



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ELABORACIÓN DE UN ANDAMIO DESCELULARIZADO
DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CERDO PARA
INGENIERÍA DE TEJIDOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Alejandra Oseguera Rodríguez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez



Los Reyes Iztacala, Edo. de México. 2022



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.

DEDICATORIA

A los que hoy ya no están...
Mi madre, mi amigo y mi abuela

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por mi educación.

A mis tutores: Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez y Dr. Miguel Ángel Herrera Enriquez por todo su apoyo, conocimientos, consejos y cariño.

A la Bió. Beatriz Hernández por el apoyo y el conocimiento para llevar acabo las técnicas histológicas de mi proyecto, por su consejos, regaños y cariño.

A la Dra. Gabriela Piñon Zárate, a pesar de no ser mi tutora me diste todo tu apoyo y cariño.

A mi hermana Andrea Oseguera por todo su apoyo, amor y nunca rendirte conmigo. Te amo.

A mis amigos: Wendy Lara, Erick Sánchez, Andrea López, Cinthya Escamilla y Agustín Hernández, por todos los consejos, aventuras y cariño fuera y dentro de la escuela.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
Músculo esquelético	2
Estructura de la fibra muscular esquelética	2
Tipos de fibras musculares.....	3
Placa motora.....	5
Matriz extracelular del músculo esquelético	5
Desgarros musculares	7
Reparación muscular	8
Proceso de reparación después de la lesión muscular.....	9
Fibrosis muscular	10
Tratamiento de lesiones musculares esqueléticas.....	11
Uso de Xenotrasplantes porcinos: ventajas y desventajas.....	13
Xenotrasplantes	13
Anti-Gal.....	14
Ingeniería de tejidos	14
Componentes de la ingeniería de tejidos.....	15
Células.....	15
Biomateriales	15
Factores de crecimiento.....	15
Descelularización	15
Detergentes utilizados en la descelularización	16
ANTECEDENTES.....	17
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
RESULTADOS.....	22
Descelularización en el transcurso de ocho días.....	22
Descelularización dependiendo del detergente.....	23

Descelularización dependiendo del tamaño del tejido	25
Registro del cambio en el peso de las muestras durante el tratamiento	32
Porcentaje de descelularización de los tratamientos	33
Análisis histológico de los andamios a las diferentes edades de músculo esquelético porcino	34
Descelularización dependiendo de la edad	34
Ultraestructura del andamio	38
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	44
PERSPECTIVAS	44
LITERATURA CITADA	45

ELABORACIÓN DE UN ANDAMIO DESCELULARIZADO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CERDO PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

RESUMEN

El músculo esquelético es el tejido más abundante en el cuerpo humano, constituye alrededor del 40% del peso corporal total. Es responsables de dar fuerza y protección al esqueleto al distribuir las cargas y absorber el impacto; permite que los huesos se muevan en las articulaciones, y mantiene la postura corporal contra la fuerza de gravedad. La reparación muscular tarda entre 3 a 16 semanas dependiendo de la localización y del tamaño de la lesión. Cuando el espacio de la lesión es ocupado progresivamente por un tejido cicatricial denso, éste impide el normal desarrollo del tejido muscular y, en consecuencia, la función contráctil y la movilidad del músculo quedarán limitadas. Por lo tanto, es necesario buscar nuevas alternativas para el adecuado tratamiento de los daños musculares o en su defecto de la cicatrización, por lo que es necesario desarrollar nuevos tratamientos, una alternativa es la ingeniería de tejidos mediante el uso de la matriz extracelular. De acuerdo a lo anterior el presente trabajo tuvo como objetivo obtener un andamio descellularizado a partir de músculo esquelético de cerdo. Se obtuvo una matriz descellularizada de músculo esquelético de cerdo a diferentes edades a partir del método de Perniconi *et al.* (2014).

Se utilizó musculo esquelético de cerdos de diferentes edades, expuesto a tres tipos de detergentes: Tritón X-100 al 2% (Fu Y *et al.*, 2010), SDS al 1% (Perniconi *et al.*, 2014) y Tween 20 al 2% en agitación constante a 37°C. Posteriormente se realizaron cortes histológicos, tinciones de H-E, Tricrómica de Masson, DAPI, inmunohistoquímica con anticuerpos anti alfa-galactosidasa y anti-actina y microscopia electrónica de barrido. Se encontró que el detergente SDS al 1% fue el detergente más efectivo porque con él se logró obtener un andamio descellularizado de músculo esquelético a diferentes edades.

INTRODUCCIÓN

Músculo esquelético

El músculo esquelético es el tejido más abundante en el cuerpo humano, constituye alrededor del 40% de la masa corporal (Silverthorn, 2009). En condiciones normales la renovación celular del músculo esquelético es de aproximadamente el 1 al 2% de células por semana (Wenjun Yang y Ping Hu, 2018). Está compuesto de tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, nervios y material contráctil (Gillies y Lieber, 2011). El músculo es responsable de dar fuerza y protección al esqueleto, al distribuir las cargas y absorber el impacto; permite que los huesos se muevan en las articulaciones, y mantener la postura corporal contra la fuerza (Nordin y Frankel, 2012).

Las células que componen el músculo esquelético son las células contráctiles multinucleadas alargadas, llamadas fibras musculares. Una fibra muscular se forma durante el desarrollo embrionario por la fusión de varias células musculares individuales pequeñas que reciben el nombre de mioblastos. Las fibras musculares se mantienen unidas gracias al tejido conjuntivo. El diámetro de la fibra muscular mide entre 10 y 100 μm y su longitud varía dependiendo del músculo en el que se encuentre (Ross y Pawlina, 2015). Las células musculares se asocian entre sí para formar fascículos, y éstos a su vez se unen para formar cada músculo esquelético, encargado de la movilidad de los organismos (figura 1 y 2) (Megías *et al.*, 2017).

El aspecto estriado de las fibras musculares se debe a la disposición especial de los filamentos de actina y miosina de su citoplasma, conjuntamente denominados miofilamentos, los cuales se organizan en haces paralelos al eje principal de la célula. Las bandas oscuras (bandas A) corresponden a la superposición entre filamentos de actina y de miosina, y las claras (bandas I) sólo a filamentos de actina (figura 2) (Megías *et al.*, 2017).

Estructura de la fibra muscular esquelética

Las células musculares están altamente especializadas y sus componentes adquieren nombres específicos: sarcolema (membrana plasmática), sarcoplasma (citoplasma), retículo sarcoplásmico (retículo endoplásmico) y sarcosomas (mitocondrias).

El sarcoplasma de la fibra muscular está repleto de subunidades estructurales dispuestas longitudinalmente denominadas miofibrillas, éstas están compuestas por haces de polímeros individuales de miosina II llamados filamentos gruesos; así como de filamentos delgados de actina (formada por una doble hélice de moléculas globulares de actina G) y sus proteínas asociadas (tropomiosina y complejo troponina). Los filamentos gruesos y delgados reciben el nombre de miofilamentos, siendo éstos los elementos contráctiles del músculo estriado (figura 1) (Ross y Pawlina, 2015).

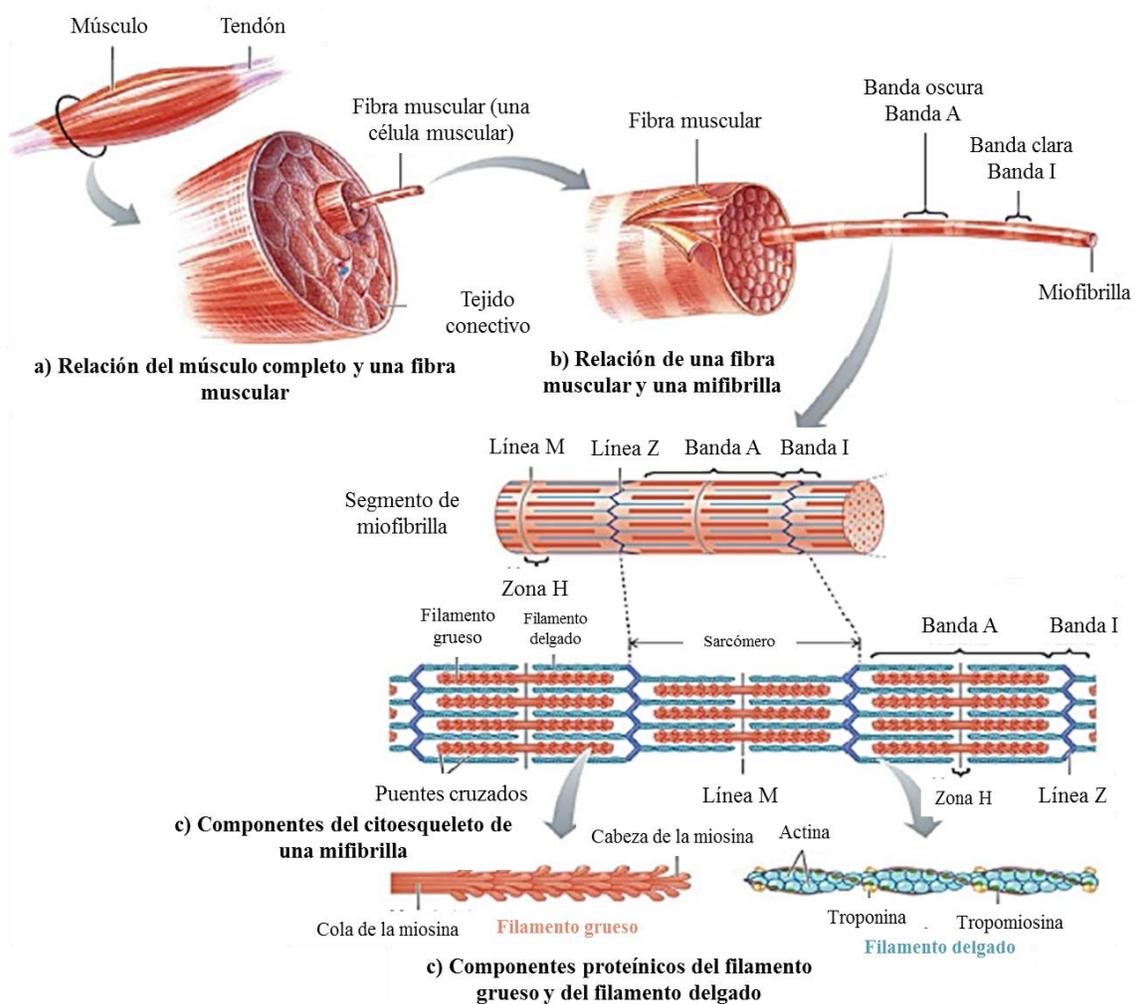


Figura 1. Estructura del músculo esquelético, la fibra muscular y la miofibrilla. Tomado de Raven *et al.*, 2013: original de Sherwood, 2010.

Tipos de fibras musculares

Durante su actividad contráctil, el músculo esquelético utiliza energía, que se obtiene de distintas fuentes, siendo las principales las vías: glucolítica (anaeróbica) y oxidativa (aeróbica). Es importante señalar que, en cada una de las fibras presentes en un músculo, predomina un tipo de metabolismo y esto condiciona tanto las características morfológicas (color, cantidad de mitocondrias y de mioglobina), como las propiedades funcionales de éstas (duración de la contracción, cantidad de fuerza desarrollada, fatiga) y la vía metabólica predominante. Considerando lo anterior, las fibras musculares se han agrupado como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tipos de fibras musculares

Características	Rojas Fibras tipo I	Intermedias Fibras tipo IIa	Blancas Fibras tipo IIb
Mitocondrias	Tienen muchas mitocondrias, grandes cantidades de mioglobina y complejos del citocromo.	Tienen muchas mitocondrias y contenido alto en hemoglobina.	Presenta menor cantidad de mitocondrias y mioglobina.
Enzimas oxidativas	Concentración elevada de enzimas oxidativas mitocondriales,	Tienen grandes cantidades de glucógeno y son capaces de realizar la glucólisis anaeróbica.	Baja concentración de enzimas oxidativas, pero exhiben una actividad enzimática anaeróbica alta y almacenan una cantidad considerable de glucógeno.
Unidades motoras	Son unidades motoras de contracción lenta resistente a la fatiga.	Constituyen las unidades motoras de contracción rápida resistente a la fatiga.	Integran las unidades motoras de contracción rápida, que se fatigan rápidamente.
Tensión	Generan menor tensión.	Constituyen las unidades motoras de contracción rápida resistente a la fatiga.	Generan un gran pico de tensión.
Función de la ATPasa	Su reacción a la ATPasa miosínica es la más lenta. Típicas fibras de las extremidades de los mamíferos y del músculo pectoral de aves migratorias.	.	Su velocidad de reacción de ATPasa miosínica es la más rápida de todos los tipos de fibras.
Músculos en las que se encuentran	Son las fibras principales de los músculos largos erectores de la columna en el dorso en humanos, donde se adaptan particularmente a las contracciones prolongadas y lentas necesarias		Constituyen la mayor parte de las fibras de los músculos extrínsecos del ojo y los músculos que controlan los movimientos de los dedos.

	para mantener la postura recta.		
Atletas en los que se encuentran las fibras	Constituyen los músculos de atletas de alta resistencia como los corredores de maratones.	Presentes en corredores de 400m y 800m, nadadores de distancia media y jugadores de hockey	Presentes en corredores de distancias cortas, levantadores de pesas, etc.
Uniones neuromusculares			Contienen una mayor cantidad de uniones neuromusculares.
Otras características			Están adaptadas a la contracción rápida y movimientos precisos. Se fatiga rápidamente a causa de la producción de ácido láctico.

Fuente: Ross y Pawlina, 2015.

Placa motora

Las células musculares están gobernadas por motoneuronas localizadas en el encéfalo o en la médula espinal, y son de contracción voluntaria. Cada motoneurona (ubicada en la médula espinal), es capaz de inervar a varias células musculares. Se denomina unidad motora al conjunto de células musculares inervadas por un mismo axón. Las unidades motoras pueden ser grandes (más de 100 células inervadas por un mismo axón) o pequeñas (con varias decenas de células musculares inervadas por un mismo axón), dependiendo de la precisión que se necesite para ese músculo. Más precisión significa unidades motoras más pequeñas (Megías *et al.*, 2017). La unión neuromuscular es la conexión o sinapsis entre una motoneurona somática y una fibra muscular donde se produce una transformación de una señal química en un impulso eléctrico que desencadena la contracción de la fibra muscular.

Matriz extracelular del músculo esquelético

La matriz extracelular (MEC) es una estructura dinámica que posee propiedades mecánicas y bioquímicas específicas del tejido en el que se encuentra. La MEC fija a las células en los tejidos mediante moléculas de adhesión célula-matriz extracelular y provee vías de migración celular. Ejerce acción reguladora tanto sobre el desarrollo embrionario como sobre la diferenciación celular. Tiene la capacidad de fijar y retener factores de crecimiento que, a su vez, modulan la proliferación celular (Velleman, 1999; Ross y Pawlina, 20015).

La arquitectura de la matriz extracelular muscular es muy compleja en comparación con otros tejidos conjuntivos. Está constituida principalmente por colágeno, representando del 1-10% del peso seco de la masa muscular; y proteoglicanos (PG) como heparán sulfato (HSPGs) y glucosaminoglicanos (GAG) como el biglican, fibromodulin, y lumican, comprendiendo aproximadamente 30% de los PG en la MEC (Barbany, 2002; Gillies y Lieber, 2011) (Cuadro 2).

COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR		
PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Elastina Entactina Colágeno tipo I, III, IV y VII. Fibrilinas	PROTEOGLICANOS Decorina Versicano Perlecano	PROTEÍNAS ESPECIALIZADAS Integrinas Hemidesmosoma: Micro-filamentos intermedios Receptores de Membrana Factores de crecimiento Enzima de metaloproteinasas Fibronectina
	Glucosaminoglucanos Ácido hialurónico Condroitín sulfato	

Cuadro 2. Componentes de la matriz extracelular. Tomado de Saavedra *et al.*, 2015.

La MEC del músculo esquelético se subdivide en: membrana basal y endomisio (alrededor de la célula muscular), perimisio (alrededor de grupos de células musculares; los fascículos) y epimisio (alrededor del músculo entero). Forman un sistema ininterrumpido de tabiques que le confiere unidad estructural y funcional al músculo (Barbany, 2002; Gillies y Lieber, 2011). Además, rodeando a cada fibra muscular se encuentra una membrana basal.

Membrana basal consta principalmente de una red de colágeno tipo IV, aunque también están presentes los tipos VI, XV y XVII. Los tipos XV y XVIII de colágeno se clasifican como multiplexinas, que son proteoglicanos heparán sulfato. Las multiplexinas pueden unirse a factores de crecimiento y también ayudan a enlazar la membrana basal con otras glicoproteínas de la propia membrana basal y del endomisio. Aunque la membrana basal se considera distinta del endomisio, las dos están íntimamente conectadas e involucradas en la transmisión de fuerza desde la membrana basal hasta el tendón (figura 3) (Gillies y Lieber, 2011).

Endomisio es una red altamente ordenada que rodea las fibras musculares individualmente, constituida principalmente por colágeno tipo III, pero también se puede encontrar colágeno tipo I. A su vez el colágeno tipo V se asocia con los tipos I y III forma un núcleo para las fibrillas de colágeno tipo I (figura 3) (Gillies y Lieber, 2011).

Perimisio es definido como matriz extracelular que rodea haces de células musculares. Las fibras de colágeno del perimisio se organizan en haces más o menos discretos que se extienden a lo largo y a través de las fibras musculares. Las fibras de colágeno orientadas longitudinalmente forman una serie densa de bandas a lo largo de las fibras musculares, mientras que las fibras de colágeno transversales se interconectan con las fibras musculares en puntos discretos. Estos puntos de conexión transversales están colocalizados con adherencias focales y subdominios intracelulares sugiriendo que el perimisio puede estar implicado en la señalización celular (figura 3) (Gillies y Lieber, 2011).

Las fibras de colágeno del perimisio se unen y se vuelven continuas con el tendón. El tendón y el perimisio contienen principalmente colágeno tipo I, y el proteoglicano principal en ambos es la decorina (Gillies y Lieber, 2011). Al igual que en el endomisio el colágeno tipo III se asocia con el colágeno tipo I y puede formar un núcleo para las fibrillas (tipo I).

Los tipos de colágeno XII y XIV son colágenos asociados a fibrillas con híbridos triples ininterrumpidos (FACIT) localizados principalmente en el perimisio.

Epimisio formado por haces muy grandes de colágeno tipos I y III (en mayor proporción) (figura 2) (Gillies y Lieber, 2011).

