



## **El Colegio de Chihuahua**

Preparación de una matriz biológica con métodos de  
ingeniería tisular utilizando tráquea de cerdo

Tesis presentada por

**Elisa Barrera Ramírez**

para obtener el grado de

**DOCTOR EN INVESTIGACIÓN**

Ciudad Juárez, Chihuahua, Noviembre, 2017



## **El Colegio de Chihuahua**

Preparación de una matriz biológica con métodos de ingeniería tisular utilizando tráquea de cerdo

Tesis presentada por

**Elisa Barrera Ramírez**

para cumplir con los requisitos parciales para obtener el grado de

**DOCTOR EN INVESTIGACIÓN**

Director de Tesis

Dra. Edna Rico Escobar

Comité de Tesis

Dr. Alejandro Martínez Martínez

Dr. Luis Fernando Plenge Tellechea

Ciudad Juárez, Chihuahua, Noviembre, 2017

**Se autoriza el uso del contenido de esta tesis, siempre y cuando sea sin fines de lucro o para usos estrictamente académicos, citando invariablemente la fuente sin alteración del contenido y dando los créditos autorales.**

Se recomienda citar esta tesis de la siguiente manera:

Barrera Ramírez E. (2017). Preparación de una matriz biológica con métodos de ingeniería tisular utilizando tráquea de cerdo (Tesis doctoral). Recuperada de <http://www.colech.edu.mx/cont/tesis/.pdf>



## **El Colegio de Chihuahua**

Sínodo de tesis

Presidente

Dr. Alejandro Martínez Martínez

Secretario

Dr. Luis Fernando Plenge Tellechea

Vocal

Dra. Edna Rico Escobar

Vocal

Dr. Joaquín Rodrigo García

Vocal

Dra. Marbella Chávez Solano

## **Dedicatoria**

A mi Dios

Mi esposo y mis hijas

## **Agradecimientos**

Esta tesis doctoral es el resultado de un trabajo arduo y lleno de dificultades, pero también repleto de satisfacciones y no solo mías, sino de toda la gente que me acompañó en este proceso y a las cuales tengo que agradecer por tal esfuerzo. Sin la ayuda de mi Dios, la motivación, paciencia y amor de mi esposo, Rubén y mis hijas Elisa y Eugenia no habría logrado este proyecto. Mi abuela, padres, hermanos, cuñados y yerno, han sido una parte muy importante de mi vida, estabilidad y crecimiento, gracias por su apoyo.

Debo agradecer a mi directora de tesis la Dra. Edna Rico Escobar su esfuerzo para que este proyecto se llevara a cabo y pudiera concluirse, gracias por sus aportaciones, comprensión y amistad.

De manera especial debo agradecer a quienes me han acompañado desde la maestría como asesores, pero más como amigos, por su apoyo incondicional y confianza, al Dr. Alejandro Martínez Martínez y Luis Fernando Plenge Tellechea quienes, con todo su equipo de trabajo y laboratorio, permitieron la realización de estos experimentos. Gracias por el apoyo de sus estudiantes de maestría como la Maestra Mariana Grigoruta. Debo agradecer al Dr. Alfredo Hernández, médico veterinario y responsable de la unidad de Cirugía Experimental de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, y a todo su equipo por su disposición y gran trabajo en el manejo y cuidado de los animales de experimentación durante su desarrollo. Quiero reconocer la amistad y gran compañerismo del Dr. Genaro Tamayo aportando su experiencia quirúrgica en ese experimentar en los procesos de regeneración, en los cuales también participó el estudiante médico Rubén Rincón trabajando siempre con gusto y gran empeño. Al Colegio de Chihuahua por la oportunidad para el desarrollo de un proyecto como este, por abrir este espacio para aportar conocimiento desde esta ciudad tan compleja y en uno de los momentos más difíciles de su historia. Y como institución, a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, por su acogida como maestro e investigador. Por último a la Fundación Garrido, por su financiamiento desde el principio hasta la conclusión del proyecto.

## **Resumen**

La ingeniería tisular ha hecho posible la regeneración de órganos para mejorar o sustituir funciones biológicas con ausencia de respuesta inmunológica al utilizar matrices y células autólogas. El objetivo del proyecto es obtener matrices biológicas por ingeniería tisular utilizando tráqueas de cerdos. Se desarrollaron dos métodos para la descelularización de las tráqueas, las que se esterilizaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el proceso de regeneración. Se descongelaron tomando muestras para su análisis antes de ser implantadas en el epiplón de la cavidad abdominal de cuatro cerdos Yorkshire. Cada animal recibió diferente matriz; tráquea descelularizada con Tritón X100 (DT), tráquea descelularizada con desoxicolato (DD), tráquea nativa criopreservada (NC), tráquea descelularizada con desoxicolato y reforzada con polímero y células epiteliales (DDR). Después de 15 y 8 días se obtuvo el tejido para su evaluación mecánica e histológica. Las matrices mostraron diferentes características macroscópicas en relación al control, en la evaluación mecánica no hubo diferencias significativas. Los tejidos regenerados presentaron evidencias de revascularización, neoformación y alteraciones mecánicas. Todos los animales sobrevivieron al experimento sin datos de inflamación, infección o deterioro de la salud. Como conclusión, se obtuvieron matrices por medio de métodos para la descelularización con características mecánicas similares al control. La regeneración del tejido utilizando el epiplón abdominal del cerdo es una opción, ya que mantiene la esterilidad, interacción celular y provee nutrientes y factores de crecimiento; es sencillo, factible y económico. Las alteraciones mecánicas del tejido regenerado se deben a un tratamiento drástico en la descelularización, criopreservación o a la falta de fuerzas de cizallamiento en el epiplón. El reforzamiento con un polímero para corregir estas alteraciones no tuvo éxito ya que impidió la neoformación y revascularización generando un proceso inflamatorio potente, la aplicación de células epiteliales tenía el objetivo de mejorar la reepitelialización que por lo anterior, no se logró.

***Palabras clave:*** Matrices biológicas, ingeniería tisular, injerto, tráquea

## **Abstract**

Tissue engineering has made possible organ regeneration for the improvement or substitution of biological functions without immunological response by using matrices and autologous cells. The objective of the project is to obtain biological matrices through tissue engineering using tracheas of pigs. Two methods were developed for the decellularization of tracheas, which were sterilized and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the regeneration process. They were unfrozen and samples were taken for their analysis before being implanted in the omentum of the abdominal cavity of three Yorkshire pigs. Each animal received a different matrix; decellularized trachea with Triton X100 (DT), decellularized trachea with deoxycholate (DD), native cryopreserved trachea (NC), decellularized trachea with deoxycholate and reinforced with polymer and epithelial cells (DDR). Tissue was obtained after 15 and 8 days for histological and mechanical evaluation. The matrices showed different macroscopic characteristics compared to the control, no significant differences were found in the mechanical evaluation. The regenerated tissues presented evidence of revascularization, neoformation and mechanical alterations. All the animals survived the experiment without symptoms of inflammation, infection or health deterioration. In conclusion, matrices were obtained by means of decellularization methods with similar mechanical characteristics to the control. The tissue regeneration using the abdominal omentum of the pig is an option, since it maintains sterility, cellular interaction and provides nutrients and growth factors; it is simple, feasible and economical. The mechanical alterations of the regenerated tissue are due to a drastic treatment during the decellularization, cryopreservation or the lack of shearing forces in the omentum. The reinforcement of the matrix with a polymer, intended to correct these alterations, was not successful because it prevented neoformation and revascularization, generating a powerful inflammatory process. The improvement of reepithelialization through the application of epithelial cells was not achieved due to the circumstances previously stated.

**Key words:** *biological matrixes, tissue engineering, graft, trachea*



## Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco Teórico .....</b>	<b>3</b>
2.1 Ingeniería tisular .....	3
2.2 Características del tejido traqueal .....	4
2.3 Injertos traqueales .....	11
2.3.1 Características del injerto traqueal ideal .....	15
2.4 Tipos de injertos.....	16
2.5 Injerto traqueal generado por ingeniería tisular .....	18
2.6 Matrices .....	18
2.6.1 Matriz extracelular nativa .....	18
2.6.2 Matrices sintéticas.....	20
2.6.3 Matrices biológicas .....	22
2.6.3.1 Matrices biológicas alogénicas .....	23
2.6.3.2 Matrices biológicas xenogénicas .....	25
2.6.4 Matrices híbridas.....	25
2.7 Métodos de esterilización .....	26
2.8 Almacenamiento de las matrices .....	30
2.9 Mecanismo de Regeneración .....	31
2.9.1 Células utilizadas en el proceso de regeneración.....	32
2.9.1.1 Células madre .....	32
2.9.1.2 Condrocitos .....	33

2.9.1.3 Células epiteliales traqueales .....	33
2.9.2 Biorreactor .....	34
2.9.2.1 Biorreactor mecánico .....	35
2.9.2.2 Biorreactor natural .....	35
<b>3. Metodología .....</b>	<b>36</b>
3.1 Diseño de la investigación .....	36
3.2 Descripción de los procedimientos .....	37
3.3 Justificación del diseño del estudio y métodos .....	37
3.4 Obtención de las matrices .....	38
3.4.1 Descelularización del tejido tráqueal .....	38
3.5 Esterilización .....	39
3.6 Almacenamiento .....	40
3.7 Aplicación del polímero en la matriz.....	40
3.8 Obtención e implantación de células epiteliales de la mucosa nasal .....	40
3.9 Regeneración del tejido utilizando al cerdo como biorreactor .....	41
3.9.1 Selección de animales de experimentación .....	42
3.9.2 Preparación de las matrices.....	43
3.9.3 Implantación en el epiplón abdominal.....	43
3.9.4 Obtención de las matrices del epiplón abdominal .....	44
3.10 Análisis de las características físicas del tejido .....	44
3.10.1 Evaluación mecánica .....	44
3.10.2 Análisis histológico macroscópico .....	45
3.10.3 Análisis histológico microscópico .....	46

3.11 Análisis casuístico.....	46
<b>4. Resultados.....</b>	<b>46</b>
4.1 Descripción de los procedimientos de recolección y análisis de datos.....	46
4.2 Matrices traqueales .....	47
4.2.1 Evaluación mecánica de las matrices.....	47
4.2.2 Evaluación histológica macroscópica de las matrices .....	50
4.2.3 Evaluación histológica microscópica de las matrices.....	51
4.3 Evaluación <i>in vivo</i> .....	53
4.4 Matrices traqueales regeneradas .....	53
4.4.1 Evaluación mecánica de las matrices regeneradas .....	53
4.4.2 Evaluación histológica macroscópica de las matrices regeneradas .....	57
4.4.3 Evaluación histológica microscópica de las matrices regeneradas.....	58
4.5 Evaluación mecánica comparativa de las matrices y el tejido regenerado .....	59
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>67</b>
5.1 Métodos para la descelerización y obtención de las matrices .....	67
5.2 Los cerdos como biorreactores .....	68
5.3 Regeneración de las matrices.....	68
5.4 Consideraciones finales .....	71
<b>6. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>73</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>93</b>
Anexo I. Modelo de evaluación de las características mecánicas del tejido .....	93

Anexo II. Modelo de evaluación de las características microscópicas del tejido traqueal .....	94
Anexo III. Ponencias.....	94
Anexo IV. Artículos Publicados .....	96

## **Índice**

### **Tablas, figuras y gráficas**

#### **Tablas**

Tabla 1. Animales de experimentación- Biorreactores naturales .....	42
Tabla 2. Modelo de evaluación de la rigidez del tejido traqueal .....	45
Tabla 3. Modelo de evaluación de la flexibilidad del tejido traqueal.....	45
Tabla 4. Modelo de evaluación de la conformación del tejido traqueal .....	45
Tabla 5. Evaluación de las propiedades mecánicas de las matrices .....	47
Tabla 6. Evaluación de las características histológicas microscópicas de las matrices.....	51
Tabla 7. Evaluación de las propiedades mecánicas de las matrices regeneradas .....	54
Tabla 8. Evaluación de las características microscópicas de las matrices regeneradas.....	58
Tabla 9. Evaluación mecánica comparativa de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control .....	63

## Figuras

Figura 1. Características histológicas del epitelio y submucosa de la tráquea porcina .....	6
Figura 2. Características histológicas de la tráquea porcina .....	7
Figura 3. Características histológicas macroscópicas de las matrices .....	51
Figura 4. Características histológicas microscópicas de las matrices.....	52
Figura 5. Animales utilizados como biorreactores naturales .....	53
Figura 6. Características histológicas macroscópicas de las matrices regeneradas .....	57
Figura 7. Evaluación de las características histológicas microscópicas de las matrices regeneradas .....	59
Figura 8. Características macroscópicas de la matriz descelularizada con tritón y regenerada en el biorreactor natural .....	65
Figura 9. Características macroscópicas de la matriz descelularizada con desoxicolato con ocho ciclos y regenerada en el biorreactor natural .....	65
Figura 10. Características macroscópicas de la matriz descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos reforzada con polímero y regenerada en el biorreactor natural .....	66
Figura 11. Características macroscópicas de la tráquea nativa criopreservada y regenerada en el biorreactor natural .....	66

