



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y DE LA VIABILIDAD
CELULAR DE UN ANDAMIO DESCELULARIZADO DE
INTESTINO DELGADO DE PORCINO.**

TESIS

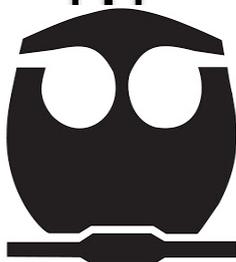
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

ALEJANDRA VÁZQUEZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. DAVID MAURICIO GIRALDO GÓMEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA CD.MX., 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Ortega Muñoz Raquel

VOCAL: Guerrero Vargas Natalí Nadia

SECRETARIO: Giraldo Gómez David Mauricio

1er. SUPLENTE: Canizalez Quinteros Samuel

2do. SUPLENTE: Bustamante García Ruth

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, LABORATORIO DE BIOMATERIALES, FACULTAD DE MEDICINA, UNIDAD DE MICROSCOPIA Y LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. David Mauricio Giraldo Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga

SUSTENTANTE:

Alejandra Vázquez García

Agradecimientos institucionales

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, por el apoyo económico recibido mediante beca de titulación del proyecto que lleva por título: desarrollo de un andamio descelularizado a partir de músculo para su aplicación en medicina regenerativa con clave TA200520 y el proyecto con clave IT100719.

Al Laboratorio de Biomateriales, a la Unidad de Microscopía y al Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionarme un espacio para poder realizar las actividades necesarias para la obtención de resultados de esta tesis.

Agradecimientos personales

Al **Dr. David Mauricio Giraldo Gómez** por todo el conocimiento, apoyo, dirección y confianza que me brindo para la realización de este trabajo, así como por su apoyo para mi desarrollo profesional.

A la **Dra. María Cristina Piña Barba** por brindarme un espacio en su laboratorio, por considerarme parte de su equipo de trabajo, además de brindarme los recursos necesarios para realizar este trabajo.

A la **Dra. Karla Karina Gómez Lizárraga** por su supervisión técnica.

A la **Bióloga Ivonne Grisell Sánchez Cervantes**, por su gran apoyo en la obtención de las increíbles fotografías de este trabajo.

A mis amigos de la Facultad de Química: Natalia, Ramón, Jocelyn, Monserrat, Andrea, Nohemí, y a todos lo demás por su apoyo y amistad incondicional, sin ellos este recorrido no hubiera sido igual.

A los miembros del laboratorio de Biomateriales del IIM de la UNAM por ayudarme a tener una increíble experiencia de investigación y compañerismo.

A Jimena por su apoyo constante y amistad.

A los honorables miembros del Jurado por su retroalimentación para el mejoramiento del presente trabajo

A todos los profesores que contribuyeron a mi conocimiento profesional durante la universidad.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, quienes siempre han confiado en mí, en cada paso que doy, sin ellos llegar hasta aquí no hubiera sido posible, gracias por el esfuerzo que han realizado todo este tiempo para darme la mejor educación. A mi mamá Candida por siempre preocuparse por mí y a mi papá Salvador, quien me enseñó a ser una mejor persona y siempre luchar por lo que quería.

RESUMEN

La insuficiencia intestinal (IF) es la incapacidad del intestino para cumplir con los requerimientos nutricionales necesarios para contar con una independencia nutricional. Dentro de los principales tratamientos existentes, está la nutrición parenteral (NP), la cual funciona adecuadamente por un tiempo, pero su uso a largo plazo trae consigo complicaciones; como lo son la enfermedad hepática e infecciones recurrentes, es aquí cuando se recurre a los trasplantes de intestino delgado, pero ahora los pacientes se enfrentan a otro problema, la gran demanda de estos, las listas son muy largas y los órganos son pocos, debido a todas estas complicaciones, buscamos contar con una alternativa ante dicho problema, en este caso un andamio descelularizado de intestino delgado de cerdo, adecuado para ser utilizado como sustituto biológico en medicina regenerativa de intestino.

En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos de la caracterización histológica de un proceso de descelularización de una matriz de intestino de cerdo, para determinar si el proceso de descelularización que se llevó a cabo fue efectivo. Así como la caracterización de esta matriz como andamio celular mediante viabilidad celular al intestino descelularizado.

Para analizar la efectividad del proceso mediante las imágenes histológicas, se utilizó el software de procesamiento digital de imágenes Image J. Al comparar las imágenes obtenidas se observó un protocolo de descelularización efectivo, además de la preservación de la matriz extracelular.

Para la prueba de viabilidad celular se utilizó el KIT LIVE/DEAD, el cual nos permite saber si el andamio es o no citotóxico, ya que puede permitir la adhesión de las células a él, de esta prueba se obtuvo un $99.42\% \pm 0.20\%$ de viabilidad celular, lo cual nos indica que el andamio no es citotóxico.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS Y METAS	3
JUSTIFICACIÓN	4
Capítulo 1. Intestino Delgado	5
1.1 Anatomía.....	5
1.2 Patologías asociadas a intestino delgado.....	9
Capítulo 2. Ingeniería de Tejidos	12
2.1 Matriz extracelular (MEC).....	13
2.2 Descelularización.....	14
2.3 Agentes de descelularización.....	15
2.3.1 Agentes físicos.....	16
2.3.2 Agentes químicos.....	16
2.3.3 Agentes enzimáticos.....	17
2.4 Caracterización del andamio de intestino delgado descclularizado.....	20
2.4.1 Histología.....	20
2.4.1.1 Hematoxilina & Eosina.....	23
2.4.1.2 Tricrómico de Masson.....	23
2.4.1.3 Tinción PAS (Ácido peryódico de Schiff).....	24
2.4.1.4 Tinción de Herovici.....	24
2.4.1.5 DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol).....	25
2.5 Recelularización.....	25
2.6 Viabilidad celular.....	25
Capítulo 3. Metodología experimental	26
3.3 Caracterización.....	30
3.3.1 Histología.....	30
3.4 Viabilidad celular.....	31
3.4.1 Recelularización del andamio.....	31
3.4.1.1 Siembra de células mesenquimales en los andamios.....	32

3.4.2 Ensayo de viabilidad celular con el KIT LIVE/DEAD	32
Capítulo 4. Resultados y Análisis	33
4.1.1 Efectividad del protocolo de descelularización	34
4.1.2 Evaluación de la Matriz Extracelular (MEC)	36
4.3 Viabilidad celular	38
CONCLUSIONES	40
BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del intestino delgado. Tomado de 35	6
Figura 2. Vista tridimensional de las tunicas del intestino delgado que muestra las vellosidades. Tomada de ²¹	6
Figura 3. Vista aumentada de una vellosidad que muestra los quilíferos, capilares, glándulas intestinales y tipos celulares. Tomada de ²¹	8
Figura 4. Técnica quirúrgica de la extracción de intestino delgado. (a) Extirpación del segmento intestinal, (b) Fracción de intestino delgado (yeyuno)	27
Figura 5. Proceso de descelularización. (a) Perfusión de intestino (b) Intestino descelularizado	28
Figura 6. Proceso general de descelularización	29
Figura 7. Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental	30
Figura 8. Proceso general de la técnica histológica	31
Figura 9. Esquema general de viabilidad celular. Fila A: matriz descelularizada y células (constructo). Fila B: células en monocapa Fila C: células en monocapa y etanol al 70%.	32
Figura 10. Macrofotografías del segmento de intestino delgado nativo y después de ser sometido al proceso de descelularización.	34
Figura 11. Caracterización de intestino delgado nativo y descelularizado a través de histología con DAPI y Hematoxilina & Eosina (H&E). A). Intestino nativo en tinción H&E (B) Intestino descelularizado en tinción H&E. (C) Acercamiento de intestino nativo en tinción H&E en el cual se pueden observar los núcleos teñidos de morado (D) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción H&E en el cual se presenta la ausencia de núcleos (E) Intestino nativo en tinción DAPI (F) Intestino descelularizado en tinción DAPI (G) Acercamiento de intestino nativo en tinción DAPI en el cual se observan núcleos en color azul (H) Acercamiento de intestino descelularizado	

en tinción DAPI en el cual se observa la ausencia de núcleos y un poco de autofluorescencia de la colágena. (I) Cuantificación de núcleos con tinción DAPI. (J) Cuantificación de núcleos con tinción H&E.	35
Figura 12. Caracterización de intestino delgado nativo y descelularizado a través de histología con tinción Herovici, Tricrómica de Masson , y la técnica de Schiff (PAS)(A). Intestino nativo en tinción Herovici (B) Intestino descelularizado en tinción Herovici. (C) Acercamiento de intestino nativo en tinción Herovici (D) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción Herovici. (E) Intestino nativo en tinción Tricrómica de Masson (F) Intestino descelularizado en tinción Tricrómica de Masson (G) Acercamiento de intestino nativo en tinción Tricrómica de Masson (H) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción Tricrómica de Masson (I) Intestino nativo en tinción PAS (J) Intestino descelularizado en tinción PAS (K) Acercamiento de intestino nativo en tinción PAS (L) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción PAS.	36
Figura 13. Viabilidad pre-siembra	38
Figura 15. Control positivo a los 30 días	39
Figura 14. Constructo a los 30 días.	39
Figura 17. Porcentaje de viabilidad del control positivo y a los 30 días.	40
Figura 16. Constructo negativo a los 30 días.	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Causas de malabsorción intestinal.....	11
Tabla 2. Complicaciones del Trasplante Intestinal	12
Tabla 3. Proteínas multiadhesivas que forman parte de la matriz extracelular.	14
Tabla 4. Agentes de descelularización	17

INTRODUCCIÓN

El intestino delgado es una maquinaria perfectamente acoplada, la cual permite que se lleve a cabo de forma correcta la absorción de los nutrientes y agua, los cuales son proporcionados por los alimentos que ingerimos; pero como siempre sucede, no todo es perfecto, en muchos de los casos existen defectos, por ejemplo, la insuficiencia intestinal, este término se refiere a la incapacidad para que se lleve a cabo un correcto transporte y absorción de nutrientes, agua y electrolitos a través de la pared intestinal, los cuales son necesarios para mantener un balance de fluidos normal, permitiendo una adecuada digestión y con esto asegurando el mantenimiento de la salud del paciente.¹⁻⁵

Dentro de la insuficiencia intestinal, las enfermedades más comunes son: la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que representa un problema para la salud de los pacientes que la padecen, la cual cada vez va en aumento. Dentro las principales formas de la EII, se encuentra la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI) y la enfermedad de Crohn (EC).^{4,6} Estas patologías son de baja prevalencia, sin embargo, afecta directamente la calidad de vida de los pacientes y sus familias, además de que se asocia con altos costos económicos.^{2,4}

El trasplante intestinal (TI) está indicado para pacientes en los cuales la rehabilitación no es posible o ésta ha fracasado, las principales indicaciones de TI son aquellas derivadas del uso permanente de nutrición parenteral (NP), así como episodios de infecciones graves, admisiones frecuentes por deshidratación o desequilibrios hidroelectrolíticos y la insuficiencia hepática asociada a NP. Es una operación importante y crítica para reemplazar el intestino perdido o enfermo.^{2,4,7} Dentro de ellos hay tres tipos: trasplante intestinal aislado, trasplante hígado-intestino y el trasplante multivisceral.^{2,4,7} Aunque el hablar de un trasplante resulta un gran problema, ya que está limitado por las listas de espera debido a la escasez de órganos de donantes.

Debido a lo anterior, se busca conseguir un andamio de intestino delgado el cual pueda ser utilizado para ser reemplazado en pacientes que lo requieran.

Por ende, este trabajo pretende contar con un protocolo eficaz de biofabricación de andamios, como lo es la descelularización.

La descelularización es un proceso basado en la eliminación de componentes celulares, dejando a la matriz extracelular (MEC) íntegra.^{3,8} Para llevar a cabo este proceso, se cuenta con diversos protocolos, aunque para que este sea completo y eficaz, es habitual combinar tratamientos físicos, químicos y enzimáticos entre sí para optimizar la eficiencia del proceso para cada tejido y órgano.⁸⁻¹⁰ Este proceso es usado para obtener órganos y/o tejidos que pueden ser utilizados en medicina regenerativa.

Anteriormente en nuestro grupo de investigación se han realizado diferentes métodos de descelularización para diferentes órganos y tejidos, como lo son tráquea, corazón, riñón, hueso, arteria, entre otros.¹¹⁻¹⁴

El protocolo de descelularización empleado en este trabajo se basó en el de descelularización de tráquea¹² desarrollado y publicado por nuestro grupo de trabajo, pero dada las diferencias histológicas se realizaron modificaciones para estandarizar el proceso en intestino. Este trabajo se centra en determinar la efectividad del proceso y la caracterización de la matriz extracelular obtenida.

Por lo tanto, en este trabajo se describe la metodología experimental propuesta para realizar el protocolo de descelularización de intestino delgado de cerdo, además de las pruebas histológicas y de viabilidad celular, en el cual se busca ver al intestino no solo como órgano para trasplante, sino como una estructura que pueda funcionar como andamio celular en medicina regenerativa.

OBJETIVOS Y METAS

Objetivo

- Caracterizar biológicamente un sustituto de intestino delgado para determinar su potencial uso como alternativa en pacientes con insuficiencia intestinal en los que la terapia o el trasplante no es una alternativa viable.

Metas

- Evaluar la efectividad del proceso de descelularización en intestino delgado de cerdo mediante marcaje de núcleos con tinción de Hematoxilina-Eosina y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).
- Caracterización histológica del andamio descelularizado.
- Evaluar la viabilidad celular del constructo de intestino delgado de cerdo mediante el ensayo celular muerte/vida.

Hipótesis

Modificando un protocolo de descelularización que resultó eficaz para tráquea, se puede obtener un andamio descelularizado de intestino delgado de cerdo adecuado para ser usado como sustituto biológico en medicina regenerativa.

JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia intestinal es una enfermedad que provoca que la calidad de vida del que la padece disminuya de forma sorprendente, su independencia nutricional deja de existir, teniendo que mantener de forma permanente la nutrición parenteral; aun sabiendo que el uso de ésta trae consigo complicaciones la usan hasta que les sea concedido un trasplante.¹⁵⁻¹⁷

Además, la problemática que existe con los trasplantes cada vez va en aumento, la demanda de éstos es muy grande, los órganos son muy pocos, tienen que esperar mucho tiempo para ser candidatos a uno, y cuando lo consiguen, corren el riesgo de rechazarlo. Tan solo en 2018 el Registro Mundial de Trasplantes reportó que, de los 139,024 trasplantes, 162 fueron de intestino.¹⁸ Además según el CENATRA, en 2020 no se registró ningún trasplante de intestino¹⁹, lo cual nos muestra la escases de estos, por lo tanto se requiere contar con una alternativa eficaz y permanente para los pacientes en los que las opciones existentes no fueron una solución.