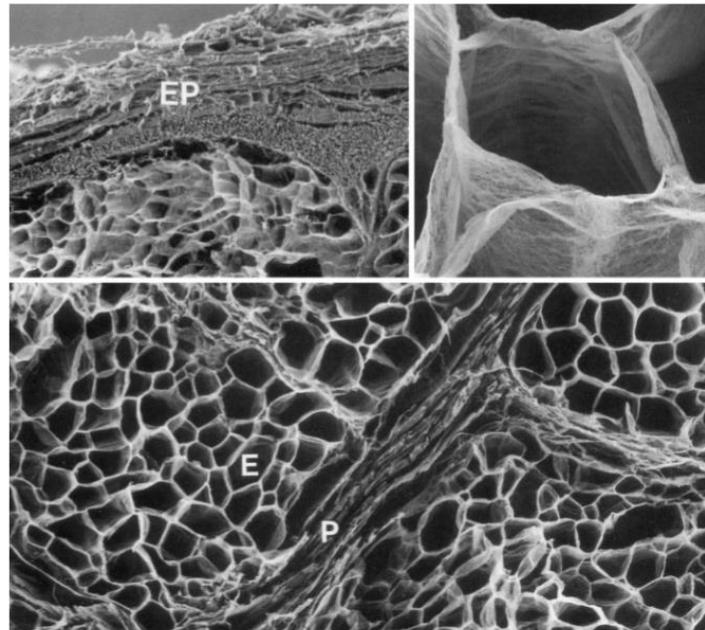


Figura 2. Ultraestructura de matriz extracelular descelularizada de músculo esquelético tendinoso bovino donde se puede observar el epimisio (EP), perimisio (P) y endomisio (E). Tomada de Nishimura *et al.*, 1994.

Desgarros musculares

La lesión muscular resulta de una ruptura de los tejidos conjuntivo y contráctil, es una de las lesiones más comunes que ocurren en el deporte, con una incidencia que varía entre el 10% y el 55% de todas las lesiones sufridas. Las lesiones musculares pueden ser causadas por contusión, distensión o laceración. Las laceraciones musculares son las más infrecuentes de las lesiones musculares que ocurren en los deportes, ya que más del 90% de todas las lesiones relacionadas con el deporte son contusiones o distensiones (Järvinen *et al.*, 2005).

En el siguiente cuadro se explican los diferentes tipos de desgarros musculares de acuerdo al espesor de la lesión.

Cuadro 3. Clasificación de los desgarros musculares de acuerdo al espesor de la lesión

Clasificación de los desgarros		
Desgarro	Características	Espesor
Miofascial	Comprende la fascia o aponeurosis y las fibras musculares periféricas. Se trata de una separación de la fascia muscular y cierta retracción de las fibras musculares periféricas, siempre hay edema periférico de fibras musculares. Es una lesión de muy buen pronóstico y suele curarse sin secuelas en 15-25 días.	Es un desgarro pequeño cuando compromete un segmento de hasta 3 cm, con escaso compromiso de fibras musculares, moderado cuando mide entre 3 y 6 cm, sobre los 6 cm se estima un desgarro de un tamaño importante.

Fibrilar	Generalmente es una lesión de tipo lineal muy fina, ocurre en el espesor de la musculatura, se acompañan de edema perilesional de cuantía variable y su pronóstico es muy bueno, cicatrizando sin secuelas.	Suelen ser lesiones con poca extensión, no más de 3 a 4 cm de longitud, pero con un grosor que no debería exceder los 2 mm.
Multifibrilar	Consta de varias lesiones de continuidad lineales, generando un foco lesional de mayor tamaño y, asociado a edema de mayor extensión e intensidad. Su pronóstico sigue siendo bueno, pero requiere de un mayor tiempo de curación. Pueden dejar pequeñas cicatrices retráctiles.	Se consideran de cuantía moderada desde los 3-4 cm.
Fascicular	Es una lesión de mayor trascendencia, puede ocurrir en el espesor del músculo o en su periferia, donde se acompañan de compromiso fascial. El lecho de la rotura se acompaña de un hematoma que ocasionalmente puede ser de mayor tamaño por efecto expansivo con compresión del músculo adyacente. En estos casos el período de cicatrización puede tomar más de un mes.	Son lesiones de cuantía moderada que miden aproximadamente 3x3 cm en espesor y longitud hacia arriba. Las lesiones periféricas con compromiso de la fascia suelen ser de mayor tamaño y se consideran de cuantía importante.
Masivo o total con o sin avulsión ósea	Lesiones graves que dejen algún grado de pérdida de la función, desbalances musculares y grandes cicatrices. Se incluyen aquí también las roturas tendomusculares completas y aquellas que se acompañan de avulsión de las inserciones óseas. Generalmente se acompañan de hematomas extensos.	Comprenden desde un grueso segmento hasta todo el espesor del músculo.
Adherenciolisis	Se refiere a la apertura de la cicatriz, o re-desgarro, generalmente parcial y que ocurre siempre en la zona periférica del desgarro.	La lesión puede ser de una magnitud incluso mayor que la original.

Tomado de Verdugo, 2004

Reparación muscular

El músculo esquelético es susceptible a diferentes lesiones en la vida cotidiana, algunas de las lesiones más comunes suelen ser por traumatismos mecánicos, estrés térmico, agentes miotóxicos, isquemia, daño neurológico y otras afecciones patógenas.

El músculo esquelético tiene una alta capacidad innata para la reparación después de una lesión a través de la presencia de células madre musculares adultas conocidas como células satélite (Laumonier and Menetrey, 2016). Una vez que las miofibras han sido lesionadas se pueden reparar a partir de las células satélite mediante la diferenciación celular en las primeras dos semanas después de la lesión y las funciones musculares como la fuerza de

contracción y el metabolismo también pueden ser restaurados. Sin embargo, se ha observado que esta recuperación es parcial y que aún en periodos más prolongados de hasta cuatro semanas, aún se presentan cambios tanto de regeneración celular, como de aumento de la proporción de la matriz extracelular (Rosero *et al.*, 2016; Yang & Hu., 2018).

Proceso de reparación después de la lesión muscular

El mecanismo general de lesión y reparación es similar en la mayoría de los tipos de lesiones musculares. Se distinguen tres fases: la destrucción y la fase inflamatoria (1 a 3 días), la fase de reparación (3 a 4 semanas) y la fase de remodelación (3 a 6 meses). Las dos últimas fases tienden a superponerse. Cuando un músculo se lesiona, las fibras musculares se rompen y necrosan. Al mismo tiempo se forma un hematoma durante esta primera fase, las células inflamatorias pueden invadir libremente el sitio de la lesión porque los vasos sanguíneos están rotos. Las células inflamatorias más abundantes son los leucocitos polimorfonucleares. Estos son reemplazados por monocitos, unas pocas horas después de la lesión. Estas células finalmente se transforman en macrófagos. Los macrófagos tienen dos funciones: en primer lugar, eliminan las células necróticas por fagocitosis, en segundo lugar, producen, junto con fibroblastos, señales quimiotácticas tales como factores de crecimiento, citoquinas y quimiocinas. La matriz extracelular también contiene factores de crecimiento que se activan cuando el tejido se daña. Algunos de estos factores de crecimiento, como FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina-1), IGF-2 (factor de crecimiento similar a la insulina-2), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), HGF (factor de crecimiento de los hepatocitos), TNF- α (factor de necrosis tumoral- α) e IL-6 (interleucina-6) pueden activar a las células satelitales.

La siguiente fase, la fase de reparación, consiste en dos procesos relacionados. La primera es la regeneración de las miofibras alteradas. La reparación puede ocurrir debido al grupo de células de reserva indiferenciadas, también llamadas precursores miogénicos o células satélite bajo la lámina basal de la miofibrilla. Las células satélite proliferan y eventualmente se diferencian en mioblastos, estos nuevos mioblastos se fusionan con las miofibras lesionadas, rellenando el espacio formado entre los dos extremos de la miofibrilla lesionada. El segundo proceso de la fase de reparación es la formación de una cicatriz de tejido conjuntivo. El tejido cicatricial da la fuerza muscular para soportar las contracciones, y da a los fibroblastos un sitio de anclaje para invadir el tejido de granulación. Sin embargo, en caso de proliferación excesiva de estos fibroblastos, se forma tejido conjuntivo fibroso denso en el músculo lesionado. Esto no sólo interfiere con el proceso de reparación, sino que también interrumpe el proceso de regeneración muscular y contribuye a la recuperación funcional incompleta del músculo lesionado durante la tercera fase, la fase de remodelación. En esta última fase, las miofibras recién formadas maduran. Y, al mismo tiempo, el tejido cicatricial se reorganiza y se contrae.

Debido a una lesión, la inervación intramuscular puede ser dañada. Por lo tanto, las fibras musculares pueden ser denervadas, lo que podría afectar negativamente el proceso de curación.

Todo el proceso se coordina a través de diferentes mecanismos como es la interacción entre célula-célula y la interacción célula-matriz extra celular; secreción de factores. HGF, IL-1 e IL-6 son factores secretados que pueden estimular la actividad de las células satélites. FGF e IGF también pueden activar células satélite, pero en contraste con IGF, FGF también puede

inhibir su diferenciación, mientras que el IGF estimula la diferenciación. TGF- β 1 estimula la deposición de colágeno, dando lugar a la formación de tejido fibroso cicatricial (Quintero *et al.*, 2009; Baoge *et al.*, 2012; Mann *et al.*, 2011; Yang & Hu., 2018).

Fibrosis muscular

La mayor limitación que resulta para los pacientes después de una lesión muscular esquelética es la formación de tejido fibroso cicatricial denso (fibrosis). La fibrosis es la acumulación excesiva de componentes de la MEC, principalmente de colágeno tipo I. Es el resultado final de una cascada de eventos procedentes de la lesión tisular a través de la inflamación (por aumento del factor de crecimiento transformante, TGF-B1) (Quintero *et al.*, 2009), y que como resultado da la formación de una cicatriz, pone en peligro la función normal del tejido (Mann *et al.*, 2011).

Todas las reacciones fibróticas comparten mecanismos celulares y moleculares comunes, tales como la degeneración de células y tejidos, la infiltración de leucocitos, la inflamación persistente de los tejidos, y la proliferación de las células con un fenotipo similar a fibroblastos. La interacción y el desequilibrio de diferentes tipos de células sostiene la producción de numerosos factores de crecimiento, enzimas proteolíticas, factores angiogénicos y citocinas fibrogénicas, que en conjunto perturban el microambiente del tejido dañado, estimulan el depósito de elementos del tejido conjuntivo que remodelan progresivamente, destruyen y reemplazan la arquitectura del tejido normal (Mann *et al.*, 2011), lo que impide en parte la formación de nuevos axones hacia las miofibras y contribuyen a una disminución de la contractilidad muscular y el rango de movimiento, debido a que el tejido cicatricial formado siempre es mecánicamente inferior y mucho menos capaz de realizar las funciones normales de una fibra muscular. También es más susceptible a las lesiones recurrentes (Baoge *et al.*, 2012).

El dolor que resulta de la fibrosis también es un factor limitante en la recuperación de los pacientes, tanto durante la rehabilitación como a largo plazo (Quintero *et al.*, 2009).

Por otro lado, el envejecimiento está asociado con la pérdida de masa muscular esquelética y la fibrosis por el depósito de matriz extracelular, esto agrava los problemas de salud relacionados con la edad. Las consecuencias de la disminución de masa muscular implican la atrofia progresiva y la pérdida de fibras musculares individuales, asociado a su vez con la pérdida de las unidades motoras, así como la infiltración de grasa y otro material no contráctil provocando la disminución en la calidad muscular (Mann *et al.*, 2011).

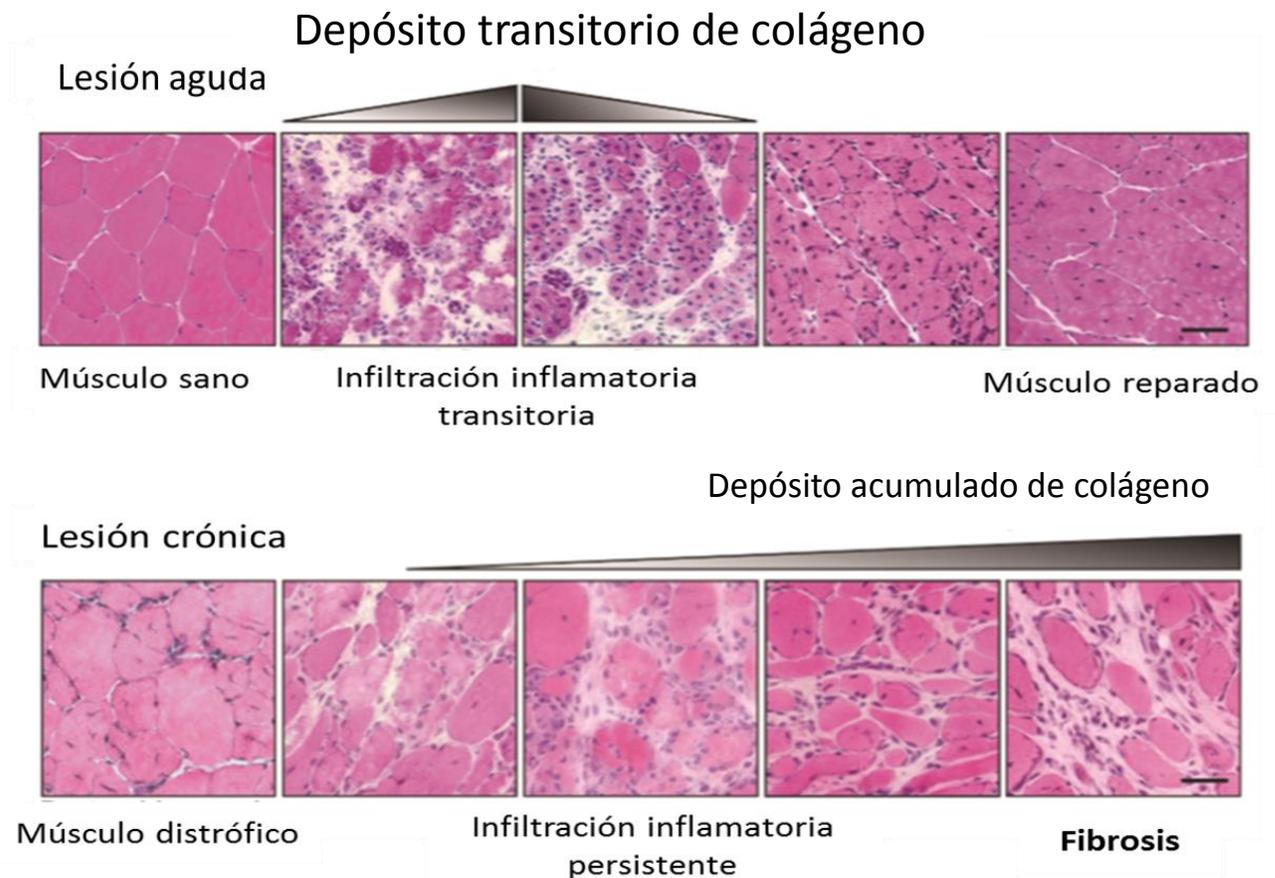


Figura 3. Proceso de reparación de una lesión aguda y de una lesión crónica. Tomado de Mann *et al.*, 2011

Tratamiento de lesiones musculares esqueléticas

Existe una variedad de estrategias de tratamiento para las lesiones del músculo esquelético agudas y crónicas. Los objetivos principales de los tratamientos son minimizar el daño adicional, aliviar el dolor y el espasmo, reducir la hemorragia y el edema, y promover la reparación.

Cuadro 4. Principales estrategias de tratamiento de lesiones musculares

RICE	El tratamiento más conocido inmediatamente después de una lesión muscular es el "RICE". Este acrónimo significa descanso, hielo, compresión y elevación. El objetivo es minimizar el hematoma del músculo lesionado y posteriormente el tamaño de la cicatriz del tejido conjuntivo. Sin embargo, la eficacia de este enfoque no se ha demostrado en ningún ensayo clínico aleatorizado. El hielo debe aplicarse intermitentemente durante 15 a 20 minutos con un intervalo de 30 a 60 minutos. Períodos más largos de aplicación en frío conducen a un aumento de la circulación y aumento del sangrado.
Fisioterapia	La movilización temprana acelera el crecimiento capilar y promueve la regeneración de las fibras musculares. El músculo cicatrizado también

	recupera más rápidamente su nivel de pre-resistencia. Sin embargo, la movilización temprana también tiene desventajas. La cicatriz que se forma será más grande, y las re-rupturas serán más comunes. Por lo tanto, el descanso se aconseja durante los primeros 3 a 7 días para permitir que el tejido cicatricial gane fuerza. Posteriormente, se inicia la movilización dentro de los límites sin dolor. La inactividad continua puede conducir a la atrofia de los músculos sanos, deposición excesiva de tejido conjuntivo dentro de los músculos y una recuperación sustancialmente retardada de la fuerza del músculo esquelético lesionado. Los ejercicios deben comenzar gradualmente.
NSAID	Los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) se utilizan principalmente por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Las células inflamatorias juegan un papel importante en el proceso de curación de un músculo lesionado. Por lo tanto, el uso de fármacos que inhiben estas células, como los NSAID, se cuestiona hoy en día. Los estudios experimentales en los que se administraron NSAID inmediatamente después de la lesión han mostrado resultados contradictorios. Los NSAID no tendrían un mayor efecto sobre el dolor de una lesión muscular que el paracetamol, pero tienen más efectos secundarios incluyendo exacerbaciones de asma, efectos secundarios gastrointestinales y renales, hipertensión y otros. Sin embargo, los NSAID también tienen efectos beneficiosos. El proceso inflamatorio puede ser excesivo y causar edema, resultando en anoxia y muerte celular adicional. Esto puede prevenirse mediante la administración de dosis bajas de NSAID.
Reparación biológica	Varios estudios han llevado a la identificación de factores de crecimiento que tienen el potencial de influir en la regeneración de los músculos lesionados, por lo que se ha tratado de desarrollar fármacos que funcionen sobre esta base biológica y pueden ayudar a recuperarse mejor y/o más rápido una lesión muscular. Para lograr este objetivo, se investigan varios factores de crecimiento, tales como factores de crecimiento exógenos que promoverían la cicatrización de fibras musculares lesionadas, y TGF- β 1, cuya inhibición bloquearía la fibrosis muscular. Dentro de los factores de crecimientos identificados que son capaces de promover la regeneración muscular se encuentra el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de insulina (IGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), TGF- β 1 y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).
Cirugía	La cirugía sólo puede ser implementada en condiciones específicas. Estas condiciones incluyen un gran hematoma intramuscular, tensión o desgarramiento completo de un músculo con pocos o ningún músculo agonista o una tensión parcial si más de la mitad de las capas vientre del músculo está roto y si el paciente se queja de dolor persistente (> 4-6 meses). Después de la cirugía, el miembro operado debe colocarse en un molde e inmovilizarlo en una posición neutral con una ortesis.

Tomado de Baoge *et al.*, 2012.

En la literatura médica no se encuentra el uso de trasplantes de tejido muscular esquelético, las únicas prácticas que se tienen registradas son los injertos autólogos (colgajos musculares) que son utilizados para reconstruir partes del cuerpo que sufrieron un traumatismo severo en la que se generaron pérdidas de tejidos blandos.

En la Ciudad de México los traumatismos se han convertido en un serio problema de salud pública porque afectan de manera significativa a la población en desarrollo y a la población económicamente activa, siendo ésta la primera causa de morbimortalidad entre los 15 y los 45 años. Los traumas son predominantes en el sexo masculino, aunque en los últimos años ha aumentado la incidencia en el sexo femenino. Las principales causas de este problema de salud pública son los accidentes automovilísticos, las caídas y las quemaduras, siendo las principales áreas corporales afectadas por los traumatismos las extremidades (Illescas, 2003).