## **Gráficas**

Gráfica 1. Propiedades mecánicas de las matrices .....	49
Gráfica 2. Propiedades mecánicas de las matrices regeneradas .....	56
Gráfica 3. Evaluación mecánica de rigidez de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control .....	60
Gráfica 4. Evaluación mecánica de flexión de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control .....	61
Gráfica 5. Evaluación mecánica de conformación de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control .....	62
Gráfica 6. Características mecánicas de rigidez, flexibilidad y conformación de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control .....	64

## **1. Introducción**

La ingeniería tisular ofrece por medio de nuevas tecnologías la generación de órganos y tejidos funcionales como injertos para trasplante y mejorar o sustituir funciones biológicas con ausencia de respuesta inmunológica al utilizar células autólogas. El tratamiento de padecimientos estructurales traqueales extensos consiste en la sustitución del segmento afectado, sin embargo el trasplante alogénico ha fracasado debido a la poca disponibilidad del órgano en tiempo y condiciones adecuadas así como a la histocompatibilidad. Otros tratamientos como el uso de materiales sintéticos no han tenido buenos resultados (Grillo HC, 2004; Olmos-Zuñiga JR, 2006; Birchall M, 2008). Se han desarrollado novedosas metodologías de ingeniería tisular para ofrecer un injerto traqueal al obtener un soporte o matriz que funcione como andamiaje para sembrar células autólogas generando un reemplazo de tejido traqueal adecuado para su implante (Jungebluth P, 2012; Baiguera S, 2011; Svenja H, 2013; Elliot MJ, 2012).

El objetivo de este proyecto como estudio piloto es obtener matrices biológicas traqueales por métodos de ingeniería tisular para su posterior regeneración con la posibilidad de ser utilizadas como injertos en cerdos.

El cual consiste en obtener tejido traqueal de un donador, descelularizarlo y contar con una matriz biológica que funcione como soporte para las células del receptor y lograr su regeneración como la reepitelialización y revascularización del tejido (Zheng H, 2014; Martinod E, 2013).

El injerto ideal de tráquea debe contar con las características mecánicas como rigidez, flexibilidad e integridad para que no colapse durante la inspiración (Neville WE, 1990). No

debe ser inmunogénico para evitar el rechazo, no tóxico, y debe contar con vasculatura y epitelio cilíndrico ciliado que lo haga resistente a la colonización bacteriana y garantice su permanencia. Para que la matriz sea adecuada y funcione como soporte para las células del receptor debe permitir la adhesión celular, su crecimiento y diferenciación (Demirbag B, 2011; Conconi MT, 2005; Jungebluth P, 2009). Un factor importante en la regeneración del tejido es el biorreactor como dispositivo de cultivo para contener la matriz, células y moléculas necesarias para permitir su interacción en las condiciones ideales, debe ser dinámico, controlable y reproducible. Es esencial para la distribución de las células, el suministro de nutrientes y eliminación de desechos apoyando la actividad metabólica y la diferenciación. También provee de fuerzas hidrodinámicas para promover el desarrollo del tejido, la angiogénesis y la función ciliar, sin olvidar la esterilidad (Badylak SF, 2012; Baiguera S, 2010).

El desarrollo y aplicación de la tecnología en ingeniería tisular ha de permitir la generación de injertos como terapia alternativa en trasplantes tratando de solucionar la disponibilidad de órganos, al obtener reemplazos de tejidos con ausencia de antigenicidad, en un tiempo adecuado disminuyendo las complicaciones post-trasplante (Bagueira et al., 2012).



## **2. Marco Teórico**

### **2.1 Ingeniería tisular**

La pérdida parcial o total de tejidos u órganos es un problema grave de salud, el trasplante es una opción en estos casos, sin embargo, la baja disponibilidad de órganos y el rechazo por la falta de histocompatibilidad limitan su utilización. Esta necesidad llevó a la creación de la ingeniería tisular como un nuevo campo interdisciplinario con amplia experiencia en biología celular, molecular, bioquímica y biomateriales con apoyo de la cirugía. Utiliza la combinación de andamios matrices o soportes, células autólogas y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. Su finalidad es generar sustitutos para su implante y restaurar, mantener o mejorar la función y/o estructura de tejidos y órganos (hueso, cartílago, válvula cardiaca, vejiga, páncreas, hígado etc.). Esta estrategia busca resolver la falta de disponibilidad de injertos y los efectos adversos de la terapia inmunosupresora.

Los fundamentos básicos que sustentan la ingeniería tisular para desarrollar los reemplazos de tejidos, consisten en evitar la respuesta inmunológica (rechazo, inflamación), utilizando un sustrato biocompatible como los componentes de la matriz extracelular, que permitan la supervivencia, desarrollo, diferenciación y proliferación de células autólogas y proveer un microambiente controlado y con señales autocrinas, paracrinas y endocrinas. Así como de señales de posición, interacciones célula-matriz, fuerzas mecánicas y los contactos célula-célula para mediar la formación de la arquitectura que permita mantener la función del tejido neoformado (Falke, 2000).

## **2.2 Características del tejido traqueal**

La tráquea forma parte del aparato respiratorio, este tiene la función de conducir el aire desde las fosas nasales, nasofaringe, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos hacia los pulmones para llevar a cabo el intercambio gaseoso (hematosis) en los alvéolos. Las estructuras conductoras acondicionan el aire durante el mecanismo de la inspiración, filtrándolo y modificando su temperatura y humedad para que llegue en las condiciones ideales hasta los alvéolos. Se mantiene libre de cuerpos extraños por medio del mecanismo de la tos, el arrastre mecánico y la respuesta inmune por medio de la producción de IgA. El aire puede penetrar gracias a los músculos respiratorios (intercostales, diafragma) que en forma rítmica como inspiración y espiración aumentan y disminuyen la cavidad torácica. La pleura forma una cavidad que contribuye en este proceso debido a que se opone a la retracción del tejido pulmonar con presión negativa. Además se cumplen en este aparato otras funciones como el olfato en las fosas nasales, la fonación por las cuerdas vocales a nivel de la laringe y el control de la presión arterial produciendo enzima convertidora de angiotensina (Bakhle YS, 1990; Marschall RP, 2003; Maron BA, Leopold J, 2014).

La tráquea es un conducto membranoso cartilaginoso indispensable para la ventilación ya que conecta la laringe con los bronquios permitiendo la salida y entrada de aire hasta el pulmón. Inicia por debajo del cartílago cricoides a nivel de la sexta vértebra cervical hasta llegar a los bronquios principales donde se bifurca (carina) en el mediastino a nivel de la quinta vertebra torácica. Tiene una longitud aproximada de 12 cm, con un diámetro de 2.5 cm. Situada en la línea media del cuello y dentro del tórax (tráquea cervical y torácica) desviada ligeramente a la derecha por el cayado aórtico (Minnich DJ, 2007).

Es aplanada en la parte posterior y cilíndrica en la anterior, de paredes finas y flexibles con 15 a 20 anillos de cartílago incompleto en forma de C uniéndose en la parte posterior por tejidos fibroso y muscular, característica que impide su colapso durante la inspiración (Svenja H, 2013; Yang, 2003). La contracción de los músculos que se insertan en los extremos de los cartílagos permiten que se estreche el lumen del conducto, mecanismo que acelera la velocidad del flujo respiratorio.

Histológicamente su luz está revestida por una mucosa de epitelio respiratorio cilíndrico ciliado pseudoestratificado, secretor y de absorción, de 30  $\mu\text{m}$  de espesor que permite la depuración de moco y arrastre de secreciones, que regula los fluidos y el transporte de iones (Lopez-Vidriero et al., 1989). Las células que componen la mucosa son cilíndricas ciliadas, en un 30%, prismáticas altas con 100 a 200 cilios móviles apicales (de 5-7  $\mu\text{m}$ ) y con movimientos hacia la nasofaringe desplazando el moco superficial (Weinberger SE et al., 2004). Las células basales que no alcanzan la luz, que constituyen el 30%, son pequeñas redondeadas y precursoras del resto (Remlinger., 2010). Las células neuroendocrinas basales producen hormonas y catecolaminas, y se encuentran innervadas funcionando como quimiorreceptores sensibles al oxígeno. Las calciformes que representan el 30% tienen forma de copa y producen proteínas y glucosaminoglucanos sulfatados (moco). Las células en cepillo por sus microvellosidades (tipo I y II) son el resto de las células cilíndricas y se consideran sensoriales (I) o reserva de las ciliadas y calciformes (II). Existen células M epiteliales especializadas como presentadoras de antígenos con invaginaciones basales que contienen linfocitos. Este epitelio se apoya en una membrana basal de tejido conectivo laxo rico en fibras elásticas, tejido linfóide y glándulas seromucosas. Le sigue una submucosa

de tejido conjuntivo denso rico en elastina, sin límites definidos con presencia de glándulas serosas, mucosas, ases musculares, vasos sanguíneos y linfáticos terminando en el pericondrio que la une con el cartílago hialino (Figura 1).

**Figura 1. Características histológicas del epitelio y submucosa de la tráquea porcina**

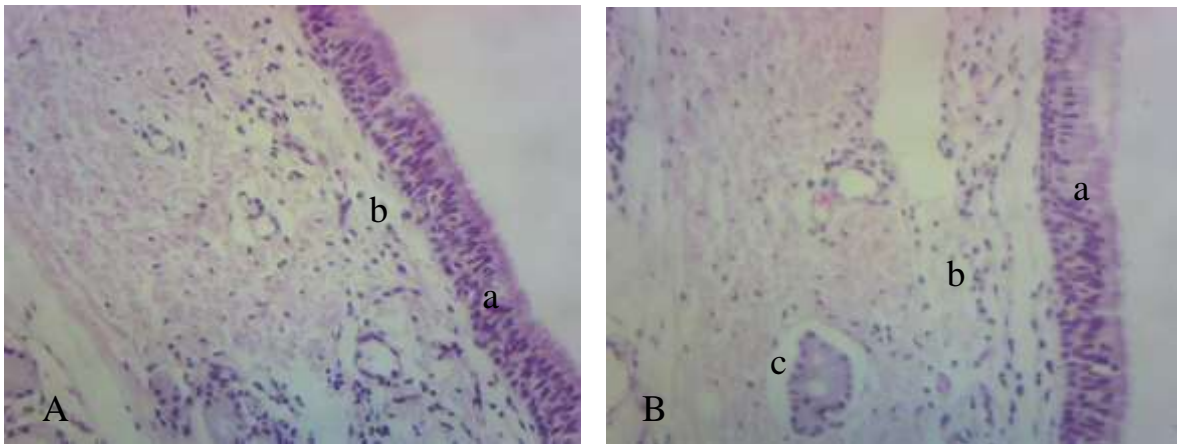


Figura 1. Fotografías de cortes histológicos de tráquea porcina (10x). En la imagen (A) se observa el epitelio respiratorio (a) que se apoya en la membrana basal (b). En la imagen (B) se observa el epitelio (a) la submucosa (b) con glándulas seromucosas (c).

El cartílago hialino es avascular integrado por condrocitos. Estos ocupan una cavidad llamada laguna entre el material extracelular de proteoglicanos, glicoproteínas estructurales y una red de tejido conjuntivo de colágena tipo II.

La nutrición ocurre por difusión de nutrientes desde el pericondrio principalmente y crece desde aquí donde los pericondrocitos se diferencian en condrocitos que migran al cartílago y se multiplican. Los condrocitos tienen un metabolismo muy bajo y si mueren es difícil su restitución desde el pericondrio para regenerar el cartílago, la reparación es a través de tejido fibroso (Figura 2).