Dada la situación, surge un nuevo campo de investigación, el cual busca contar con alternativas capaces de regenerar o mejorar las funciones de los órganos y tejidos del cuerpo humano. Aquí es donde se aplica la ingeniería de tejidos, la cual se basa en principios de medicina regenerativa para restablecer la función de varios órganos al combinar células con biomateriales.²⁰

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea aportar en la caracterización biológica de un proceso de descelularización del intestino delgado de cerdo, evaluando histológicamente el proceso y la viabilidad celular, para comprobar la eficacia de este proceso, además de saber si el andamio obtenido es o no citotóxico. Este conocimiento asentará las bases para un posible uso de este proceso en la obtención de andamios con posible uso como sustituto biológico en medicina regenerativa.

Marco teórico

Capítulo 1. Intestino Delgado

1.1 Anatomía

El intestino delgado es el componente más largo del tubo digestivo, es el principal lugar de absorción de los nutrientes, agua y sales²¹⁻³⁰, mide aproximadamente dos centímetros y medio de diámetro²⁹ y entre 4 a 7 m de longitud y se divide en tres porciones anatómicas: duodeno, yeyuno e íleon (Fig.1).^{22,23,33,24-27,29-32}

El duodeno es el segmento más corto, el cual abarca aproximadamente de 20-25 cm de longitud, su luz es la más ancha del intestino delgado, es retroperitoneal, la submucosa de este tiene glándulas de Brunner las cuales secretan un moco alcalino que ayuda a neutralizar el ácido gástrico del quimo, y las vellosidades son cortas y anchas.^{21,24,33}

Seguido del duodeno se encuentra una porción intermedia, llamada yeyuno, la cual se encuentra fija mediante el mesenterio, lo cual le permite tener movimiento³⁴, además de que el tejido graso que lo acompaña es escaso, lo que hace que tenga un aspecto transparente y brillante.³¹ Este mide aproximadamente 2/5 partes del intestino distal al duodeno, tiene mayor diámetro y una pared más gruesa que el íleon, la capa mucosa se caracteriza por numerosos pliegues prominentes, además de que presenta vellosidades largas. La marca anatómica del inicio del yeyuno se conoce como ligamento de Treitz^{21,33} La porción final y más grande del intestino, se llama íleon, la cual se diferencia del yeyuno, debido a la cantidad de tejido graso, es mayor en este caso, y macroscópicamente se observa con un aspecto más opaco y despulido.³¹ Este tiene paredes más delgadas, menos pliegues mucosos y menos prominentes, además de vellosidades digitiformes más cortas. En él existen grupos de ganglios linfáticos conocidos como folículos linfáticos agregados (placas de Peyer).^{21,22,25,29,31,33}

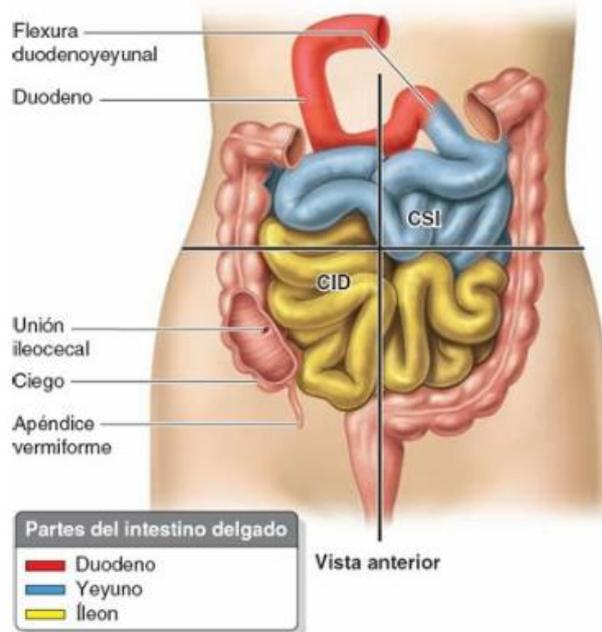


Figura 1. Anatomía del intestino delgado. Tomado de (Moore, Keith L Dailey, Arthur F Agur, 2013) ³⁵

El intestino delgado cuenta con cuatro capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa o peritoneo. (Figura 2) ^{21,26,31,33,36}

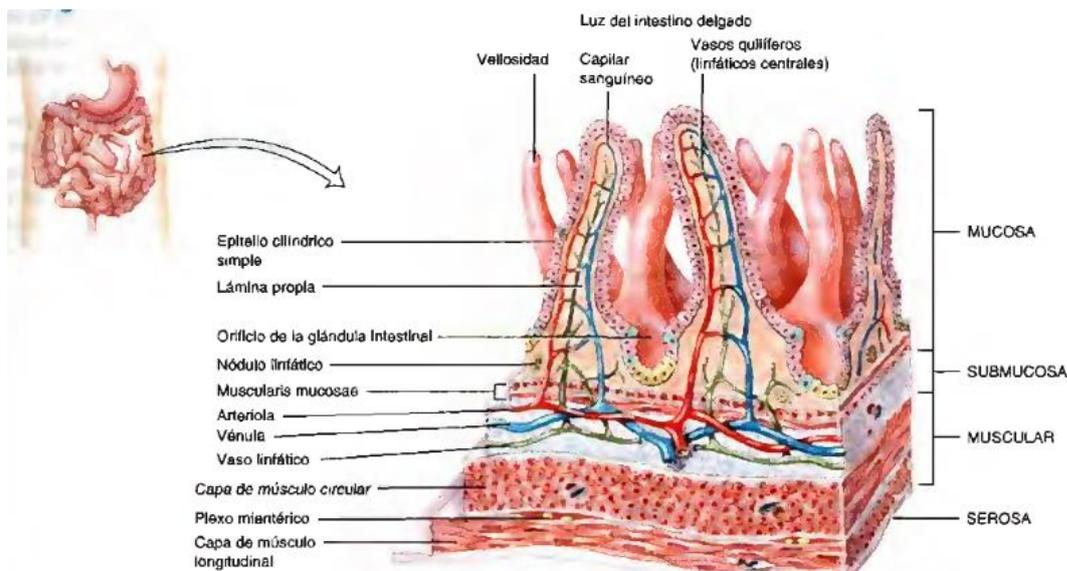


Figura 2. Vista tridimensional de las tunicas del intestino delgado que muestra las vellosidades. Tomada de (Tortora, Gerard J Derrickson, 2011) ²¹

La mucosa está adaptada para aumentar el área de absorción, ya que cuenta con varias hendiduras revestidas de epitelio glandular, las células que las revisten forman las glándulas intestinales (criptas de LieberkÜhn) y secretan jugo

intestinal. Tiene por función realizar los movimientos de segmentación y peristaltismo.³⁰ Ésta se divide en tres capas: epitelio, lámina propia y la muscular de la mucosa. La lámina propia es una capa entre el epitelio y la muscular de la mucosa, en ella se encuentran nódulos linfoides y algunas células inmunocompetentes aisladas, por lo cual es una importante localización para las respuestas inmunitarias. La submucosa es el principal lugar de distribución del flujo sanguíneo y linfático. Ésta, al igual que la lámina propia contienen aglomeraciones de nódulos linfáticos (GALT), las cuales se conocen como Placas de Peyser y la mayoría de ellas se encuentra en el íleon.^{23,33} La capa muscular es el límite entre la mucosa y la submucosa.^{30,33} Consiste en dos capas de músculo liso: la externa es más gruesa, contiene fibras longitudinales; la interna, más fina, tiene fibras circulares. Ésta es la responsable de mezclar el contenido intestinal y de los movimientos peristálticos.^{21,33} Finalmente la serosa cubre la superficie interna de la pared abdominal.^{30,33} Por otra parte, la pared del intestino no es lisa, ésta se encuentra replegada sobre si misma formando pliegues que permiten tener mayor absorción y digestión.²⁹ Dentro de éstas características están los pliegues circulares conocidos como válvulas de Kerckring, estos son pliegues que están más desarrollados en el yeyuno^{21,23,33}

Las vellosidades dan un aspecto aterciopelado, además de que aumentan la superficie del epitelio disponible para la absorción y la digestión, y, por último, las microvellosidades, son proyecciones de la membrana apical de las células absorptivas, las cuales incrementan la extensión de la superficie absorptiva, formando una línea vellosa llamada borde en cepillo, el cual contiene muchas enzimas con funciones digestivas.^{21,33}

La responsabilidad de la absorción de los alimentos recae sobre las células del epitelio intestinal. En el cual se encuentran al menos cinco tipos de células: enterocitos o células absorptivas, células caliciformes, de Paneth, enteroendocrinas y células M. (Figura 3)

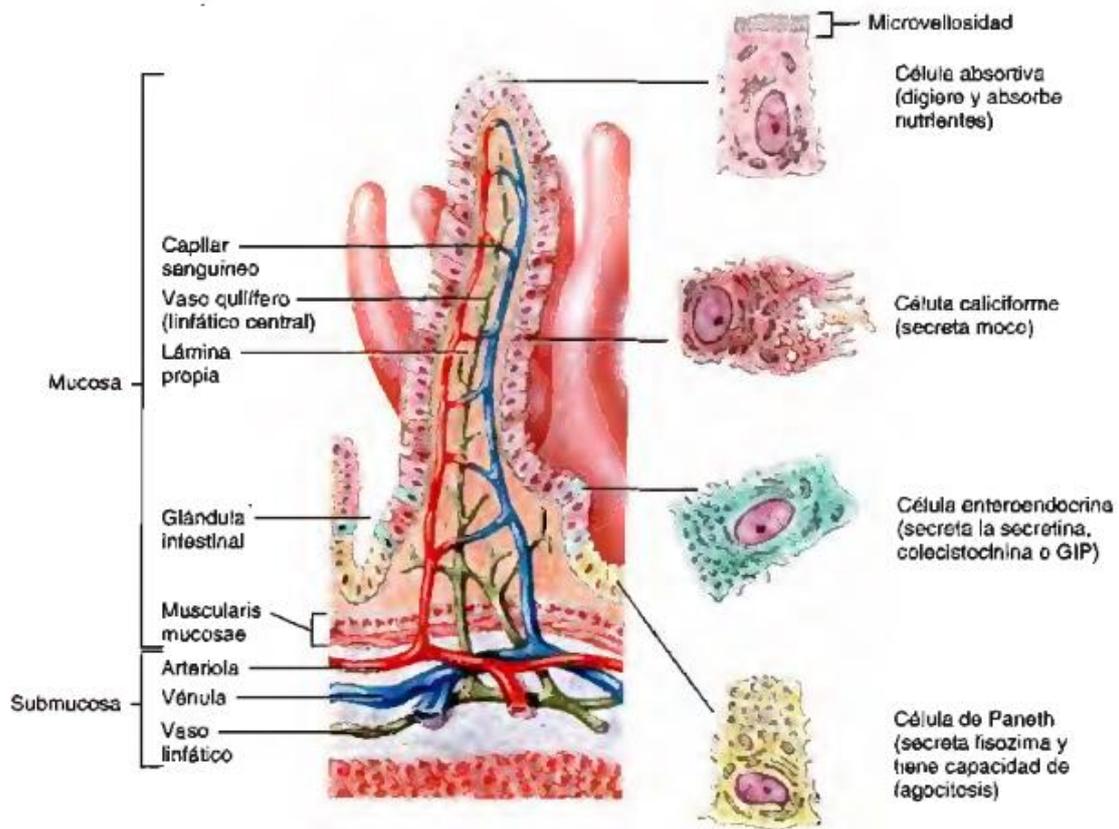


Figura 3. Vista aumentada de una vellosidad que muestra los quilíferos, capilares, glándulas intestinales y tipos celulares. Tomada de (Tortora, Gerard J Derrickson , 2011) ²¹

Dentro de las células más abundantes se encuentran los enterocitos, apareciendo en aproximadamente el 90% de las células del intestino delgado.^{26,33} Su principal función es la absorción, ya que sintetizan diversas enzimas digestivas y participan en la absorción de proteínas, hidratos de carbono, lípidos, calcio y otras sustancias. Son células especializadas para el transporte de sustancias desde la luz del intestino hacia el sistema circulatorio.^{5,21,33,36}

Las siguientes células que se describen se conocen como caliciformes, éstas son glándulas unicelulares secretoras de mucina.^{21,23,33} Su principal función es proteger de invasión bacteriana y lubricar la mucosa intestinal.^{21,23,33}

La mucosa también cuenta con células de Paneth, las cuales permanecen en las criptas y tienen una forma piramidal.³¹

Éstas son las que mantienen la inmunidad innata de la mucosa mediante la secreción de sustancias antimicrobianas como T N F- α , lisozima y defensinas, además de que cuentan con capacidad fagocítica, ayudando así al control de la flora microbiana residente y patógena. Las proteínas antimicrobianas son retenidas dentro de la capa de moco intestinal. Éstas células se localizan en la base de las criptas de Lieberkühn y viven unos 20 días.^{5,21,23,33}

Además de las anteriormente mencionadas, también se encuentran las células enteroendocrinas, estas producen varias hormonas endocrinas y paracrinas.^{21,33}

Existen 3 tipos; células S, células CCK, y células K, las cuales secretan la hormona secretina, la colecistocinina (CKK) y el péptido insulínico dependiente de glucosa, respectivamente, estas hormonas controlan varias funciones del aparato digestivo.^{21,33}

Y, por último, pero no menos importantes, las células M (células con micropliegues), las cuales son especializadas en el epitelio, ya que desempeñan un papel en la monitorización de la luz intestinal y en el mantenimiento de la función barrera intestinal, además de que son un eslabón importante de la defensa inmunitaria intestinal.^{5,23,33}

1.2 Patologías asociadas a intestino delgado

Existen diferentes enfermedades asociadas con la insuficiencia intestinal, las cuales van desde las menos a las más prevalentes, pero todas terminan afectando la vida del que la padece. (Tabla 1)

Estas se basan en el mismo principio, la falla de la función y motilidad del intestino delgado, provocando así una disminución en la calidad de vida; a continuación, se describen algunas de ellas.