Otro sector afectado por las lesiones musculares son los deportistas, donde las lesiones se pueden dividir en lesiones benignas y severas, situando dentro de las primeras a las contusiones, hematomas, contracturas, elongaciones y los calambres y en las segundas las rupturas fibrilares, sobre todo las rupturas musculares y las hernias. Sin embargo, del 3 al 10% de las lesiones en el deporte son graves y pueden incluso significar una capacidad disminuida o incapacidad absoluta para practicar el deporte. La ruptura muscular se produce en la masa muscular en el 85% de los casos y también en la unión del músculo y tendón (González, 1998).

En México se han establecido varios bancos de órganos y tejidos en donde éstos son sometidos a diversos procesos mecánicos y fisicoquímicos para poder ser utilizados en humanos. El principal problema que enfrentan los programas de trasplante en todo el mundo es el desequilibrio entre la disponibilidad de órganos y tejidos para trasplante respecto a los que se requieren para el tratamiento de enfermedades (Álvarez-San Martín, 2012).

Uso de Xenotrasplantes porcinos: ventajas y desventajas

Xenotrasplantes

El trasplante de órganos, tejidos y células, como se mencionó con anterioridad, es una opción para el tratamiento de diversas patologías, pero la falta de donadores y poca compatibilidad conllevan al ineficiente o limitado tratamiento de enfermedades que pueden llevar a la muerte del paciente. Es por eso que la utilización de órganos, tejidos y células de especies animales diferentes al hombre (xenotrasplante) ha sido estudiada como una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades, pero debido a diversas limitantes como el rechazo inmunológico, capacidad metabólica, posible transmisión de infecciones entre donante y receptor (xenozoonosis), carácter ético y social y disponibilidad de los donantes, su uso no ha sido exitoso (Bazán *et al.*, 2004).

Las investigaciones en las que se utilizaba como donantes a primates superiores (chimpancé, orangután, o gorila) presentan varios inconvenientes: a) problemas éticos por el uso de animales en peligro de extinción; b) el elevado riesgo de infecciones transmitidas por los primates, por su proximidad genética; c) largo período de gestación y largo tiempo de crecimiento; y d) por razones técnicas y éticas debido a que los primates son pobres candidatos para la manipulación genética. Por lo anterior, en la actualidad la mayoría de los grupos de investigación en xenotrasplante están de acuerdo en que la fuente ideal de órganos y tejidos son los cerdos, ya que son animales de fácil acceso y con un período de crecimiento

corto; además es ampliamente aceptada su utilización para la alimentación y la experimentación, su obtención libre de patógenos es fácil, y el tamaño de sus órganos y su **Cuadro 5.** Riesgos de xenotransplantes fisiología son bastante similares a la humana (Bazán *et al.*, 2004).

	Primate → Humano	Cerdo → Humano
Rechazo	++	++++
Incompatibilidad metabólica	++	++++
Riesgos de trasmisión de infecciones	++++	
Problemas éticos-sociales	+++++	++
Disponibilidad	++++++	+

Tomado de Bazán *et al.*, 2004

Los tejidos y órganos de origen porcino han sido objeto de investigaciones principalmente en el uso de xenotrasplante de órganos, tejidos o células porcinas a fin de resolver el problema de la insuficiencia de aloinjertos humanos para trasplante y en la Ingeniería tisular, en la que se ha estudiado MEC, tejidos y órganos descelularizados para su uso como andamio biológico para la remodelación y regeneración de tejidos (Galili, 2015).

Anti-Gal

Todos los seres humanos producen un anticuerpo natural que se une al epítipo α -gal (Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc-R) que es abundante en todos los mamíferos a excepción del humano. Este anticuerpo natural, denominado anti-Gal, es el anticuerpo más abundante en seres humanos, que comprende aproximadamente el 1% de las inmunoglobulinas circulantes. El carbohidrato se denomina epítipo α -gal (epítipo α -galactosil y Gal α 1-3Gal). El anti-Gal se encuentra en el suero humano como varios isotipos incluyendo IgG, IgM e IgA. La subclase IgG anti-Gal más abundante es IgG2 seguida de IgG3, IgG1, y la menor cantidad de anticuerpo se encuentra como IgG4. En una pequeña proporción de la población, anti-Gal puede estar presente también como un isotipo de IgE que puede mediar reacciones alérgicas. El epítipo α -gal que es el ligando para anti-Gal tiene la estructura Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R y es abundante en glicolípidos y glicoproteínas de la membrana celular de mamíferos no primates, su cantidad en las células varía en diferentes tejidos y diferentes mamíferos incluidos los cerdos. IgG anti-Gal cruza la placenta y se encuentra en la sangre del recién nacido en proporciones comparables a los de la sangre materna. Su producción se inicia en aproximadamente 6 meses y se produce continuamente a lo largo de la vida como una respuesta inmune frente a antígenos de carbohidratos con estructuras similares a los epítipos α -gal que se presentan en bacterias de la flora gastrointestinal humana normal (Galili, 2015).

Alrededor del 1% de las células B humanas son capaces de producir anti-Gal, la mayoría de estas células B (células anti-Gal B) están inactivas y sólo aquellas a lo largo del tracto gastrointestinal producen continuamente este anticuerpo natural. Sin embargo, la introducción de implantes xenogénicos que presentan epítipos α -gal en humanos da lugar a la activación de las células anti-Gal B quiescentes por glicoproteínas que portan epítipos α -gal que se liberan del implante. Esto da como resultado un aumento de la actividad IgG anti-Gal de aproximadamente 100 veces en aproximadamente 2 semanas, provocando el rechazo del implante (Galili, 2015).

Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es el área científica interdisciplinaria cuyo fundamento es el uso de células vivas, la manipulación del entorno extracelular para la creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo con la intención de reparar, remplazar, mantener o mejorar la función de un órgano o tejido (Falke y Atala, 2000; Serrato *et al.*, 2015).

Componentes de la ingeniería de tejidos

Células

Dentro de la ingeniería de tejidos se utilizan generalmente células progenitoras o troncales, cuya principal característica es su capacidad para autorrenovarse y diferenciarse a distintos tipos celulares (Serrato *et al.*, 2015).

Biomateriales

Son materiales de origen natural o sintético que son utilizados en la fabricación de sistemas biológicos. En ingeniería de tejidos los biomateriales funcionan como un soporte que imita a la matriz extracelular nativa de los tejidos, esto quiere decir que promueve la proliferación, la diferenciación y la sobrevivencia de las células (Serrato *et al.*, 2015).

Cuadro 5. Principales materiales sintéticos y naturales utilizados en Ingeniería de tejidos

NATURALES	Seda, colágeno, gelatina, fibrinógeno, ácido hialurónico, alginato	Biodegradables, de fácil obtención, bioactivos, interactúan con las células
SINTÉTICOS	PEG, PGA, PMMA, PLGA	Facilitan la regeneración de tejidos dañados, inertes, vida media larga, porosidad y degradación predecibles, reproducibles

Tomado de Serrato *et al.*, 2015

Factores de crecimiento

Son una amplia variedad de proteínas y nucleótidos secretados de forma endógena por las células. Estas sustancias en conjunto con la matriz extracelular influyen en el comportamiento y función de las células. En ingeniería de tejidos los factores de crecimiento interactúan con las células troncales y las matrices artificiales aumentando la diferenciación y proliferación de los tejidos generados, en comparación con los que no reciben dicha adición (Serrato *et al.*, 2015).

Descelularización

Una alternativa a los xenoinjertos es la descelularización de órganos y tejidos, método recientemente introducido para la creación de materiales de andamios para la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa (Teodori *et al.*, 2014). Los andamios biológicos compuestos de matriz extracelular se han estudiado con éxito para reparar o sustituir una variedad de tejidos dañados o enfermos (Valentin *et al.*, 2010).

Existen diversos métodos de descelularización como; físicos, ácidos y alcalinos, detergentes iónicos y no iónicos, tratamientos hipotónicos e hipertónicos, métodos enzimáticos, etc., que se pueden combinar para lograr una mayor remoción del contenido celular y a su vez se busca disminuir el daño a los componentes de la matriz extracelular para mantener sus propiedades mecánicas y biológicas (Morales-Valencia *et al.*, 2016).

Detergentes utilizados en la descelularización

Los detergentes son compuestos orgánicos constituidos por una cadena hidrocarbonada hidrofóbica y un grupo hidrofílico con carga en un extremo. Son utilizados en los métodos de descelularización donde se emplean para romper las membranas celulares (lisis celular). Los detergentes rompen las interacciones entre proteínas, entre proteínas y lípidos, y entre lípidos, desnaturalizan proteínas y otras macromoléculas. Dentro de los detergentes más utilizados para la obtención de matrices extracelulares se encuentran los detergentes iónicos y no iónicos (Johnson, 2016).

Detergentes no iónicos: en este grupo se destaca el Tritón X-100, usado extensamente porque no produce efectos graves en la estructura del tejido. Estos detergentes rompen las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína (Morales-Valencia *et al.*, 2016).

Detergentes iónicos: solubilizan tanto las membranas citoplasmáticas como las nucleares, pero tienden a desnaturalizar las proteínas al romper las interacciones proteína-proteína (Morales-Valencia *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Tipos de detergentes y características principales

Tipos de detergentes: características principales	
Detergentes iónicos	Detergentes no iónicos
<p>Ejemplo: Aniónico: dodecil sulfato de sodio (SDS) Catiónico: bromuro de cetil metil amonio (CTAB)</p> <ul style="list-style-type: none">• Contiene grupo de cabeza con una carga neta.• O aniónico (- cargado) o catiónico (+ cargado).• El tamaño de micela está determinado por el efecto combinado de la atracción hidrofóbica de la cadena lateral y la fuerza de repulsión del grupo de cabeza iónica.• La neutralización de la carga en el grupo de cabeza con el aumento de los contraiones puede aumentar el tamaño de las micelas.• Útil para disociar las interacciones proteína-proteína.• La concentración micelar crítica (CMC) de un detergente iónico se reduce al aumentar la fuerza iónica del medio, pero no se ve afectada por los cambios de temperatura.	<p>Ejemplo: Detergente TRITON-X-100 n-octil-b-D-glucopiranosido</p> <ul style="list-style-type: none">• Grupo de cabeza hidrofílica sin carga.• Más adecuado para romper las interacciones lípido-lípido y proteína lipídica.• Considerado como no desnaturalizante.• Las sales tienen un efecto mínimo en el tamaño micelar.• Solubiliza las proteínas de membrana de una manera más suave, permitiendo que las proteínas solubilizadas retengan la estructura de la subunidad nativa, la actividad enzimática y / o la función no enzimática.• La concentración micelar crítica (CMC) de un detergente no iónico no se ve relativamente afectada por el aumento de la fuerza iónica, pero aumenta sustancialmente con el aumento de la temperatura.

Tomado de Morales-Valencia *et al.*, 2016

ANTECEDENTES

Autor	Aportaciones
<p data-bbox="237 405 440 470">Perniconi et al., 2011</p> <p data-bbox="237 556 451 621">Perniconi et al., 2014</p>	<p data-bbox="532 344 1386 594">Desarrollaron un método utilizando para descelularizar músculo esquelético de ratón BALB/C adulto, en donde utilizaron la tibia anterior (TA) y el extensor lardo de los dedos (EDL). Las muestras fueron tratadas con una solución de SDS al 1% en agua destilada durante 6 y 24h y 24 y 48h respectivamente. Encontraron que a las 24h el EDL se encontraba descelularizado, mientras que TA a las 48h.</p> <p data-bbox="532 623 1386 835">Esto fue comprobado a partir de un análisis histológico mediante la tinción de H-E y tricrómica de Maason. En la tinción de H-E se observaron la MEC como una red de material filamentoso, que concuerda con la organización de endomisio típico del musculo sin descelularizar; no se encontraron núcleos, ni material fibrilar eosinófilos.</p> <p data-bbox="532 865 1386 1003">Mientras que en la tinción tricrómica de Masson donde en comparación con los controles no encontraron la presencia de componentes celulares y se corroboró la presencia de la MEC conservada.</p> <p data-bbox="532 1033 1386 1136">Mediante la tinción de foloidina y Hoechst del ADN, demostraron la pérdida completa tanto de la actina como de los núcleos de las microfibrillas celulares.</p> <p data-bbox="532 1165 1386 1268">También realizaron inmunofluorescencia para los componentes de la MEC, donde encontraron que la laminina y fibronectina se conservaron.</p> <p data-bbox="532 1297 1386 1640">Para evaluar la degradación de los andamios a lo largo del tiempo realizaron un análisis de imagen de los andamios mediante la presencia de laminina. Los andamios fueron almacenados en PBS estéril a 4 C y en condiciones de cultivo (en DMEM a 35 C, 5% de CO2 ambiental) durante dos semanas. Encontraron que la laminina disminuyó un 10%, mientras que la arquitectura no fue afectada a 4 C, mientras tanto en condiciones de cultivo la presencia de lamimina disminuyó en un 50%, aunque la arquitectura no se vio afectada.</p> <p data-bbox="532 1669 1386 1772">Posteriormente, implantaron el andamio descelularizado en un modelo murino durante 1, 2, 3 y 4 semanas, donde observaron regeneración muscular a los 30 días.</p> <p data-bbox="532 1801 1386 1866">Realizaron un ensayo con células C2C12 cultivadas en la MEC para observar la diferenciación a miotubos a 7 días de cultivo.</p>

<p>Wang <i>et al.</i>, 2013</p>	<p>Desarrollaron un método para descelularizar músculo de cerdo utilizando un método que consistió en congelación-descongelación, enzimático (tripsina/EDTA) y detergentes (triton x-100) que mantiene la arquitectura tridimensional, las propiedades mecánicas y bioquímicas de los componentes (colágeno, GAG y factores de crecimiento).</p> <p>También demostraron que la matriz extracelular obtenida proporciona un nicho compatible para la integración de células troncales derivadas de tejido adiposo humano.</p>
<p>Chaturvedi <i>et al.</i>, 2015</p>	<p>Describieron tres tratamientos de descelularización para músculo esquelético de ratas y ratones, donde encontraron que el más efectivo es el tratamiento con fosfolipasa A2, siendo éste capaz de eliminar material celular al tiempo que maximiza la retención de componentes de MEC.</p> <p>Posteriormente, la matriz fue solubilizada para utilizarse como sustrato para la proliferación de mioblastos C2C12 para la diferenciación a miotubos bajo condiciones de cultivo libre de suero. Encontraron que las matrices descelularizadas proporcionan señales para la migración y adhesión de mioblastos, ya que facilita la secreción y organización de glicoproteínas para una rápida organización celular.</p>

JUSTIFICACIÓN

La cicatrización como consecuencia de la reparación del tejido muscular en las lesiones, así como la disminución de la masa muscular por el envejecimiento conllevan a la acumulación excesiva de componentes de la MEC provocando la pérdida de la arquitectura y función normal del músculo. Las técnicas hasta ahora documentadas distan en gran medida de resolver estos problemas. Por lo anterior es necesario buscar nuevas alternativas para el adecuado tratamiento de las lesiones en músculo esquelético. Por lo que, es necesario el desarrollo de nuevos procedimientos basados en el uso de matrices extracelulares dado que éstas se caracterizan por poseer sitios bioactivos implicados en la migración, diferenciación y proliferación celular, además que es necesario eliminar moléculas inmunogénicas como alfa-gal para evitar rechazo inmunológico. Por lo que en el presente trabajo se sugiere un procedimiento innovador que no solo descelulariza tejido muscular, sino que elimina epitopos inmunogénicos como alfa-gal, característica relevante para el posterior uso del andamio en el tratamiento de lesiones musculares.

HIPÓTESIS

El procedimiento de descelularización de tejido muscular porcino con SDS o Tritón X-100, durante ocho días dará como resultado la obtención de un andamio caracterizado por la presencia de fibras de colágeno y la ausencia de células musculares y el epitopo alfa gal.

El procedimiento de descelularización de tejido muscular porcino a diferentes edades con SDS al 1% durante ocho días dará como resultado la obtención de un andamio caracterizado por la presencia de fibras de colágeno y la ausencia de células musculares y el epitopo alfa gal.

OBJETIVOS

Objetivo general

Obtención de un andamio descelularizado a partir de músculo esquelético porcino tratado con SDS al 1% o Tritón X-100 al 2%.

Estandarización del método de descelularización con SDS al 1% en músculo esquelético de cerdos de diferentes edades.

Objetivos particulares

1. Estandarización del tiempo necesario para la descelularización de porciones de 1cm^3 de músculo esquelético porcino.
2. Analizar en los andamios descelularizados los siguientes parámetros:
 - a) La presencia del epitopo alfa-gal mediante inmunohistoquímica.
 - b) Patrones histológicos del endomisio, perimisio y epimisio.
 - c) La presencia de células musculares mediante la presencia de actina y núcleos.
 - d) La ultraestructura de la matriz extracelular mediante microscopía electrónica de barrido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como modelo animal se utilizaron cerdos obtenidos del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los cerdos fueron sacrificados de acuerdo a lo establecido por la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999.

Para el primer experimento se sacrificó un cerdo de 9 días de edad, se tomaron muestras de músculo de las extremidades inferiores. Se colocaron en PBS 1X y se mantuvieron en hielo, posteriormente se cortaron en pedazos de 1cm^3 y se colocaron en los dos diferentes detergentes: 1) Tritón x-100 al 2%, y 2) SDS al 1% y como controles negativos se colocaron en agua destilada y PBS 1X (n=3) a 37°C en agitación 121rpm durante 8 días, se realizaron cambios cada tercer día de cada detergente. Transcurrido ese tiempo las muestras se enjuagaron en agua destilada y se fijaron en formaldehído al 10%. Se realizaron cortes histológicos y tinciones con hematoxilina y eosina (H y E) y tricrómico de Masson. También se realizó tinción fluorescente de núcleos utilizando 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Se tomaron fotos macroscópicas de cada muestra durante los 8 días de tratamiento (figura 4).

Para el segundo experimento se sacrificó un cerdo adulto (7 meses de edad) y se tomó una muestra del muslo de las extremidades inferiores, ésta fue transportada en PBS 1X en hielo al laboratorio. Posteriormente, se cortaron segmentos de 1cm^3 , 2cm^3 , 6cm^3 y 8cm^3 con una n=3, cada una se colocó en SDS al 1% a 37°C en agitación a 121rpm durante 8 días para todas las muestras, durante 10 y 12 días para las muestras de $2\times 3\times 1\text{cm}$ y $2\times 4\times 1\text{cm}$. Se

tomaron fotos y se registró el peso inicial y final de cada una de las muestras. Trascurrido el tiempo de tratamiento las muestras se lavaron con agua destilada y se fijaron en formaldehído al 10%. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos para la realización de tinciones de H y E y tricrómico de Masson (figura 5).

Posteriormente, se realizó un análisis de imagen para evaluar la presencia de células en las muestras, y la densidad celular se determinó contando los núcleos y remanentes celulares en 10 campos aleatorios visualizados a 40x.

