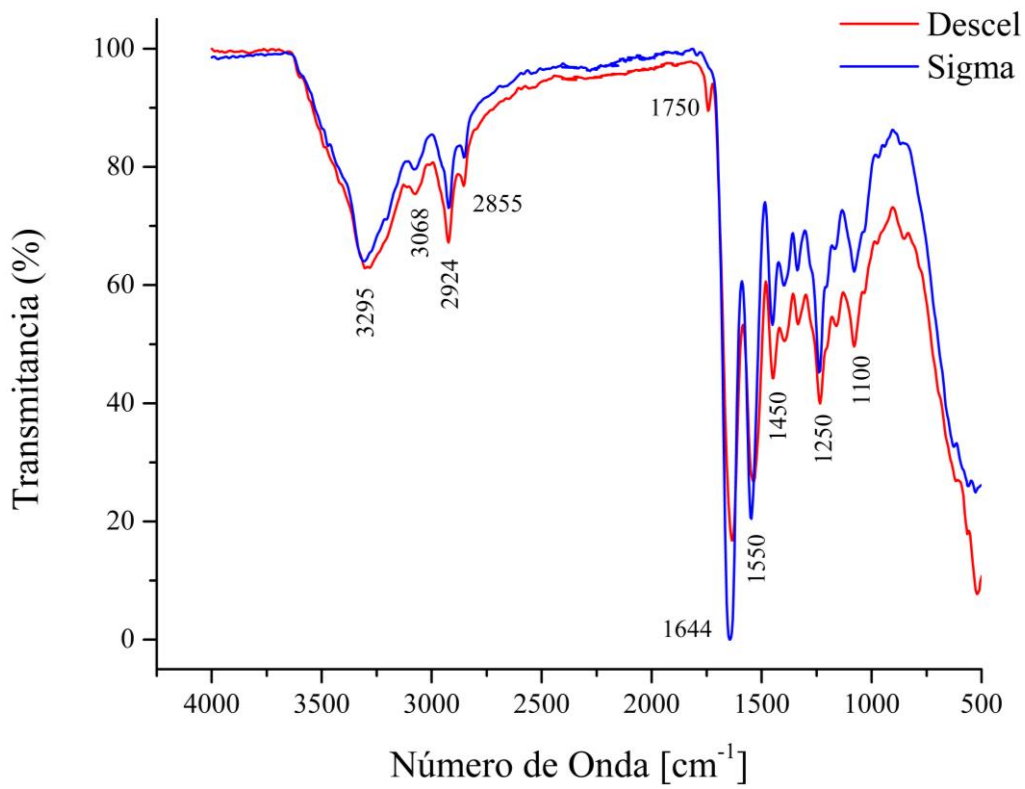


Figura 27. Comparación entre espectros FTIR de la muestra descelularizada y el cartílago de tráquea bovino liofilizado.

En la Tabla 10 se presenta la relación entre los picos observados por FTIR de acuerdo con su número de onda.

Tabla 10. Relación del número de onda con el grupo funcional asociado.

Grupo Funcional	Número de onda [cm^{-1}]
Amida A	3295
Amida B	3068
Enlace C – H	2924
Enlace C – O	1750
Amida I	1644
Amida II	1550
Prolina	1450
Amida III	1250
GAGs	1100