## Figura 2. Características histológicas de la tráquea porcina

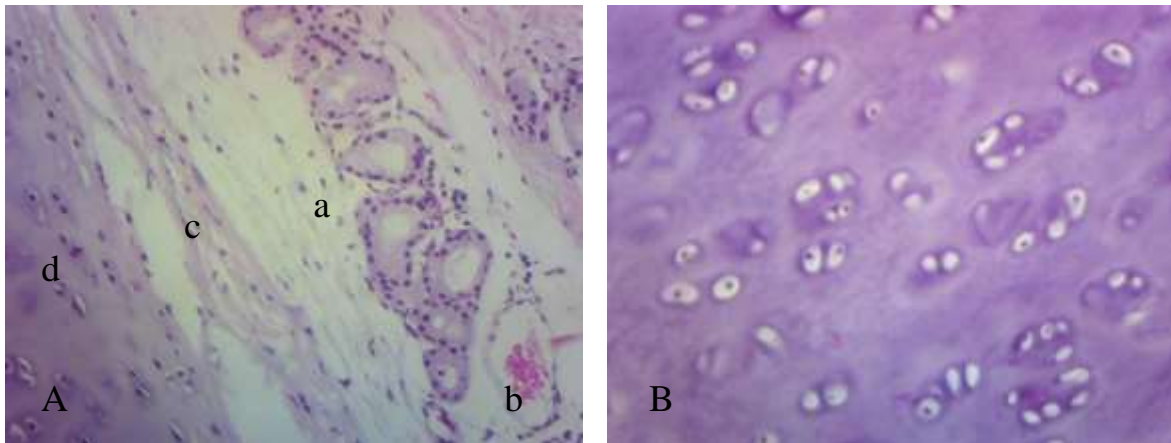


Figura 2. Fotografías de cortes histológicos de tráquea porcina (40x). En la imagen (A) se observa la submucosa con glándulas seromucosas (a), un vaso sanguíneo (b) y el pericondrio (c) que une el cartílago hialino (d). En la imagen (B) se observa el cartílago hialino con múltiples condrocitos.

El cartílago está unido posteriormente por una membrana fibroelástica y músculo con glándulas seromucosas. También se presentan fascículos longitudinales de músculo en la porción más externa que es la adventicia de tejido conectivo laxo y que fija la tráquea a las estructuras adyacentes mediastinales y contiene la irrigación e inervación del tejido. Su irrigación la realizan ramas de las arterias carótida y broncoesofágicas derecha e izquierda. El suministro sanguíneo es intrincado y la devascularización es fácil (Salassa JR, 1977).

El drenaje venoso es por las venas yugulares interna y externa y la vena ácigos izquierda. Los vasos linfáticos drenan hacia los nódulos linfáticos cervicales profundos, mediastínicos y traqueobronquiales. Su inervación simpática es por el ganglio cervical medio y tronco simpático, la inervación parasimpática proviene de los nervios laríngeo recurrente y vago.

La ontogenia de la tráquea comienza en la cuarta semana de gestación al día 28, con la aparición del primordio respiratorio como una evaginación medial (divertículo respiratorio) del extremo caudal de la pared ventral de la faringe primitiva (intestino anterior), llamada hendidura laringotraqueal. Este primordio del árbol traquebronquial se desarrolla caudal al cuarto par de las bolsas faríngeas. El endodermo que reviste la hendidura laringotraqueal da lugar al epitelio especializado respiratorio, glándulas de la laringe, tráquea, bronquios y epitelio pulmonar, determinado por el factor de transcripción TBX4, que se expresa en el endodermo. El tejido conjuntivo, el cartílago y el músculo liso se desarrollan a partir del mesodermo esplancnico que rodea al intestino anterior.

A la quinta semana se presenta la bifurcación traqueal, a la décima semana el mesoblasto se condensa alrededor del divertículo laringotraqueal primitivo, formando los anillos cartilaginosos incompletos alrededor del músculo traqueal.

Al inicio el esbozo pulmonar comunica ampliamente con el intestino anterior pero al extenderse el divertículo respiratorio en forma caudal se produce una separación por los denominados rebordes traqueoesofágicos.

La inmunidad en vías respiratorias incluye una gama amplia de mecanismos que tienen la finalidad de eliminar partículas y microorganismos inhalados así como mantener el pulmón en condiciones estériles ya que el sistema respiratorio se expone a 10,000 litros de aire diariamente. Esta defensa inicia desde la nariz pasando por laringe, tráquea, bronquios, y pulmón. Durante su recorrido el aire inspirado contiene partículas y microorganismos, que tienen que ser expulsados por la tos o el movimiento del moco. La tos es la expulsión rápida y brusca de aire durante la espiración para eliminar el exceso de moco o partículas extrañas, por la irritación de las terminaciones nerviosas hasta el tronco cerebral y como

respuesta los impulsos nerviosos llegan al diafragma, músculos intercostales y laringe para producir la fuerza explosiva respiratoria. La secreción mucosa es expulsada gracias al movimiento de batido de los cilios del epitelio, las propiedades de las secreciones son cruciales para cumplir con esta función, además contiene péptidos antimicrobianos como mucinas, lisozima, lactoferrina, peroxidasas, colectinas y anticuerpos IgA. La barrera nasofaríngea retiene partículas mayores de 2-3 micromicras ( $\mu\text{m}$ ) atrapándolas en el moco que es deglutido. El epitelio es una barrera mecánica gracias a las uniones intercelulares y mantiene el gradiente iónico secretando diferentes sustancias, además responden frente a patógenos con la producción de eicosanoides, citocinas y factores de crecimiento participando en los procesos inflamatorios, en la tráquea estos mecanismos son especialmente importantes (García-Araque HF, 2015).

Si estas barreras físicas y químicas son superadas se puede desencadenar una respuesta innata o adaptativa mediada por el tejido linfoide asociado a la mucosa (TLAM) de la vía respiratoria. Como parte de la inmunidad innata se encuentran los macrófagos (residentes o circulantes) en los tejidos como las mucosas y son capaces de fagocitar partículas gracias a sus receptores like Toll (TLR) de los cuales se han identificado 11, para patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o a sus receptores para proteínas opsonizantes como la proteína C reactiva (PCR) o complemento que lleva a su activación y producción de citocinas y quimiocinas (TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IL8) con efectos locales como la activación del endotelio de las vénulas con expresión de selectinas e integrinas convirtiéndose en un endotelio alto (HEV) para el rodamiento, pavimentación y paso de los leucocitos requeridos al tejido. Los efectos sistémicos pueden ser el aumento en la producción de proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, fibrinógeno etc.) por el hígado o aumento de la

temperatura por actuar en sistema nerviosos central. Los fagocitos producen componentes del complemento para amplificar la respuesta y también participan en la remodelación y reparación del tejido con la producción de metaloproteasas, colagenasas, metaloelastasas, y sus inhibidores. Como parte de la inmunidad innata se encuentran las células NK (CD16, CD56) y son capaces de reconocer células que no expresan moléculas MHCI por estar infectadas por patógenos intracelulares o se han transformado en cancerosas, desencadenado la citotoxicidad, los principales factores involucrados en su reclutamiento en el sistema respiratorio son las quimiocinas CC (MCP1-5, MIP-1<sup>a</sup>,b, RANTES) y las quimiocinas CXXXC.

Si esta respuesta es superada entra en acción la inmunidad adaptativa o de memoria, dependiente de LTH y LB estos tiene la capacidad de reconocer específicamente al antígeno. Los linfocitos TH necesitan reconocer forzosamente al antígeno (proteínas) en una célula presentadora (APC) a diferencia de los LB que poseen receptores de superficie (anticuerpos o inmunoglobulinas) específicos para antígenos solubles de cualquier característica química. Ambos se activan, proliferan y se diferencian (selección clonal) dando lugar a linfocitos de memoria y efectores. En caso de los LB sus células efectoras son las plasmáticas productoras de anticuerpos IgM como respuesta primaria e IgG, IgA, IgE como anticuerpos de memoria producidos al segundo contacto con el antígeno. Las células efectoras de los TH son TH1, TH2, TH17, TH3 o reguladores los cuales producen diferente gama de citocinas y actúan sobre diferentes células para dirigir la respuesta frente a patógenos extra o intracelulares y cáncer. Estos linfocitos se ubican en el TLAM, los LB en folículos linfoides y LT rodeando a estos. Especialmente en la tráquea el TLAM no es abundante a diferencia de otras mucosas, por ello es importante la barrera física y química.



Los fagocitos actúan como células presentadoras de antígenos junto con otras células como las dendríticas interdigitadas o los linfocitos B (que se encuentran en ganglios linfáticos y TLAM) para que sean reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4 (LTH). Los linfocitos TH tienen la función de dirigir la respuesta inmune convirtiéndose en LTH1 para producir citocinas que cooperen con la respuesta celular frente a patógenos intracelulares o LTH2 y LTH17 frente a extracelulares. Si esta respuesta se desarrolla por primera vez frente al antígeno, se lleva a cabo en los ganglios linfáticos regionales asociados a la vía aérea, si es el segundo contacto esta respuesta se desencadena en el TLAM por tanto es mucho más rápida.

Otras células residentes en el tejido conjuntivo adyacentes a los vasos sanguíneos y mucosas son los mastocitos que expresan en su superficie receptores para la IgE y son sensibilizados por estos anticuerpos específicos para antígenos parasitarios o alérgenos en alergias. El entrecruzamiento de estos receptores desencadena su desgranulación con la liberación de histamina como mediador inflamatorio inmediato por vasodilatación, triptasa, factor quimiotáctico de eosinófilos y sintetizan prostaglandinas y leucotrienos como mediadores inflamatorios tardíos. Esta inflamación reduce el flujo aéreo y provocan broncoconstricción en asma alérgico.

### **2.3 Injertos traqueales**

Un injerto es un segmento de tejido u órgano, que ha sido privado totalmente de su aporte sanguíneo y del punto de unión a la zona donante y es transferido a una zona receptora donde debe recibir un nuevo aporte sanguíneo. Pueden ser autólogos que provienen del mismo individuo, alogénicos de individuos de la misma especie pero genéticamente

diferentes, singénicos de individuos genéticamente idénticos, xenogénicos de diferente especie y genéticamente diferentes y los generados por bioingeniería. Según su composición pueden ser simples constituidos por un tejido único o compuestos por varios tejidos. El trasplante consiste en sustituir un órgano, tejido (injerto) o un conjunto de células de una persona (donante) y trasladarlos a otra (receptor) o bien, de una parte del cuerpo a otra en un mismo paciente (Watson CJ, 2012).

Cuando el órgano o tejido es alogénico o xenogénico antes de realizar el procedimiento se debe tomar en cuenta la histocompatibilidad entre el donante y el receptor. De no ser así, el sistema inmunológico del receptor reaccionará frente al trasplante rechazándolo poniendo en riesgo el procedimiento y la vida del paciente. El trasplante es una realidad gracias al descubrimiento de las bases inmunológicas del rechazo y tolerancia de los injertos por Peter Medawar en 1940. En 1952 Jean Dausset describe el complejo de genes de histocompatibilidad permitiendo avanzar en el reconocimiento de lo propio y extraño (Dausset J, 1990).

Uno de los factores que determina este rechazo o aceptación es la compatibilidad del grupo sanguíneo ABO/Rh ya que estos antígenos se expresan en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, y existen anticuerpos preformados frente a ellos llamados isohemaglutininas que condicionan el rechazo. En caso de incompatibilidad se puede realizar el trasplante utilizando plasmaféresis e inmunosupresión (Tanabe K et al., 1998).

Otro factor determinante es el grado de similitud en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 (segmento 6p21.3) y que codifican las moléculas HLA (Antígenos leucocitarios humanos) expresadas en todas las células nucleadas y en las células presentadoras de antígenos de los

tejidos. Las moléculas MHC I son las HLA A, B, C, una combinación heredada de cada progenitor, comportándose de forma mendeliana codominante al igual que las moléculas MHC II, que son los HLA DR, DP, DQ que se expresan únicamente en las células presentadoras de antígenos (APC). Ambas son muy polimórficas (alelos) aplicando una nomenclatura especial en su identificación, existen dos procedimientos en su tipificación el serológico por medio de anticuerpos frente a ellos y el molecular (ASHI., 2000).

Las proteínas HLA A,B,C tienen la función de presentar antígenos a los linfocitos T CD8 para desencadenar la citotoxicidad o respuesta inmune celular frente a péptidos endógenos en caso de infecciones intracelulares o cáncer. Las moléculas HLA DR, DP, DQ en las APC presentan antígenos exógenos a los linfocitos T CD4 y dirigen la respuesta inmunológica humoral o celular. En caso de un trasplante la respuesta inmune del receptor es capaz de identificar las diferencias (alelos) en las moléculas MHC I y II expresadas en las células del injerto como no propias y desencadenar una respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos o celular citotóxica de parte del receptor rechazando el injerto y perdiendo su función. Ya que es complicado realizar trasplantes con injertos totalmente compatibles es indispensable la terapia inmunosupresora para evitar el rechazo. En caso de trasplante de órganos sólidos alogénicos se realiza la identificación de tres pares de alelos HLA A, B, y DR, si entre receptor-donador la disparidad es de cero o existen seis antígenos iguales se habla de una alta compatibilidad y se realiza el trasplante, además es importante verificar la presencia de anticuerpos del receptor frente al HLA del donador llamada prueba cruzada la cual tiene que ser negativa (Lechler R, 2000). La presencia de los anticuerpos contra HLA en el receptor se traduce en % de reactividad y esto predice la posibilidad de rechazo reduciendo la posibilidad de un donador compatible. Su presencia se

debe generalmente a transfusiones, trasplantes previos y embarazos o abortos. La sobrevida del injerto depende del grado de histocompatibilidad entre el donador y receptor y de la revascularización del injerto (Cicciarelli JC, 2004; De-Leo-Cervantes C, 2005).