Una de las principales es la Enfermedad de Crohn (EC), la cual es de origen idiopático y se asocia a un proceso inflamatorio crónico,^{33,37-40} el sitio de localización más común es el íleon terminal, aunque de igual forma puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo^{33,37,39,40}, las criptas de Lieberkühn son invadidas por células inflamatorias, ya que se presenta una reducción de

defensinas. Esta enfermedad se caracteriza por signos como la diarrea, dolor abdominal y recaídas periódicas,^{33,37,38} además del aumento de linfocitos.^{33,40} Dentro de las principales complicaciones está la obstrucción de la luz intestinal por fibrosis, la formación de fístulas en otros segmentos del intestino delgado, y la perforación intestinal.³³

Siendo estos síntomas la causa de que los pacientes diagnosticados con EC, tengan que modificar su vida cotidiana, ya que cuando estos se presentan provocan una pérdida de control intestinal^{6,38-40}, por lo tanto, tienen la necesidad de ir al baño muy seguido, además del cansancio anormal; lo cual, afecta su vida en todos los aspectos, esto conlleva problemas en el trabajo y en su vida personal, lo que los puede llevar a un estado de depresión.^{38,40} Pero en estos casos el apoyo de la familia y amigos es un punto muy importante para poder sobrellevar todas las consecuencias ocasionadas. Hay poca difusión de información acerca de los síntomas o tratamientos existentes para dicha enfermedad, por lo cual, los pacientes tienen que investigar por cuenta propia, haciendo de esta forma que sientan que no hay un mayor interés por ayudarlos.³⁸

Otra de las enfermedades que se presentan debido a la falla intestinal es el síndrome de intestino corto (SIC), este es un cuadro clínico caracterizado por una importante disminución de la superficie intestinal (mayor a 45 cm) por una pérdida anatómica o funcional del intestino delgado, la mayoría de las veces aparece tras resecciones extensas por isquemia mesentérica y algunas veces es una causa congénita.^{7,17,28,41-43}

Dentro de las principales complicaciones que se presentan están la malabsorción, diarrea, deshidratación, desnutrición y por ende pérdida de peso, de igual forma la translocación de bacterias entéricas al torrente sanguíneo, la cual se manifiesta como infección del catéter venoso central^{7,17,28,42,43} La resección de una longitud importante de intestino delgado produce una secuencia de síntomas graves derivados de la disminución de la superficie intestinal activa para la absorción, lo que se incrementa por la disminución del tránsito de los alimentos, conduciendo a grandes pérdidas de agua, electrolitos, grasas, proteínas, vitaminas, y, finalmente, al deterioro creciente del paciente lo que puede llevar a la muerte por desnutrición.⁷

Los pacientes con SIC necesitan contar con un soporte nutricional adecuado y personalizado, por lo cual se deben adaptar a recibir diferentes tratamientos, ya que esto implica el factor clave para la evolución de estos.⁴⁴

Los principales tratamientos para esta enfermedad son: nutrición parenteral^{17,42}, nutrición enteral, supresores de secreción ácida, antidiarreicos, hormona de crecimiento y glucagón^{17,42}, y para pacientes con síntomas más graves se llega hasta el tratamiento quirúrgico, cuando lo anteriormente mencionado ha fallado.^{17,41,42}

Tomando lo anterior como referencia se sabe que la posibilidad de una adecuada adaptación intestinal depende de cómo funcionen los tratamientos, además de la longitud y la porción del intestino resecado.⁴¹

Por otro lado, está la enfermedad celíaca, la cual es una lesión crónica del intestino delgado mediada por mecanismos inmunitarios, debido a la sensibilidad al gluten, proteína presente en cereales como el trigo, el centeno, la cebada, entre otros. Esta enfermedad dura toda la vida y sólo aparece en individuos que tienen susceptibilidad genética.¹⁷ La ingestión de estos alimentos produce una reacción inmunitaria que finalmente daña la mucosa del intestino delgado, lo cual produce atrofia de las vellosidades del mismo, y finalmente disminución de la superficie de absorción.¹⁷

Tabla 1. Causas de malabsorción intestinal.¹⁷

Anatómica	Funcional
Compromiso de la longitud intestinal producto de malformaciones congénitas	Dismotilidad intestinal
Compromiso de la longitud intestinal producto de resecciones quirúrgicas	Enfermedades asociadas a malabsorción

Este tipo de enfermedades son de carácter debilitante con un efecto negativo en la calidad de vida de los pacientes y de su familia, además de que se asocia a costos elevados^{41,42}

Cuando los tratamientos anteriormente mencionados no fueron efectivos se recurre a los trasplantes intestinales, siendo esta la última opción.^{7,16,28}

Los trasplantes intestinales, se presentan como la técnica quirúrgica más desarrollada y se reserva para los pacientes que desarrollan complicaciones graves y en los cuales los tratamientos existentes no fueron eficientes, aunque siendo esta su última alternativa, y la más efectiva, todavía se presentan complicaciones (Tabla 2) y una morbilidad importante.^{7,16,28}

Tabla 2. Complicaciones del Trasplante Intestinal

Complicaciones del Trasplante Intestinal (TI)⁴	
Tipo	Consecuencia
Quirúrgicas	Trombosis vasculares, hemorragias, perforaciones y complicaciones derivadas de ostomías.
Inmunológicas	Secuencia rechazo grave, disfunción del injerto y potencial muerte del receptor.
Infecciosas	Infecciones virales, bacterianas y fúngicas.

Capítulo 2. Ingeniería de Tejidos

Este trabajo está dirigido al campo de la medicina regenerativa o ingeniería de tejidos, que es el paso fundamental para obtener un material adecuado para la regeneración de un órgano o tejido.

La ingeniería de tejidos es un campo que aplica fundamentos de medicina regenerativa, se ha venido desarrollando la combinación andamios, o biomateriales con células biológicamente activas, es una alternativa prometedora para sustituir tejidos u órganos lesionados, siendo una posible solución a la necesidad de trasplantes.^{20,45-48}

La construcción de órganos y tejidos artificiales por ingeniería tisular es uno de los campos de investigación que ha experimentado mayor progreso durante los últimos años ⁴⁹, con el uso de biomateriales, los cuales son aquellos que se utilizan con la intención de interactuar con sistemas biológicos para evaluar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función en el cuerpo. ⁵⁰

2.1 Matriz extracelular (MEC)

La MEC sirve como un soporte tanto mecánico como estructural para el tejido conjuntivo, contribuyendo a la integridad mecánica y ayudando así a la adhesión y crecimiento de células en él, de igual forma proporciona señales bioquímicas y proteínas especializadas. ^{22,47,51-58}

Al ser el componente de los tejidos que da el principal soporte a las células, se utiliza en la ingeniería de tejidos para guiar las interacciones entre ellas, además de que establece los patrones para su adhesión.⁵⁷

Es una mezcla muy compleja de proteínas estructurales y funcionales y otras biomoléculas, incluye fibras proteínicas de colágeno, elásticas y reticulares, además de la llamada sustancia fundamental (Tabla 3), que ocupa el espacio entre las células y las fibras, es una sustancia de aspecto viscoso y transparente, es rica en proteoglicanos, glucosaminoglucanos (GAG) y glucoproteínas multiadhesivas.^{22,53,57,59,60} Los compuestos que forman la matriz extracelular son secretados principalmente por fibroblastos. ^{51,58,59}

Esta se compone de macromoléculas, las cuales son las siguientes:

Tabla 3. Proteínas multiadhesivas que forman parte de la matriz extracelular.

Proteína	Función
Colágena	Provee el principal soporte estructural para los tejidos.
Fibronectina	Lleva a cabo la adhesión celular y media la migración.
Laminina	Fija las superficies celulares a la lámina basal , proporcionando un sustrato de adhesión para resistir las fuerzas de tensión en los tejidos.
Elastina	Proporciona soporte, resistencia y capacidad de recuperación en regiones sometidas a estrés biomecánico.
Proteoglicanos	Se encargan de que la MEC sea un gel hidratado, lo que permite a los tejidos soportar las fuerzas compresivas.

2.2 Descelularización

La descelularización es el proceso que se basa en la eliminación de componentes celulares, los cuales pueden iniciar una respuesta inmune, dejando a la matriz extracelular (MEC) íntegra, la cual sirve como un “andamio celular”, el cual en un proceso posterior puede ser repoblado con células del paciente.⁶ El proceso de biofabricación a través de la descelularización conlleva diversos tratamientos, entre estos están los físicos, químicos y enzimáticos, los cuales buscan eliminar tanto el material celular como el nuclear, sin afectar la composición y actividad de la matriz extracelular. ^{3,8,9,47}

El uso de andamios descelularizados en ingeniería de tejidos conlleva diversos beneficios, como lo son: disminuir la probabilidad de rechazo por parte del receptor, preservación de componentes de la MEC, además de conservar la arquitectura de esta. ^{11,57,58}

Además, las propiedades del material del andamio descelularizado puede estar inherentemente limitadas por las características de la fuente de tejido, incluida la forma y el comportamiento mecánico.⁹

Por lo tanto, la descelularización conlleva a la eliminación de antígenos celulares, con lo que permite el uso de materiales xenogénicos, además de que minimiza la respuesta inmunológica sobre la implantación, conserva tanto la integridad mecánica y la composición bioquímica del tejido nativo, de igual manera cuenta con la capacidad de conservar la microarquitectura tridimensional del tejido nativo y las propiedades bioinductivas para facilitar la remodelación de tejidos. Sin embargo, también se encuentran diferentes desafíos aún por resolver tales como: la optimización del proceso de descelularización dependiendo de la fuente del tejido, dado esto, la eficiencia del proceso es altamente dependiente de las características del tejido fuente. Durante el proceso de fabricación se puede ver afectada la bioactividad y la integridad estructural del tejido. Se puede llegar a presentar una respuesta inmunológica por eliminación celular incompleta, y una rápida degradación in vivo antes de la recelularización.⁹

2.3 Agentes de descelularización

Existen diversos protocolos de descelularización, aunque para que este sea completo y eficaz, es habitual combinar varios agentes físicos, químicos y enzimáticos (Tabla 4) entre sí para optimizar la eficiencia del proceso para cada tejido y órgano.^{9,61}

Pero el primero protocolo que se propuso para llevar a cabo la descelularización fue en 1975, en este protocolo mencionan la técnica utilizada para eliminar las células de la MEC, usando una combinación de procesos químicos y enzimáticos.^{9,62}

Conforme ha pasado el tiempo se han ido actualizando dichos protocolos dependiendo del tejido que se esté trabajando. Cada tejido tiene una respuesta diferente ante los procesos de descelularización, por ende se tiene que buscar un protocolo que sea adecuado para cada uno de ellos.^{8,9}

Generalmente para que un protocolo de descelularización resulte más efectivo utiliza una combinación de tratamientos o agentes, los cuales pueden ser químicos, biológicos y enzimáticos, obteniendo de esta forma una mayor eliminación de células y conservando mayormente la estructura de la MEC.^{9,63}

Comúnmente, un protocolo de descelularización regular sigue el orden que se presenta a continuación:

1. Se usan tratamientos físicos o soluciones iónicas para causar lisis en la membrana celular.
2. El tratamiento enzimático ayuda a separar los componentes celulares de la MEC.
3. Tratamiento con detergentes para solubilizar células citoplasmáticas y nucleares.
4. Enjuague y eliminación de remanentes celulares de la MEC.

2.3.1 Agentes físicos

Los agentes físicos que usualmente se utilizan para la descelularización son: temperatura, presión, perfusión, liofilización, congelación-descongelación, sonicación, y agitación. El mecanismo general de este método es el de romper la membrana plasmática de la célula, dando como resultado la lisis celular y la eliminación del tejido.^{9,47}

2.3.2 Agentes químicos

Los agentes químicos por lo general se usan para la remoción de componentes nucleares^{9,47}, dentro de estos se encuentran los tratamientos alcalinos y ácidos, los cuales alteran la membrana celular, y de igual forma pueden solubilizar los principales componentes citoplásmicos de las células ayudando así a la eliminación de ácidos nucleicos.⁹ Además también existe la extracción con detergentes, estos solubilizan la membrana lipídica y encapsulan proteínas dentro de micelas. Se pueden utilizar detergentes iónicos, no iónicos, catiónicos o zwitteriónicos.^{9,47,48,64} Los iónicos son efectivos para solubilizar membranas celulares citoplasmáticas y nucleares, alteran potencialmente la integridad del colágeno,^{9,47,48} mientras que los no iónicos son suaves, capaces de romper las

interacciones lípido-lípido y proteína-lípido.^{9,47,48,64} Los catiónicos son demasiado fuertes que provocan la desnaturalización de las proteínas estructurales en la MEC nativa.^{9,47} Por otro lado, los zwitteriónicos presentan propiedades tanto de detergentes no iónicos como iónicos, pero tienen una mayor tendencia a ser clasificados como agente hipotónico e hipertónico, los cuales causan un choque osmótico ayudando a incorporarse a la estrategia de descelularización como un medio para lisar células de manera eficaz.