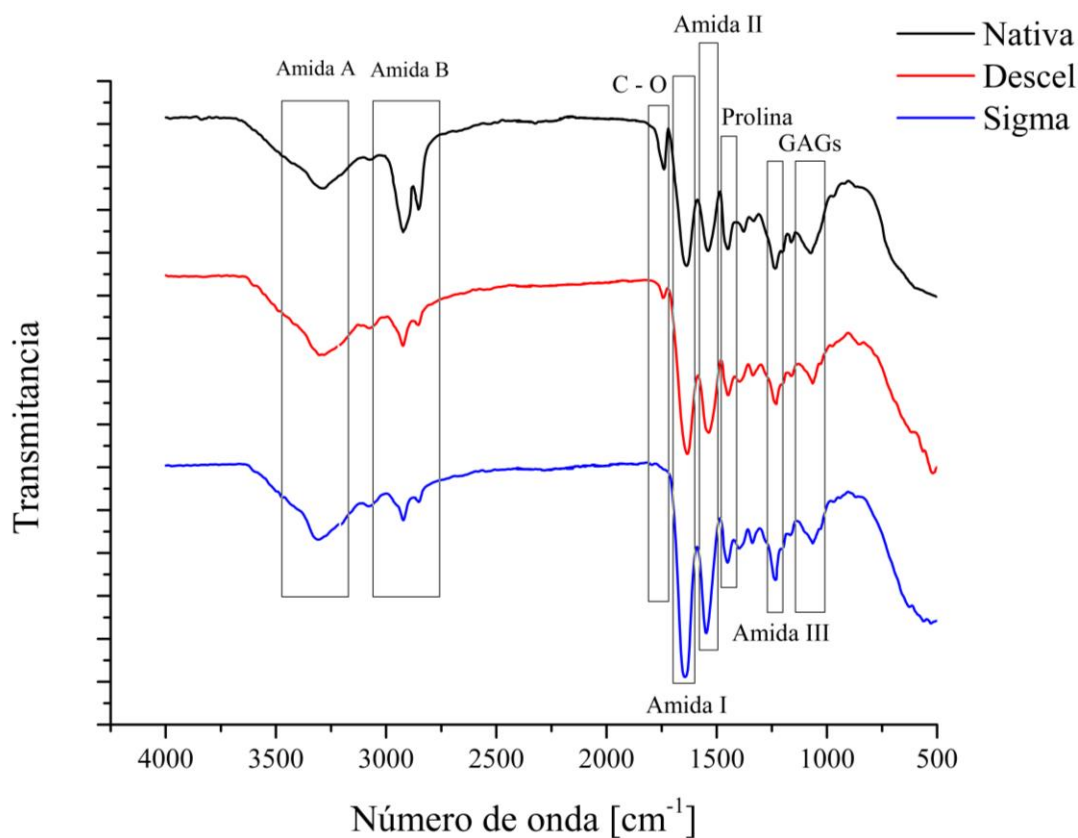


Figura 28. Comparación entre espectros FTIR de la muestra nativa, la muestra descelularizada y el cartílago de tráquea bovino liofilizado.

6. DISCUSIÓN

En este proyecto se ha obtenido un biomaterial en polvo derivado de tejido traqueal, el cual está planeado para ser utilizado en el desarrollo de andamios celulares en la IT y servir como una herramienta para fabricar modelos complejos de segmentos traqueales. Hemos descelularizado con éxito la tráquea de rata, lo cual fue comprobado con un análisis histológico (H&E) e inmunohistoquímico (DAPI), en ambos casos se obtuvo un porcentaje de descelularización cercano al 90%. Es fundamental resaltar que en el proceso de descelularización es crucial garantizar la ausencia de moléculas de SDS. La presencia de moléculas de SDS se relaciona directamente con la viabilidad celular en el material, dado que alteran las membranas celulares hasta causar su muerte, y ocasionan daños severos a los GAGs y a la proteína elastina [87]. Con el fin de evitar la adhesión y/o filtración de dichas moléculas en la MEC, se llevaron a cabo múltiples ciclos de lavado utilizando PBS y agua desionizada estéril.

La presencia de colágena en la MEC se puede confirmar con las imágenes de la tinción tricrómica de Masson en las cuales se muestran las fibras de colágena teñidas en color azul en las muestras descelularizadas; sin embargo, Novaes et al. compararon diversas técnicas para evaluar el contenido de colágena y observaron que los datos obtenidos mediante la tinción de Masson es la menos confiable respecto a otras tinciones como PicroSirus Red o técnicas bioquímicas como determinación de hidroxiprolina, ya que la tinción de Masson también tiñe moléculas como glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas, características que denotan su inespecificidad para determinar el contenido real de colágena [88], por lo que en este proyecto realizamos además del estudio histológico, el análisis de la MEC y MECd mediante FTIR – ATR. En la caracterización por FTIR se observan las bandas características reportadas en las colágenas fibrosas formadas de hélices (I, II, III y V) lo cual es un indicador de la integridad estructural de la molécula [89].