Al utilizar injertos alogénicos existen disparidades en la histocompatibilidad, estas diferencias desencadenan la respuesta inmune y es necesaria la terapia inmunosupresora con múltiples inconvenientes, como mantener un balance entre la protección del injerto frente a la respuesta inmune del receptor minimizando sus reacciones adversas a largo plazo (Delaere PR, 2014). El éxito en las últimas décadas en la supervivencia de los injertos es gracias al desarrollo de estos fármacos. Se ha utilizado de forma única o en combinación la ciclosporina, (15 mg/kg/día) aziatropina, (2 mg/kg/día) tacrolimus (FK 506) o la radioterapia externa eliminando linfocitos circulantes en el injerto. La metilprednisolona (2mg/kg/día) contribuye con su efecto inmunosupresor y anti-inflamatorio (Olmos-Zúñiga RJ, 2006).

Los injertos pierden su irrigación por tanto es muy importante su revascularización para su permanencia. Este proceso tiene lugar cuando el injerto es incorporado al lugar receptor y su éxito depende de la rapidez con que se restituye la irrigación del tejido isquémico.

En otros injertos este proceso tiene éxito debido a que se realizan las anastomosis arteriales y venosas, en el caso de tráquea y debido a las características anatómicas este proceso no se realiza y el tejido sufre necrosis por falta del aporte sanguíneo.

Es necesario un injerto traqueal cuando tiene que ser sustituido un segmento mayor de 6 cm de longitud en adultos y un tercio en niños, debido a padecimientos que generan obstrucción y no pueden tratarse con resección y anastomosis término-terminal (Antón-Pacheco Sánchez A, 2002; Grillo HC, 2002). La obstrucción o estenosis traqueal se debe a

lesiones causadas por el uso prolongado de ventilación mecánica con sondas orotraqueales, nasotraqueales o cánulas de traqueostomía, en el 5-20% de los casos (Acosta L, 2004; Brichet A, 1999). Otras causas pueden ser tumores malignos, benignos, neoformaciones (granulomas, papilomas, bridas), enfermedades congénitas (traqueomalacia) e infecciosas (tuberculosis). Dicha obstrucción se manifiesta clínicamente por dificultad respiratoria, retención de secreciones y neumonías, puede conducir a la muerte por asfixia, por lo que su diagnóstico y tratamiento es urgente. Los injertos utilizados en trasplante han sido un fracaso por la falta de disponibilidad del órgano en condiciones y tiempo adecuado, así como por la histocompatibilidad y el tratamiento inmunosupresor. En los injertos traqueales es vital conservar el epitelio y lograr la revascularización o llevará a la pérdida del injerto o a la recidiva de la estenosis (Garrido-Cardona et al., 2015). Se ha intentado el reemplazo sintético con múltiples materiales, pero inducen una infección, extrusión y estenosis. También se han intentado utilizar tejidos autólogos, pero la complicación más común es la recidiva de la estenosis o necrosis por lo que se han implementado tecnologías en ingeniería de tejidos para generar reemplazos de tráquea con resultados muy controvertidos (Jacobs JR, 1988; Brichall M, 2008).

### **2.3.1 Características del injerto traqueal ideal**

El injerto ideal de tráquea debe ser rígido lateralmente y flexible longitudinalmente, hermético que no colapse durante la inspiración, debe contar con el epitelio ciliado, biocompatible, no inmunogénico, no tóxico, resistente a la colonización bacteriana, vascularizado, no cancerígeno, que evite la acumulación de secreciones y fácil de implantar para garantizar su permanencia (Neville et al., 1990; Haykal et al., 2014).

## 2.4 Tipos de injertos

Los injertos utilizados en el trasplante traqueal son muy diversos así como su evolución y resultados. Durante décadas se han intentado los reemplazos con injertos traqueales alogénicos frescos, (tejidos donados por individuos de la misma especie pero genéticamente diferentes) de donadores cadavéricos con dificultad en su disponibilidad. En estos casos las disparidades HLA desencadenan la respuesta inmunológica y rechazo cuando no se administra inmunosupresión, aún con este tratamiento se pierden los injertos debido a que no hay revascularización (Daniel RA, 1948; Pacheco CR, 1954; Aronstam EM, 1961; Edgerton MT, 1954; Neville WE, 1976; Beigel A, 1984; Bujia J, 1990).

Todos estos injertos se necrosan con destrucción del tejido o se estenosan, para hacerlos menos inmunogénicos se ha propuesto eliminar el epitelio (células que expresan HLA) con detergentes e irradiación, pero la regeneración del epitelio en el receptor ha fracasado perdiéndose el injerto (Liu Y, 2000).

Con el objetivo de mejorar la vascularización en estos injertos se ha intentado la revascularización arterial directa aportando el suministro de sangre por anastomosis de la arteria tirotraqueal con la tiroidea pero no se han reportado resultados a largo plazo (Khalil-Marzouk JF, 1993).

Para generar el restablecimiento de la irrigación arterial y venosa con injertos alogénicos frescos utilizando inmunosupresión, se ha intentado la revascularización indirecta colocando el injerto en los tejidos del receptor como el epiplón (Hirata T et al., 1992; Messineo A et al., 1991; Borro JM et al., 1992). El músculo intercostal o deltopectoral, pectoral mayor (He J et al., 2009), colgajos condromusculares (Guerrissi JO, 2009),

musculofacial (Fell et al., 1985; Kumaran S, et al., 2009) semanas antes de su implantación (Delaere PR, et al., 1995; Delaere PR, et al., 1996).

Se reportó en 1971 un implante de tráquea revascularizada indirectamente en los tejidos del receptor, sin inmunosupresión logrando la reepitelialización (Rose KG, 1979), otro caso parecido administrando inmunosupresores se necrosó y estenosó requiriendo un sten (Levashov Yu N, 1993).

Para disminuir la inmunogenicidad y expresión de HLA los injertos se han criopreservado y desvascularizado y también han fracasado debido a la resorción del cartílago, fibrosis, y obstrucción (Bjork VO, 1958; Pacheco CR, 1954; Jackson TL, 1950; Davies OG, 1952). Se ha intentado con injertos de segmentos cortos reepitelializados pero fallaron a largo plazo (Lenot B, 1993). Todos estos esfuerzos ponen de manifiesto que el suministro sanguíneo es crítico para el éxito del trasplante así como la reepitelialización (Kutten JC, 2015).

Por la dificultad en la disponibilidad de órganos se han obtenido injertos no traqueales alogénicos frescos y criopreservados como la aorta sin administrar inmunosupresión pero no han resultado aptos por sus características mecánicas y no permite la incorporación del tejido del receptor como el epitelio. Cuando se ha realizado este trasplante es necesario colocar un sten para evitar su colapso (Tsukada H, 2010; Wurtz A, 2012).

Los injertos producidos por ingeniería de tejidos no son inmunogénicos al eliminar las células (HLA) de la tráquea del donador y utilizar las del receptor para reconstruir un nuevo tejido reepitelializado y revascularizado, el primer trasplante con este injerto ya se reportó en pacientes (Macchiarini P, 2004; Walles T, 2004). Se han utilizado para trasplante en modelos animales tráqueas descelularizadas para eliminar la inmunogenicidad logrando la regeneración del epitelio y de los anillos traqueales (Ershadi R, 2017).

## **2.5 Injerto traqueal generado por ingeniería tisular**

Es un reemplazo traqueal construido con la finalidad de no ser inmunogénico, y obtener un injerto vascularizado y epitelializado o apto para ello. Se utiliza una matriz como soporte o andamio el cual carece de células (HLA) y aporta una red con la forma, tamaño y características mecánicas adecuadas, para la regeneración del tejido como epitelio y vasos. Se siembran las células del receptor sobre la matriz en un biorreactor que provea el medio ideal de cultivo como esterilidad, factores de crecimiento, temperatura, fuerzas de cizallamiento etc., para que dichas células se establezcan y regeneren el tejido.

## **2.6 Matrices**

Para generar un injerto se debe contar con una matriz que debe funcionar como soporte o andamio para sembrar las células del receptor, con las características mecánicas y estructurales adecuadas imitando al tejido nativo. El andamio ideal debe permitir la adhesión celular, el crecimiento y la diferenciación, pero también tiene que crear una red tridimensional estable con porosidad suficiente para el crecimiento e interacción de las células y lograr la formación del tejido. Deben tener una vida media adecuada ya sea temporal o permanente, pueden ser biológicas (orgánicas o naturales) obtenidas de un donador de la misma especie (matrices alogénicas), de diferente especie, (matrices xenogénicas), pueden ser sintéticas (inorgánicas) o combinadas (Dee., 2003).

### **2.6.1 Matriz extracelular nativa**

Ya que se busca construir u obtener una matriz que imite a la nativa es importante hacer



referencia a su estructura y función. Esta proporciona un sostén mecánico a los órganos y células permitiéndoles saber donde están y que deber hacer, sus componentes pueden variar según el sitio anatómico y el estado fisiológico de los tejidos y les confieren sus propiedades específicas como fuerza, amortiguación, adhesión etc. Es indispensable junto con las moléculas de adhesión para mantener la estabilidad celular, migración, multiplicación, preservación, procesos bioquímicos y señalización. Es una red tridimensional formada por fibras de colágeno, elásticas, y reticulares que fortalecen y ayudan a organizar la matriz, los espacios entre estas fibras se mantienen por diferentes tipos de proteoglicanos (proteínas asociadas a glucosaminoglicanos) en donde residen también células especializadas, fibroblastos y leucocitos interactuando con proteínas especializadas (integrinas, hemidesmosomas, receptores de membrana, factores de crecimiento, metaloproteasas, fibronectinas y laminina). Las uniones intercelulares están mediadas por las selectinas, integrinas, conexinas y cadherinas que dependen de los iones de calcio y magnesio, esta interacción es esencial para el crecimiento, diferenciación y apoptosis celular.

Las respuestas adaptativas de las células diferenciadas y la sincronización de sus funciones celulares está integrada a la matriz extracelular por las uniones gap (conexinas).

La colágena es la proteína más abundante del organismo, hay 27 tipos diferentes codificados por 41 genes distribuidos en 14 cromosomas, cada colágena esta constituida por tres cadenas unidas como triple hélice y contienen aminoácidos especializados de hidroxiprolina e hidroxilisina. Se clasifican de acuerdo a la forma en la que se agregan como fibrilares (I,II,III,V,XI) y no fibrilares (VI, VII, VIII, X), estas a su vez se clasifican si forman membranas (IV, VI, VIII) o si se interrumpe la triple hélice (IX, XII, XIV), si

forman microfibrillas en cuenta de rosario (VI) o fibras de anclaje (VII). Estas se combinan para formar los diferentes tejidos conjuntivos. Las fibras de elastina son elásticas y pueden someterse a estiramiento, estas abundan en tejidos donde se necesita como vasos sanguíneos. Las fibras reticulares son delgadas y crean una red flexible en órganos sujetos a cambios en forma y volumen como el bazo, hígado, útero, músculo e intestino. Los fibroblastos son las células residentes que junto con las especializadas en la matriz sintetizan los proteoglucanos y glucosaminoglucanos. La composición de la matriz condiciona la angiogénesis al modificar sus condiciones físicas, la formación de una red de fuerzas en la matriz induce que las células endoteliales secreten proteasa y la proteólisis permite la migración de células endoteliales y liberación de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico) (FGF-2) estimulando a los fibroblastos a sintetizar colágena manteniendo el equilibrio (Saavedra J, et al., 2015).

### **2.6.2 Matrices sintéticas**

Son andamios utilizando materiales sintéticos biocompatibles o tolerables por el organismo. Estos dispositivos pueden ser temporales o permanentes y deben reproducir la función del tejido *vivo* de forma segura, fisiológicamente eficaces, mecánicamente funcionales, no tóxicos, no inflamatorios y deben conseguir la regeneración tisular. Se han utilizado biomateriales como metales, cerámicas, vidrios, acero y otras aleaciones metálicas, polímeros sintéticos de múltiples clases y polímeros naturales (Ratner, 2004). Se debe considerar en cada caso su bioestabilidad a corto y largo plazo así como el mantenimiento de sus propiedades y estructura físico-química en el entorno biológico. Los

polímeros sintéticos más utilizados son polihidroxiácidos (poliláctico y poliglicólico) y copolímeros poliacrilatos (poli-HEMA, poli-MMA).