2.3.3 Agentes enzimáticos

Los tratamientos enzimáticos, involucran proteasas y nucleasas^{10,47,65}, que ayudan a la eliminación de proteínas celulares y restos nucleicos.⁹

Diversos estudios han utilizado una combinación de las técnicas anteriormente mencionadas, ejemplo de ello son:

Tabla 4. Agentes de descelularización

Método		Modo de acción	Efecto en MEC	Referencias
Físico	Rápida congelación y liofilización	Formación de cristales de hielo intracelulares que daña las células presentes en el tejido, lo que resulta en la permeabilización de la membrana celular.	Proporciona una matriz porosa, y conserva la estructura del colágeno El ECM se rompe o se fractura durante la congelación rápida	11,12,47
	Congelación-Descongelación	Lisis celular	Elimina efectivamente la antigenicidad de las matrices, además de que permite la conservación efectiva de las láminas basales nativas.	66
	Agitación y perfusión	Facilita la exposición química y la eliminación de residuos celulares; puede lisar las células	Las condiciones agresivas pueden dañar los componentes del ECM	3

Químico	Ácidos	<p>Producen degradación hidrolítica de moléculas.</p> <p>Solubilizan el componente citoplasmático de las células, producen disrupción de los ácidos nucleicos y desnaturalización de las proteínas.</p> <p>Ej. Ácido peracético</p>		<p>Pueden afectar a los GAGs y eliminar factores de crecimiento.</p>	10,12,48
	Detergentes	<p>Iónicos</p> <p>Ej. dodecil sulfato de sodio (SDS)</p> <p>Desoxicolato sódico</p>	<p>Solubilizan las membranas celulares y nucleicas, desnaturaliza proteínas.</p>	<p>Elimina restos nucleares y las proteínas citoplasmáticas de los tejidos gruesos, tiende a alterar la ultraestructura, elimina el GAG y los factores de crecimiento y daña el colágeno.</p>	12,48,61,67
		<p>No iónico</p> <p>Ej. Triton X-100</p>	<p>Solubilizan las membranas celulares y disocian el ADN de las proteínas</p>	<p>Rompen y disocian proteínas de la matriz.</p> <p>Eliminación de células más eficaz de tejidos delgados, cierta alteración de la ultraestructura y eliminación de GAG.</p>	12,48,61
		<p>Zwitteriónicos</p> <p>Ej. CHAPS</p> <p>(3-[(3-colamidopropilo) dimetilamonio]-1-propano)</p>	<p>Presenta propiedades iónicas y no iónicas.</p>	<p>A través de una modificación ultraestructural en tejidos delgados elimina a las células.</p>	12,47,48,61

	Soluciones hipotónicas	Producen lisis celular por efecto osmótico.	Cambios mínimos en la composición y arquitectura de la MEC.	66,67
	Soluciones hipertónicas	Disocian las moléculas de ADN de las proteínas al romper sus interacciones.		67
	Agentes quelantes	Disocian las células de las proteínas de la matriz. Ej. Ácido etileno diaminotetraacético (EDTA) y el Ácido etileno glicol tetraacético (EGTA)	Producen disrupciones proteína-proteína mediante el secuestro de iones de metal, interrumpiendo así la adhesión celular a ECM	47,61,66,67
Enzimáticos	Tripsina	Se utiliza como agente inicial, especialmente en tejidos densos ya que produce fácilmente disrupción de la ultraestructura tisular facilitando así la penetración de otros agentes en un segundo paso	Disminuye significativamente el contenido de elastina y GAG Permite desnaturalizar las proteínas que mantienen unidas las células a la matriz.	67,68
	Nucleasas	DNAasas y RNAasas Ej. Endonucleasa-Benzonasa	Escinden secuencias de ácidos nucleicos. Útiles en la eliminación de nucleótidos después de la lisis celular en tejidos	47,61,66,67

2.4 Caracterización del andamio de intestino delgado descelularizado.

Las evaluaciones histológicas, son importantes, ya que se tiene que aplicar la mejor técnica para la caracterización del andamio, determinando de esta manera la eficiencia de este antes de ser implantado. Se tiene que realizar la caracterización adecuada para saber si el proceso de descelularización que se llevó a cabo eliminó por completo los componentes celulares o si aún existen residuos en la MEC.

Para evaluar los andamios naturales obtenidos mediante descelularización se requiere la aplicación algunas técnicas, debido a que se desea identificar y cuantificar los componentes presentes en la MEC, a continuación, se describe el fundamento de estas para poder comprender la utilidad de cada una.

2.4.1 Histología

La técnica histológica se basa en una serie de pasos a los cuales se somete un tejido para que sea posible la observación de estructuras no visibles al ojo humano mediante el microscopio.^{69,70}

En el desarrollo de esta técnica se realizan los siguientes pasos^{69,70}:

1) Obtención del material histológico

La obtención del material es un proceso que se debe realizar con varias precauciones, y se deben de cumplir varias reglas, como lo son:

- Realizar la toma del tejido del lugar correcto.
- Es preciso obrar con cuidado y precaución, a fin de evitar la destrucción de los tejidos.
- Cortar la pieza de órganos macizos en trozos pequeños (entre 1 y 3 cm x 0.5 cm), teniendo en cuenta la configuración anatómica.
- La manipulación de órganos huecos debe ser cuidadosa con el fin de evitar la distensión de estos.

- Realizar éste proceso con la mayor rapidez posible para evitar la autodestrucción del tejido (autólisis).

2) Fijación

Mediante la fijación se busca impedir el desarrollo de los procesos vitales de los tejidos e impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir la célula (procesos autolíticos), que consiste en la destrucción de los tejidos por sus propias enzimas locales producidas por los lisosomas, y aun así manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos. ^{69,70}

3) Inclusión

Los tejidos fijados adquieren cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente para que de ellos se obtengan secciones delgadas, estas secciones se conseguirán cuando los tejidos se infiltren con sustancias denominadas “de inclusión”, las cuales tienen la finalidad de servirles de soporte. Así los tejidos y la sustancia de inclusión forman un bloque homogéneo en dureza y consistencia, a pesar que sus componentes tuvieron originalmente distinta dureza. ^{69,70}

Existen dos procedimientos fundamentales para la obtención del corte, los cuales son: previa congelación del material de estudio, lo cual no altera la composición química de los componentes histológicos del material a examinar, además de que los cortes obtenidos por congelación son siempre más gruesos, el otro procedimiento, es la previa inclusión del material en parafina, es preferible impregnar los tejidos con una sustancia líquida que luego pasa a una fase sólida y homogénea, estos dos procedimientos son la forma en que se adquiere tal dureza, que sometidos al filo de una navaja produzcan secciones, cortes o láminas sumamente delgados y transparentes. ^{69,70}

La inclusión o formación del bloque de parafina se efectúa empleando moldes de diversos materiales y diferentes áreas y profundidades. Pueden ser de papel, metal o plástico. El bloque de parafina debe contener la muestra correctamente orientada para facilitar la obtención de las secciones o “cortes”. ⁶⁹

4) Obtención de cortes mediante micrótomo

En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes.⁶⁹ Con el objeto de realizar los cortes adecuados para el estudio al microscopio, se utilizan distintos métodos y variados aparatos de gran precisión, a los que se denominan “micrótomos”. Los espesores más utilizados van desde 5 a 8 um. La elección del grosor depende de la textura del tejido y de los elementos y detalles que se quieran observar y estudiar.⁷⁰

5) Tinción

Las estructuras contenidas en las preparaciones histológicas, poseen poco contraste o carecen de él completamente, por lo que no van a poder ser distinguidas al microscopio. Este inconveniente queda resuelto por la propiedad que tienen los distintos componentes celulares y tisulares de incorporar con variable intensidad sustancias colorantes, mediante el procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora.^{69,70}

6) Montaje

Concluido el proceso de la tinción de los cortes, se realiza el montaje, el cual tiene por objeto mejorar la observación, facilitar el manejo y aumentar la duración de los preparados histológicos.⁷⁰

Este procedimiento consiste en colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, diluida, generalmente en xilol (resina natural como el bálsamo de Canadá o resinas sintéticas, cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio) y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina.

A continuación se deja que el xilol se evapore, y la resina adquiera solidez suficiente; para ello las láminas se colocan en una platina caliente (45° a 50° C) durante 24 a 48 horas y estarán listas para ser observadas.^{69,70}

En este trabajo se utilizaron diferentes evaluaciones, de las cuales se explica el fundamento a continuación:

2.4.1.1 Hematoxilina & Eosina

La tinción hematoxilina-eosina (H&E), es el método de las tinciones más utilizadas en investigación. Se basa en la combinación de dos colorantes; la hematoxilina, que, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilas) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma.^{71,72}

2.4.1.2 Tricrómico de Masson

La técnica histoquímica de coloración tricrómica de Masson diferencia mediante tres colorantes distintos y tres tipos de estructuras, como son los núcleos, el citoplasma y el tejido conjuntivo.^{71,73,74}

El fundamento se basa en:

1. Primero se tiñen las secciones con un reactivo ácido de tipo fucsina, tal como escarlata de Biebrich, la cual tiñe de color rojo elementos acidófilos como citoplasma, y músculo.
2. El segundo colorante que se utiliza es el ácido fosfotúngstico y/o fosfomolibdico, el cual se diluye del colágeno, pero no del citoplasma, este tiene varios grupos ácidos los cuales actúan entre el colágeno y el azul de anilina, el cual es afín al colágeno y se tiñe de color azul.

3. El último colorante que se utiliza es la hematoxilina férrica de Weigert, que tiñe componentes basófilos, sirve para para diferenciar el núcleo celular, se tiñe de color marrón o negro.

2.4.1.3 Tinción PAS (Ácido peryódico de Schiff)

Esta reacción tiñe carbohidratos y macromoléculas compuestas por carbohidratos (glucosaminoglicanos y proteoglicanos).⁷¹

Algunos de los múltiples usos de la reacción incluyen:

1. Demostración de fibras reticulares y membranas basales.
2. Demostración de hongos.
3. Demostración de ciertos tipos de mocosustancias secretadas por el epitelio de varios órganos del tracto digestivo, respiratorio y genital femenino (cérvix) ⁷²

Todas ellas se pueden ver en PAS positivas en color magenta con núcleos azules. ⁷²Los polisacáridos PAS positivos pueden ser mucopolisacáridos ácidos no sulfatados como las sialomucinas epiteliales; mucopolisacáridos ácidos sulfatados como las sulfomucinas epiteliales y glucosaminoglicanos del tejido conectivo; mucoproteínas y mucolípidos.

2.4.1.4 Tinción de Herovici

La tinción de Herovici es una tinción policrómica, utilizada para evaluar estructuras tisulares como el núcleo, citoplasma y colágena extracelular, en las cuales utilizan colorantes como azul de celestino, amarillo de metanilo, fucsina ácida y azul de metilo. ⁷⁵ Esta tinción tiñe de diferente color según la fase de maduración de la colágena, además de distinguir el tipo I y III, se tiñe de azul, si la colágena se encuentra en una etapa inmadura y roja si se encuentra en su forma madura,. El citoplasma se colorea en tono amarillo y los núcleos de negro.

^{75,76}

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

Es una tinción de ácido nucleico fluorescente azul que se une al ADN bicatenario y parece asociarse con los grupos de AT en el surco menor de la molécula de ADN. Es un colorante de ADN no permeable, pero puede entrar en una membrana dañada, en donde el colorante puede interactuar con el ADN en la célula.^{77,78}

2.5 Recelularización

Durante la recelularización, un órgano o tejido se mantiene en condiciones en las que al menos algunas de las células regenerativas se pueden multiplicar y/o diferenciar dentro del órgano o tejido descelularizado o sobre el mismo. Dentro de las condiciones adecuadas están: temperatura y/o presión, pH, la cantidad oportuna de O₂ y/o CO₂, humedad, y condiciones estériles o casi estériles. Las células regenerativas pueden ser alogénicas de un órgano o tejido descelularizado de la misma especie, o xenogénicas de una especie diferente a la que originó el órgano o tejido.⁶³

2.6 Viabilidad celular

El estudio de la viabilidad celular se centra en evaluar que tan aptas son las células para ser utilizadas. El principal interés es conocer si cuentan con el potencial para su uso en ingeniería tisular.^{79,80}

Dentro de las técnicas que existen para dicha evaluación, se encuentra el uso de azul de tripán, es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir células muertas, este es un ensayo rápido, el cual se basa en poner de manifiesto la integridad de la membrana plasmática.^{79,81}

Otro de los ensayos que se puede emplear, es el uso del kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD, este se basa en el uso de dos colorantes; la calceína AM verde fluorescente que detecta la actividad de la esterasa intracelular, lo cual es un indicio de que la membrana plasmática está intacta, por lo tanto, detecta a las células vivas, y el homodímero-1 de etidio rojo fluorescente, el cual detecta la integridad de la membrana plasmática.⁸²

El uso de este kit resulta ser más sensible y seguro en comparación con el uso del colorante de exclusión azul de tripano, debido a que ambos colorantes son prácticamente no fluorescentes antes de interactuar con las células, por lo cual son muy sensible debido a la brillante fluorescencia de ambos colorantes al interactuar con las células vivas o muertas.^{79,81}

Capítulo 3. Metodología experimental

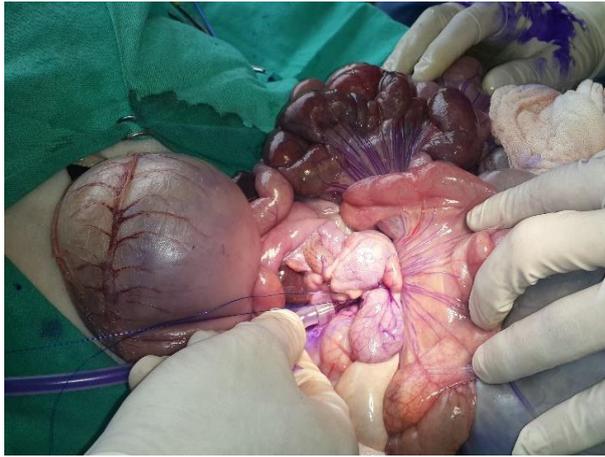
En este capítulo se describe la metodología experimental llevada a cabo para descelerarizar el intestino delgado, además de las técnicas utilizadas para comprobar la eficacia del proceso de decelularización, así como la caracterización tanto del intestino delgado descelerarizado como del nativo y una prueba de viabilidad celular del intestino descelerarizado.

3.1 Protocolo de descelerarización

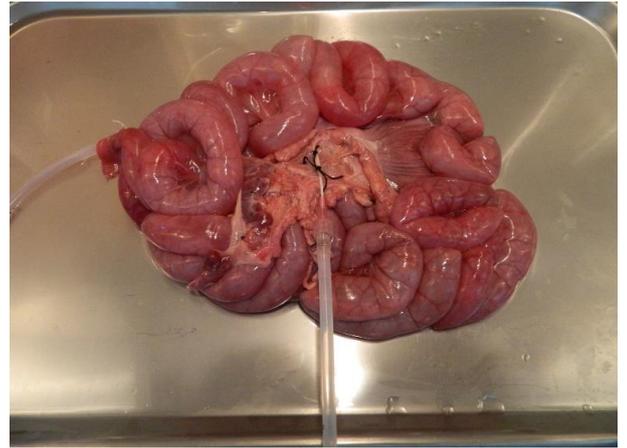
En este caso la metodología que se llevó a cabo se basó en trabajos previos realizados en nuestro laboratorio^{12,83-85}, se utilizaron tres cerdos de la raza Landrace-Yorkshire, de entre 3 a 5 kg.

Lo primero que se realizó fue obtener el intestino delgado de porcino, donde se resecó la parte del yeyuno. (Fig 4)

El procedimiento quirúrgico del donante se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UNAM), el cual estuvo dirigido por la Dra. Norma Silvia Pérez Gallardo y su equipo, de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999⁸⁶ y los requisitos del Comité de Ética FMVZ.



(a)



(b)

Figura 4. Técnica quirúrgica de la extracción de intestino delgado. (a) Extirpación del segmento intestinal, (b) Fracción de intestino delgado (yeyuno).

Previo a la extracción de la fracción de intestino delgado se preparó al donante porcino mediante sedación, aplicando azaperona (Sural®) 20 mg/kg IM como sedante y sulfato de atropina (Atropisa®) 1mL IM como protector vagal y antisialagogo, además de pentobarbital sódico como anestésico general. Una vez obtenido el yeyuno (Fig 4b) se realizó el procedimiento de descelularización que se describe a continuación.