Se logró mantener la estructura de la colágena, lo cual fue comprobado mediante el estudio FTIR – ATR y la relación amida III/prolina; con esta relación se puede obtener una medida semi cuantitativa de la conservación de la colágena, entre más cercana se encuentre a la unidad mejor conservada estará la estructura de la colágena, ya que la amida III está asociada a la deformación N – H de aminas cíclicas.

En la Figura 25 se puede apreciar una disminución en la pico ubicado en la región de los lípidos a 1750 cm^{-1} en la MECd con respecto a la nativa, disminución que puede estar

relacionada con el decremento del material celular, específicamente de la membrana celular la cual se rompe durante el proceso de descelularización.

Respecto a la conservación de los GAGs se puede observar en la gráfica de la Figura 28 que se encuentran presentes, recordando que los principales en la matriz del cartílago son: ácido hialurónico, sulfato de condroitina y queratán sulfato.

7. CONCLUSIONES

Se logró alcanzar el objetivo general del proyecto, que consiste en la obtención de la matriz extracelular de tráquea, como se demuestra a través de los resultados obtenidos en las caracterizaciones histológicas y por FTIR.

La creciente necesidad de contar con opciones adicionales en los tratamientos de enfermedades de la tráquea que requieren cirugía ha ampliado los límites de la Ingeniería de Tejidos, en busca de un enfoque alternativo para comprender y abordar dichas enfermedades.

El propósito de este estudio ha sido demostrar la posibilidad de obtener un biomaterial en polvo que contenga la MEC. Nuestro protocolo de descelularización ha demostrado su eficacia al preservar la integridad de la matriz extracelular del tejido, eliminando aproximadamente el 90% de las células, como se ha confirmado mediante las técnicas histológicas H&E y DAPI.

Además, mediante la tinción tricrómica de Masson y la técnica FTIR, hemos verificado la composición del polvo obtenido, constatando la presencia de colágeno tipo II, característico de este tejido, así como la conservación de los glicosaminoglicanos.

En conclusión, nuestros resultados respaldan de manera contundente la obtención exitosa de la MEC de tráquea mediante nuestro protocolo de descelularización. Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en la aplicación de este biomaterial en el desarrollo de enfoques innovadores para el tratamiento de enfermedades de la tráquea, ofreciendo una potencial alternativa terapéutica para los pacientes que lo requieren.

REFERENCIAS

- [1] R. V.G., J. Wilson, L. V. Thomas, and P. D. Nair, "Assessing the 3D Printability of an Elastomeric Poly(caprolactone- co-lactide) Copolymer as a Potential Material for 3D Printing Tracheal Scaffolds," *ACS omega*, vol. 7, no. 8, pp. 7002–7011, Mar. 2022.
- [2] "Las 10 principales causas de defunción." [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. [Accessed: 24-Jun-2022].
- [3] H. Etienne *et al.*, "Tracheal replacement," *Eur. Respir. J.*, vol. 51, no. 2, 2018.
- [4] A. A. Abouarab, H. H. Elsayed, H. Elkhayat, A. Mostafa, D. C. Cleveland, and A. El Nori, "Current solutions for long-segment tracheal reconstruction," *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 23, no. 2, pp. 66–75, 2017.
- [5] R. Belsey, "Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea," *Br. J. Surg.*, vol. 38, no. 150, pp. 200–205, 1950.
- [6] H. C. Grillo, "Tracheal replacement: A critical review," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 73, no. 6, pp. 1995–2004, 2002.
- [7] S. V. Murphy and A. Atala, "3D bioprinting of tissues and organs," *Nature Biotechnology*, vol. 32, no. 8. Nature Publishing Group, pp. 773–785, 2014.
- [8] P. Selcan Gungor-Ozkerim, I. Inci, Y. Shrike Zhang, A. Khademhosseini, and M. Remzi Dokmeci, "Bioinks for 3D bioprinting: an overview HHS Public Access," vol. 6, no. 5, pp. 915–946, 2018.
- [9] N. T. Remlinger *et al.*, "Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction," *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3520–3526, 2010.
- [10] D. M. Giraldo-Gomez *et al.*, "Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 105, Dec. 2019.
- [11] S. W. Bae *et al.*, "3D bioprinted artificial trachea with epithelial cells and chondrogenic-differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 6, Jun. 2018.
- [12] D. Y. Kim *et al.*, "Tissue-engineered allograft tracheal cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation," *Laryngoscope*, vol. 120, no. 1, pp. 30–38, Jan. 2010.
- [13] M. Costantini *et al.*, "3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for in vitro neocartilage formation," *Biofabrication*, vol. 8, no. 3, Jul. 2016.