A las muestras de 1cm³ se les realizaron inmunohistoquímica contra alfa-gal, anti-actina y DAPI.

Para el tercer experimento se sacrificaron cerdos de 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días (uno por cada día de edad), se tomaron tres muestras del muslo de las extremidades inferiores de cada cerdo de 1cm³ n=3 (del mismo individuo) y se colocaron en SDS al 1% a 37°C en agitación 121 rpm durante 8 días. Trascurrido este tiempo las muestras se lavaron en agua destilada y se fijaron en formaldehído al 10%. Posteriormente, se realizaron cortes histológicos y tinciones de H-E y tricrómico de Masson. También se realizaron inmunohistoquímica anti alfa-gal, anti-actina y DAPI. Se tomaron muestras al azar para analizar la ultraestructura del andamio mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) (figura 6).

Por último, se realizó un análisis de imagen con el programa ImageJ de las fibras de colágeno tipo I, este análisis consistió en medir las fibras del endomisio y del perimisio en 10 campos aleatorios visualizados en 40X por cada tratamiento, a los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza de un factor.

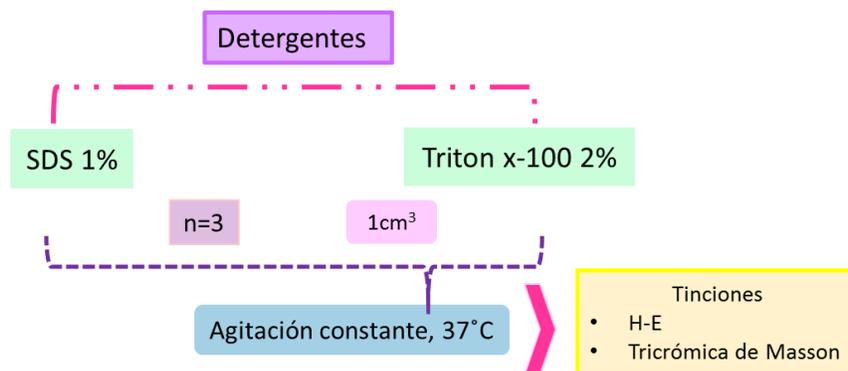


Figura 4. Diseño experimental del primer experimento, utilizando los detergentes SDS al 1% y Tritón x-100 al 2%.

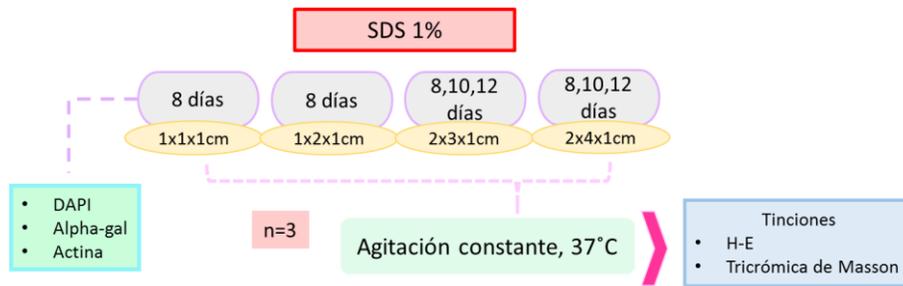


Figura 5. Diseño experimental del segundo experimento, utilizando SDS al 1% en muestras de cerdo adulto.

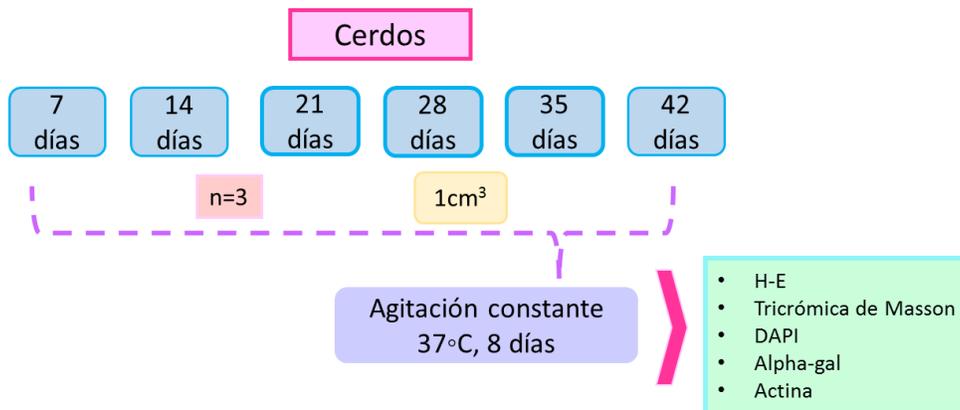


Figura 6. Diseño experimental del tercer experimento, utilizando SDS al 1% en muestras de diferentes edades de cerdo.

RESULTADOS

Descelularización en el transcurso de ocho días

En la primera parte del presente trabajo se establecieron dos tratamientos, SDS 1% y Tritón x-100 al 2% por ocho días para la obtención de los andamios. En ambos tratamientos se observó la pérdida gradual del tejido muscular hasta la obtención de la matriz extracelular. En el día cero el tejido previo al tratamiento se caracterizó por presentar un color rosado rojizo debido a la presencia de mioglobina (figura 9A). Al día uno y dos se observó que las muestras empezaban a perder color. En los días tres y cuatro se observó como el tejido aún conservaba parte de su color característico. A los días cinco, seis y siete las muestras habían perdido casi por completo la mioglobina. En el día 8 el tejido se observó de un color blanquecino traslúcido característico de los tejidos que han sido tratados con métodos de descelularización, lo que podría indicar que las muestras han perdido sus componentes celulares, obteniéndose como resultado una matriz extracelular descelularizada (figura 7 y 8).

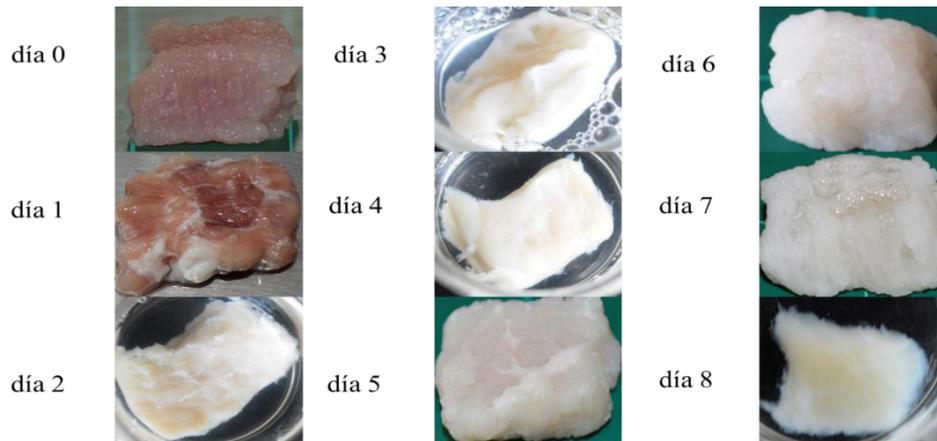


Figura 7. Fotografías macroscópicas de músculo esquelético de cerdo de 9 días al transcurso de 8 días de tratamiento con tritón x-100 al 2%.



Figura 8. Fotografías macroscópicas de músculo esquelético de cerdo de 9 días al transcurso de 8 días de tratamiento con SDS al 1%.

Descelularización dependiendo del detergente

En el músculo tratado con SDS al 1% se observó la pérdida de color, así como la disminución del tamaño de la muestra, lo que nos puede indicar la degradación de las fibras musculares (figura 9 B). Mientras que en el músculo tratado con Tritón X-100 al 1%, se observó la pérdida de mioglobina, pero no la reducción del tamaño de la muestra, lo que puede indicar que no hubo una pérdida considerable de fibras musculares (figura 9 C).

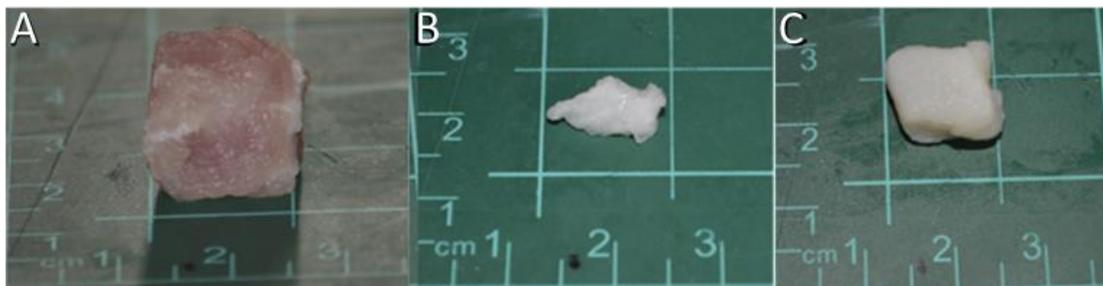


Figura 9. Fotografías macroscópicas de músculo esquelético de cerdo adulto tratado con diferentes detergentes durante 8 días a 37°C. (A) Músculo sin tratamiento (B) Músculo tratado con SDS al 1% (C) Músculo tratado con Tritón x-100 al 2%.

Para el análisis histológico de los tratamientos se realizaron cortes histológicos y tinciones de H-E y tricrómico de Masson.

En la tinción H-E del músculo esquelético de cerdo sin tratamiento, se observa en color rosa el citoplasma de las fibras musculares y en color morado los núcleos periféricos, así como la disposición de las fibras musculares formando fascículos. En el corte longitudinal se puede apreciar cómo las células musculares están unidas formando fibras largas (figura 10 A y a). Mientras que en el músculo tratado con SDS al 1% se observó la degradación total de las fibras musculares, ya que no se encontraron restos de los componentes celulares de tejido muscular. También se apreció cómo se conservó la estructura de la matriz extracelular ya que se logró mantener tanto el endomisio como el perimisio (figura 10 B y b). A diferencia del músculo tratado con Tritón X-100 al 1%, en el que se observó que, si hubo degradación de las fibras musculares, pero no completamente ya que se aprecian restos de citoplasma que mediante la tinción H-E se marcan de color rosa. También se pudo apreciar que el tejido conjuntivo fue degradado por el tratamiento ya que se observa la degradación de los componentes de la matriz, sin embargo, las fibras musculares no se lograron eliminar mediante el tratamiento (figura 10 C y c). Finalmente, respecto a los controles, el músculo esquelético tratado con agua destilada (figura 10 D) y músculo tratado con PBS (figura 10 E) se observó que el tejido fue completamente degradado a los cuatro días de tratamiento por la lisis normal del tejido.

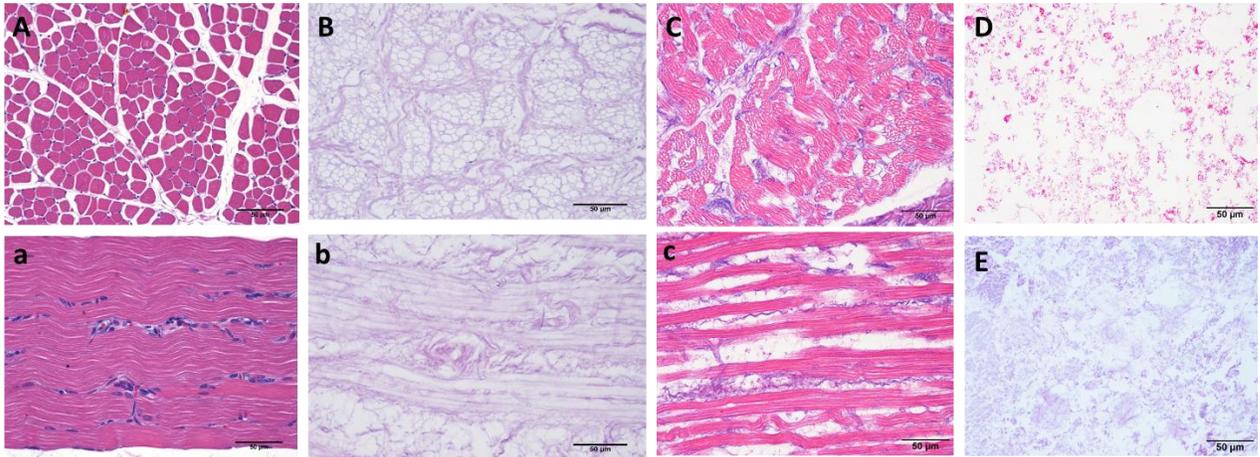


Figura 10. Fotomicrograffías de cortes transversales y longitudinales de músculo esquelético de cerdo adulto tratado con diferentes detergentes durante 8 días a 37°C, teñidas con H-E. 400X. (A y a) Músculo sin tratamiento (B y b) Músculo tratado con SDS al 1% (C y c) Músculo tratado con Tritón x-100 al 2% (D) Músculo tratado con Agua destilada (E) Músculo tratado con PBS 1X.

A su vez en los cortes teñidos con tricrómico de Masson se encontró que en el músculo esquelético de cerdo sin tratamiento se observaron en color rojo el citoplasma de las fibras musculares y en negro los núcleos de las células (figura 11 A y a). Mientras que en el músculo tratado con SDS al 1% se observó la degradación total de las fibras musculares, ya que no se encontraron restos de los componentes celulares de tejido muscular. También se observa en color azul las fibras de colágeno tipo I y las fibras reticulares que conforman la estructura de la matriz tanto el endomisio como el perimisio (figura 11 B y b). En el músculo tratado con Tritón X-100 al 1%, se observó que sí hubo degradación de las fibras musculares, pero no completamente, debido a que se observaron restos de las fibras musculares teñidas de color rojo. También se pudo apreciar que el tejido conjuntivo fue degradado por el tratamiento dado que se observa cómo la disposición de las fibras de colágeno se vio disminuida. En relación a los controles de músculo tratado con PBS al 1X (figura 11 D) y músculo tratado con agua destilada (figura 11 E) se observó que el tejido completo, tanto fibras musculares y matriz extracelular, se degradaron a los cuatro días de tratamiento por la lisis normal del tejido.

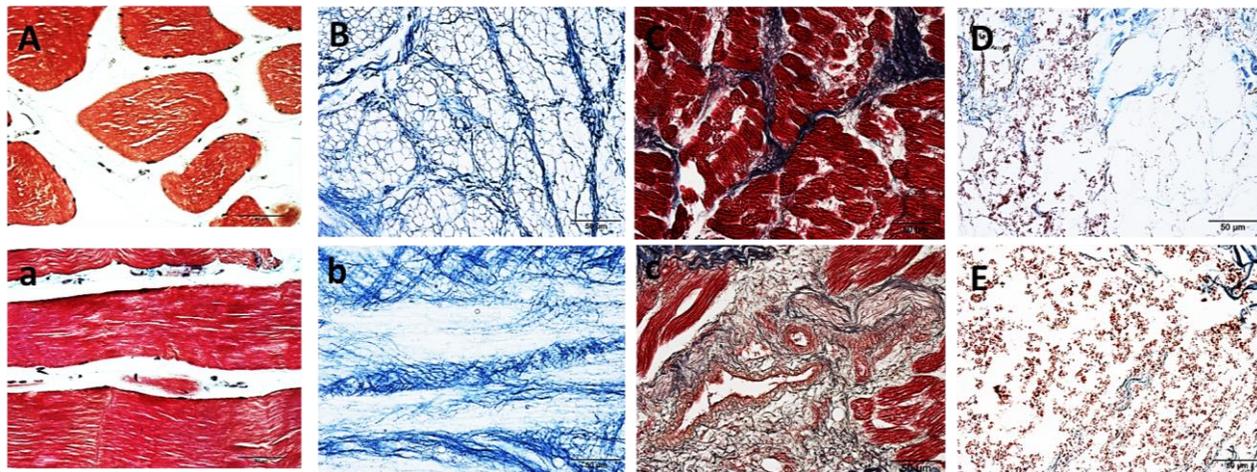


Figura 11. Fotomicrografías de cortes transversales y longitudinales de músculo esquelético de cerdo adulto tratado con diferentes detergentes durante 8 días a 37°C, teñidos con Tricrómica de Masson. 400X. (A y a) Músculo sin tratamiento (B y b) Músculo tratado con SDS al 1% (C y c) Músculo tratado con Tritón x-100 al 2% (D) Músculo tratado con Agua destilada (E) Músculo tratado con PBS 1X.

Para completar el análisis histológico de los tratamientos se realizó una inmunofluorescencia para la identificación de material nuclear por medio de la tinción DAPI. Se encontró que en ambos tratamientos SDS al 1 % (figura 12 B) y Tritón X 100 (figura 12 C) los ácidos nucleicos fueron eliminados por los detergentes.

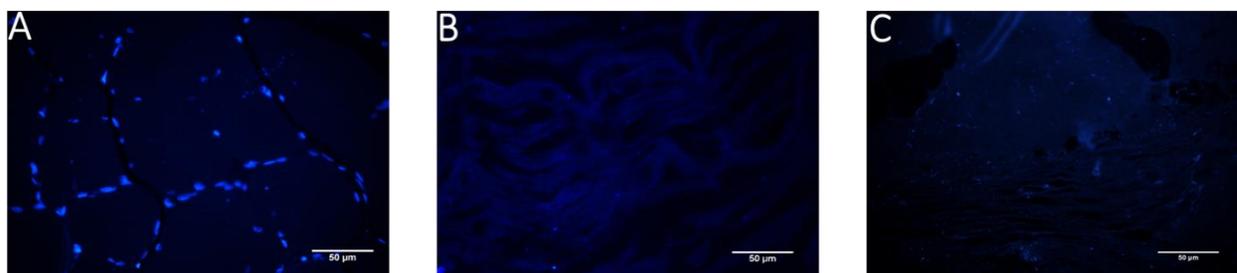


Figura 12. Fotomicrografía de músculo esquelético de cerdo adulto. Tinción DAPI. 400X. (A) Músculo sin tratamiento (B) Músculo tratado con SDS al 1% (C) Músculo tratado con Tritón X-100.

Descelularización dependiendo del tamaño del tejido

Al haber obtenido mejores resultados con el tratamiento de SDS al 1%, que con el Tritón X-100 al 2%, se decidió hacer pruebas con distintos tamaños de muestras.

En la segunda parte del presente estudio se establecieron distintos tamaños de muestra (1cm³, 2cm³, 6cm³ y 8cm³) y se trataron con SDS al 1% durante 8, 10 y 12 días a 37°C.

En las imágenes macroscópicas (figura 13 A y B) se muestran los cortes de músculo sin tratamiento donde se observó el color rojo característico del tejido muscular, mientras que las muestras tratadas con SDS al 1% durante ocho días, se pueden apreciar la disminución del tamaño y el cambio de color de la muestra, lo que sugiere la degradación de los componentes de las fibras musculares (figura 13 a y b).