Las ventajas de las matrices sintéticas consisten en poder controlar su tamaño, (micro o nano métricas) forma, resistencia, tiempo de degradación, porosidad, microestructura, pero carecen de ciertas características del tejido natural.

La nanotecnología permite construir (desde arriba o desde abajo) con nanomateriales las matrices a escala nanométrica. La ventaja es que estos andamios son comparables a la matriz extracelular natural como una red nanofibrilar (50 a 500 nm) compuesta de biomacromoléculas que rodean y soportan las células de los tejidos. En el campo de la ingeniería de tejidos se aplican varios métodos de fabricación, como el autoensamblado de moléculas, la segregación de polímeros en nanofases, la litografía, el ataque químico selectivo y el electrohilado entre otros (Laurencin CT, 2008). Las nanofibras son las más empleadas y se autoensamblan, por separación de fases o electrohilado. En esta última se utiliza un gradiente de potencial para dirigir la solución del polímero y obtener andamios de fibras orientadas al azar o alineadas con un incremento del área superficial y rugosidad que favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación de las células con mejores propiedades mecánicas y eléctricas que los materiales convencionales (Zhang, 2009; Lovat V, 2005; Harrington DA, 2008). Las diferencias en los patrones de las nanoestructuras afectan la orientación y la morfología de las células sembradas permitiendo el control de su crecimiento (Engel E, 2008). Sin embargo falta mejorar su eficiencia para enviar señales y estimular controladamente el crecimiento celular y la bioseguridad durante su elaboración e implantación.

Se han utilizado matrices sintéticas para construir injertos traqueales, en la década de los

90 se usaron materiales poliméricos o de hidrogel para crear cartílago, con malos resultados preclínicos ya que generaron una potente respuesta inflamatoria (Britt et al., 1998). Sin embargo en los últimos años se han sembrado células madre autólogas en matrices de nanocompuestos cubiertos con un polímero sintético (Jungebluth et al., 2011). Se ha utilizado como matriz una estructura tubular de silicio cubierta con un injerto epitelial obtenido de la mucosa interna de la oreja, una malla de polipropileno para sustituir el cartílago traqueal y fascia torácica lateral como suministro vascular. Después de 2 semanas *in vivo*, la rigidez, elasticidad, diámetro, y espesor de la pared fue similar a la tráquea nativa. Sin embargo, las complicaciones a largo plazo fueron el desarrollo de estenosis, crecimiento glandular y acumulación de secreciones mucosas debido a la falta de la función mucociliar (Okumus et al., 2005). Para resolver algunos de los problemas anteriores se ha propuesto utilizar polímeros sensibles a la temperatura como sustrato para las células epiteliales, estos, fueron utilizados en el lumen del injerto compuesto de polipropileno monofilamentoso reforzado con Dacron. También se han sembrado células madre en un andamio de ácido poliglicólico tratado con factores de crecimiento, desarrollando una estructura similar a la nativa (Kojima et al., 2004). En comparación con estos andamios sintéticos las matrices biológicas tienen fuertes ventajas ya que mantienen la composición natural de la matriz extracelular, no liberan productos tóxicos no producen inflamación y desempeñan un papel activo en la regulación del comportamiento de la célula afectando su proliferación, migración y diferenciación (Kim et al., 2000).

### **2.6.3 Matrices biológicas**

Son matrices construidas con materiales naturales, polímeros similares a los de la matriz

extracelular nativa. Se pueden obtener de plantas, animales, algas, microorganismos. Los más utilizados son los hidrogeles que se dividen en polisacáridos (quitosano, alginato, celulosa, agarosa, ácido hialurónico), y proteínas (colágeno, fibrina, elastina). Los hidrogeles son más blandos que los de los tejidos blandos naturales debido a su alineación aleatoria de las fibras y el alto contenido de agua en su estructura polimérica lo que limita su uso (Ahearne et al., 2008). La fibrina es un polímero que usan los tejidos naturales en el proceso de reparación, está formada por largas cadenas fibrilares flexibles con gran resistencia mecánica con estructuras tridimensionales, sola o en combinación con otros materiales se utiliza como andamio para la regeneración de tejido adiposo, óseo, cardíaco, cartilaginoso, nervioso, ocular etc., (Carriel et al., 2013; Chien et al., 2012). La combinación de hidrogeles (agarosa) con fibrina se han utilizado para obtener matrices para la regeneración de cartílago, el principal inconveniente es su limitación biomecánica (Mauck et al., 2006; Slaughter et al., 2009).

### **2.6.3.1 Matrices biológicas alogénicas**

Las matrices biológicas alogénicas consisten en soportes o andamios obtenidos de órganos donados por individuos de la misma especie pero genéticamente diferentes, que al someterlos a métodos para la eliminación de células (descelularización) se eliminan las moléculas HLA (evitando la respuesta inmunológica frente al tejido) y se obtiene una maya de matriz extracelular para ser sembrada por células autólogas y regenerar el tejido. Los componentes de la matriz extracelular que soportan las células están formados por fibras de colágeno, elastina, vitronectina, y glucosaminoglucanos (ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, keratán sulfato). Es importante que

esta estructura no sufra degradación durante el proceso de descelularización. Son ventajosas porque apoyan la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular, las limitaciones son su falta de consistencia, estructura, maleabilidad y biodegradabilidad (Sutherland RS, 1996).

En la generación de injertos traqueales se han utilizado matrices biológicas alogénicas descelularizadas y sembradas con células autólogas, conservando algunas de las propiedades esenciales del tejido original, con relativo éxito (Conconi, 2005; Macchiarini et al., 2008). La matriz se obtiene eliminando las células (moléculas HLA) y residuos de ADN del segmento traqueal, para no desencadenar una respuesta inflamatoria y de rechazo, aún así se han reportado casos en los que se monta dicha respuesta frente a estos tejidos ya que la descelularización y eliminación de ADN no es completa y hay otros factores menos inmunogénicos como los polimorfismos de proteínas estructurales (Badylak et al., 2012; Bayrak et al., 2010). La falta de viabilidad y funcionalidad en la construcción del tejido se puede deber a la destrucción de los componentes estructurales como las fibras de colágena y elásticas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos de la matriz durante el proceso de descelularización (Schenke-Layland, 2003; Baiguera, 2012). Perdiendo resistencia y rigidez ya que este proceso ha sido difícil de estandarizar (Petersen, 2012). Los proteoglicanos (PG) son importantes en el tejido traqueal ya que intervienen en la adhesión migración y proliferación celular, además son reguladores de la matriz extracelular (MEC) afectando su integridad, rendimiento y durabilidad ya que mantienen los espacios entre las fibras, por ello tienen un papel relevante en la generación del tejido *in vitro* (Schaefer, 2010).

### **2.6.3.2 Matrices biológicas xenogénicas**

Las matrices biológicas xenogénicas se obtienen de órganos donados por individuos de diferente especie (Remlinger, 2010). Los injertos traqueales usando matrices xenogénicas de animales no han provocado rechazo. Ya que durante el proceso de decelularización son eliminados los antígenos (HLA) reconocidos por el sistema inmune y son repoblados por células del receptor (Jungebluth et al., 2009). Se han realizado injertos con parches de segmentos de yeyuno porcino descelularizados y sembrados con células musculares y por fibroblastos humanos que reemplazaron el tejido conectivo con ausencia de rechazo (Macchiarini et al., 2004).

### **2.6.4 Matrices híbridas**

En la actualidad el esfuerzo consiste en la creación de matrices híbridas combinando materiales sintéticos y biológicos. Los materiales artificiales buscan fortalecer la matriz biológica ya que durante el proceso de decelularización se pueden afectar las características mecánicas (Sato et al., 2008). La combinación de materiales sintéticos y biológicos alogénicos en injertos traqueales se han experimentado en perros con éxito. Ya se utilizó una matriz híbrida traqueal en la que un andamio biológico alogénico se asoció a un biopolímero de polie-caprolactona  $(C_6H_{10}O_2)_n$ , poliéster alifático biodegradable, semicristalino que se obtiene de la polimerización de la caprolactona, su degradación es por hidrólisis en un periodo de 2 a 4 años. Esta matriz fue sembrada con células madre autólogas aplicando el factor transformador del crecimiento beta ( $TGF\beta$ ) sobre los cartílagos para inducir la proliferación de los condrocitos y mejorar la resistencia de la

matriz. El injerto regenerado se implantó en un paciente pediátrico con estenosis traqueal congénita y después de múltiples cirugías y complicaciones el injerto sobrevivió después de 2 años de seguimiento (Elliot et al., 2012). La combinación de una matriz biológica y de policaprolactona ofrece que los injertos híbridos tengan una resistencia comparable a la tráquea nativa, fortaleciendo sus propiedades mecánicas y reducir la necesidad de implantar un stent intraluminal, ya que durante el proceso de descelularización puede disminuir su resistencia (Johnson C, 2016).

## **2.7 Métodos de esterilización**

La seguridad microbiológica es uno de los requisitos importantes en cualquier dispositivo biológico para ser utilizado con fines clínicos. Actualmente hay una variedad de sistemas de esterilización disponibles y todos presentan inconvenientes. Por lo tanto al elegir un sistema de esterilización se debe evitar el daño tisular, evaluar la seguridad microbiológica biocompatibilidad, accesibilidad y disponibilidad al manejar los tejidos.

La esterilización es el proceso físico o químico para la eliminación completa de agentes patógenos de un objeto, en este caso de un tejido no viable o matrices acelulares, por medios de agentes físicos como la radiación, (gamma, UV) calor húmedo, seco, gases (óxido de etileno) y químicos (timerosal, antibióticos). La desinfección no elimina completamente a los microorganismos y se realiza por agentes químicos (Geler DA, 2007; Wee Ling H, 2013; Kunachak S. 2000, 2007).

Uno de los métodos más convenientes son los antibióticos para lavar los injertos y descontaminarlos antes de su criopreservación con la finalidad de eliminar a los microorganismos del tejido. Son seguros ya que no generan toxicidad como los residuos de



otras sustancias químicas como el timerosal (Geler DA. 2007). Un antibiótico es una sustancia con actividad antimicrobiana (antibacteriana), puede ser natural, semisintético o sintético. Tienen acción bacteriostática que impide el desarrollo o multiplicación bacteriana o bactericida provocando su lisis. De acuerdo a sus mecanismos de acción pueden inhibir la formación de la pared bacteriana, la síntesis protéica, la duplicación del ADN, o sus vías metabólicas. Los bactericidas de amplio espectro son aquellos que actúan sobre una gama muy amplia de patógenos abarcando gram- y gram+, como los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemes) que inhiben la síntesis de la pared bacteriana. La resistencia de las bacterias es debido a la producción de betalactamasas, enzimas que hidrolizan el anillo beta lactámico, los efectos adversos de estos medicamentos es que pueden generar hipersensibilidad. Otros bactericidas que actúan sobre la pared son de espectro reducido (gram+) como la vancomicina y teicoplanina que se usan sobre todo a nivel intrahospitalario para reducir la resistencia frente a otros medicamentos. Otro grupo son los aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, estreptomina, tobramicina) que se dirigen sobre todo frente a bacterias gram- inhibiendo su síntesis protéica uniéndose de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, como efectos adversos pueden ser ototóxicos o nefrotóxicos. Los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina) y las lincosaminas (lincomicina, clindamicina) tienen una acción similar como bacteriostáticos y a dosis altas son bactericidas y actúan sobre todo frente a gram+ y pueden producir bloqueo neuromuscular y hepatotoxicidad. Las quinolonas son bactericidas inhibiendo la DNA girasa que interviene en el superenrollamiento del ADN cromosómico inhibiendo la división celular, son de 1ª generación el ácido nalidíxico y ácido pipemídico, dirigidos sobre enterobacterias y son

inactivas sobre gram+ y anaerobios, las de 2ª generación, las fluoroquinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina) actúan sobre gram- y pseudomona aeruginosa con moderada actividad sobre gram+. Las de 3ª generación (levofloxacina, gatifloxacina) actúan sobre bacterias gram- inhibiendo a la ADN girasa y frente a gram+ inhibiendo la topoisomerasa IV, pueden producir efectos secundarios como hepatotoxicidad alteraciones en sistema nervioso central, tubo digestivo y artropatías.

Su elección debe tener en cuenta el tipo de bacterias que pueden estar presentes en el tejido, en caso de las vías respiratorias pueden ser gram- y + por tanto los antibióticos de amplio espectro son los indicados. El moxifloxacino pertenece al grupo de las quinolonas e inhibe a la topoisomerasa II (DNA girasa) y IV, impide la replicación, transcripción y recombinación bacteriana, tiene un amplio espectro contra grampositivos y gramnegativos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Legionella pneumophila*). En la práctica clínica se ha demostrado su eficiencia en el tratamiento de infecciones bacterianas del tracto respiratorio (sinusitis, bronquitis, neumonías), infecciones de piel y tejidos blandos.