- [14] N. Khoshnood and A. Zamanian, “Decellularized extracellular matrix bioinks and their application in skin tissue engineering,” *Bioprinting*, vol. 20, p. e00095, 2020.
- [15] C.-C. Chen *et al.*, “The Physicochemical Properties of Decellularized Extracellular Matrix-Coated 3D Printed Poly(ϵ -caprolactone) Nerve Conduits for Promoting Schwann Cells Proliferation and Differentiation,” *Materials*, vol. 11, no. 9. 2018.
- [16] E. Bianchi *et al.*, “Innovative Strategies in Tendon Tissue Engineering.,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 1, Jan. 2021.
- [17] S. C. Pedroza-González, M. Rodríguez-Salvador, B. E. Pérez-Benítez, M. M. Alvarez, and G. T. Santiago, “Bioinks for 3D Bioprinting: A Scientometric Analysis of Two Decades of Progress.,” *Int. J. bioprinting*, vol. 7, no. 2, p. 333, 2021.
- [18] F. Al-Hakim Khalak, F. García-Villén, S. Ruiz-Alonso, J. L. Pedraz, and L. Saenz-Del-Burgo, “Decellularized Extracellular Matrix-Based Bioinks for Tendon Regeneration in Three-Dimensional Bioprinting.,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 21, Oct. 2022.
- [19] A. J. Rouvière, Nathan and Scobell., *Anatomía Humana Descriptiva, topográfica y funcional. Tomo 1. Cabeza y cuello 11.^a ed.*, vol. 1, no. 5. 2005.
- [20] J. M. Prades and S. Chardon, “Anatomía y fisiología de la tráquea,” *EMC - Otorrinolaringol.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–12, 2000.
- [21] D. Hellín Meseguer and R. Arce Martínez, “Anatomía del cuello,” *Man. Otorrinolaringol. Infant.*, pp. 397–412, 2012.
- [22] D. J. Minnich and D. J. Mathisen, “Anatomy of the Trachea, Carina, and Bronchi,” *Thorac. Surg. Clin.*, vol. 17, no. 4, pp. 571–585, Nov. 2007.
- [23] S. K. Epstein, “Anatomy and physiology of tracheostomy,” *Respir. Care*, vol. 50, no. 4, pp. 476–482, Apr. 2005.
- [24] C. F. MACKENZIE, T. C. MCASLAN, B. SHIN, D. SCHELLINGER, and M. HELRICH, “The Shape of the Human Adult Trachea,” *Anesthesiology*, vol. 49, no. 1, pp. 48–49, Jul. 1978.
- [25] B. E. M. Brand-Saberi and T. Schäfer, “Trachea: Anatomy and physiology,” *Thorac. Surg. Clin.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–5, 2014.
- [26] “Pressure.” [Online]. Available: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbasees/ppois.html>. [Accessed: 15-May-2022].
- [27] J. PFITZNER, “Poiseuille and his law,” *Anaesthesia*, vol. 31, no. 2, pp. 273–275, 1976.
- [28] L. Bertolaccini, E. Prisciandaro, and L. Spaggiari, “Commentary: Go with the flow: The biophysical aspects of tracheal reconstructions.,” *JTCVS techniques*, vol. 10. United States, pp. 561–562, Dec-2021.