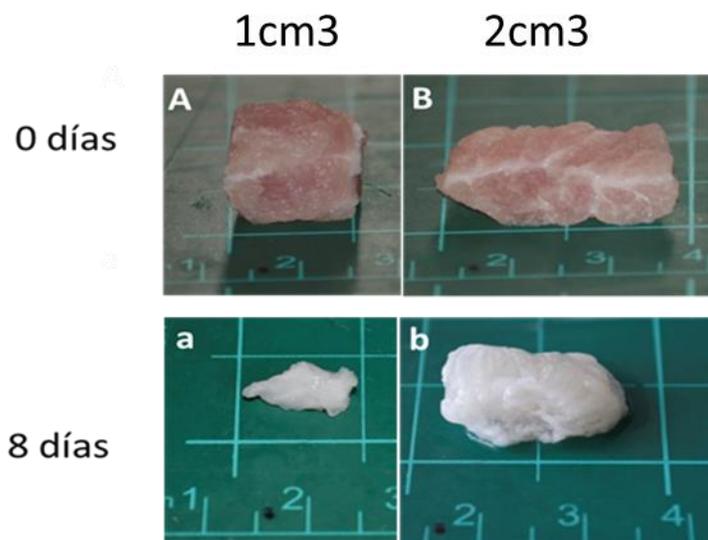


Figura 13. Fotografías macroscópicas de músculo esquelético de cerdo adulto. (A) Músculo de 1cm³ sin tratamiento (a) Músculo de 1cm³ tratado con SDS al 1% durante 8 días, (B) Músculo esquelético de 2cm³ sin tratamiento, (b) Músculo esquelético de 2cm³ tratado con SDS al 1% durante 8 días.

Para el análisis histológico de las muestras de músculo esquelético de cerdo de 1cm³ y 2cm³ tratado con SDS 1% durante ocho días de tratamiento se realizaron tinciones de H-E y tricrómico de Masson. En la tinción con H-E de las muestras de 1cm³ se observó la ausencia de fibras musculares y la preservación de la estructura de la matriz extracelular caracterizada por el endomisio, perimisio y epimisio (figura 14).

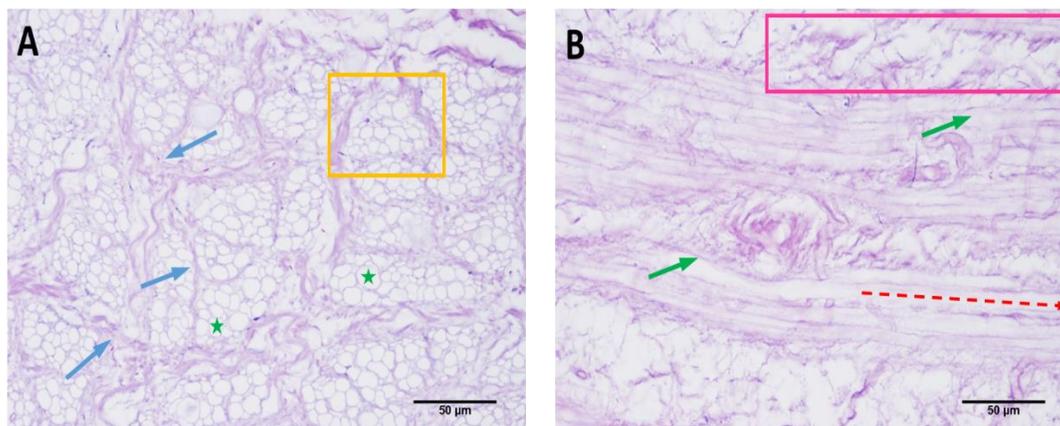


Figura 14. Fotomicrografía de músculo esquelético de cerdo de 1cm³ tratado con SDS al 1% a 8 días de tratamiento, teñido con H-E 400x. (A) Corte transversal, (B) Corte longitudinal. Las flechas señalan el perimisio de la matriz extracelular, el rectángulo encierra las fibras de tejido conjuntivo de un fascículo y las estrellas señalan el espacio que ocupaba una fibra muscular.

En la tinción de tricrómico de Masson de las muestras de 1cm³ de músculo esquelético de cerdo 1cm³ en SDS 1% a ocho días de tratamiento, se corroboró lo encontrado en la tinción de H-E al observarse la ausencia de fibras musculares y la preservación de la estructura de la

matriz extracelular caracterizada por el endomisio, perimisio y epimisio. Esta tinción nos permite apreciar la presencia de fibras de colágeno tipo I teñidas en color azul (figura 15).

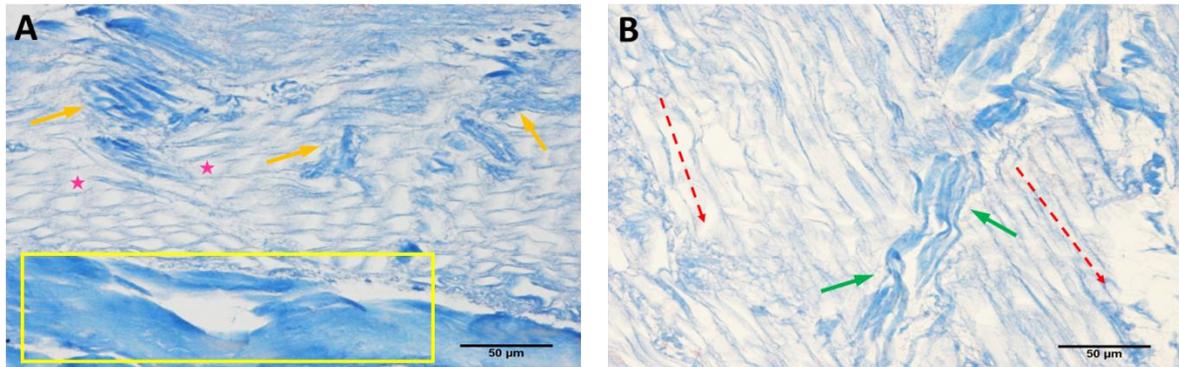


Figura 15. Fotomicrografías de (A) Corte transversal y (B) Corte longitudinal de músculo esquelético de cerdo 1cm^3 en SDS 1% a 8 días de tratamiento, teñido con tricrómico de Masson 400X. Las flechas señalan las fibras de la MEC del perimisio, mientras que las líneas punteadas y las estrellas muestran el espacio que ocupaban las fibras musculares. Para finalizar en el recuadro amarillo se muestran las fibras que conforman el epimisio.

Respecto a las muestras de músculo esquelético de cerdo 2cm^3 tratadas con SDS 1% durante ocho días, la muestra teñida con H-E mostró que prácticamente todo el tejido muscular fue removido, aunque quedaron algunos restos celulares en las muestras, también se logró mantener la estructura de la matriz extracelular (figura 16).

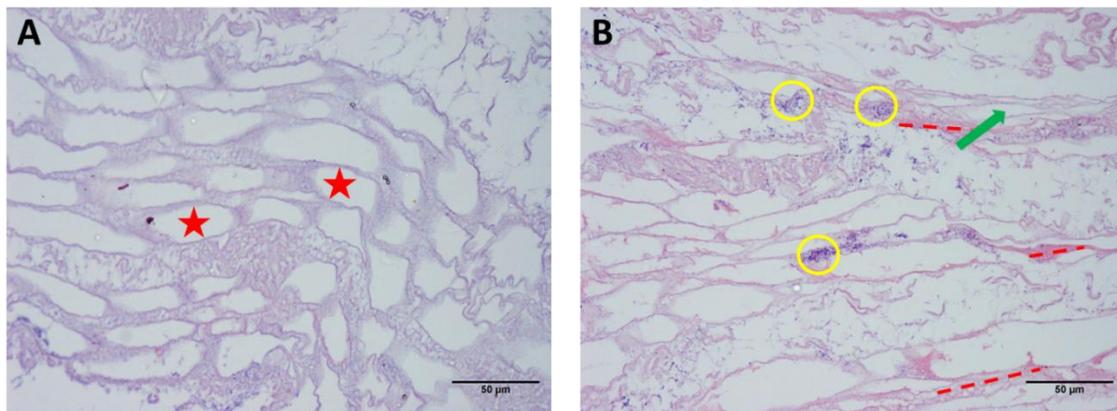


Figura 16. Fotomicrografías de (A) Corte transversal y (b) Corte longitudinal de músculo esquelético de cerdo 2cm^3 en SDS 1% a 8 días de tratamiento, teñido con H-E 400x. Las estrellas señalan el espacio que ocupaban las fibras musculares. Los círculos señalan los restos celulares en la matriz extracelular, mientras que las flechas y líneas punteadas señalan las fibras de la MEC.

En la tinción de tricrómico de Masson, las muestras de músculo esquelético de cerdo de 2cm^3 tratadas con SDS 1% por ocho días mostraron que la mayor parte del tejido muscular fue removido por el detergente, pero quedaron restos de las fibras musculares; asimismo, se puede apreciar que se mantuvo la estructura de la matriz extracelular (endomysio y perimisio) (figura 17).

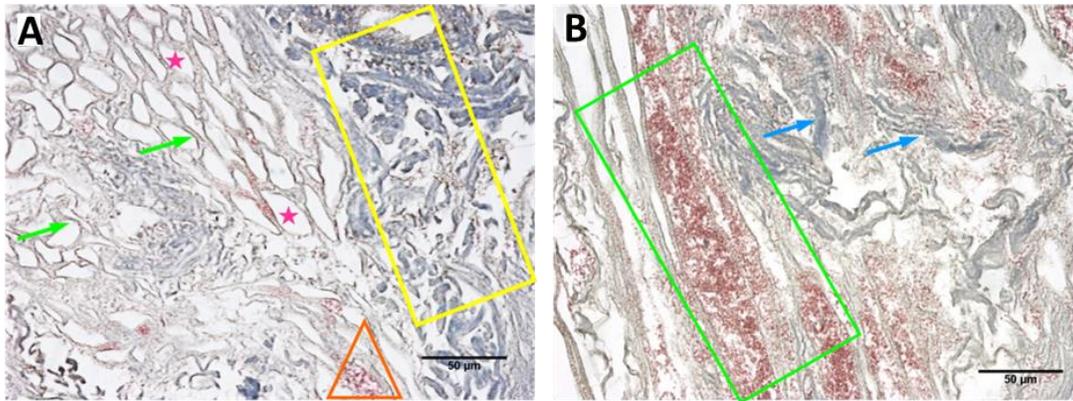


Figura 17. Fotomicrografías de (A) Corte Longitudinal y (B) Corte transversal de músculo esquelético de cerdo 2cm³ en SDS 1% a 8 días de tratamiento teñido con tricrómico de Masson, 400X. En (A) las estrellas indican el espacio que ocupaban las células musculares rodeadas por el endomisio que está señalado con flechas. En el rectángulo amarillo muestra el perimisio rodeando al endomisio. En (B) las flechas señalan las fibras de la MEC. El rectángulo muestra los restos celulares en la MEC.

Las fotografías macroscópicas de músculo esquelético de cerdo adulto tratado con SDS al 1% a 0, 8, 10 y 12 días de músculo de 6cm³ (figura 18 A) y músculo de 8cm³ (figura 18 B) mostraron la disminución progresiva de la coloración y tamaño del tejido muscular.

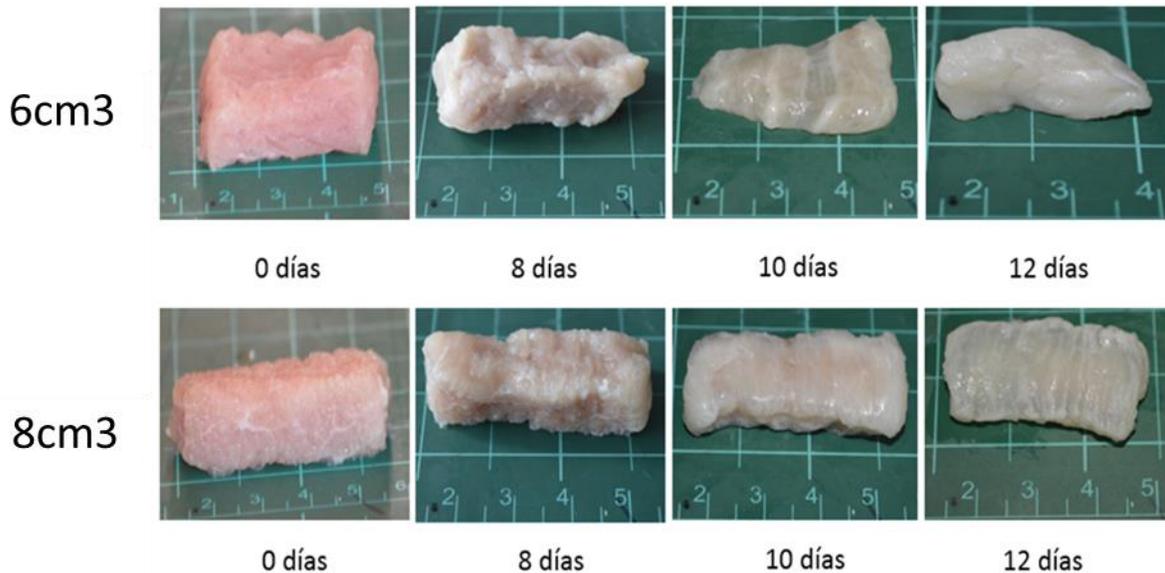


Figura 18. Fotografías macroscópicas de músculo esquelético de cerdo adulto tratado con SDS al 1% a 0, 8, 10 y 12 días. (A) Músculo de 6cm³. (B) Músculo de 8cm³.

Para el análisis histológico de las muestras de 6cm³ y 8cm³ tratadas con SDS al 1% por 8 días, 10 días y 12 días, se realizaron tinciones de H-E y tricrómico de Masson La tinción H-E de las muestras de 6cm³ tratadas durante ocho días con SDS al 1% (figura 19 A) indicó que la mayor parte del tejido permaneció intacto por el tratamiento ya que la tinción permite teñir de rosa el citoplasma de las células. Por otra parte, las muestras tratadas 10 (figura 19 B) y 12 días (figura 19 C) señalaron que la parte central el tejido no había sido degradado

por el detergente, pero en el acercamiento se puede observar que las partes más exteriores que se descelularizaron no mantuvieron la estructura normal de la matriz extracelular ya que no se diferenció el endomisio. Solo se lograron apreciar fibras sin ninguna organización. Esto podría indicarnos que el detergente no puede penetrar a las partes más profundas del tejido y que al paso del tiempo tiende a degradar la matriz extracelular.

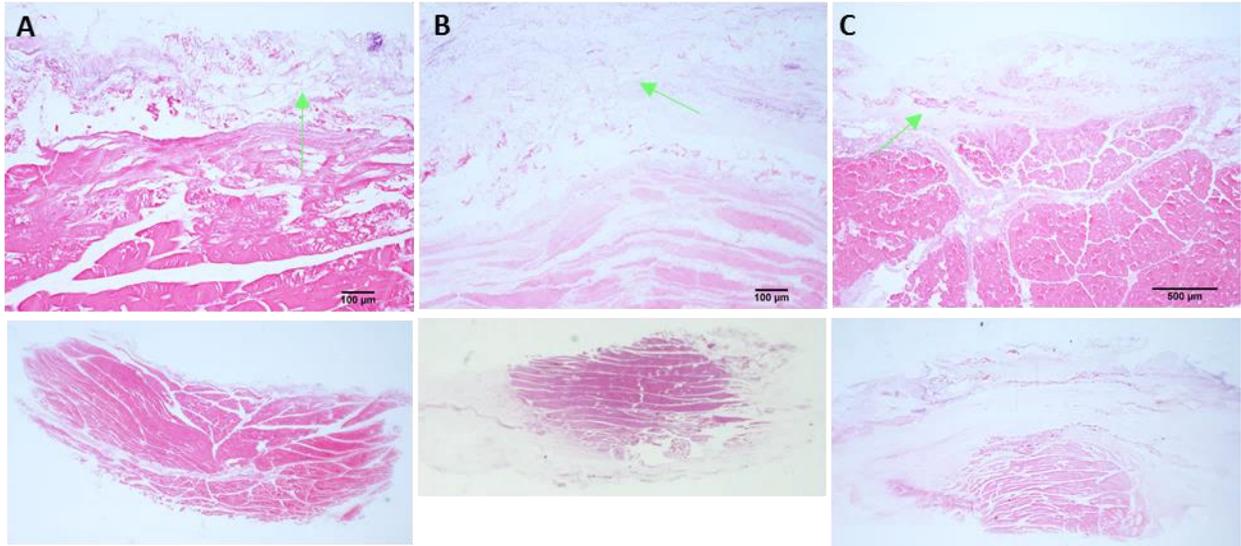


Figura 19. Fotomicrografías de músculo esquelético a las muestras de 6cm^3 tratadas con SDS al 1% por (A) 8 días, (B) 10 días y (C) 12 días teñidas con de H-E 100X y Holóptica. Las flechas señalan la parte que fue descelularizada.

Para las muestras de 6cm^3 en la tinción de tricrómico de Masson se puede observar que a los 8 días de tratamiento la mayor parte del tejido permaneció intacto (figura 20 A), en el acercamiento se puede observar que el tejido que se logró descelularizar aún mantiene la estructura de la MEC. En los 10 y 12 días de tratamiento la mayor parte del tejido fue descelularizado con el SDS al 1% (figura 20 B y C). En el acercamiento se puede observar que la zona que se ha descelularizado no mantiene la estructura normal de la matriz extracelular del músculo esquelético, ya que no se puede diferenciar el endomisio, solo se logra apreciar fibras sin ninguna organización. En la figura 21 (C) se puede diferenciar el perimisio pero las fibras de colágeno se observan rotas.

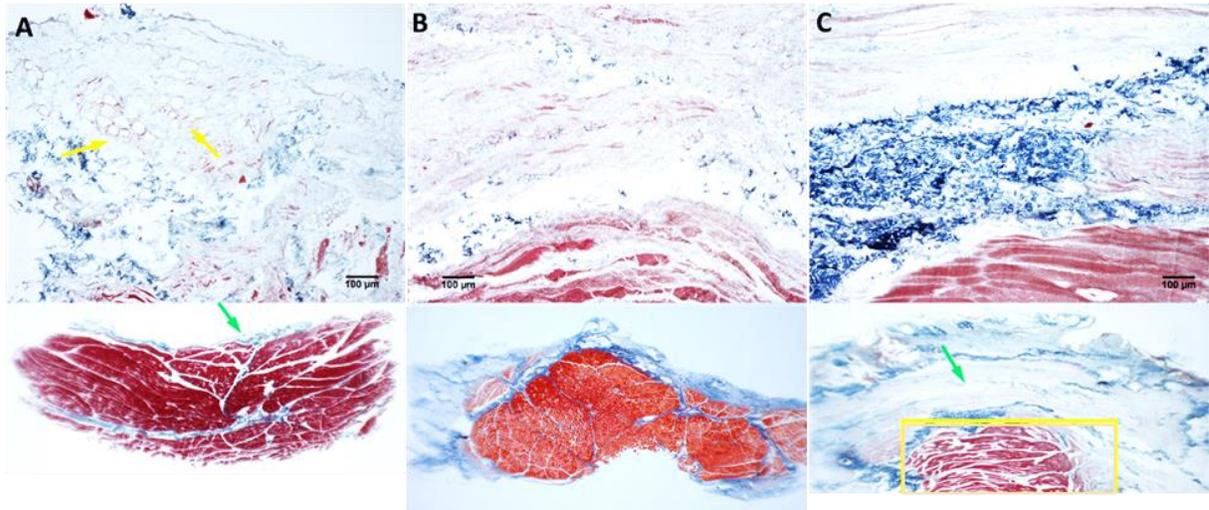


Figura 20. Fotomicrografías de músculo esquelético a las muestras de 6cm^3 tratadas con SDS al 1% por (A) 8 días, (B) 10 días y (C) 12 días teñidas con tricrómico de Masson 100X y Holóptica. Las flechas muestran la parte que fue descelularizada. El rectángulo amarillo señala la parte central que no logro ser penetrada por el detergente.