Después de la extracción, el intestino delgado se colocó en solución de antibiótico-antimicótico al 10% (SIGMA) en solución amortiguadora salina-fosfato (PBS) para su transporte desde el quirófano en el Departamento de Medicina Cirugía y Zootecnia para Pequeñas Especies de la FMVZ-UNAM hasta el laboratorio de Biomateriales en el Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El intestino delgado se colocó sobre una charola, se removió el tejido ganglionar del mesenterio intestinal sin comprometer el árbol vascular con ayuda de un equipo básico de disección, se enjuagó con agua Mili-Q, posteriormente se introdujo el intestino en una nueva solución de PBS a temperatura de 4°C, en donde comenzó el protocolo (Fig 6) que se describe a continuación:

Día 1. Se conectó a una bomba para perfundirlo con la misma solución por 24 h.

Día 2. Se incubó el intestino en una nueva solución de PBS por 24 h a 4°C.

Día 3: Se realizó el cambio de solución para terminar el enjuagado de la sangre y se incubó de nuevo en una solución de en PBS por 24 h a 4°C.

Día 4: Se realizó el cambio de solución y se perfundió en 2 L de solución de PBS/tritón X-100 con 2% v/v de Tritón X-100 y 0.2% v/v de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 0.3% v/v buffer azida sódica con 2%v/v SDS por 24h. Además, se realizaron lavados con PBS por 24 h.

Día 5: Se perfundió por 1 h con solución de PBS para enjuagar y se coloca de nuevo en una solución PBS/Desoxicolato de sodio (4%) por 24 h a 4°C

Día 6: Se enjuagó en 2 L de solución de PBS 24 h y finalmente se almacenó en una solución 50% de agua deionizada con 50% de solución de PBS y 0.5% de anfirm/ solución antibiótico y (33 mg) azida sódica.



(a)



(b)

Figura 5. Proceso de descelularización. (a) Perfusión de intestino (b)Intestino descelularizado.

El andamio de intestino descelularizado obtenido se almacenó congelándolo a una temperatura de -20°C. Después se esterilizó previo a los ensayos biológicos, incubándolo en una solución de 10% de antibiótico-antimicótico en PBS durante 24 h a 4°C y después se irradió con luz UV durante 30 minutos.

PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN

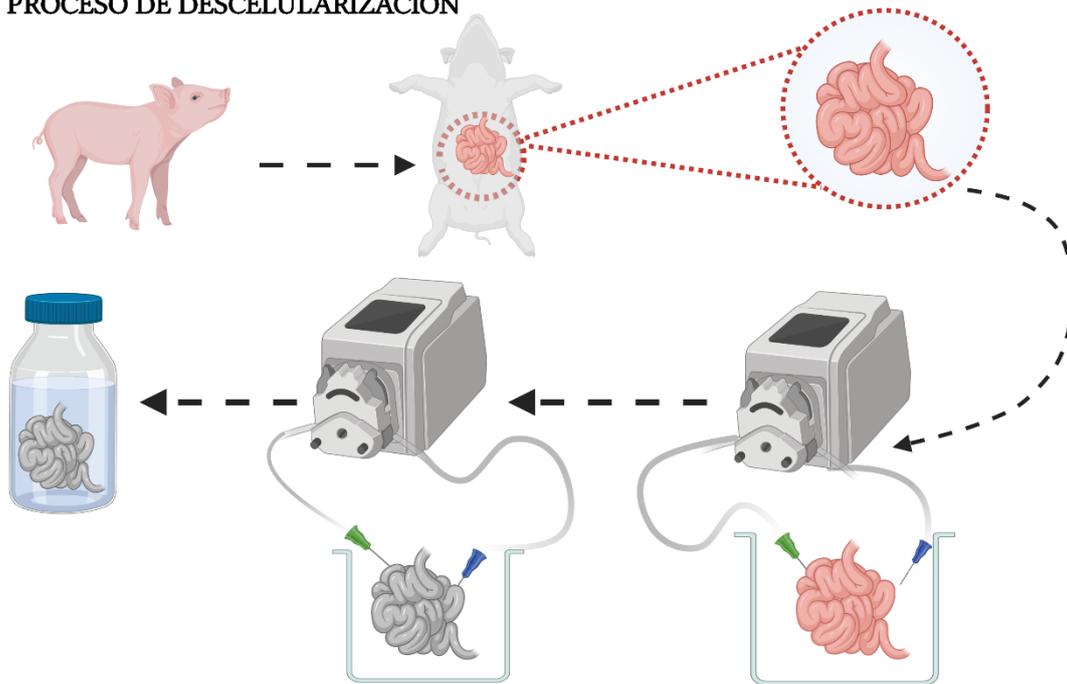


Figura 6. Proceso general de descelularización.

3.2 Expansión de células mesenquimales provenientes de pulpa dental.

Las células que se utilizaron fueron proporcionadas por la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se obtuvieron mediante un sistema de cultivo de tejido de explante de 5 pacientes adultos que fueron sometidos a la extracción del tercer molar en la Clínica de Cirugía Maxilofacial de la División de Estudios de Posgrado e Investigación (DEPeI) en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.⁸⁷

Una vez teniendo las células se realizó una expansión de las mismas para llevar a cabo el experimento de viabilidad celular. Se sembraron en frascos de cultivo (BD Falcon) a una densidad de 70,700 células/cm². Después de 24 h, se cambió el medio y las células adheridas se dejaron expandir hasta obtener una confluencia del 80%. Las células se mantuvieron con medio DMEM/F12 + GlutaMAX (1x) (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 1% de antibiótico- antimicótico (Gibco). (Fig 7)

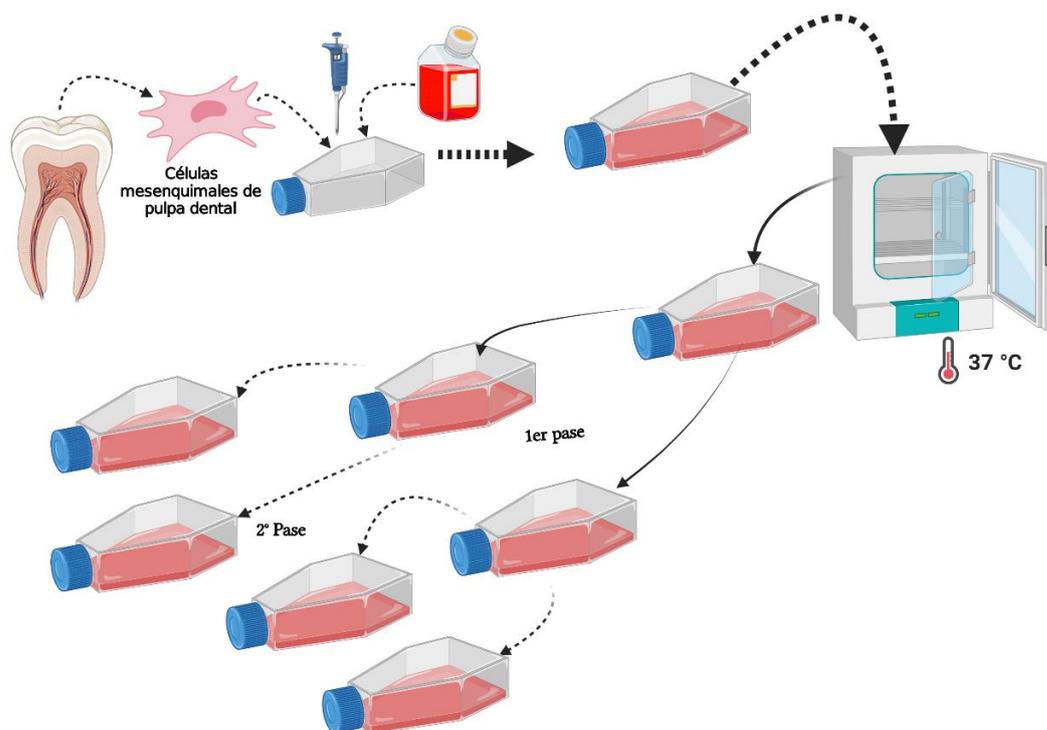


Figura 7. Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental

3.3 Caracterización

Después de haber realizado la descelularización del intestino delgado, se caracterizó la matriz obtenida, el procedimiento se describe a continuación.

3.3.1 Histología

El intestino descelularizado fue sometido a una evaluación microscópica, tal y como se describe en el punto 2.4.1. Esta evaluación se realizó en el departamento de embriología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Los fragmentos de intestino delgado nativo como descelularizado, se colocaron adecuadamente en un molde de metal, al cual se le agregó parafina para posteriormente realizar los cortes. Se realizaron cortes de 5 μm con el micrótopo de rotación (SLEE) los cuales se colocaron en el portaobjetos fijándolos con calor en una estufa. Los cortes se tiñeron con hematoxilina & eosina (H&E), y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), para evaluar la efectividad de descelularización,

mientras que para evaluar mucopolisacáridos, colágena y tejido conjuntivo se utilizó PAS, Herovici y Tricrómica de Masson respectivamente. (Fig. 8)

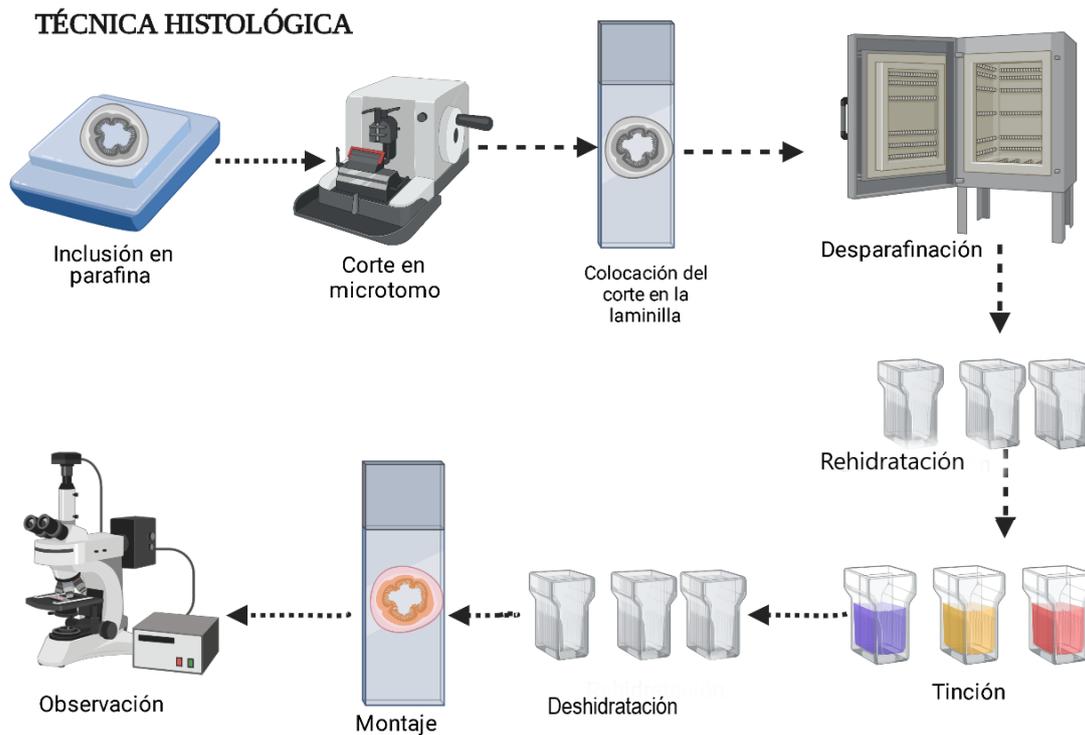


Figura 8. Proceso general de la técnica histológica

3.4 Viabilidad celular

Lo primero que se realizó para comenzar con la prueba de viabilidad celular fue el corte del tejido, se colocó el medio de montaje tissuetek en la base de aluminio para posteriormente colocar el tejido. Los bloques congelados de tissuetek a 30°C conteniendo las muestras se cortaron en el criostato (SLEE) a un espesor de 30 µm.

3.4.1 Recelularización del andamio

Una vez teniendo los andamios cortados se colocaron dentro de una caja de 24 pozos, se colocaron en los tres primeros pozos de la fila A los andamios descelularizados, en la fila B se tenía al control positivo, y en la fila C al control negativo. (Fig. 9)

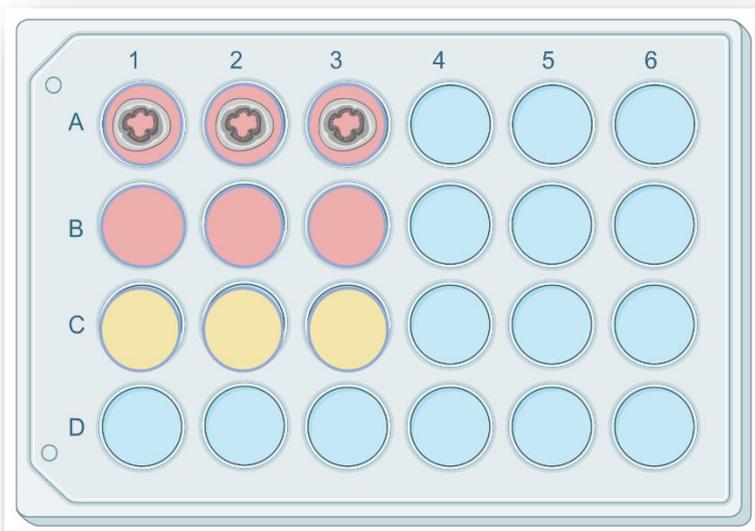


Figura 9. Esquema general de viabilidad celular. Fila A: matriz descelerizada y células (constructo). Fila B: células en monocapa Fila C: células en monocapa y

Una vez colocados los andamios se procedió a realizar tres lavados con PBS para eliminar el exceso de tissuetek, agitando suavemente la caja, se retiró el PBS y se realiza un cuarto lavado con antibiótico-antimicótico al 10%, seguido de dos lavados más con PBS, dejando finalmente el andamio con 1 mL de DPBS para ser irradiado con luz UV por 15 minutos, consiguiendo un andamio estéril.

3.4.1.1 Siembra de células mesenquimales en los andamios

Se realizó la tripsinización del cultivo celular contenido en 6 frascos T75, de los cuáles se obtuvo una cantidad de 49,166 células por pozo.

Se retiró el DPBS de los 9 pozos, para agregar 100 μ L de cultivo celular y 1 mL de medio de cultivo, la caja se incubó a 37°C por 30 días, realizando cambios de medio de cultivo a los 2,6,13,18 y 25 días de haber sido incubados.