- [29] F. García Ríó, V. Lores, and B. Rojo, “Evaluación funcional respiratoria (obstrucción y atrapamiento),” *Arch. Bronconeumol.*, vol. 43, pp. 8–14, 2007.
- [30] M. Campbell and A. Sapra, “Physiology, Airflow Resistance,” *StatPearls*, 2022.
- [31] W. E. Finkbeiner, “Physiology and pathology of tracheobronchial glands,” *Respir. Physiol.*, vol. 118, no. 2–3, pp. 77–83, Dec. 1999.
- [32] P. Wojciech and M. Ross, *Histología Texto y Atlas*. 2015.
- [33] T. I. Fortoul van der Goes, *Histología y Biología Celular*, Segunda Ed., vol. 1. Ciudad de México, 2014.
- [34] A. R. Armiento, M. Alini, and M. J. Stoddart, “Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair?,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 146, pp. 289–305, Jun. 2019.
- [35] D. M. Giraldo Gómez, “Obtención de un Andamio Acelular para Substitución de Tráquea,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- [36] C. N. M. Ryan, A. Sorushanova, A. J. Lomas, A. M. Mullen, A. Pandit, and D. I. Zeugolis, “Glycosaminoglycans in Tendon Physiology, Pathophysiology, and Therapy.,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, no. 7, pp. 1237–1251, Jul. 2015.
- [37] M. D. Shoulders and R. T. Raines, “Collagen structure and stability,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 78, pp. 929–958, 2009.
- [38] E. F. Canosa, *Bioquímica: Conceptos esenciales*. Editorial Médica Panamericana S.A., 2014.
- [39] “Enfermedades de la tráquea | Miami Cancer Institute.” [Online]. Available: <https://cancer.baptisthealth.net/es/miami-cancer-institute/cancer-care/adult-cancers/thoracic-cancers/tracheal-diseases>. [Accessed: 09-May-2022].
- [40] A. Dhasmana, A. Singh, and S. Rawal, “Biomedical grafts for tracheal tissue repairing and regeneration ‘Tracheal tissue engineering: an overview,’” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 14, no. 5, pp. 653–672, May 2020.
- [41] A. Valadez-Caballero, David; Pérez-Romo, “Tratamiento quirúrgico de la estenosis traqueal,” *Cir. Gen.*, vol. 31, no. 4, pp. 239–243, 2009.
- [42] D. Barros Casas, S. Fernández-Bussy, E. Folch, J. Flandes Aldeyturriaga, and A. Majid, “Patología obstructiva no maligna de la vía aérea central,” *Arch. Bronconeumol.*, vol. 50, no. 8, pp. 345–354, Aug. 2014.
- [43] T. Langer *et al.*, “Prone position in intubated, mechanically ventilated patients with COVID-19: a multi-centric study of more than 1000 patients.,” *Crit. Care*, vol. 25, no. 1, p. 128, Apr. 2021.