En la tinción de H-E para las muestras de 8cm^3 se puede observar en rosa que la mayor parte del tejido permaneció intacto por el tratamiento a los 8 días de tratamiento (figura 22 “A”), en el acercamiento se puede observar que la parte que se ha descelularizado mantiene la estructura normal del endomisio. Mientras que a los 10 (figura 21 B) y 12 días de tratamiento (figura 21 C) se muestra que la parte central de tejido muscular, en color rosa, no fue degradado por el detergente en el acercamiento se puede observar que la parte que se ha descelularizado no mantiene la estructura normal de la matriz extracelular ya que no se puede diferenciar el endomisio, solo se logra apreciar fibras sin ninguna organización. A los 12 días (figura 21 C) se puede apreciar en algunas partes de la muestra el endomisio, pero solo en las zonas más cercanas al tejido que no ha sido descelularizado, esto se puede deber a que esta parte de la muestra ha estado durante menor tiempo en contacto con el detergente.

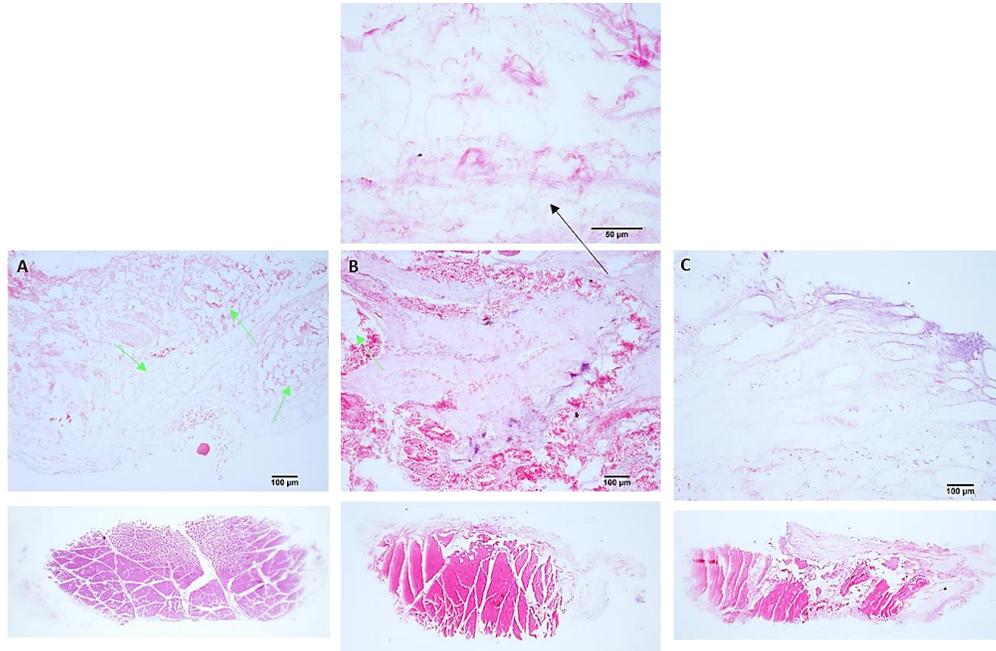


Figura 21. Fotomicrografías de músculo esquelético porcino de 8cm³ tratado con SDS al 1% a (A) 8 días, (B) 10 días y (C) 12 días de tratamiento. Teñidas con H-E 100X y Holóptica. Las flechas señalan las fibras rotas de la MEC.

Por último, con la tinción tricrómico de Masson para las muestras de 8cm³ tratadas durante 8 días (figura 22 A) se muestra en rojo que la mayor parte del tejido ha permanecido intacto por el tratamiento, en el acercamiento se puede observar que la parte que se ha descelularizado mantiene la estructura normal de la matriz extracelular del músculo esquelético. A los 10 (figura 22 B) y 12 días de tratamiento (figura 22 C), en rojo se muestra la parte del tejido muscular que no ha sido degradado por el detergente, en el acercamiento se puede observar que la parte que se ha descelularizado no mantiene la estructura normal de la matriz extracelular ya que no se puede diferenciar el endomisio, solo se logra apreciar fibras sin ninguna organización. A los 12 días de tratamiento (figura 22 C) se pueden apreciar en algunas partes de la muestra el endomisio, pero solo en las áreas más cercanas al tejido que no ha sido descelularizado, esto se puede deber a que esta parte de la muestra ha estado durante menor tiempo en contacto con el detergente.

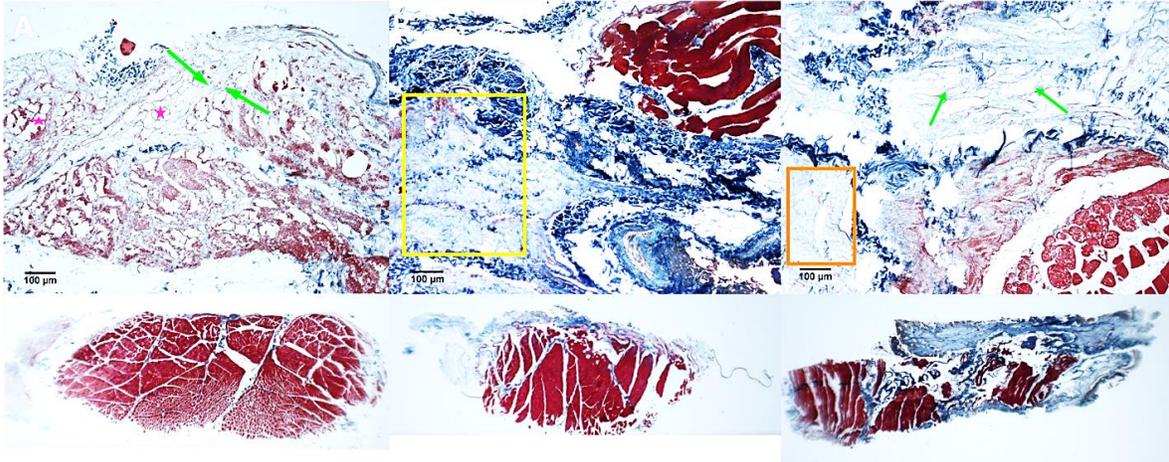
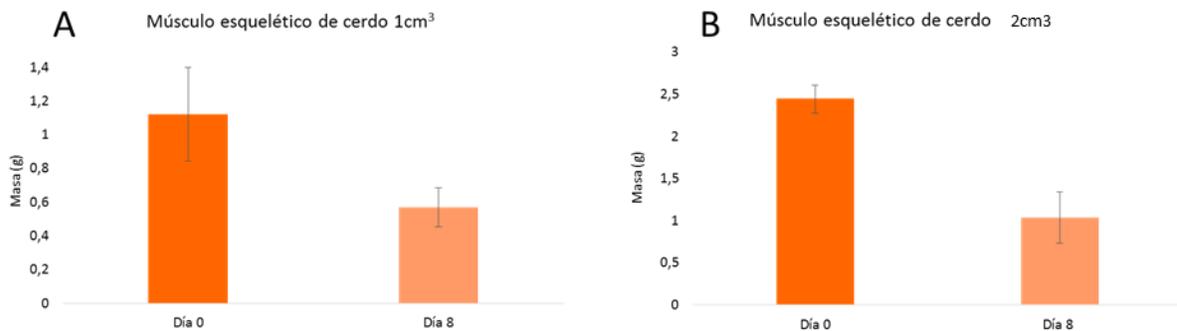


Figura 22. Fotomicrografías de músculo esquelético porcino de 8cm³ tratado con SDS al 1% a (A) 8 días, (B) 10 días y (C) 12 días de tratamiento. Teñidas con Tricrómica de Masson 100X y Holóptica. Los recuadros y las flechas señalan en los tejidos las pares que si fueron descelularizadas con el tratamiento.

Registro del cambio en el peso de las muestras durante el tratamiento

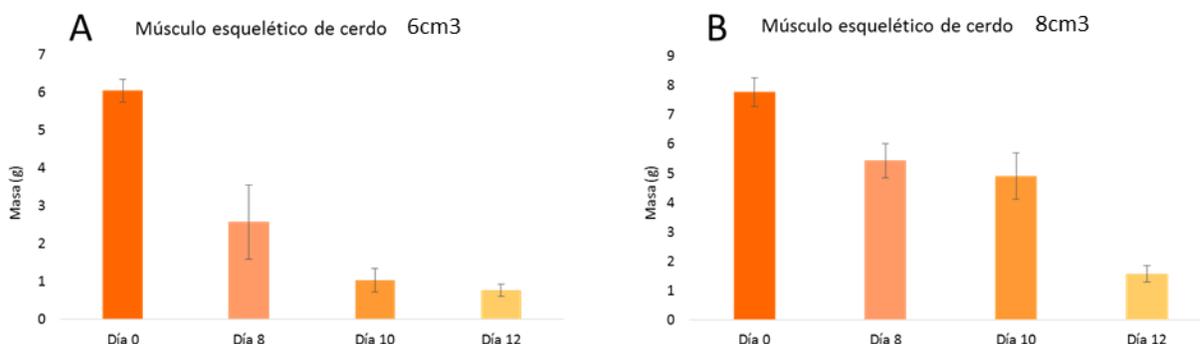
Para analizar el cambio de peso en las diferentes muestras se realizaron graficas donde se comparó el peso inicial y el peso al terminar el tratamiento. Respecto a los resultados registrados de los pesos en las muestras de 1cm³ de músculo esquelético de cerdo tratado con SDS al 1% durante ocho días se observó que el peso promedio inicial de las muestras fue de 1.1g y después del tratamiento de 0.44g (gráfica 1 A), lo que nos indica la disminución del peso de las muestras al ser sometidas al tratamiento con SDS. Mientras que para las muestras de 2cm³ (grafica 1 B) el peso inicial de las muestras fue de 2.3g y transcurridos los ocho días de tratamiento fue de 1g, lo que nos indica la pérdida de material celular en ambas medidas



Gráfica 1. Peso (g) inicial y a ocho días de tratamiento de las muestras 1cm³ (A) y 2cm³ (B) tratadas con SDS al 1% (n=3). En las barras de las gráficas se observa la desviación estándar.

Respecto a las muestras de 6cm³ y 8cm³ se registró el cambio en el peso de las muestras. El peso promedio inicial de las muestras de 6cm³ (gráfica 1 A) fue de 6g, a los ocho días de tratamiento de 2.5g, a los diez de 1g y a los doce de 0.7g. Mientras que para las muestras de 8cm³ (gráfica 2 “B”) el peso inicial de las muestras fue de 7.7g, a los ocho días de tratamiento de 5.4g a los diez días de 4.9g y a los doce días de 1.5g. Estos resultados muestran que la

pérdida de peso fue proporcionalmente mayor en comparación con las muestras de 1cm^3 y 2cm^3 , lo que nos podría indicar que no sólo hubo pérdida de fibras musculares, sino que también de los componentes de la matriz extracelular.

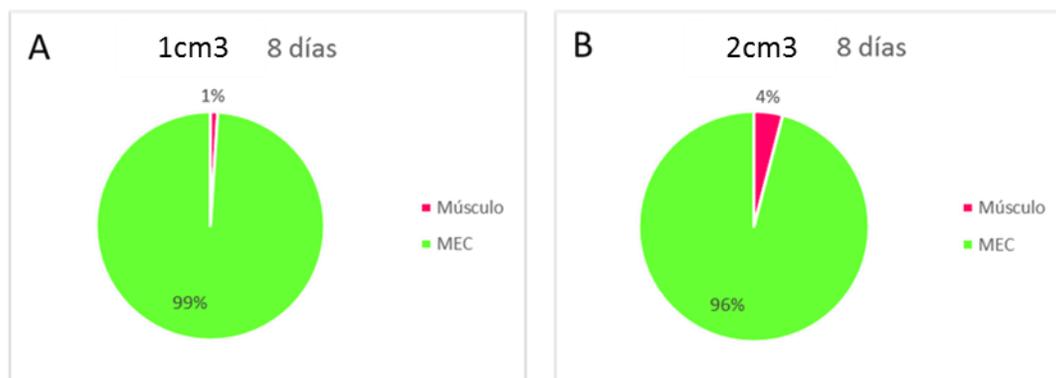


Gráfica 2. Peso (g) inicial y a 8, 10 y 12 días de tratamiento con SDS al 1% de las muestras 6cm^3 (A) y 8cm^3 (B) tratadas con SDS al 1% (n=3). En las barras de las gráficas se observa la desviación estándar.

Porcentaje de descelularización de los tratamientos

Para obtener el porcentaje de descelularización de las diferentes muestras se realizó un análisis de imagen de los cortes histológicos.

Para los cortes de 1cm^3 (gráfica 3 A) se encontró que el porcentaje de descelularización fue del 99%, mientras que para los cortes de 2cm^3 (gráfica 3 B) fue del 96% concordando con los resultados mostrados en los cortes histológicos.



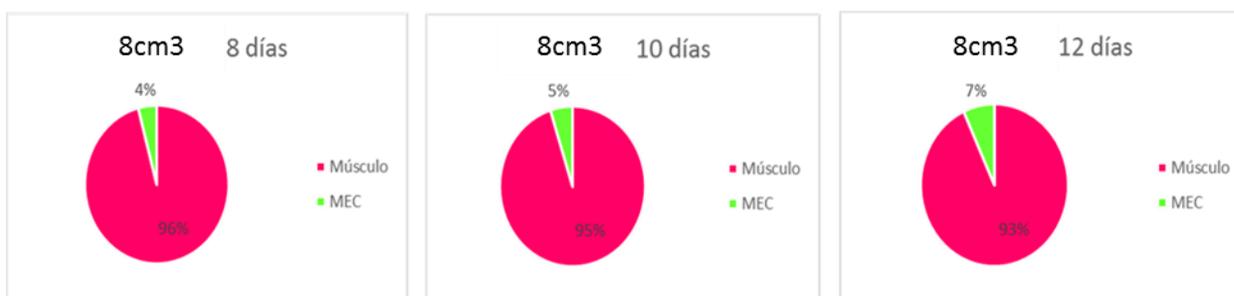
Gráfica 3. Porcentaje de descelularización de las muestras de 1cm^3 (A) y 2cm^3 (B) tratadas con SDS al 1% durante ocho días. En verde se indica el porcentaje de matriz extracelular y en rosa de músculo esquelético.

De acuerdo con el análisis de imagen se observa que el porcentaje de descelularización para las muestras de 6cm^3 fue del 1% a los 8 días, de 46% a los 10 días y del 69% a los 12 días (gráfica 4).



Gráfica 4. Porcentaje de descelularización de las muestras de 6cm³ a 8, 10 y 12 días de tratamiento con SDS al 1%. En verde se indica el porcentaje de matriz extracelular y en rosa de músculo esquelético.

Respecto al análisis de imagen de las muestras de 8cm³ se obtuvo que el porcentaje de descelularización fue del 4% a los 8 días, de 5% a los 10 días y del 7% a los 12 días de tratamiento con SDS al 1% (gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de descelularización de las muestras de 8cm³ a 8, 10 y 12 días de tratamiento con SDS al 1%. En verde se puede observar el porcentaje de MEC y en rosa de músculo esquelético.

Análisis histológico de los andamios a las diferentes edades de músculo esquelético porcino

Descelularización dependiendo de la edad

Al obtener los mejores resultados con el tratamiento de SDS al 1% por ocho días, se decidió establecer nuevos tratamientos, pero ahora utilizando edades ascendentes de cerdos con el objetivo de averiguar si en el andamio se encontraba presente el epitopo alfa-gal.

Para la tercera parte del presente estudio se realizó el análisis histológico del músculo esquelético de cerdo tratado con SDS al 1% durante ocho días en el modelo animal a diferentes edades: 7 días, 14 días, 21 días, 35 días, 42 días y adulto (7 meses), mediante las tinciones de H-E, tricrómico de Masson y DAPI.

En la tinción de H-E se encontró que el detergente SDS al 1% eliminó el tejido muscular en todas las muestras de diferentes edades, ya que la tinción permite teñir el citoplasma de las células de color rosa y de color morado el tejido conjuntivo. También se pudo observar cómo se conservó la estructura característica de la matriz extracelular del músculo esquelético conformada por el endomisio, perimisio y epimisio (figura 23).

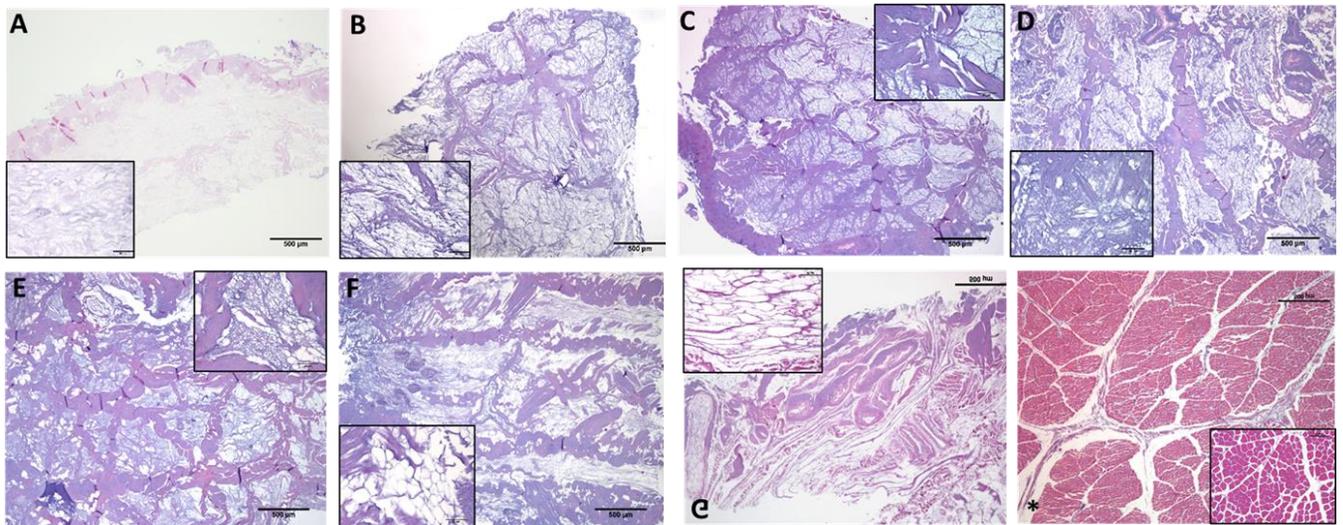


Figura 23. Fotomicrografías de músculo esquelético de cerdo tratado con SDS 1% durante 8 días. H-E. 40X y 400X. (A) Cerdo adulto, (B) 7 días, (C) 14 días, (D) 21 días, (E) 35 días, (G) 42 días (*) Sin tratamiento.