3.4.2 Ensayo de viabilidad celular con el KIT LIVE/DEAD

Pasados los 30 días de incubación se realizó el ensayo de viabilidad celular, utilizando el KIT LIVE/DEAD. Lo primero que se realizó fue la eliminación del medio de cultivo que contenían los pozos, posteriormente se hicieron tres

lavados con PBS, se colocó 500 μ L de DPBS al constructo (andamio descelularizado conteniendo las células) y al control positivo. Al control negativo se le agregó 500 μ L de etanol al 70%, se incubó por 15 minutos a 37°C, mientras se preparaba el mix de reactivos, se utilizaron 3 mL de PBS con 6 μ L de homodímero de etidio y 1.5 μ L de calceína. Una vez pasados los 15 minutos de incubación se retiró el DPBS y el etanol 70% de los pozos, se añadió 300 μ L del mix de reactivos a los controles y 400 μ L a los constructos, la caja y el tubo que mantenían el mix se mantuvo cubierta con papel aluminio todo el tiempo para evitar el contacto con la luz, se incubó nuevamente por 15 minutos a 37°C, posterior a este tiempo se realizaron tres lavados con PBS y se mantuvieron en DPBS, para finalmente tomar las microfotografías correspondientes.

Capítulo 4. Resultados y Análisis

En este capítulo se presenta y se analiza la efectividad de la descelularización, comparando la caracterización del intestino nativo y del descelularizado, además de mostrar los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular.

4.1 Evaluación del proceso de descelularización

El intestino delgado se descelularizó de acuerdo al protocolo presentado en el punto 3.1 para eliminar el contenido celular presente en el tejido. Macroscópicamente se observó el cambio de coloración del tejido, el cuál en cuestión de 6 días pasó de un tono rojizo a blanco (Fig.10), generándose un andamio que mantuvo su estructura anatómica desde el punto de vista macroscópico. Lo que se busca con un protocolo de descelularización adecuado es eliminar los componentes celulares, pero manteniendo intactos los componentes de matriz extracelular.

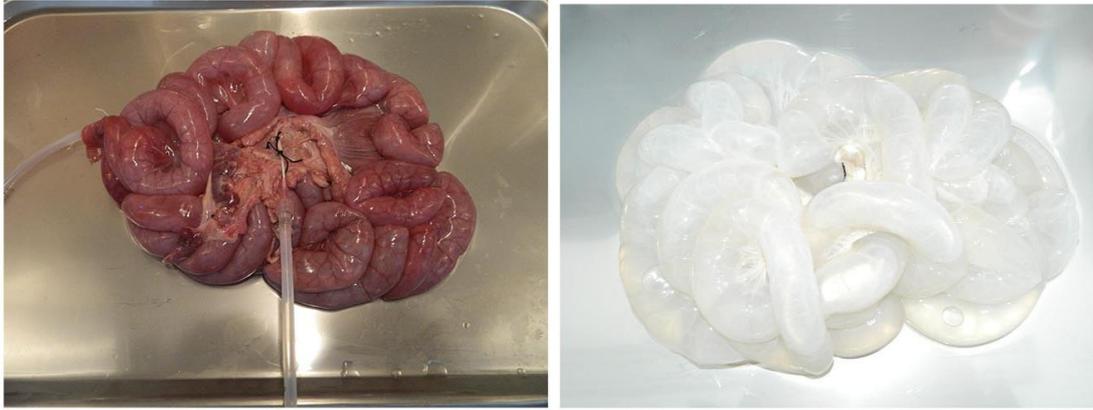


Figura 10. Macrofotografías del segmento de intestino delgado nativo y después de ser sometido al proceso de descelularización.

4.1.1 Efectividad del protocolo de descelularización

La medición de la efectividad del protocolo de descelularización se realizó mediante el uso del software de análisis de imagen (Image J) para cuantificar los núcleos celulares en las fotomicrografías obtenidas con el microscopio Axiozoom V16 (Zeiss) de la Unidad de Microscopía en la Facultad de Medicina, se analizaron con tinción de DAPI (Fig. 11 E, F, G y H) la cual muestra la disminución del material celular después de someter el intestino delgado al proceso de descelularización. Al observar el intestino nativo se notó la presencia de las estructuras del órgano intestinal normal, como son: las capas mucosa, submucosa y serosa, además de células como la caliciformes y de Paneth, también se pudo observar la presencia de la vellosidad intestinal (Fig. 11 A, C, E y G). Posterior al proceso de descelularización se observó la ausencia de las células anteriormente mencionadas, debido a la disminución de fluorescencia en el tejido, sin embargo, las capas se mantuvieron, aunque más laxas que en la nativa (Fig. 11 B, D, F y H). Al igual que en la tinción de Hematoxilina & Eosina, (H&E) (Fig. 11 A,B,C y D) estos resultados fueron consistentes. De igual forma, en trabajos similares, se muestra que las muestras tratadas con SDS y Tritón X-100 muestran menor cantidad de núcleos.⁸⁸⁻⁹⁰ Para evaluar la eficacia del proceso de descelularización se realizó la cuantificación del proceso, mediante el software GraphPad Prism 8.0.1 obteniendo como resultado una diferencia significativa ($p > 0.0001$) del contenido de núcleos presente en las matrices extracelulares en ambas tinciones. (Fig. 11 I, F).

Además de que, al analizar el porcentaje de descelularización de 6 muestras, se obtuvo un promedio de $96.17\% \pm 2.18\%$ para DAPI y $94.97\% \pm 13.09\%$ para H&E, esto es similar en el trabajo de Oliveira 2013, en el cual utilizaron un método de descelularización usando los detergentes como SDS y Tritón X-100 reportando resultados con porcentajes de descelularización de $98.88\% \pm 1.62\%$ usando SDS, y de $94.63\% \pm 5.85\%$ usando Tritón X-100.⁸⁹ Otros autores mencionan que para que el andamio pueda ser utilizado en aplicación para Ingeniería de Tejidos debe alcanzarse un porcentaje de descelularización mínimo de entre 70 % y 80%.^{91,92}

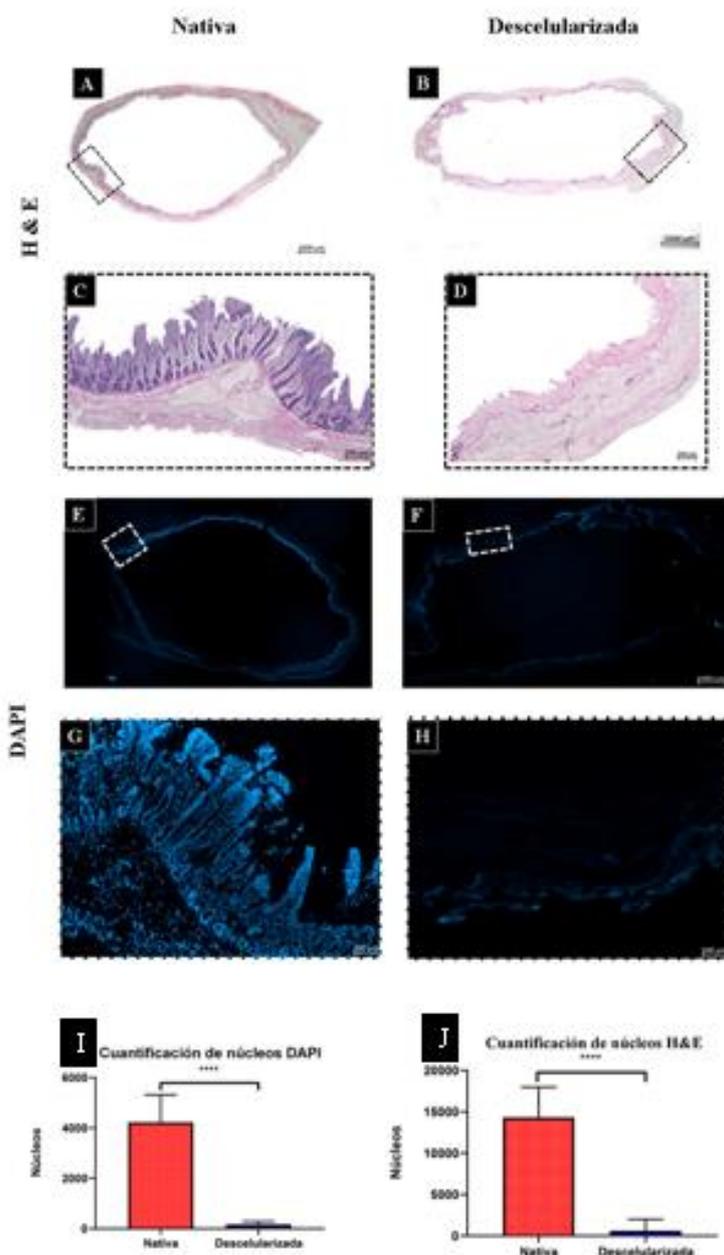


Figura 11. Caracterización de intestino delgado nativo y descelularizado a través de histología con DAPI y Hematoxilina & Eosina (H&E). A). Intestino nativo en tinción H&E (B) Intestino descelularizado en tinción H&E. (C) Acercamiento de intestino nativo en tinción H&E en el cual se pueden observar los núcleos teñidos de morado (D) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción H&E en el cual se presenta la ausencia de núcleos (E) Intestino nativo en tinción DAPI (F) Intestino descelularizado en tinción DAPI (G) Acercamiento de intestino nativo en tinción DAPI en el cual se observan núcleos en color azul (H) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción DAPI en el cual se observa la ausencia de núcleos y un poco de autofluorescencia de la colágena. (I) Cuantificación de núcleos con tinción DAPI. (J) Cuantificación de núcleos con tinción H&E.

4.1.2 Evaluación de la Matriz Extracelular (MEC)

Es importante mantener lo más intacta posible la estructura de la matriz extracelular para que esta sirva como soporte, por lo tanto, se evaluaron microscópicamente al intestino nativo y al descelularizado con tres tinciones histológicas: PAS, Herovici y Tricrómico de Masson. (Fig. 12) La matriz extracelular principalmente se compone de colágena y proteoglicanos, los cuales se preservaron en la estructura de la MEC después del proceso de descelularización.

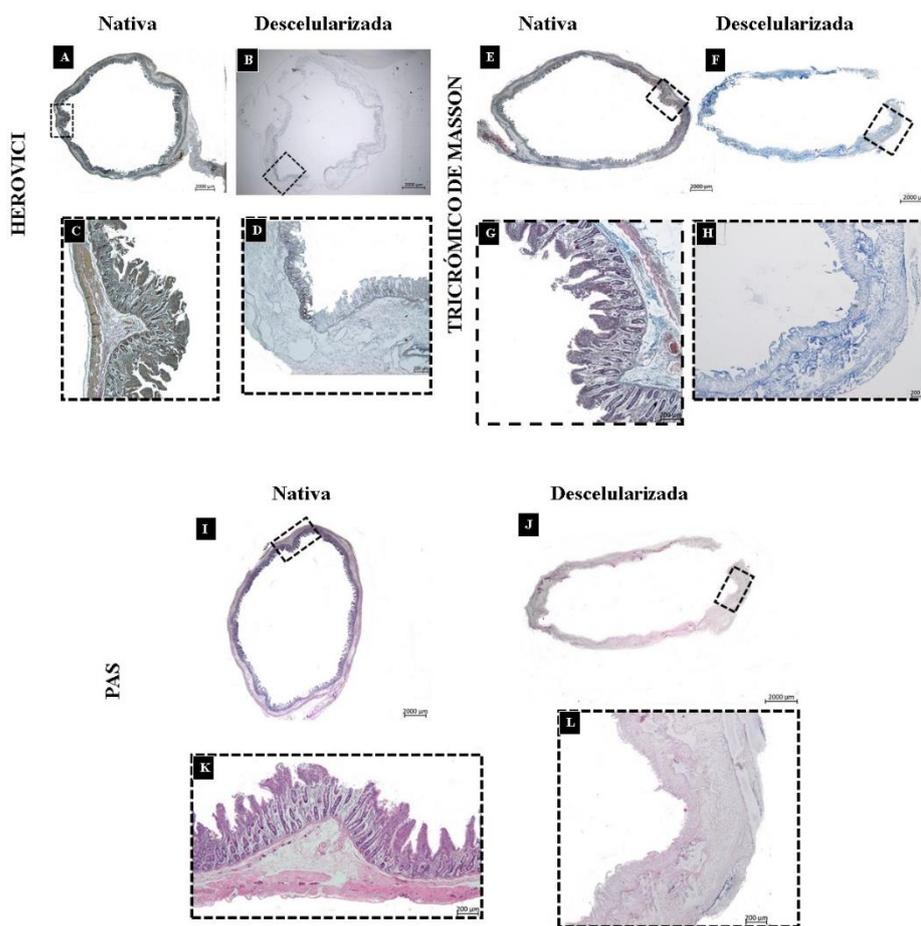


Figura 6. Caracterización de intestino delgado nativo y descelularizado a través de histología con tinción Herovici, Tricrómica de Masson, y la técnica de Schiff (PAS)(A). Intestino nativo en tinción Herovici (B) Intestino descelularizado en tinción Herovici. (C) Acercamiento de intestino nativo en tinción Herovici (D) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción Herovici. (E) Intestino nativo en tinción Tricrómica de Masson (F) Intestino descelularizado en tinción Tricrómica de Masson (G) Acercamiento de intestino nativo en tinción Tricrómica de Masson (H) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción Tricrómica de Masson (I) Intestino nativo en tinción PAS (J) Intestino descelularizado en tinción PAS (K) Acercamiento de intestino nativo en tinción PAS (L) Acercamiento de intestino descelularizado en tinción PAS.

En la tinción de PAS se pueden observar polisacáridos en color magenta y los núcleos de color azul (Fig. 12 K),^{71,74} Mientras que en la tinción de Herovici se tiñen de color azul las fibras de colágena nueva y en rojo la colágena madura, y los núcleos de negro.^{75,76} (Fig. 12C) En la tinción de Tricrómico de Masson se observa de color rojo elementos como citoplasma y músculo, la colágena se tiñe de color azul, y el núcleo celular se tiñe de negro.^{71,73,74} (Fig. 12 G) En las micrografías aumentadas del intestino descelularizado, se puede observar en las tres tinciones (Fig. 12 D, H y L) la conservación de los principales componentes de la MEC, como lo son las fibras de colágena, en cuanto a la tinción de Herovici (Fig. 12 D) se observan mayor cantidad de colágena madura, ya que esta se identifica gracias al color rojizo. En la tinción de Tricrómico de Masson (Fig.12 H) se muestra el tejido conectivo intacto en el andamio, al igual que en el trabajo de Maghsoudlou (2013).⁸⁸En relación a la tinción de PAS (12 L), la intensidad de la tinción disminuyó significativamente en la matriz extracelular descelularizada, en comparación con el intestino nativo; lo cual se asemeja con lo reportado en el trabajo de Oliveira y cols 2013⁸⁹ El objetivo de realizar estas tinciones fue demostrar que el protocolo de descelularización que se utilizó fue adecuado para poder eliminar los componentes celulares, manteniendo los componentes de la estructura de la MEC.