- [44] E. Martínez-Téllez *et al.*, “Traqueotomía en pacientes COVID-19: un procedimiento necesario de alto riesgo. Experiencia de dos centros,” *Arch. Bronconeumol.*, vol. 56, no. 10, p. 673, Oct. 2020.
- [45] C. L. Backer, C. Mavroudis, M. E. Dunham, and L. Holinger, “Intermediate-term results of the free tracheal autograft for long segment congenital tracheal stenosis,” *J. Pediatr. Surg.*, vol. 35, no. 6, pp. 813–819, Jun. 2000.
- [46] H. C. Grillo, “Development of tracheal surgery: a historical review. Part 1: techniques of tracheal surgery,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 75, no. 2, pp. 610–619, Feb. 2003.
- [47] K. Kojima and C. A. Vacanti, “Tissue engineering in the trachea,” *Anat. Rec.*, vol. 297, no. 1, pp. 44–50, Jan. 2014.
- [48] “Tissue Engineering and Regenerative Medicine.” [Online]. Available: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>. [Accessed: 09-May-2022].
- [49] M. C. Piña-Barba, “Regeneran huesos y tejidos vivos en humanos con andamios moleculares.” [Online]. Available: https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2022_432.html. [Accessed: 29-May-2023].
- [50] G. Arnason, “Regulating Clinical Innovation: Trachea Transplants and Tissue Engineering,” *Am. J. Bioeth.*, vol. 19, no. 6, pp. 32–34, Jun. 2019.
- [51] R. Katari, A. Peloso, and G. Orlando, “Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Semantic Considerations for an Evolving Paradigm,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 2, Jan. 2015.
- [52] “Ingeniería de tejidos y medicina regenerativa | NeuroMéxico | Investigación, Divulgación y Difusión Científica.” [Online]. Available: <https://www.neuromexico.org/enchulame-la-mente-podcast/ingenieria-de-tejidos-y-medicina-regenerativa/>. [Accessed: 10-Jun-2022].
- [53] T. Go *et al.*, “Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs,” *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 139, no. 2, pp. 437–443, Feb. 2010.
- [54] D. MC, A. Loera Muro, F. Ramírez Castillo, O. R, and A. Guerrero-Barrera, “Matriz extracelular: ¿es el andamio de los tejidos?,” *Investig. Cienc.*, pp. 53–60, Dec. 2012.
- [55] S. H. Kim, J. Turnbull, and S. Guimond, “Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor,” *J. Endocrinol.*, vol. 209, no. 2, pp. 139–151, May 2011.
- [56] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, “The extracellular matrix at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. Pt 24, pp. 4195–4200, Dec. 2010.

- [57] R. S. Aziz-Seible and C. A. Casey, “Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 17, no. 20, pp. 2482–2499, 2011.
- [58] R. P. Tucker and R. Chiquet-Ehrismann, “Evidence for the evolution of tenascin and fibronectin early in the chordate lineage,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 41, no. 2, pp. 424–434, Feb. 2009.
- [59] F. Ramirez and L. Y. Sakai, “Biogenesis and function of fibrillin assemblies,” *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 71–82, Jan. 2010.
- [60] K. I. Gawlik and M. Durbeej, “Skeletal muscle laminin and MDC1A: pathogenesis and treatment strategies,” *Skelet. Muscle*, vol. 1, no. 1, Mar. 2011.
- [61] M. Rosa, R. Castillo, / Ysabel, and A. López Ramirez, “Purificación de vitronectina humana para la obtención de antisuero antivitronectina,” *Arch. Med. ISSN-e 1698-9465, Vol. 1, Nº. 3, 2005*, vol. 1, no. 3, p. 1, 2005.
- [62] E. M. Srokowski and K. A. Woodhouse, “Decellularized Scaffolds,” *Compr. Biomater.*, vol. 2, pp. 369–386, Jan. 2011.
- [63] L. Partington *et al.*, “Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 2, pp. 5251–5261, Feb. 2013.
- [64] M. Brovold *et al.*, “Naturally-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1077, pp. 421–449, 2018.
- [65] Q. Yao, Y. W. Zheng, Q. H. Lan, L. Kou, H. L. Xu, and Y. Z. Zhao, “Recent development and biomedical applications of decellularized extracellular matrix biomaterials,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, Nov. 2019.
- [66] L. Edgar *et al.*, “Utility of extracellular matrix powders in tissue engineering,” *Organogenesis*, vol. 14, no. 4, pp. 172–186, 2018.
- [67] J. S. Choi *et al.*, “Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering,” *J. Control. release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 139, no. 1, pp. 2–7, Oct. 2009.
- [68] Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid, and M. Glogauer, “Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications,” *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 8, no. 9, pp. 5744–5794, Aug. 2015.
- [69] A. Ebrahimi Sadrabadi, P. Baei, S. Hosseini, and M. Baghaban Eslaminejad, “Decellularized Extracellular Matrix as a Potent Natural Biomaterial for Regenerative Medicine,” *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 1341, pp. 27–43, 2021.
- [70] L. Penolazzi *et al.*, “Human mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix-