La tinción de tricrómico de Masson (figura 23) confirma lo encontrado en la tinción de H-E, al observar como el tejido muscular (en rojo) fue eliminado en todas las muestras de las diferentes edades y la matriz extracelular fue conservada. Esta tinción permite identificar las fibras de colágeno tipo I al teñirlas de azul, el colágeno es el principal componente de la matriz extracelular.

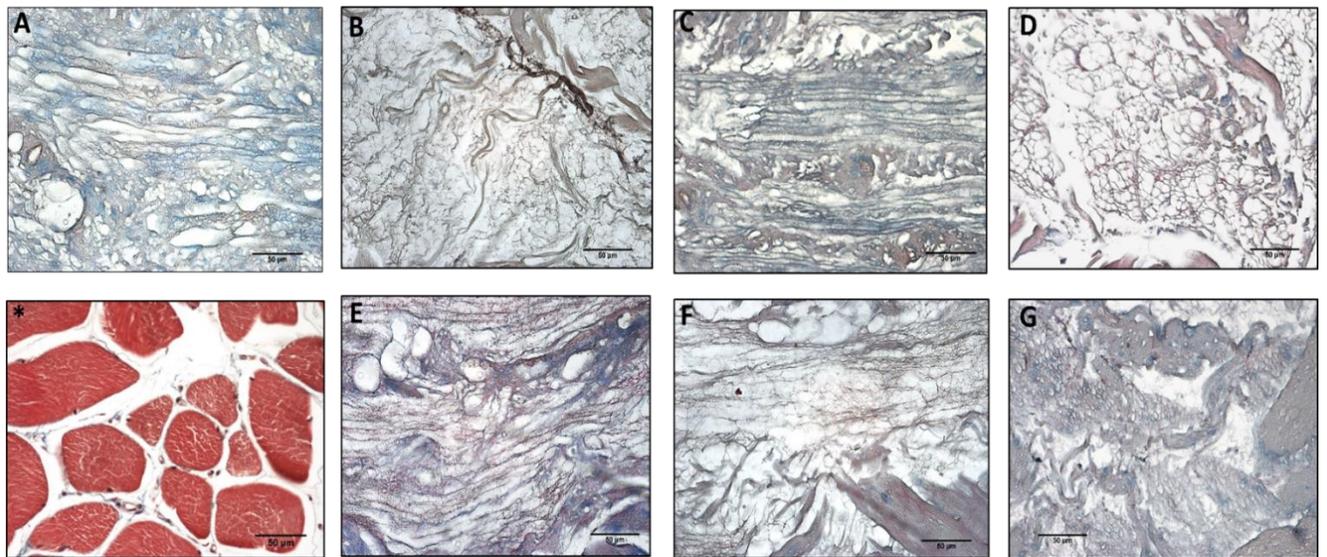


Figura 23. Fotomicrografías de músculo esquelético de cerdo tratado con SDS 1% durante 8 días. tricrómico de Masson. 400X. (A) Cerdo adulto, (B) 7 días, (C) 14 días, (D) 21 días, (E) 28 días, (F) 35 días, (G) 42 días (*) Sin tratamiento.

La tinción de núcleos DAPI permitió confirmar la ausencia de material nuclear de las células musculares en las muestras a diferentes edades tratadas con el detergente, ya que a diferencia

del control sin tratamiento no hubo marca positiva en color azul (+) para la presencia de ácidos nucleicos en las muestras (figura 24).

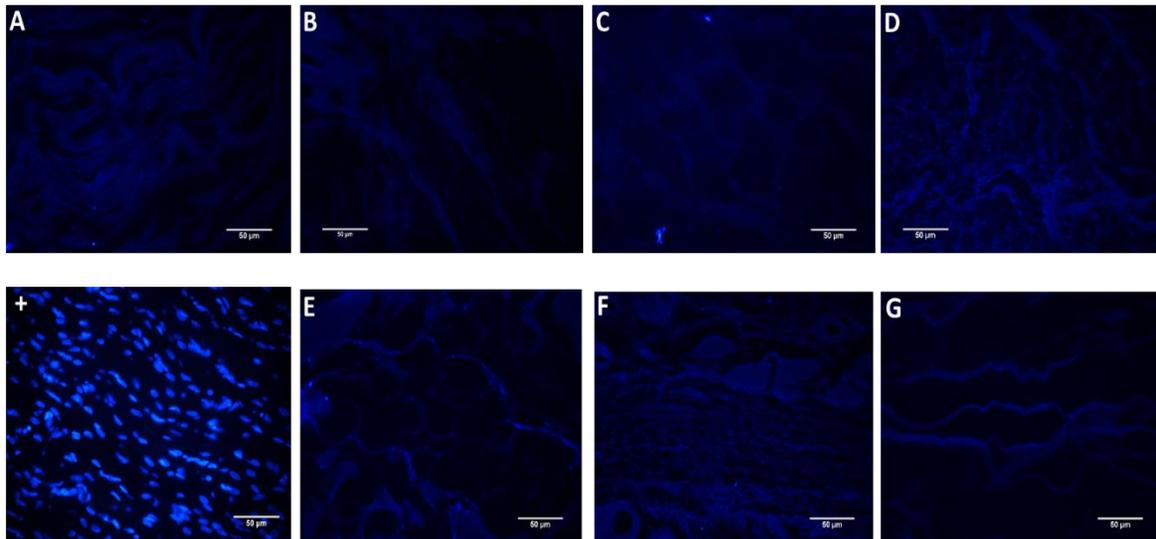


Figura 24. Micrografías de músculo esquelético de cerdo tratado con SDS 1% durante 8 días. Tinción DAPI. 400X. (A) Cerdo adulto, (B) 7 días, (C) 14 días, (D) 21 días, (E) 28 días, (F) 35 días, (G) 42 días (+) Músculo esquelético de cerdo sin tratamiento.

Para corroborar que el tejido muscular fue eliminado de las muestras de diferentes edades de músculo esquelético porcino se realizó una inmunohistoquímica anti actina. Los resultados nos muestran que la marca fue negativa para todos los tratamientos (figura 25) indicándonos la completa eliminación de la actina, uno de los principales componentes del citoesqueleto de las células musculares.

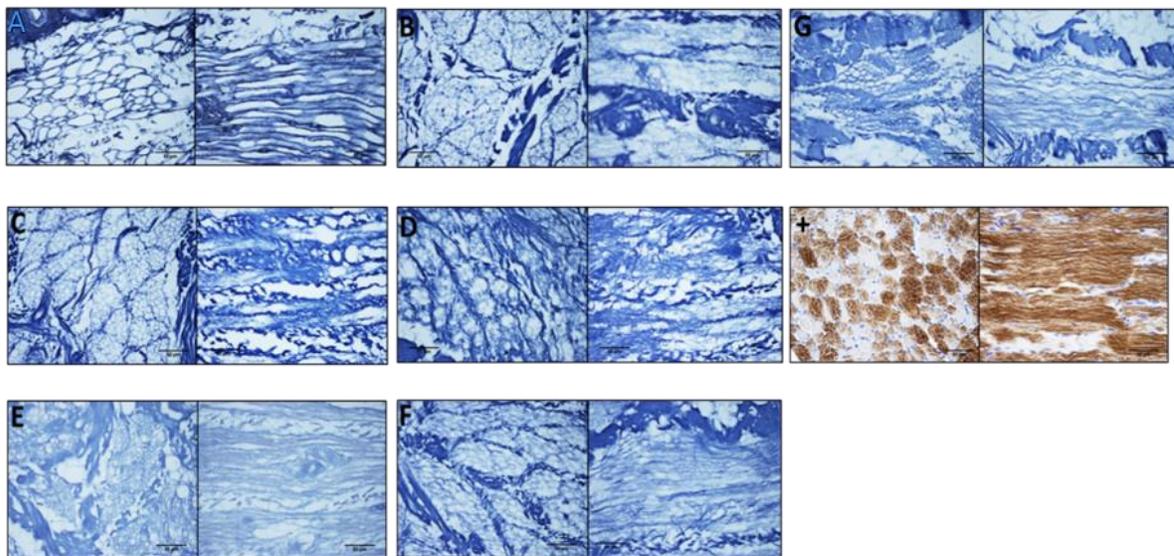


Figura 25. Inmunohistoquímica anti actina en muestras de músculo esquelético de cerdo tratado con SDS 1% durante 8 días. 400X. (A) Cerdo adulto, (B) 7 días, (C) 14 días, (D) 21 días, (E) 28 días, (F) 35 días, (G) 42 días. (+) Músculo esquelético de cerdo sin tratamiento.

Debido a que uno de los factores de rechazo de los xenoinjertos es la presencia del epítipo alfa-gal, se realizó una inmunohistoquímica para poder identificar si esta molécula fue eliminada con el tratamiento de SDS al 1% en las muestras a diferentes edades. La tinción permitió identificar que el epítipo alfa gal, que se caracteriza por estar presente en el epitelio de los vasos sanguíneos que irrigan a las fibras musculares, fue eliminado en todas las muestras de diferentes edades, al estar expuesto el tejido al detergente (figura 26 A–G). A diferencia del músculo sin tratamiento en el que se observó una marca positiva color café indicando la presencia del epítipo alfa gal (figura 26 +).

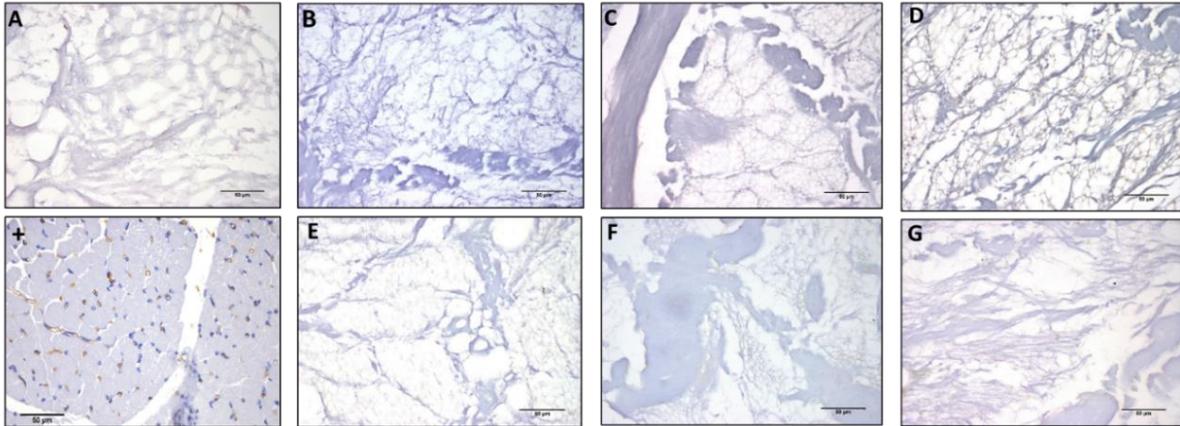


Figura 26. Inmunohistoquímica anti alfa-gal en muestras de músculo esquelético de cerdo tratado con SDS 1% durante 8 días. 400X. (A) Cerdo adulto, (B) 7 días, (C) 14 días, (D) 21 días, (E) 28 días, (F) 35 días y (G) 42 días (+) Músculo esquelético de cerdo sin tratamiento

Ultraestructura del andamio

Se tomaron muestras al azar (7 a 42 días) para analizar la ultraestructura del andamio mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) del andamio descelularizado de músculo esquelético porcino.

Se observó que se conservó la estructura del colágeno del endomisio después del tratamiento con SDS al 1%. También se observó la ausencia de células en el andamio. La organización 3D sugiere que la MEC está bien conservada al poder diferenciar los huecos donde se encontraban las fibras musculares, el endomisio y el perimisio de la MEC (figura 27).

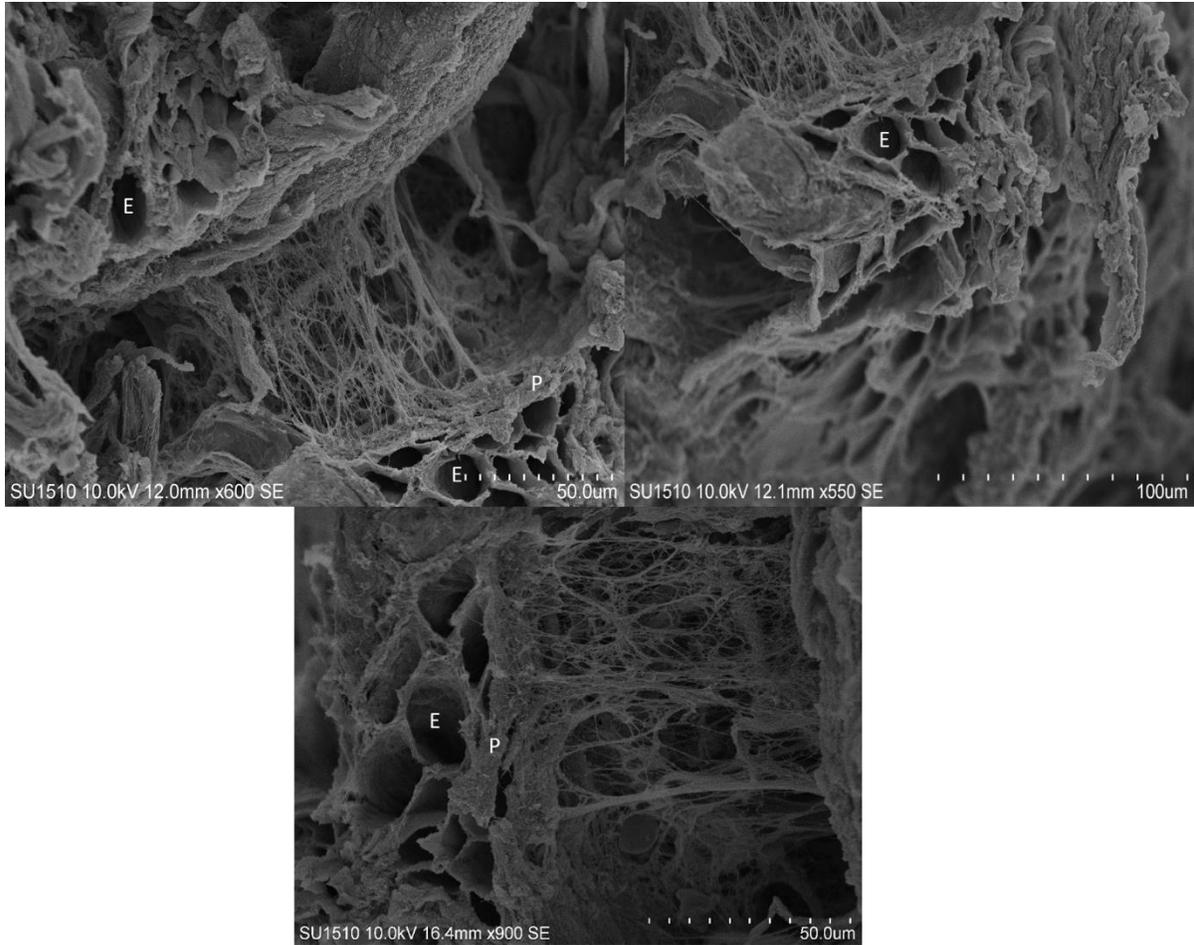


Figura 27. SEM del andamio descelularizado de músculo esquelético porcino. Se observan los huecos donde se encontraban las fibras musculares, el endomisio (E), el perimisio (P) y las fibras de colágeno después del tratamiento con SDS al 1%. Por lo que se puede decir que la organización 3D sugiere que la MEC está bien conservada.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluaron los resultados de la descelularización del músculo esquelético por medio de un análisis histológico mediante las tinciones de H-E y tricrómico de Masson, presencia de núcleos celulares con la tinción DAPI, presencia de actina mediante la inmunohistoquímica anti actina, presencia de α -gal por la inmunohistoquímica anti α -gal y el estado de la ultra estructura de la MEC por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM). Se tomaron en cuenta otros parámetros como fue el registro del peso de las muestras y el seguimiento macroscópico del cambio en la apariencia de las muestras durante el periodo de tratamiento.

En la primera parte del experimento se utilizaron dos diferentes detergentes, SDS al 1% y tritón x-100 al 2% por ocho días. La elección de los detergentes se realizó por las características del tejido a descelularizar, donde se buscaba un detergente que fuera capaz de remover el contenido celular sin afectar los componentes y la estructura tridimensional de la MEC. Los detergentes que son utilizados para romper las membranas celulares actúan rompiendo las interacciones entre proteínas, entre proteínas y lípidos y entre lípidos, desnaturalizan proteínas y otras macromoléculas (Jhonson, 2013).

Respecto a los resultados macroscópicos obtenidos de los primeros tratamientos establecidos (SDS al 1% y Tritón X-100 al 2%) se encontró que las muestras fueron perdiendo el color y apariencia característica del tejido muscular, que consiste en la presencia de fibras largas de color rojo por la presencia de mioglobina, tras el transcurso del tratamiento las muestras fueron tornándose gradualmente en un tejido blanquecino traslucido, apariencia común de los andamios descelularizados (figura 7, 8 y 9).

Mediante el análisis histológico se observó que las muestras que fueron tratadas con SDS al 1% fueron descelularizadas, ya que se pudo observar la ausencia de núcleos y del citoplasma de las miofibrillas mediante la tinción de H-E (figura 10). Por medio de la tinción de tricrómico de Masson se pudo rectificar la ausencia de células musculares (figura 11).

Mediante la tinción con DAPI se pudo corroborar la ausencia de núcleos en los andamios (figura 12). Como se ha mostrado en el análisis histológico el tratamiento con SDS al 1% es capaz de descelularizar el tejido muscular. Esto se debe a que el SDS es un detergente surfactante muy efectivo para solubilizar prácticamente todas las proteínas, ya que rompe las interacciones no covalentes intra e inter proteicas; por eso las desnaturaliza, lo que resulta en la pérdida de su conformación nativa y de su función. El SDS se une a las proteínas en una relación 1,4 a 1 p/p (o un anión de SDS por cada dos aminoácidos). El SDS le agrega carga negativa a todas las proteínas de una muestra (Morales-Valencia *et al.*, 2016; Jhonson, 2013).

Por el contrario las muestras tratadas con Tritón x-100 al 2% no fueron completamente descelularizadas, dado que los resultados arrojados por el análisis histológico mostraron la presencia de restos de fibras musculares (figura 10 y 11), esto se puede deber a que el Tritón es un detergente no iónico que contiene grupos de cabeza hidrófilos no cargados, al no estar cargado no desnaturalizan las proteínas al no transferirles una carga, por lo que el Tritón X-100 es más adecuado para romper las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína que las

interacciones proteína-proteína, por lo que es de esperarse que no se hayan degradado por completo las proteínas del citoesqueleto, principalmente la actina y miosina (Morales-Valencia *et al.*, 2016; Jhonson, 2013).

La tinción DAPI permitió observar que el tritón x-100 es efectivo para eliminar el material nuclear en el tejido muscular; por lo tanto, este detergente permite eliminar los núcleos de las células musculares más no los demás componentes de las fibras como son los componentes del citoplasma, las miofibrillas de actina y miosina (figura 12).