4.2 Evaluación de la recelularización

Para comenzar con el proceso de recelularización se realizó la cuantificación de las células mesenquimales de pulpa dental, o, en inglés, dental pulp stem cell (**DPSC**) pre siembra, esto se llevó a cabo con el Cell counter (Corning®), la cual se consideró como el día 1 (Fig. 13), obteniendo una viabilidad del 95.1 ± 1.62 %, el cultivo primario de dichas células presentaron un crecimiento de tipo fibroblástico, el cual se evidencio entre las primeras 72 h.

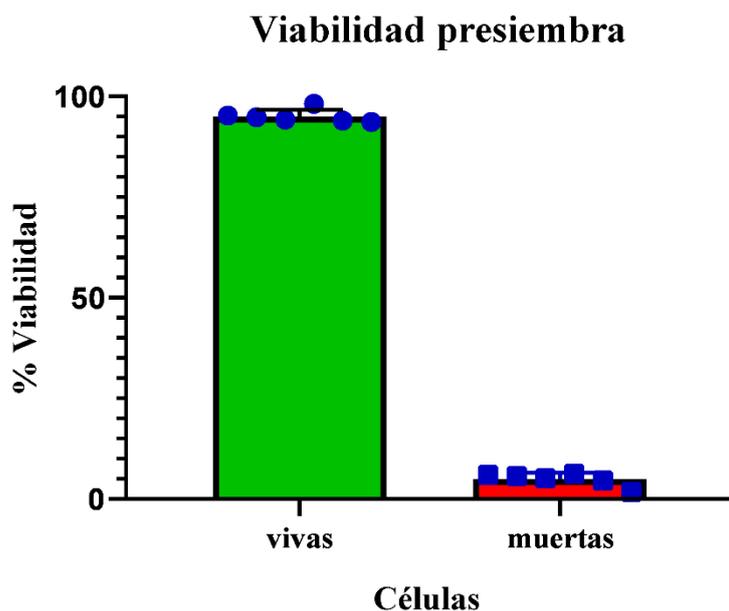


Figura 13. Viabilidad pre-siembra

4.3 Viabilidad celular

A los constructos evaluados se les realizó el ensayo de viabilidad celular con el KIT LIVE/DEAD a los 30 días, de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.4.2, el cual se basa en determinar el estado de la membrana plasmática de las células que se utilizaron, si está se mostró afectada, fluorescerá de rojo, debido a la interacción con el homodímero-1 de etidio (528) y si está intacta fluorescerá verde, ya que la calceína AM (494) detecta la actividad de la esterasa intracelular.⁸²

Las DPSC presentaron una morfología fibroblástica y una confluencia mayor al 90 %. Aunque diferentes autores han descrito que estas células tienen el potencial para diferenciarse en osteoblastos, condroblastos y células adiposas, además de que cuentan con la capacidad de autorrenovar su población por un tiempo relativamente largo.⁹³⁻⁹⁷

Para esta prueba se utilizaron tres constructos, de los cuales se consideraron 9 micrografías para obtener un porcentaje de viabilidad celular, teniendo como resultado un promedio de 99.46% ± 0.20%. (Fig. 14 y 17.) Martin Piedra y col,

evaluaron la viabilidad celular de las DPSC a las 48 h, y los resultados que obtuvieron demuestran un porcentaje mayor al 85%.^{79,98}

La diferencia encontrada entre estos trabajos puede deberse a que Martin Piedra y col, utilizaron un andamio de fibrina agarosa, en comparación con el presente trabajo, en el cual fue un andamio natural de intestino delgado, lo que demuestra que al ser un andamio natural proporciona un ambiente más favorable para que las células puedan proliferar mayormente.⁷⁹

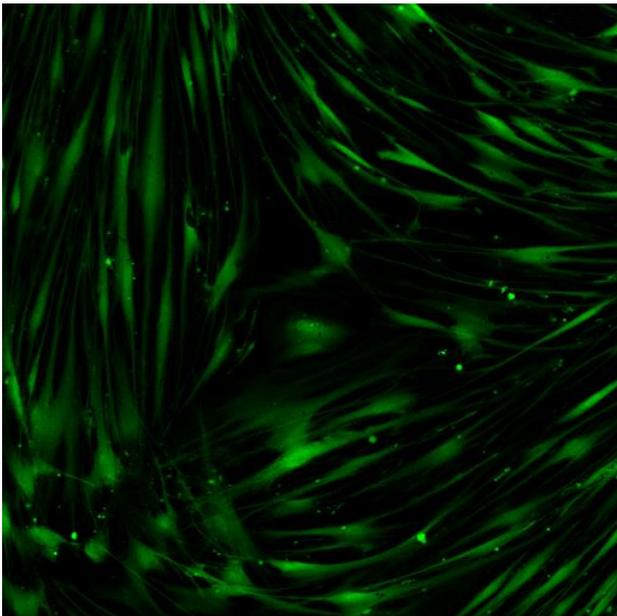


Figura 14. Constructo a los 30 días.

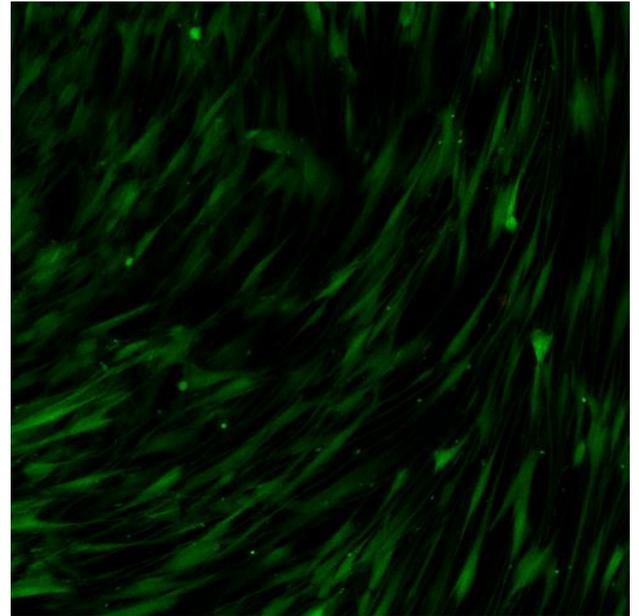


Figura 15. Control positivo a los 30 días

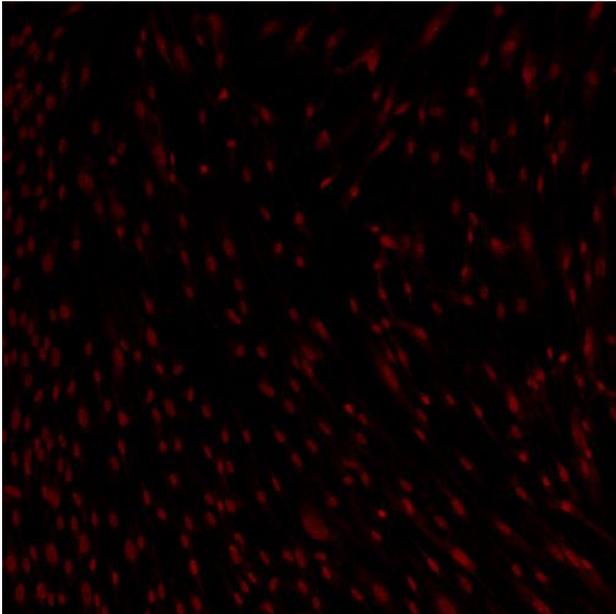


Figura 16. Constructo negativo a los 30 días.

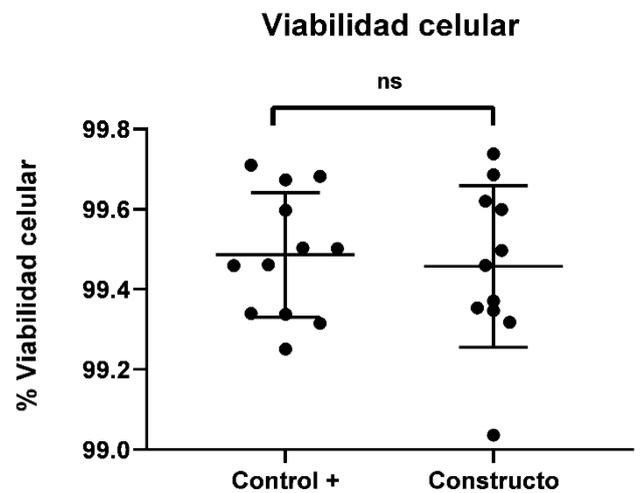


Figura 17. Porcentaje de viabilidad del control positivo y a los 30 días.

CONCLUSIONES

La posible aplicación de un órgano descelularizado como el intestino delgado ofrece una alternativa para el reemplazo del mismo. Los resultados de esta investigación demuestran que el protocolo de descelularización aplicado en el intestino es efectivo, debido a que se evaluó la caracterización histológica y la efectividad de este, obteniendo un porcentaje de descelularización del $94.97\% \pm 13.09$ en la tinción de H&E y un $96.17\% \pm 2.18$ en DAPI, además de que se conservaron los componentes de la matriz extracelular (MEC), lo cual se comprobó mediante las tinciones de PAS, Herovici y Tricrómico de Masson.

Además de que se obtuvo un porcentaje de viabilidad celular del $99.46\% \pm 0.20\%$, demostrando así que el protocolo de descelularización no afectó de manera significativa los componentes de la MEC, por lo cual este no fue citotóxico para las células, permitiendo así la adhesión a éste.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martén Marén, Deisy; Ramírez Arias MC. Malabsorción intestinal y malnutrición por defecto. *MEDISAN*. 2012;66(3):37-39.
2. Lal S, Allan P. Intestinal failure: A review. *F1000Research*. 2018;7:1-9. doi:10.12688/f1000research.12493.1
3. Palacios J del CA, Vivas LAA. *Técnicas Básicas En Cultivos Celulares*.; 2012. <http://books.google.com.py/books?id=4pBLLgEACAAJ>
4. Gigliola Alberti Reus D, alberti G, le roy catalina, et al. Actualización En El Manejo De Pacientes Con Insuficiencia Intestinal Advances in the Management of Children With Intestinal Failure. *Rev Chil Pediatría -Marzo -Abril*. 2014;85(2):148-156.
5. Salvo-Romero E, Alonso-Cotoner C, Pardo-Camacho C, Casado-Bedmar M, Vicario M. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev Esp Enfermedades Dig*. 2015;107(11):686-696.
6. Yamamoto-Furusho JK, Bosques-Padilla FJ, Charúa-Guindic L, cols. Epidemiología, carga de la enfermedad y tendencias de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en México. *Rev Gastroenterol México*. 2020;85(3):246-256. doi:10.1016/j.rgmx.2019.07.008
7. Rodríguez-Montes JA. Intestino corto: De la resección al trasplante. *Nutr Hosp*. 2014;30(5):961-968. doi:10.3305/nh.2014.30.5.8088
8. Daniel J, Ortiz M. Juan daniel muñoz ortiz. Published online 2018.
9. Srokowski EM, Woodhouse KA. *Decellularized Scaffolds*. Vol 2. Elsevier Ltd.; 2011. doi:10.1016/b978-0-08-055294-1.00078-7
10. D`Aleman C. Universidad Complutense de Madrid Un. *La teisis Dr en Teor y Empir*. Published online 2016:1-55.
11. GIRALDO D. Protocolo De Descelularización Cíclico De Tráquea Como Método De Obtención De Un Andamio Natural 3D Para Ingeniería De Órganos. Published online 2016.
12. Giraldo-Gomez DM, Leon-Mancilla B, Del Prado-Audelo ML, et al. Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization. *Mater Sci Eng C*. 2016;59:930-937.

doi:10.1016/j.msec.2015.10.094

13. Giraldo Gomez DM. Obtención de un andamio acelular para sustitución de tráquea. Published online 2011.
14. Ramírez Marín JY. Generación y caracterización de un andamio celular procedente de vía biliar extrahepática para fines de medicina regenerativa y trasplante. Published online 2019:34.
15. Montalvo-Javé E, Guzmán-Jiménez D, Martínez-Sosa I, Carrasco-Rojas J, Tapia-Jurado J, Toledo-Pereyra L. Estado actual del trasplante de intestino en adultos. *Cir Cir.* 2016;84(Supl.1):70-79.
16. R GA, O CLR, D CC. Actualización en el manejo de pacientes con insuficiencia intestinal. 2014;85(2):148-156.
17. Madrazo de la Garza JA. *Nutricion y Gastroenterologia Pediatrica.* Mc Graw Hill; 2013.
18. Ministerio de sanidad consumo y bienestar social. Registro Mundial de Trasplantes. Published online 2019.
19. Centro DEL, Trasplantes NDE. Boletín Estadístico Informativo -CENATRA (Centro Nacional de Trasplantes) Quinto Aniversario. 2020;(2):48.
20. Atala A. Ingeniería de tejidos. In: Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J, eds. *Harrison. Principios de Medicina Interna, 19e.* McGraw-Hill Education; 2019. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1137919967>
21. Tortora, Gerard J; Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología.* 11 a edici. Editorial Médica Panamericana.; 2011.
22. Ross. *Histología. Texto y Atlas Color Con Biología Celular y Molecular.* 7^a.; 2015.
23. JUNQUEIRA LCCJ. Histología básica. In: *Histología Básica.* 12a ED. Editorial Médica Panamericana.; 2015:280-310.
24. Nielsen Mark MS. *Atlas of Human Anatomy.* JOHN WILEY & SONS, INC; 2011.
25. Drake, Richard L; Vogl A. Wayne; Mitchell AWM. *Anatomía Para Estudiantes.* 2a edición. Elsevier; 2010.
26. Lozano Calderón EI, Garcia Compean D. ANATOMIA, FISILOGIA ,SEMILOGIA Y METODOS DE EXPLORACION DEL INTESTINO DELGADO. *Univ Hosp Auton Univ Nuevo Leon.* Published online 2016:6.