- scaffold: viability and osteogenic potential.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 227, no. 2, pp. 857–866, Feb. 2012.
- [71] K. G. Soucy *et al.*, “Feasibility study of particulate extracellular matrix (P-ECM) and left ventricular assist device (HVAD) therapy in chronic ischemic heart failure bovine model.,” *ASAIO J.*, vol. 61, no. 2, pp. 161–169, 2015.
- [72] I. Cervantes, “OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS TEGUMENTARIOS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURALES DE *Cassiopea xamachana*,” CIYI, 2018.
- [73] “DAPI.” [Online]. Available: <https://www.beckman.es/reagents/coulter-flow-cytometry/qc-and-support-reagents/viability-dyes/dapi>. [Accessed: 19-Oct-2022].
- [74] “DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) | Thermo Fisher Scientific - MX.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>. [Accessed: 19-Oct-2022].
- [75] L. Salazar and F. Moreno, “Comparison of three types of histochemical staining in histological sections of palate and tongue of Wistar rat,” *Salut. Sci. Spiritus*, vol. 2, pp. 1426–2463, Dec. 2016.
- [76] A. J. Abanto Vargas, “DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD TINTORIAL DEL COLORANTE TRICRÓMICO DE MASSON EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO DE CEREBRO Y CEREBELO DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*),” p. 48, 2014.
- [77] “Conceptos básicos de FTIR | Thermo Fisher Scientific - MX.” [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>. [Accessed: 09-Nov-2022].
- [78] “Thermo Nicolet 6700 FTIR | Core Facilities.” [Online]. Available: <https://cores.research.asu.edu/aep/equipment/thermo-nicolet-6700-ftir>. [Accessed: 12-Nov-2022].
- [79] B. H. Stuart, “Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications,” *Infrared Spectrosc. Fundam. Appl.*, pp. 1–224, Jul. 2005.
- [80] E. Meezan, J. T. 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 Sci.*, vol. 17, no. 11, pp. 1721–1732, Dec. 1975.
- [81] S. K. Goh *et al.*, “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.
- [82] L. Rieppo, L. Janssen, K. Rahunen, P. Lehenkari, M. A. J. Finnilä, and S. Saarakkala,

- “Histochemical quantification of collagen content in articular cartilage,” *PLoS One*, vol. 14, no. 11, Nov. 2019.
- [83] Y. Hu, L. Liu, Z. Gu, W. Dan, N. Dan, and X. Yu, “Modification of collagen with a natural derived cross-linker, alginate dialdehyde,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 102, no. 1, pp. 324–332, Feb. 2014.
- [84] P. Vitale, J. Tasca, M. Bax, A. Flores, G. G. Politis, and L. Valenzuela, “Análisis mediante FTIR de la conservación del colágeno y la posible contaminación en muestras óseas del Cuaternario pampeano,” in *Anales de Arqueología y Etnología*, 2019, vol. 74, no. 2, pp. 169–189.
- [85] T. Riaz *et al.*, “FTIR analysis of natural and synthetic collagen,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 53, no. 9, pp. 703–746, Oct. 2018.
- [86] T. W. Stafford, K. Brendel, and R. C. Duhamel, “Radiocarbon, ^{13}C and ^{15}N analysis of fossil bone: Removal of humates with XAD-2 resin,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 52, no. 9, pp. 2257–2267, 1988.
- [87] W. Jeong, M. K. Kim, and H. W. Kang, “Effect of detergent type on the performance of liver decellularized extracellular matrix-based bio-inks,” *J. Tissue Eng.*, vol. 12, 2021.
- [88] R. D. Novaes, M. C. Cupertino, M. M. Sarandy, A. Souza, E. A. Soares, and R. V. Gonçalves, “Time-Dependent Resolution of Collagen Deposition During Skin Repair in Rats: A Correlative Morphological and Biochemical Study,” *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Canada*, vol. 21, no. 6, pp. 1482–1490, Dec. 2015.
- [89] H. Lodish *et al.*, “Molecular Cell Biology,” pp. 31–49, Jan. 2003.