Los antibióticos empleados como régimen de descontaminación en injertos traqueales son la penicilina G (50 IU/mL) y estreptomicina (50 µg/mL) incubándolos a 37°C por 6 a 12 horas antes de la congelación. Los inconvenientes de este método es que permite la sobrevivencia de otros patógenos como hongos, virus y otras bacterias, por lo tanto hay que complementarlo con otros sistemas como rayos UV o el uso de anti-fúngicos como

Caspofungin (0.1 mg/ml) a 4<sup>0</sup>C por 24 hrs. que no genera daño celular como la anfotericina B (Deresinki SC, 2003; Wee Ling H, 2013).

La radiación UV es un método comúnmente utilizado para esterilizar o eliminar bacterias, hongos y virus, de muestras biológicas, líquidos, superficies etc., las longitudes de onda responsables de esta reacción se sitúan entre 200-300 nanómetros (uv-c, espectro de la radiación electromagnética). La generación artificial de la luz UV se realiza a través de una lámpara (emisor) de cuarzo puro, la cual contiene un gas inerte encargado de proveer la descarga inicial y conforme se incrementa la energía eléctrica, el calor producido por el emisor también aumenta junto con la presión interna del gas, lo que genera la excitación de electrones produciendo la luz UV.

El principal mecanismo del efecto letal de la luz UV sobre los patógenos, se atribuye a su absorción por el ADN dañándolo provocando la formación de uniones covalentes entre los residuos de pirimidina adyacentes pertenecientes a la misma cadena, lo que provoca la generación de dímeros de pirimidina de tipo ciclobutano. Esto produce distorsiones en la forma del DNA e interfiere con el apareamiento normal de las bases. El resultado final es la inhibición de la síntesis de ADN impidiendo el crecimiento de los patógenos. Es igualmente efectivo para gram+ y gram- hongos y virus lo que representa una ventaja en tejidos de vías respiratorias, así como la facilidad y accesibilidad en el procedimiento y manejo, un inconveniente es que puede causar la desnaturalización de la matriz traqueal (Nataraj C, 2007; Geler DA, 2007).

Otros métodos de esterilización utilizados en injertos alogénicos traqueales son la radiación gamma aplicando un rango de 15-35 kGy por 5 horas antes de su criopreservación se encontró que es un procedimiento igual de efectivo que los químicos y

reduce la antigenicidad pero puede generar hidrólisis de las fibras de colágena, y no se ha llegado a un consenso en su proceso (Kunachak S. 2000, 2007).

## **2.8 Almacenamiento de las matrices**

La criopreservación ha demostrado mantener la integridad de tejidos en condiciones morfológicas, funcionales y bioquímicas adecuadas. En el proceso de conservación es indispensable contemplar las condiciones óptimas de seguridad, temperatura y tiempo de la preservación (Escalante Cobos JL, 2009).

Las temperaturas de criopreservación recomendadas son de 0 a 4<sup>0</sup> C para realizar manipulaciones de material fresco, de -20<sup>0</sup> C para evitar la actividad proteolítica y mantener la estabilidad del ADN, a -80<sup>0</sup> C se logra la estabilidad de ARN y se almacenan tejidos y a -150<sup>0</sup> a -196<sup>0</sup> C se almacenan células. Los métodos de criopreservación que mantienen la integridad celular de los tejidos deben utilizar soluciones crioprotectoras para disminuir el daño osmótico de la congelación como medios de cultivo celular como el RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y TC-199 (Tissue Culture) complementados con suero bovino fetal (SBF) y dimetilsulfóxido (DMSO). En caso de la preservación de injertos frescos para alargar el tiempo de almacenamiento hasta de 12 horas es necesaria la infusión de soluciones como la de la Universidad de Wisconsin, Eurocollins etc., para conferir al órgano una protección celular frente a los efectos de la isquemia y la hipotermia (Escalante Cobo LJ, 2009). El proceso de congelación debe ser programado disminuyendo la temperatura de manera gradual y regular entre (-1 y -5°C/minuto) hasta alcanzar un rango entre (-80 y -100°C) y para un almacenamiento prolongado (730 días) se recomienda el nitrógeno líquido, fase de

vapor  $-196^{\circ}\text{C}$  (Villalba CJ, 2007; Sotres-Vega A 2006). La criopreservación de las matrices busca evitar la actividad proteolítica y la degradación de los componentes de la matriz extracelular y no de las células. Al no aplicar soluciones crioprotectoras se contribuye a la eliminación de células residuales conservando las características estructurales de la tráquea (Jones, 2015). Se ha reportado que un largo período de almacenamiento puede favorecer el deterioro del cartílago traqueal (Villalba Caloaca J, 2010; Sotres VA, 2010). Otros autores sin embargo reportan que no hay diferencias (Nakanishi R 1999).

## **2.9 Mecanismo de Regeneración**

En ingeniería de tejidos el proceso de regeneración consiste en reconstruir tejidos u órganos con ayuda de material biológico propio o extraño. Para ello es necesario el soporte de cualquier tejido que consiste en un andamio extracelular conformado por fibras de colágena, elastina etc., proteínas y proteoglicanos lugar donde radican las células llamado matriz. Las células son sembradas o cultivadas en este soporte para la regeneración del tejido y convertirse en células especializadas dependiendo del órgano que se trate y lograr la revascularización, gracias a la aportación de factores de crecimiento, nutrientes, etc., Este proceso debe llevarse a cabo en biorreactores naturales o mecánicos que aportan el lugar donde la interacción del andamio, células y biomoléculas sea ideal hasta obtener un tejido reconstruido.

Para la regeneración del tejido traqueal se ha utilizado una matriz biológica alogénica sin alteraciones en su estructura y membrana basal, sembrada con células autólogas progenitoras endoteliales, células de médula ósea, condrocitos costales y células epiteliales

respiratorias. Para obtener una construcción con todos los elementos celulares de la tráquea como los condrocitos, la matriz cartilaginosa, el tejido muscular, vasos y células epiteliales ciliadas (Walles et al., 2004).

### **2.9.1 Células utilizadas en el proceso de regeneración**

El éxito en la construcción del tejido u órgano depende del tipo de células utilizadas, las condiciones del cultivo y de las propiedades del andamio. Las diversas fuentes para obtener células en la ingeniería de tejidos continúa en aumento. Pueden ser células madre, o células primarias diferenciadas que se obtienen a partir de tejidos funcionales y según su origen autólogas, homólogas, o xenogénicas.

#### **2.9.1.1 Células madre**

Las células madre según su origen pueden ser embrionarias, embrionarias germinales, adultas o somáticas y de acuerdo a su potencialidad pueden ser totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y de potencialidad restringida. Las más utilizadas en la regeneración de tráquea son las derivadas del tejido graso, sangre periférica y médula ósea, estas últimas poseen una gran capacidad de diferenciación. Recientemente se han utilizado experimentalmente células madre obtenidas de líquido amniótico y cordón umbilical para el tratamiento de padecimientos estenóticos congénitos (Kunisaki et al., 2006; Fishman JM, 2014), debido a sus propiedades como auto-renovación, clonogenicidad y pluripotencialidad (Bader A, 2010).

Estos avances han permitido la identificación y clasificación de las células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes y progenitoras. También han dado lugar al

desarrollo de su cultivo y su diferenciación para su utilización en ingeniería de tejidos y otras terapias. El uso de células madre adultas o embrionarias específicas de tejido ha sido recientemente planteada para el tratamiento de diversos trastornos humanos.

### **2.9.1.2 Condrocitos**

Como células primarias diferenciadas, los condrocitos se han obtenido de cartílago auricular, costal, tabique nasal, hueso o articulaciones, para desarrollar tejido cartilaginoso *in vitro* realizando cultivos primarios en sistemas 3D (Gong Y, et al., 2011; Weidenbecher M et al., 2008) logrando la generación de neotráqueas vascularizadas pero con fallas mecánicas debido a la pobre proliferación de los condrocitos. Las células madre siguen siendo una mejor alternativa para la amplificación celular (Imaizumi M, 2013).

### **2.9.1.3 Células epiteliales traqueales**

Las células epiteliales traqueales son células especializadas ciliadas que se encuentran a lo largo de la capa basal de la tráquea. Como células primarias diferenciadas se pueden aislar cultivar y diferenciar *in vitro* para ser utilizadas en la regeneración del tejido traqueal. También pueden obtenerse a partir de células madre (embrionarias, pluripotentes, mesenquimales, de sangre periférica) e inducir su diferenciación y proliferación con el mismo propósito (Yamaya M, 1992; Sachs LA 2003). Estas células son importantes en la construcción de la nueva tráquea ya que tienen la función por medio de los cilios de arrastrar mecánicamente las secreciones y partículas extrañas. Se ha demostrado que si no existe reepitelialización en los injertos traqueales estos no cumplen con su función y sufren estenosis ya que es sustituido por tejido fibrótico. Su aislamiento requiere un

procedimiento complejo por ello se ha intentado lograr regenerar el epitelio traqueal a partir de células epiteliales de la mucosa nasal y cultivarlas *in vitro* para que funcionen como una barrera física y superficie de reguladora de funciones metabólicas de la vía respiratoria (Yamaya M, 1992).

En los primeros intentos para obtener una bioprótesis traqueal en cerdos se utilizaron únicamente condrocitos que dieron resistencia biomecánica *in vivo* del injerto, pero se infectaron, por carecer de células epiteliales con la función de barrera a microorganismos (Vacanti et al., 1994). Con la adición de células epiteliales obtenidas por biopsia traqueal en la parte interna del injerto se generó tejido sano con supervivencia a largo plazo. Se ha desarrollado un nuevo sistema de cultivo *in vitro* llamado co-cultivo sembrando en lados opuestos de una membrana de colágeno a los condrocitos nasales y células epiteliales de vías respiratorias.

### **2.9.2 Biorreactor**

Un factor importante en la generación de órganos o injertos es el biorreactor como dispositivo para contener la matriz, células y moléculas necesarias para permitir su interacción en las condiciones ideales. El ambiente del cultivo debe ser dinámico, controlable y reproducible y es esencial para la distribución uniforme de las células en el andamio así como el suministro de nutrientes y eliminación de desechos. También provee de fuerzas hidrodinámicas de tensión y cizallamiento para promover el desarrollo del tejido como la angiogénesis, la función ciliar y apoyar la actividad metabólica y de diferenciación (Conconi et al., 2005).



### **2.9.2.1 Biorreactor mecánico**

Es el dispositivo de cultivo de tejidos *in vitro* que proporcionan un entorno controlado para sembrar en la matriz las diferentes células y regenerar el tejido. Permite la proliferación celular a gran escala y la producción del constructo en tercera dimensión (Tan Q, 2016; Partner R, 2005) al proporcionar el medio óptimo para la adhesión celular, el crecimiento y la diferenciación mediante la provisión de nutrientes y factores de crecimiento, manipulando el pH temperatura, tensión de oxígeno (Asnaghi MA, 2009; Vunjak-Novakovic G 1999). El primer biorreactor comercial para generar una tráquea lo puso en marcha la Universidad de Harvard Biosci- ENCE (Macchiarini P, 2008). Los inconvenientes a considerar son los largos periodos de siembra, los altos costos, los riesgos de inestabilidad en la diferenciación celular y la contaminación (Kalathur M, 2010).

### **2.9.2.2 Biorreactor natural**

El cuerpo puede ser un dispositivo para cultivar tejidos (*in vivo*) ya que proporciona el medio con la temperatura ideal y esterilidad, además proporciona nutrientes y promueve el crecimiento, migración y adhesión celular. Es una opción factible al uso de biorreactores mecánicos.

El uso de biorreactores naturales han tenido éxito en la regeneración de tejidos traqueales impulsando la movilización periférica y diferenciación de células madre con moléculas bioactivas, después de dos semanas de su implantación se obtuvo el tejido regenerado (Jungebluth, 2012).

El biorreactor natural es un concepto alternativo y novedoso que facilita el acceso a la

regeneración celular en ingeniería de tejidos, evita totalmente la replicación, expansión y diferenciación celular *in vitro*, usando del cuerpo como nicho para el cultivo celular de las matrices y lograr su regeneración (Bader, 2010). A pesar del relativo éxito del procedimiento existen inconvenientes como la dificultad para controlar los factores de crecimiento y manipular la diferenciación celular debido al difícil acceso anatómico o a la falta de respuesta de las células receptoras durante el proceso (Olender, 2011).