27. Martínez Fraga J. Anatomía y Fisiología. In: *Anatomía y Fisiología Humanas Básicas.* ; 2012.
28. Franquelo Morales P, Alramadan Alramadan M, Valero Serrano B, Achille R. Síndrome de Intestino Corto. 2011;4(2):166-169.
29. Fisiología AY, Aparato DEL. Anatomía y fisiología del aparato digestivo. *Soc catalan Dig.* 2017;3(4):4-4.
30. Herrería E. Intestino delgado y patologías asociadas a la malabsorción intestinal. *EUE Casa Salud Vald Univ Cantab.* 2013;1:8,17,10-5. <http://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/2198/HerreriaRomanE.pdf?sequence=1>
31. Ferrufino JC, Taxa L, Angeles G. Histología normal del intestino delgado. *Rev Medica Hered.* 2013;7(1):46-57. doi:10.20453/rmh.v7i1.507
32. Steinbrück I, Keuchel M, Hagenmüller F, von Herbay A. Normal Small Intestine BT - Video Capsule Endoscopy: A Reference Guide and Atlas. In: Keuchel M, Hagenmüller F, Tajiri H, eds. Springer Berlin Heidelberg; 2014:167-181. doi:10.1007/978-3-662-44062-9_19
33. Kierszenbaum, Abraham L; Tres LL. *Histología y Biología Celular. Introducción a La Anatomía Patológica.* 3a ed. Elsevier; 2012.
34. Semiología Y, Elvira I, Lozano C, Garcia-compean D. DELGADO. 2016;(September).
35. Moore, Keith L; Dailey, Arthur F; Agur AMR. *Anatomía Con Orientación Clínica.* 7a edición. Wolters Kluwer Health, S.A., Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
36. Dosh RH, Jordan-Mahy N, Sammon C, Le Maitre CL. Tissue Engineering Laboratory Models of the Small Intestine. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2018;24(2):98-111. doi:10.1089/ten.teb.2017.0276
37. Ferrer Bradley I, Hinojosa Del Val J. Definitions, clinical manifestations and diagnosis of Crohn's disease. *Medicine (Baltimore).* 2012;11(5):257-265. doi:10.1016/S0304-5412(12)70297-4
38. García-Sanjuán S, Lillo-Crespo M, Sanjuán-Quiles Á, Richart-Martínez M. Crohn's disease: The experience of living with a chronic illness. *Salud Publica Mex.* 2016;58(1):49-55. doi:10.21149/spm.v58i1.7667
39. P.Marteau, M.Allez RJ. Enfermedad de Crohn. *Rev clínica española.* 2013;17:71-81. doi:10.1157/13098296

40. Pilar M, Ferré B, Maia M, Miguel B, Pérez M. Enfermedad de Crohn. *Med Clin (Barc)*. 2018;151(1):26-33. doi:10.1016/j.medcli.2017.10.036
41. Camacho Mora JE. Síndrome De Intestino Corto En Pediatría. *Rev Médica Costa Rica Y Centroamérica*. 2014;LXXI(609):153-158. <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2014/rmc141z.pdf>
42. Moreira E, López P, Silva L, Olano E. Dependiendo de la nutrición parenteral para sobrevivir . Falla intestinal crónica por síndrome de intestino corto . Comunicación de un caso y revisión de la literatura. 2019;35(4):316-324. doi:10.29193/RMU.35.4.8
43. Velázquez Gutiérrez, Jesús; Vargas de Velázquez M. Síndrome De Intestino Corto. *Rev Latinoam Cirugía*. 2011;1:251-259.
44. Franquelo P, Alramadan M. U N P A C I E N T E C O N . . . Síndrome de Intestino Corto. 2011;4(2):166-169.
45. (NIBIB) NI of BI and B. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>
46. CANIFARMA. Ingeniería de tejidos. Published 2021. <https://dispositivosmedicos.org.mx/ingenieria-de-tejidos/>
47. Tursken K. *Cell Biology and Translational Medicine*. Vol 6. Springer; 2018. http://link.springer.com/10.1007/5584_2018_231
48. CADENA MORENO, MARGARITA MARÍA;RIVERA ARBELÁEZ JM. INDUCCIÓN DE LA RE-CELULARIZACIÓN CON TEJIDO ENDOTELIAL DE UN VASO SANGUÍNEO UTILIZANDO SU MATRIZ EXTRACELULAR COMO ANDAMIAJE, A PARTIR DE CELULAS ENDOTELIALES IN VITRO. *Univ AUTÓNOMA Occident*. 2014;3(2):1-46. <http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127>
49. Ochoa Serrato, Deyanira; Serrato Aguilar NAMA. Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. *Investig y Cienc la Univ Nac Autónoma Aguascalientes*. Published online 2015:61-69.
50. Cauich Rodríguez JV. BIOMATERIALES E INGENIERÍA DE TEJIDOS. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). <https://centrosconacyt.mx/objeto/biomateriales-e-ingenieria-de-tejidos/>
51. Vohr H-W, ed. Extracellular Matrix BT - Encyclopedia of

- Immunotoxicology. In: Springer Berlin Heidelberg; 2016:312. doi:10.1007/978-3-642-54596-2_200480
52. Thiriet M. *Extracellular Matrix. In: Cell and Tissue Organization in the Circulatory and Ventilatory Systems. Biomathematical and Biomechanical Modeling of the Circulatory and Ventilatory Systems.* Vol 1.; 2011. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9758-6_9
53. Manou, Dimitra;Caon, Ilaria ;Panagiotis, Bouris; Triantaphyllidou, Irene-Eva; Giaroni, Cristina; Passi, Alberto; Karamanos, Nikos K;Vigetti, Davide; Theocharis AD. *The Complex Interplay Between Extracellular Matrix and Cells in Tissues.* Humana Press, New York, NY; 2019. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9133-4_1
54. Bason, Caterina; Gallorini, Marialucia;Berardi AC. *Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Biomaterials.* Humana Press, Cham; 2018. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-77023-9_1
55. Cataldi, Amelia; Giacomo V di. *Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Biomaterials.* Humana Press, Cham; 2018. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-77023-9_4
56. Mooren FC, ed. Extracellular Matrix (ECM) BT - Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease. In: Springer Berlin Heidelberg; 2012:329-330. doi:10.1007/978-3-540-29807-6_2389
57. Díaz C, Muro AL, Yazmín F, Castillo R, Farías RO, Guerrero-barrera AL. Matriz extracelular : ¿ es el andamio de los tejidos ? Extracellular matrix : Is it the tissue scaffolding ? Published online 2012:53-60.
58. Naranjo TÁ, Noguera-Salvá R, Guerrero FF. La matriz extracelular: Morfología, función y biotensegridad (parte I). *Rev Esp Patol.* 2009;42(4):249-261. doi:10.1016/S1699-8855(09)70192-8
59. Schwab M, ed. Extracellular Matrix BT - Encyclopedic Reference of Cancer. In: Springer Berlin Heidelberg; 2001:318. doi:10.1007/3-540-30683-8_563
60. Domogatskaya, Anna; Rodin S. *Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Biomaterials.* Humana Press, Cham; 2018. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-77023-9_3
61. Fomby P, Cherlin AJ, Hadjizadeh A, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report. *Ann Am Thorac Soc.*

- 2010;12(3):181-204. doi:10.1002/term
62. Meezan E, Hjelle JT, Brendel K, Carlson EC. A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci.* 1975;17(11):1721-1732. doi:10.1016/0024-3205(75)90119-8
 63. TAYLOR, DORRIS A; OTT H. Descelularización y recelularización de órganos y tejidos. *REGENTS Univ MINNESOTA*. Published online 2015:1-9.
 64. García-Gurtubay García JI. Efectos del detergente no iónico tritón x-100 sobre las membranas mitocondriales. Published online 2015:288. <https://eprints.ucm.es/52231/1/5309852880.pdf>[https://www.dsflab.com.ar/albumina-bovina#targetText=La albúmina sérica bovina o,interferencia en las reacciones biológicas](https://www.dsflab.com.ar/albumina-bovina#targetText=La%20alb%C3%BAmina%20s%C3%A9rica%20bovina%20o%2Cinterferencia%20en%20las%20reacciones%20biol%C3%B3gicas).[https://www.dsflab.com.ar/albumina-bovina#targetText=La albúmina sérica bovina o,in](https://www.dsflab.com.ar/albumina-bovina#targetText=La%20alb%C3%BAmina%20s%C3%A9rica%20bovina%20o%2Cin)
 65. Tyr QC De, Tyr N De, Ile N De. Aplicación de enzimas en los detergentes. Published online 2015.
 66. Wüthrich T, Lese I, Haberthür D, et al. Development of vascularized nerve scaffold using perfusion-decellularization and recellularization. *Mater Sci Eng C.* 2020;117(December 2019):111311. doi:10.1016/j.msec.2020.111311
 67. Ciencias DEN, Polimericos M. Elaboración de injertos vasculares sintéticos y la determinación de sus propiedades mecánicas. Published online 2019.
 68. Quint C, Arief M, Muto A, Dardik A, Niklason LE. Allogeneic human tissue-engineered blood vessel. *J Vasc Surg.* 2012;55(3):790-798. doi:10.1016/j.jvs.2011.07.098
 69. Arenas Montalvo CE. Técnica Histologica. Published online 2010:1-12.
 70. Gorodner O. Histología: Métodos e Instrumentos de Estudio de la Histología. *Univ Nac del Nord Fac Med*. Published online 2013:1-13. https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/histologia_med_cat2/GUIA_1_2013.pdf
 71. Salazar L, Moreno F. Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar. *Pontif Univ JAVERIANA Cali.* 2016;2(2):12-23.

72. Fortoul T. *Histología y Biología Celular*. Vol 53. Mc Graw Hill; 2013.
73. Abanto Vargas AJ. DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD TINTORIAL DEL COLORANTE TRICRÓMICO DE MASSON EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO DE CEREBRO Y CEREBELO DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*). Published online 2014:48. http://190.116.36.86/bitstream/handle/UNC/445/T_L73_A116_2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y
74. Fortoul T. *Histología y Biología Celular*. 2a edición. Mc Graw Hill; 2013. https://www.academia.edu/39017432/Histologia_y_Biologia_Celular_Fortoul_2a_ed_booksmedicos
75. Curiel-Salgado MR. Fundamentos de una técnica policrómica : Tinción de Herovici. *Investig en Discapac*. 2012;1(1):35-36. <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdisc/ir-2012/ir121f.pdf>
76. Dehesa A, Gante D, Karina C, Villaseñor T. Estudio y detección de colágena de la matriz extracelular (MEC) mediante técnicas de tinción específicas. Published online 2008:100-104.
77. Coulter B. Colorante de viabilidad DAPI. Published 2020. <https://www.beckman.es/reagents/coulter-flow-cytometry/qc-and-support-reagents/viability-dyes/dapi>
78. Fisher TS. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Published 2021. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>
79. Martín-Piedra M, Garzón Bello I, Sánchez-Quevedo M, Alaminos Mingorance M. Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana. 2012;97:6-12.
80. López Álvarez EM. Métodos Para Determinar La Viabilidad Celular Con Aplicación En Odontología. Published online 2019:1-23. http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/handle/usmp/5143/lopez_aem.pdf;jsessionid=90F8BD06CCA0519038D6ACBFD839E90F?sequence=3
81. Procedures SO, Uaslp M. Cuadrícula Color Blue Black Área Volumen. Published online 2013.
82. Invitrogen Molecular Probes. LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells. *Prod Information, Cat number MP 03224*. Published

<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp03224.pdf>

83. Ramírez-Marín Y, Abad-Contreras DE, Ustarroz-Cano M, et al. Perfusion Decellularization of Extrahepatic Bile Duct Allows Tissue-Engineered Scaffold Generation by Preserving Matrix Architecture and Cytocompatibility. *Mater*. 2021;14(11). doi:10.3390/ma14113099
84. Giraldo-Gomez DM, García-López SJ, Tamay-de-Dios L, et al. Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering. *Mater Sci Eng C*. 2019;105:110142. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110142>
85. Villalba-Caloca J, Sotres-Vega A, Giraldo-Gómez DM, et al. In vivo performance of decellularized tracheal grafts in the reconstruction of long length tracheal defects: Experimental study. *Int J Artif Organs*. 2021;44(10):718-726. doi:10.1177/03913988211025991
86. Tecnicas E, La P. Norma oficial mexicana nom-062-zoo-1999, especificaciones tecnicas para la produccion, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Published online 2001.
87. De la Rosa-Ruiz MDP, Álvarez-Pérez MA, Cortés-Morales VA, et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Dental Tissues: A Comparative In Vitro Evaluation of Their Immunoregulatory Properties Against T cells. *Cells*. 2019;8(12):1-22. doi:10.3390/cells8121491
88. Maghsoudlou P, Totonelli G, Loukogeorgakis SP, Eaton S, De Coppi P. A decellularization methodology for the production of a natural acellular intestinal matrix. *J Vis Exp*. 2013;(80):1-6. doi:10.3791/50658
89. Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, et al. Evaluation of Small Intestine Grafts Decellularization Methods for Corneal Tissue Engineering. *PLoS One*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066538
90. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater*. 2014;10(12):5043-5054. doi:10.1016/j.actbio.2014.08.024
91. Cervante I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS TEGUMENTARIOS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURALES DE *Cassiopea xamachana*. *Cent Investig Científica Yucatán AC*. Published

- online 2018.
92. Xiang J, Zheng X, Liu P, et al. Decellularized spleen matrix for reengineering functional hepatic-like tissue based on bone marrow mesenchymal stem cells. *Organogenesis*. 2016;12(3):128-142. doi:10.1080/15476278.2016.1185584
 93. Lesiones PDE, Cavidades NO, El D. Acta Odont. Venez. Vol 53 N° 1 AÑO 2015 TRABAJO ORIGINAL PREVALENCIA DE LESIONES NO CAVITADAS DURANTE EL TRATAMIENTO DE ORTODONCIA CON APARATOLOGÍA FIJA. 2015;53.
 94. Karaöz E, Demircan PC, Sağlam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*. 2011;136(4):455-473. doi:10.1007/s00418-011-0858-3
 95. Brizuela C. C, Galleguillos G. S, Carrión A. F, Cabrera P. C, Luz C. P, Inostroza S. C. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and follicle. *Int J Morphol*. 2013;31(2):739-746. doi:10.4067/S0717-95022013000200063
 96. García-Torres VLS, Flores-Hernández FY, Santibáñez-Escobar LP. Células madre de la pulpa dental (DPSC): prospectivas terapéuticas en enfermedades crónico degenerativas. *Salud Jalisco*. 2017;(3):168-177.
 97. Romero S, Córdoba K, Martínez Valbuena CA, Gutiérrez Quintero JG, Durán Riveros JY, Munévar Niño JC. Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología. *Rev Odontológica Mex*. 2014;18(3):156-163. doi:10.1016/s1870-199x(14)72065-8
 98. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, et al. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: An accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 2013;15(4):507-518. doi:10.1016/j.jcyt.2012.11.017