Por otra parte, los controles (PBS y agua destilada) fueron completamente degradados a los 4 días de tratamiento, esto se debe a que se llevó a cabo el proceso normal de lisis, lo que provocó la degradación completa del tejido muscular (figura 10 y 11).

Posteriormente para caracterizar el comportamiento del SDS al 1% en contacto con el músculo, se establecieron diferentes tamaños de la muestra (1cm^3 , 2cm^3 , 6cm^3 y 8cm^3). Se registró el peso y se realizó el seguimiento fotográfico de las muestras al transcurso de 8, 10 y 12 días de tratamiento.

Se encontró que las muestras de 1cm^3 al transcurso de los ocho días de tratamiento tuvieron una disminución de peso del 63.34% (gráfica 1 A). También se realizó un análisis histológico mediante las tinciones de H-E y Tricrómica de Masson (figura 14 y 15), estos resultados corroboran lo esperado, ya que se logró obtener una matriz extracelular libre de células musculares, concordando con los resultados obtenidos en el análisis histológico del primer experimento. Por otra parte, las muestras de 2cm^3 tuvieron una pérdida de peso del 56.53% (gráfica 1 B). Respecto al análisis histológico los resultados evidenciaron la presencia de restos celulares en el andamio de matriz extracelular (figura 16 y 17).

Cabe señalar que en las muestras de 6cm^3 la pérdida de peso a los ocho días fue del 58.34%, a los diez días fue del 83.34%, mientras que a los doce días fue de 88.34% (ver gráfica 2), lo que nos indicaría la degradación del material celular de las muestras, pero al observar los cortes histológicos estos resultados se contraponen, ya que muestran que el tejido muscular fue degradado sólo en las partes más expuestas al detergente, mientras que en la parte más interna del tejido las fibras musculares permanecieron intactas (figura 19). También se pudo apreciar que la MEC fue degradada por acción del detergente (figura 20). Como se mencionó anteriormente éste se caracteriza por desnaturalizar las proteínas, observándose que a partir de los diez días en tratamiento éste empieza a degradar los componentes de la matriz. De igual forma para las muestras de 8cm^3 a los ocho días el porcentaje de pérdida de peso de las muestras fue del 29.88%, a los diez días fue del 36.37% mientras que a los doce días fue del 80.52% (gráfica 2) encontrándose al igual que en las muestras de 6cm^3 que la parte interna del músculo tratado con SDS al 1% no fue penetrado por el detergente (figura 21) y las fibras musculares no fueron degradadas, así como los componentes de la MEC fueron degradados por éste a partir de los diez días en tratamiento (figura 22).

Para completar el análisis del comportamiento del detergente en los tratamientos establecidos se realizó un análisis de imagen para cuantificar el porcentaje de descelularización dependiendo del tamaño y tiempo en contacto con el detergente. Se encontró que en el

tratamiento de 1cm³ el porcentaje de descelularización fue del 99% (gráfica 3), mientras que las muestras de 2cm³ el porcentaje de descelularización fue del 96% (gráfica 3). Por otra parte, en las muestras de 6cm³ a los ocho días el porcentaje de descelularización fue del 1%, a los diez días fue del 46% y a los doce días fue del 69% (gráfica 4). Para las muestras de 8cm³ el porcentaje de descelularización a los ocho días de tratamiento fue del 4%, a los diez días del 5% y a los doce días del 7% (gráfica 5). Estos resultados corroboran lo ya observado en los cortes histológicos ya que el mayor porcentaje de descelularización fue el de las muestras de 1cm³ y 2cm³, mientras que en las muestras de 6cm³ el porcentaje de descelularización fue mayor que el de 8cm³. Para estas muestras el porcentaje de descelularización no se puede cuantificar de manera precisa a partir de los diez días de tratamiento ya que la MEC tiende a degradarse.

En conjunto los resultados obtenidos nos indican que la penetración del detergente solo se ve comprometida por el ancho y no por la longitud/largo de la muestra, ya que tanto las muestras de 1cm³ y de 2cm³ fueron descelularizadas, mientras que en las muestras de 6cm³ y 8cm³ el detergente no logra penetrar al interior de la muestra. También mostró que las muestras al permanecer durante periodos largos (mayor a diez días) en contacto con el detergente, los componentes de la MEC se ven degradados.

Los órganos y tejidos de origen porcino han sido objeto de investigación dentro de la ingeniería de tejidos en la que se ha estudiado la MEC descelularizada de tejidos y órganos para su uso como implantes que proporcionan una estructura biológica para la remodelación y regeneración de tejidos (Galili, 2015).

La respuesta inmune a los implantes porcinos en humanos se debe a que en la membrana de las células porcinas se encuentra el carbohidrato galactosa-alfa-1,3-galactosa, más conocido como alfa-gal, esta molécula está ausente en las células humanas por lo que el sistema inmune humano no es indiferente a la introducción de implantes porcinos produciendo anticuerpos (anti-Gal y anti-non gal) como respuesta contra la ECM porcina implantada (Galili, 2015).

Dado que el método de descelularización con SDS al 1% resultó efectivo se sometieron a tratamiento muestras de cerdos de diferentes edades (7, 14, 21, 28, 35, 42 y adulto), esto se realizó debido a que en trabajos previos en el laboratorio se encontró que en los vasos sanguíneos del músculo esquelético porcino se encuentra presente el epitopo alfa-gal desde los 7 días de edad (Cano, 2017).

Las muestras de cerdo a diferentes edades (7, 14, 21, 28, 35, 42 y adulto) se sometieron al tratamiento de descelularización con SDS al 1% durante 8 días. Posteriormente se realizó un análisis histológico mediante las tinciones de H-E, tricómico de Masson, DAPI, inmunohistoquímica anti actina, inmunohistoquímica anti α -gal y microscopia electrónica de barrido para analizar la ultraestructura del andamio.

La tinción de con H-E permitió observar que las células musculares fueron eliminadas y que la estructura de la matriz extracelular se conservó, ya que permitió apreciar las tres capas que la conforman (endomysio, perimysio y epimysio) teñido en color morado.

La MEC se compone principalmente de dos clases principales de macromoléculas: proteínas fibrosas (incluyendo colágeno y elastina) y glicoproteínas (incluyendo la fibronectina, proteoglicanos (PGs) y laminina).

La tinción de tricrómico de Masson permitió identificar las fibras colágeno tipo I y fibras reticulares (principalmente colágeno tipo III). El colágeno es uno de los componentes esenciales de la MEC, estando presente en el endomisio y probablemente en la membrana basal, perimisio y epimisio. El colágeno junto con las glicoproteínas y el ácido hialurónico representan los principales componentes estructurales dentro de la MEC. Éstos proporcionan la mayor parte del marco de apoyo dentro de la cual interactúan los demás componentes de la MEC y las células (Mouw, 2014).

Los resultados obtenidos en las tinciones de H-E y tricrómico de Masson concuerdan con los resultados reportados por Perniconi *et al.*, (2011) cuyo estudio se basó en la metodología del presente trabajo; al lograr la obtención de una MEC libre de componentes celulares que mantiene su estructura en sus tres niveles de organización (endomiso, perimisio y epimisio). Cabe destacar que la MEC que se obtuvo en este trabajo tiene una estructura mejor conservada en los cortes teñidos con H-E y tricrómico de Masson que los reportados por Perniconi *et al.* (2011), esto puede deberse al modelo animal (murino) y al tiempo al que se expuso el tejido a proceso de descelularización, ya que como se mostró en los resultados (figura 19, 20, 21 y 22) el SDS puede llegar a degradar la MEC.

Por el contrario, los resultados obtenidos en las tinciones de H-E y tricrómico de Masson en los resultados obtenidos con SDS al 1% durante ocho días a diferentes edades (7, 14, 21, 28, 35, 24 días y adulto; figura 23 y 24) difieren de lo reportado por Wang *et al.* (2015) ya que aunque ellos reportan haber obtenido un andamio descelularizado de músculo esquelético porcino, para las muestras “D-muscle y D-fascia” en su análisis histológico mediante las histoquímicas de H-E y tricrómico de Masson, se puede observar la ausencia de núcleos pero la presencia de material citoplasmático, estando más marcada la presencia de los componentes en la muestra “D-fascia”.

Aunque en el presente trabajo no se hicieron pruebas para detectar la presencia de otros componentes en la MEC Perniconi *et al.* (2011) reportaron la presencia de laminina y fibronectina, lo que nos permite inferir que el método de descelularización con SDS permite conservar estos componentes de la lámina basal de la MEC.

Los materiales de andamios biológicos compuestos de matriz extracelular de mamíferos se usan comúnmente para la reparación quirúrgica y la reconstrucción de tejidos. A pesar del amplio éxito clínico de los andamios de ECM, los restos de ADN porcino han sido implicados como otra de las causas de reacciones inflamatorias después de la implantación de éstos (Valentin *et al.*, 2010).

Por esa razón se realizó una inmunofluorescencia para DAPI para detectar la presencia de núcleos dentro de los andamios. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de material genético en las muestras tratadas con SDS al 1%, indicándonos que el tratamiento no sólo

degrada los componentes del citoesqueleto, sino que también degrada por completo el material nuclear en las muestras a diferentes edades.

La inmunohistoquímica es una técnica que permite localizar moléculas en los tejidos mediante el uso de anticuerpos (proteínas del tipo inmunoglobulina G). La técnica, por la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas, permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en los tejidos (Stevens y Lowe, 2001).

Para el análisis de los andamios se realizaron dos inmunohistoquímicas; una para actina y otra para alfa gal.

La inmunohistoquímica para anti-actina se eligió ya que es uno de los componentes principales de las miofibrillas que ocupan el citoplasma de la célula muscular. Esta técnica permitió comprobar que los componentes intracelulares fueron eliminados de los andamios (figura 25).

Como se mencionó anteriormente el epitopo alfa gal es la principal causa de rechazo a implantes porcinos (Galili, 2015), por lo que se realizó una inmunohistoquímica anti alfa-gal para averiguar si el epitopo permanecía en las muestras después de ser tratadas con SDS al 1%. La inmunohistoquímica mostró que el epitopo alfa gal fue eliminado de los capilares de los vasos sanguíneos en todas las muestras a diferentes edades de músculo esquelético porcino (figura 26). Esto es de suma importancia ya que al eliminar el epitopo se podría evitar la principal causa de rechazo de los injertos en humanos.

Finalmente se realizó microscopia electrónica de barrido (SEM) para poder observar la ultraestructura del andamio. Los resultados obtenidos mostraron que la red tridimensional de MEC no fue afectada por el tratamiento, ya que se pudo reconocer el espacio hueco formado por el endomisio donde se encontraban las fibras musculares, así mismo se pudo apreciar el perimisio rodeando el endomisio. Estos resultados coinciden con lo reportado por Wang *et al.* (2015) quienes encontraron huecos y estructuras tubulares formadas de MEC libres de fibras musculares, logrando mantener la estructura del endomisio en su muestra “D-muscle”. Lograr mantener la arquitectura de la MEC es de suma importancia ya que es considerada un complejo ecosistema de funciones vitales para la célula y tejidos en los procesos como: multiplicación, preservación, procesos bioquímicos y de señalización; los cuales son procesos indispensables para la supervivencia de los tejidos (Serrato *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

1. Se estandarizó un método de descelularización, usando SDS al 1% en muestras de 1cm³ de músculo esquelético de cerdo.
2. Se obtuvo un andamio descelularizado de músculo esquelético de cerdo caracterizado por la ausencia de células musculares y el epitopo alfa-galactosidasa.
3. La estructura de las fibras de colágeno que conforman al andamio no sufrió modificaciones después del tratamiento, lo cual sugiere la conservación de sitios bioactivos necesarios para la diferenciación y proliferación celular.

PERSPECTIVAS

Cuantificación de ADN:

Prueba mecánica

Identificar los componentes del andamio de MEC

Tipos de colágeno

Proteoglicanos

Glucosaminoglucanos

Proteínas especializadas

Sembrar el andamio con células musculares esqueléticas

Implantar el constructo (andamio + células musculares) en un modelo animal

LITERATURA CITADA

Álvarez-San Martín R. 2012. Bancos de tejidos musculoesqueléticos en México. Parte I. Regulación y organización. *Acta Ortopédica Mexicana*. 26(2): 130-136.

Baoge L., Van Den Steen E., Rimbaut S., Philips N., Witvrouw E., Almqvist K. F., Vanderstraeten G. y Vanden Bossche L.C. 2012. "Treatment of Skeletal Muscle Injury: A Review," *ISRN Orthopedics*, vol. 2012, Article ID 689012, 7 pages, doi:10.5402/2012/689012

Barbany J. R. 2002. *Fisiología del ejercicio físico y el entrenamiento*. Editorial Paidotribo, Barcelona, España. 21-23pp. <https://books.google.com.mx/books?id=kq0XqZoY8YoC&pg=PA22&dq=epimisiso&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwj7lKm4r-jRAhWmjFQKHfkjC1sQ6AEIGjAA#v=onepage&q=epimisiso&f=false>

Bazán Milián B. M., González J. N. y Delgado B. L. 2004. Xenotransplante. Estado actual. Limitantes y expectativas. *Rev Cubana Cir.* 43 (2), http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74932004000200010&lng=es&nrm=iso. ISSN 1561-2945.

Cano R. Y. G. 2017. Evaluación de la expresión de alfa gal en tejidos de cerdo a diferentes edades. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el grado de Ingeniero biomédico.

Chaturvedi V., Dye E. D., Kinnear F. B., van Kuppevelt T. H., Grounds D. M. y Coombe R. D. 2015. Interactions between Skeletal Muscle Myoblasts and their Extracellular Matrix Revealed by a Serum Free Culture System. *PLoS One*. 10(6). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4450880/>

Falke F. G. y Atala A. 2000. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Pediatría*. Argentina. 92(2):103-15.

Galili U. 2015. Chapter 10—Human Anti-Gal and Anti-Non-Gal Immune Response to Porcine Tissue Implants. *Host Response to Biomaterials. The Impact of Host Response on Biomaterial Selection*. 239–267. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001967000104#>

Gillies A. R. y Lieber R. L. 2011. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve*. 44(3):318-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949456>

Gillies R. A, Smith R. L, Lieber L. R. y Varghese S. 2011. Method for Decellularizing Skeletal Muscle Without Detergents or Proteolytic Enzymes. *Tissue Engineering*. 17(4):383-9.

González I. J. J. 1998. Lesiones musculares y deporte. *Rev Bras Med Esporte* 4 (2). Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1517-86921998000200002>

Illescas F. G. J. 2003. Epidemiología del trauma en la ciudad de México. *Trauma*. (2): 40-43. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/trauma/tm-2003/tm032a.pdf>

Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, y Järvinen M. 2005. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 33(5):745-64. doi: 10.1177/0363546505274714. PMID: 15851777.

Johnson M. 2016. Revisión exhaustiva sobre detergentes de laboratorio y su uso en experimentos biomédicos, con revisión bibliográfica de Labome incluida. Labome. <http://www.labome.es/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>

Laumonier T. y Menetrey J. 2016. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of Experimental Orthopaedics.* 3:15. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4958098/>

Mann J. C., Perdiguero E, Kharraz Y., Aguilar S., Pessina P., Serrano L. A. y Muñoz-Cánoves P. 2011. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle.* 1: 21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156644/>

Megías M., Molist P. y Pombal A. M. 2017. Atlas de histología vegetal y animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. 4-11pp. <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/a-muscular.pdf>

Morales-Valencia M., Patiño-Vargas M. I., Restrepo-Múnera L. M. y Correa-Londoño L. A. 2016. Evaluación del método químico-enzimático de descelularización para la obtención de matrices extracelulares de tráquea en el modelo porcino. *Iatreia,* 29: 144-156. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180544647004>

Mouw J. K., Ou G., Weaver V. M. 2014. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15 (12) :771-785. doi:10.1038/nrm3902

Nishimura T., Hattori A. y Takahashi K. 1994. Ultrastructure of the intramuscular connective tissue in bovine skeletal muscle. A demonstration using the cell-maceration/scanning electron microscope method. *Acta Anat (Basel).* 151(4):250-257. doi:10.1159/000147671

Perniconi B, Coletti D, Aulino P, Costa A, Aprile P, Santacroce L, Chiaravalloti E, Coquelin L, Chevellier N, Teodori L, Adamo L, Marrelli M & Tatullo M. 2014. Muscle acellular scaffold as a biomaterial: effects on C2C12 cell differentiation and interaction with the murine host environment. *Physiology.* 5(354):1-13.

Quintero, A. J., Wright, V. J., Fu, F. H., & Huard, J. (2009). Stem Cells for the Treatment of Skeletal Muscle Injury. *Clinics in Sports Medicine.* 28 (1):1-11. <http://doi.org/10.1016/j.csm.2008.08.009>

Raven P. B., Wasserman D. H., Squires W. G. Jr, Muray T. D. 2013. Exercise physiology: an integrated approach. Wadsworth Cengage Learning, Belmont, CA

Rosero H. D., Salazar L. y Tovar A. M. 2016. Músculo esquelético y lesión por reperfusión. Ultraestructura, alteración y regeneración: Revisión sistemática. *Rev. Méd. Risaralda.* 22 (1): 58-68. <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v21n2/v21n2a12.pdf>

Ross M. H. y Pawlina W. 2015. Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 7ª edición. Editorial Médica panamericana. España.

Saavedra J., Zúñiga L., Vásquez J., Navia C., Mosquera L. y Bernal S. 2015. La matriz extracelular: un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. *Morfología*. 7(1):19.

Serrato O. D., Nieto A. R. y Aguilera M. A. 2015. Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. *Investigación y Ciencia*, vol. 23, núm. 64.pp. 61-69. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67441039009>

Sherwood L. (2010). *Human physiology*. Brooks/Cole-Cengage Learning, Belmont, CA

Silverthorn U. D. 2009. *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*. Ed. Médica Panamericana. 4ta edición. España. 398p.

Stevens A. y Lowe J. 2001. *Anatomía Patológica*. 2da (ed). España. Harcourt. 105-110pp.

Teodori L., Costa A., Marzio R., Pernicini B., Coletti D., Adamo S., Gupta B. y Tarnok A. 2014. Native extracellular matrix: a new scaffolding platform for repair of damaged muscle. *Front. Physiol.* Vol. 5. Italy. 1-9.

Valentin J. E., Turner N. J., Gilbert T. W. y Badylak S. F. 2010. Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials*. 31(29):7475-84.

Velleman G. S. 1999. The Role of the Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development. *Poultry Science* 78:778–784. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10228976>

Verdugo P., M. A. 2004. Clasificación ultrasonografica de los desgarros musculares. *Revista chilena de radiología*, 10(2): 53-57. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-93082004000200004>

Wang L., Johnson A. J., Chang W. D. y Zhang. 2013. Decellularized musculofascial extracellular matrix for tissue engineering. *Biomaterials*. 34(11):2641-54.

Yang W. y Hu P. 2018. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *Journal of Orthopaedic Translation*. 13: 25-32. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214031X17300621?via%3Dihub>