Las ventajas es que proporciona un medio que permite la proliferación celular, nutrientes y factores de crecimiento para la regeneración del tejido así como la angiogénesis gracias a la vascularidad y la interacción con células madre. Se requiere de cortos periodos de estancia con menos riesgos de contaminación a bajo costo (Jana, 2013).

Matrices biológicas (porcinas) se han implantado rodeadas de epiplón en el músculo de modelos caninos por 2 a 8 semanas y el tejido obtenido fue utilizado como parches de 2 a 3 cm en tejido traqueal dañado, el sitio de reparación fue evaluado histológicamente y después de 8 semanas de su implantación presentó desarrollo de epitelio columnar pero el cartílago mostro evidencias de degradación, el autor recomienda implantar condrocitos y lograr la vascularización antes de ser implantado como remplazo (Remlinger, 2010).

### **3. Metodología**

#### **3.1 Diseño de la Investigación**

Investigación, experimental, correlacional, como ensayo piloto

### **3.2 Descripción de los Procedimientos**

El experimento se llevó a cabo bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado de los animales de experimentación y con la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (CBE.ICB/009.04-14). Las matrices biológicas se obtuvieron descelularizando el tejido traqueal de cerdos sacrificados con otros propósitos, probando dos métodos evaluando sus características histológicas y mecánicas. Para la regeneración se utilizaron cuatro cerdos Yorkshire que funcionaron como biorreactores naturales, en cada uno se colocaron diferentes tejidos, una tráquea descelularizada con tritón, otra con desoxicolato, una tráquea nativa criopreservada y una descelularizada con desoxicolato reforzada con un polímero. Después de 15 y 8 días se obtuvo el tejido para su evaluación mecánica e histológica, dos tráqueas nativas frescas se utilizaron como control.

### **3.3 Justificación del diseño del estudio y métodos**

El estudio experimental piloto en cerdos es necesario para lograr una matriz biológica traqueal regenerada como posible injerto. Este ensayo previo permitirá a largo plazo un estudio más amplio.

La descelularización del tejido traqueal busca eliminar la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad para evitar el estímulo antigénico y rechazo al injerto permitiendo suprimir la terapia inmunosupresora pero conservando las características básicas estructurales. La utilización del cerdo como biorreactor biológico para la regeneración del tejido se debe a la dificultad de mantener los cultivos celulares primarios estériles por más

de 72 horas condición necesaria para obtener regeneración en un biorreactor tradicional, además de la imposibilidad de su adquisición. Esta opción resulta accesible, factible y mantiene las condiciones de esterilidad durante el proceso de regeneración debido a la respuesta inmune del biorreactor natural y la administración sistémica de antibióticos que protege frente a las infecciones. Este método provee las células madre del epiplón para la regeneración del tejido, suministra los nutrientes, señales biomecánicas y el medio para la eliminación de los desechos. Debido a las alteraciones mecánicas y a la falta de epitelio en los tejidos regenerados como resultado en los experimentos preliminares, se decidió modificar la metodología. Para promover la reepitelialización se utilizó en una matriz la implantación de células epiteliales nasales en la porción interna obtenidas del cerdo receptor, y cumplir con las características normales fisiológicas del tejido original. Con la intención de corregir la rigidez del tejido se utilizó un polímero como reforzamiento en la misma matriz antes de someterse la proceso de regeneración.

### **3.4 Obtención de las matrices**

#### **3.4.1 Descelularización del tejido tráqueal**

Se obtuvieron 8 tráqueas de cerdos sacrificados con otros propósitos, se limpiaron retirando otros tejidos y se lavaron seis veces con tampón fosfato salino (PBS) y antibiótico (moxifloxacino, Avelox, Bayer Sol 400mg/250mL I.V lote BXG8Z21 oct 2015), en esta misma solución se almacenaron a 4°C hasta iniciar los procesos para la descelularización. 2 tráqueas se mantuvieron en criopreservación a -80°C hasta su utilización (Conconi, 2005).

### ***Método con Tritón X-100***

Se utiliza una solución al 0,05% de hidróxido amónico que contiene Tritón X-100 al 0,5% para descelularizar el tejido traqueal, colocando 4 segmentos traqueales en agitación durante 72 horas a 4°C a una velocidad entre (95 y 150 r.p.m.) (Esta solución alcalina solubiliza los componentes citoplasmático y nuclear).

A continuación se lavaron las tráqueas 10 veces con agua destilada, se almacenan a 4°C en PBS 250 ml y antibiótico moxifloxacino 10 ml (Avelox, Bayer Sol 400mg/250mL I.V lote BXG8Z21 oct 2015) hasta su esterilización (Peloso, 2015).

### ***Método detergente-enzimático con Desoxicolato de sodio***

A dos fragmentos (6 cm) de tejido traqueal de cerdo se aplicaron 8 y 17 ciclos de la decelularización cada 48 por 4 horas. Se toma un segmento de tejido traqueal limpio de otros tejidos previamente lavados y preservados por 72 horas a 4°C en PBS y antibiótico (moxifloxacino IV, Avelox 400mg, 10ml), se coloca en un recipiente con 4% de desoxicolato sódico (sigma lot 61K0110) en NaCl 1mmol/L por 4 horas en agitación a temperatura ambiente. Después se toma el tejido y se coloca en un recipiente con agua destilada, se agita por 5 min, se cambia el agua destilada y se repite el proceso 7 veces y se deja en PBS y antibiótico en un recipiente de plástico hermético (250ml y 10 ml de moxifloxacino IV) a 4°C por 48 horas hasta el siguiente ciclo (Conconi, 2005; Jungebluth, 2009). Al finalizar los 8 y 17 ciclos se procedió a continuar con la esterilización.

### **3.5 Esterilización**

Inicia con los lavados durante la descelularización y mantenimiento de la matriz en antibiótico de amplio espectro (moxifloxacino) y se complementa con su exposición a

rayos UV. Se procede a colocar las matrices traqueales en bolsas estériles individuales, plásticas herméticas utilizando una cámara de flujo, se rotulan y posteriormente se exponen rayos UV por 30 minutos después de lo cual se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (Hoyos, 2013; Jones, 2015).

### **3.6 Almacenamiento**

En criopreservación, tras la esterilización, se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización en condiciones ordenadas y controladas (Jones MC, 2015).

### **3.7 Aplicación del polímero en la matriz**

Se formula la mezcla de policaprolactona (PCL) High molecular weight (HMW) más partículas de colágeno tipo V de  $20\ \mu\text{m}$  de tamaño (método castin film) mas solvente orgánico. Se procedió a la formación de multicapas sobre la tráquea de cerdo descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos por el método de spray simple hasta que secó y se almacena a  $4^{\circ}\text{C}$  (Johnson C, 2016).

### **3.8 Obtención e implantación de células epiteliales de la mucosa nasal**

En quirófano previo al procedimiento de regeneración se coloca al cerdo en decúbito supino y bajo anestesia general, 5ml de propofol I.V (200mg/ml, Recofol PiSA Lot No 14276041 Cad 04-07-2016) se aplica antiséptico local, solución de superóxido (Microdacyn, More Pharma) y se toma una muestra de la mucosa nasal colocándola en un tubo de 5ml con un 1 ml de tripsina para la disgregación enzimática, (Trypsin 0.5% -

EDTA 5.2 mM GIBCO BRL Cat No 15400-054, Lot No. 17K7171) trasladándose al laboratorio. Se deja en agitación por 10 min a temperatura ambiente. En condiciones estériles en campana de flujo laminar se neutraliza con 1ml de medio de cultivo DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium 1x low glucose, with low L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate, pyridoxine hydrochloride Cat No. 11885-084 Lot No. 1278668) con penicilina y estreptomina se centrifuga a 2500 r.p.m por 5 minutos, se decanta y el botón se resuspende en 2 ml de solución fisiológica y se traslada a temperatura ambiente al quirófano para su implantación en la tráquea descelularizada con desoxicolato ciclo 17 reforzada con polímero. Se toma una jeringa estéril de 3 ml aspirando el contenido de las células aplicando todo su contenido en la porción interna de la matriz colocada en el epiplón abdominal del cerdo al cual se le realizó la biopsia para su regeneración.

### **3.9 Regeneración del tejido utilizando al cerdo como biorreactor**

Los cerdos Yorkshire utilizados como biorreactores naturales fueron asignados al azar para recibir cada uno diferente matriz colocándola en el epiplón abdominal para su regeneración por distintos periodos después de los cuales se obtuvo el tejido para su análisis.

Matrices utilizadas para la regeneración

1. Tráquea descelularizada con Tritón X100 (DT)
2. Tráquea descelularizada con Desoxicolato con 8 ciclos (DD8)
3. Tráquea descelularizada con Desoxicolato 17 ciclos y reforzada con polímero (DD17R)
4. Tráquea Nativa Criopreservada (NC)

### 3.9.1 Selección de animales de experimentación

Fueron seleccionados 4 cerdos Yorkshire sanos, tres machos y una hembra con pesos entre 23 y 33 kilogramos de peso, con edad entre 4 y 5 meses, se recibieron y cuidaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Tabla 1).

**Tabla 1. Animales de experimentación- Biorreactores naturales**

<b>Tráqueas</b>	<b>Animales</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso</b>	<b>Edad</b>
<b>DT</b>	Cerdo Yorkshire	M	23.8 kg	4 meses
<b>DD8</b>	Cerdo Yorkshire	M	35 kg	5 meses
<b>DD17R</b>	Cerdo Yorkshire	M	33.8 kg	4 meses
<b>NC</b>	Cerdo Yorkshire	H	31.2 kg	4 meses

Tabla 1. Cerdos Yorkshire fueron utilizados como biorreactores naturales cada uno recibió al azar diferente matriz en el proceso de regeneración. La descclularizada con tritón (DT) se colocó en un cerdo masculino de 23.8 kg de peso y de 4 meses de edad. La matriz descclularizada con desoxicolato con 8 ciclos (DD8) se colocó en un cerdo masculino de 35 kg, de 5 meses de edad. En la descclularizada con desoxicolato con 17 ciclos y reforzada con un polímero (DD17R) se utilizó un cerdo masculino de 33.8 kg de 4 meses y la tráquea nativa criopreservada (NC) se implantó en una hembra de 31.2 kg de 4 meses.



### **3.9.2 Preparación de las matrices**

Las matrices y la tráquea nativa criopreservada se descongelaron 12 horas a 4°C antes del procedimiento, se lavaron con solución fisiológica, y se realizó la evaluación de las propiedades mecánicas tomando una muestra para su análisis histológico antes de su implantación.

### **3.9.3 Implantación en el epiplón abdominal**

Se utilizaron cuatro cerdos asignados al azar para recibir una matriz diferente en eventos quirúrgicos independientes (Tabla 1). Los animales fueron premedicados con Clorohidrato de ketamina 3.5 mg/kg (Anesket, PiSA), Clorohidrato de xilacina a 5 mg/kg (Rompun, Bayer) I.M y canalizados con solución Hartman (500 mL). Se anestesiaron con propofol 1.9 mg/kg (Recofol 200mg/20 mL PiSA), para iniciar la cirugía con asepsia y antisepsia, colocando campos, procediendo a realizar incisión abdominal hasta llegar a la cavidad abdominal exponiendo el epiplón donde se envuelven las matrices y la tráquea nativa criopreservada fijándolas con puntos en la pared, se continúa cerrando la pared por planos. Se mantienen en observación hasta su recuperación de la anestesia y reciben antibiótico, 1.5 mL de moxifloxacino intramuscular (Avelox sol 400 mg amp 250 mL, Bayer lot BX68221 oct 2015) 10 mg de prednisona cada 12 hrs vía oral (Meticorten tab 5 mg, Schering-Plough), y analgésico carprofeno 5% 1.2 mL intramuscular cada 24 horas por dos días (Centrovvet, 100 mL/5g, Ehlinger) y caprofeno vía oral 1 tab cada 24 hrs (Carprobay 50 mg Bayer) hasta su siguiente procedimiento y son examinados diariamente registrando datos de inflamación o infección, aplicando moxifloxcino diariamente intramuscular

(Avelox sol 400 mg amp 250 mL, Bayer lot BX68221 oct 2015) (Remlinger, 2010).

### **3.9.4 Obtención de las matrices del epiplón abdominal**

La matriz descelularizada con tritón permaneció 15 días y la matriz descelularizada con desoxicolato, nativa criopreservada y la descelularizada reforzada 8 días. Se procedió con los mismos procedimientos quirúrgicos a la obtención de los tejidos regenerados y realizar la evaluación mecánica e histológica. Todos los animales sobrevivieron al experimento y no mostraron datos de inflamación o infección (Martinod, 2013).

### **3.10 Análisis de las características físicas del tejido**

Fueron evaluadas las matrices antes y después del proceso de regeneración.

#### **3.10.1 Evaluación mecánica**

Fueron evaluadas las matrices antes y después del proceso de regeneración sometiendo el tejido a pruebas manuales de acuerdo a nuestro modelo. Los parámetros fueron rigidez, como respuesta del tejido a la presión, flexibilidad del tejido al flexionarla llegando a su límite y conformación de la tráquea como su capacidad de recuperación a su forma original después de la compresión.

Para evaluar la rigidez se registró el porcentaje en la disminución de la luz traqueal al comprimirla manualmente sin forzarla o lesionarla, en una escala en donde el 0% refleja el lumen cerrado y el 100% totalmente abierto (Tabla 2).

**Tabla 2. Modelo de evaluación de la rigidez del tejido traqueal**

<b>Rigidez</b>	<b>0%</b>	<b>0-25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>50-75%</b>	<b>75-100%</b>	<b>100%</b>
----------------	-----------	--------------	---------------	---------------	----------------	-------------

La flexibilidad o capacidad de flexión del tejido se determinó doblando suavemente la tráquea iniciando con el tejido sin flexionar con 180° asignando un valor de 0° o 0% hasta llegar a flexionarla totalmente a 30° con una flexibilidad de 150° y 83% de flexibilidad (Tabla 3).

**Tabla 3. Modelo de evaluación de la flexibilidad del tejido traqueal**

	<b>180°</b>	<b>140°</b>	<b>130°</b>	<b>120°</b>	<b>110°</b>	<b>90°</b>	<b>50°</b>	<b>30°</b>
<b>Flexibilidad</b>	<b>(0°)</b>	<b>(40°)</b>	<b>(50°)</b>	<b>(60°)</b>	<b>(70°)</b>	<b>(90°)</b>	<b>(130°)</b>	<b>(150°)</b>
	<b>0%</b>	<b>22%</b>	<b>27%</b>	<b>33%</b>	<b>38%</b>	<b>50%</b>	<b>72%</b>	<b>83%</b>

La conformación fue evaluada después de la compresión de la tráquea y liberándola valorando el porcentaje en la recuperación de la forma original, si es total es del 100% y si no hay recuperación será de 0% con valor de 0 (Weidenecher M, 2008) (Tabla 4).

**Tabla 4. Modelo de evaluación de la conformación del tejido traqueal**

<b>Conformación</b>	<b>0%</b>	<b>0-25%</b>	<b>25-50%</b>	<b>50-75%</b>	<b>75-100%</b>	<b>100%</b>
---------------------	-----------	--------------	---------------	---------------	----------------	-------------

### **3.10.2 Análisis histológico macroscópico**

Se analizaron las características macroscópicas de las matrices y el tejido regenerado

evaluando la luz traqueal, la superficie externa, la presencia de necrosis, los vasos sanguíneos, neoformación e integración del tejido.

### **3.10.3 Análisis histológico microscópico**

Para el análisis histológico microscópico se tomó un fragmento de la tráquea fresca como control de las matrices descelularizadas, de la tráquea nativa criopreservada y de la matriz reforzada así como de los tejidos regenerados. Las muestras se embebieron en parafina para realizar cortes de 5  $\mu\text{m}$ , se fijaron y tiñeron con eosina y hematoxilina. Por microscopía óptica (Microscopio Leica DM 2000 lámpara Mycrosystems tipo 11307072057/BZ:12 Hg100w procesador Leica application suite V3.1.0) se evaluaron las características estructurales como la presencia del epitelio, submucosa, cartílago, fibrosis, vasos sanguíneos, inflamación, en relación al control (Weidenecher, 2008).

### **3.11 Análisis casuístico**

Se realizó un análisis casuístico, que consistió en registrar y recopilar de los distintos casos, los datos pertinentes de las variables con el propósito de formar un criterio sobre casos análogos y que serían los esperados en el mismo contexto (Jonsen, 1989).

## **4. Resultados**

### **4.1 Descripción de los procedimientos de recolección y análisis de datos**

Se evaluaron las diferencias en las características físicas mecánicas e histológicas de las matrices y de los tejidos regenerados, en relación con los diferentes procedimientos para su

obtención.

## 4.2 Matrices traqueales

Se obtuvieron tres matrices descelularizadas y una tráquea criopreservada sin tratamiento.

Las cuales fueron sometidas al proceso de regeneración en el biorreactor natural

1. Tráquea descelularizada con Tritón X100 (DT)
2. Tráquea descelularizada con Desoxicolato con 8 ciclos (DD8)
3. Tráquea descelularizada con Desoxicolato 17 ciclos y reforzada con polímero y células epiteliales (DD17R)
4. Tráquea Nativa Criopreservada (NC)

### 4.2.1 Evaluación mecánica de las matrices

Las matrices descelularizadas con tritón o desoxicolato y la tráquea nativa criopreservada no mostraron diferencias significativas en la evaluación de las propiedades mecánicas, como la capacidad de rigidez, flexibilidad y conformación en comparación con la tráquea control excepto la matriz descelularizada con 17 ciclos reforzada con polímero (Tabla 5).

**Tabla 5. Evaluación de las propiedades mecánicas de las matrices**

<b>Matriz</b>	<b>Rigidez</b>	<b>Flexibilidad</b>	<b>Conformación</b>
<b>Tráquea Nativa (N)</b>	80%	22%	100%

<b>Descelularizada Tritón (DT)</b>	60%	33%	75%
<b>Descelularizada Desoxicolato (DD8)</b>	70%	33%	80%
<b>Descelularizada Desoxicolato (DD17)</b>	60%	38%	75%
<b>Descelularizada Reforzada (DD17R)</b>	100%	0%	0%
<b>Nativa Criopreservada (NC)</b>	75%	27%	100%

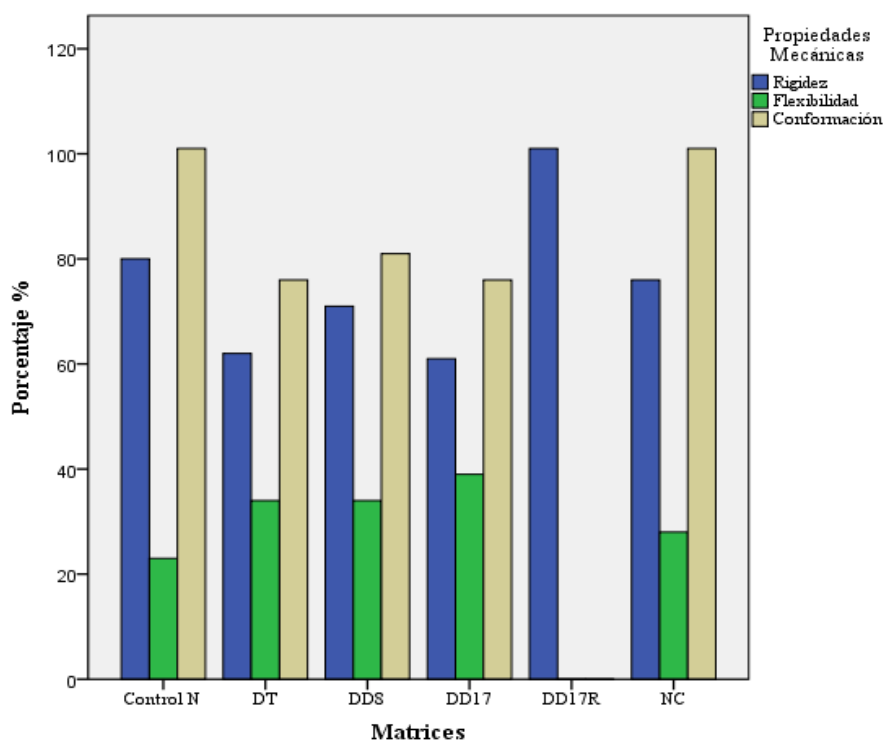
Tabla 5. La tráquea nativa como control mostró una reducción del 80% de la luz traqueal (el 100% refleja el lumen totalmente abierto) al comprimirla manualmente sin forzarla como evaluación de su rigidez. La matriz descelularizada con tritón y la descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos disminuyó su rigidez al mostrar un 60% de la luz traqueal a la compresión, la descelularizada con desoxicolato con 8 ciclos 70% y la reforzada con polímero aumentó al no reducir la luz a la presión con un 100%. La tráquea criopreservada presentó una luz traqueal del 75% a la compresión.

La flexibilidad o capacidad de flexión de la tráquea nativa se determinó doblando suavemente la tráquea control iniciando a partir de 180° que es la posición totalmente recta, hasta donde tuvo la capacidad de llegar a un ángulo de 140° con una flexibilidad de 40° ó 22%. La matriz descelularizada con tritón y desoxicolato con 8 ciclos llegó a los 120° con

una capacidad de 60<sup>o</sup> ó 33% de flexión. La descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos tuvo mayor flexión llegando a 110<sup>o</sup> ó 38%. La matriz reforzada con el polímero no tuvo capacidad de flexionarse 0<sup>o</sup> ó 0% y la nativa criopreservada llegó a 130<sup>o</sup> con una capacidad de flexión de 50<sup>o</sup> ó 27%.

La conformación es la capacidad de recuperar la forma original después de la compresión, si es total es del 100%. La tráquea nativa control recuperó su forma en un 100%, la descelularizada con tritón un 75%, con desoxicolato 8 ciclos un 80% y con 17 ciclos un 75%, la reforzada no tuvo esta capacidad con un 0% y la nativa criopreservada tuvo un 100% . Dichos resultados son mostrados a continuación en la gráfica 1.

**Gráfica 1. Propiedades mecánicas de las matrices**



Gráfica 1. Las propiedades mecánicas de las matrices de rigidez, flexión, y conformación de la tráquea nativa control (N), en relación con la matriz descelularizada con tritón (DT) la cual mostró disminución en su rigidez y conformación y aumentó su flexibilidad, al igual que la descelularizada con desoxicolato 8 ciclos (DD8), y la descelularizada con desoxicolato 17 ciclos (DD17), la NC presentó características similares. La descelularizada con desoxicolato 17 ciclos y reforzada con el polímero (DD17R)) aumentó su rigidez a un 100% pero disminuyó drásticamente su flexión y conformación perdiendo esta capacidad.

#### **4.2.2 Evaluación histológica macroscópica de las matrices**

La tráquea nativa utilizada como control después de eliminar manualmente todo el tejido circundante, presentaba una superficie externa rosada con la luz traqueal intacta con vasos sanguíneos en la fascia externa. La tráquea descelularizada con tritón y desoxicolato mostró una superficie blanca translúcida, con la luz sin cambios sin falta de continuidad del cartílago y sin vasos sanguíneos en la fascia externa. La tráquea nativa criopreservada tenía un color rosado tenue y translúcida con la luz traqueal normal y con presencia de pocos vasos sanguíneos en la fascia externa en relación a la tráquea nativa. La tráquea descelularizada con desoxicolato por 17 ciclos y reforzada con el polímero presentó una superficie externa blanca brillante y rígida con la luz traqueal sin anomalía, sin vasos sanguíneos externos (Figura 3).



**Figura 3. Características histológicas macroscópicas de las matrices**



Figura 3. La fotografía (A) representa la tráquea nativa (N) la (B) la tráquea descelularizada con tritón X100 (DT), la (C) tráquea descelularizada con desoxicolato con 8 ciclos (DD8), la (D) la tráquea nativa criopreservada (NC) y la (E) tráquea descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos y reforzada con el polímero (DD17R).

#### **4.2.3 Evaluación histológica microscópica de las matrices**

En la evaluación histológica microscópica la tráquea nativa presentó su arquitectura normal con un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado, submucosa con presencia de glándulas y cartílago íntegro con fibras musculares. Las matrices descelularizadas con tritón (DT) y desoxicolato (DD8) no presentaron epitelio, glándulas y vasos sanguíneos, el cartílago estructuralmente conservado encontrando condrocitos residuales y se visualizaron algunas fibras musculares sin células viables. En la tráquea nativa criopreservada se encontró el epitelio y submucosa sin cambios, condrocitos y fibras musculares íntegros.

**Tabla 6. Evaluación de las características histológicas microscópicas de las matrices**

Matriz	Epitelio	Submucosa (Glándulas)	Cartílago	Vasos sanguíneos	Tejido Reparación	Tejido Adiposo	Infiltrado Inflamatorio
--------	----------	-----------------------	-----------	------------------	-------------------	----------------	-------------------------

<b>N</b>	+	+++++	+++++	+++++	-	-	-
<b>DT</b>	-	-	+++	-	-	-	-
<b>DD8</b>	-	-	++++	-	-	-	-
<b>NC</b>	+	+++++	+++++	++++	-	-	-
<b>DD17R</b>	-	-	+++	-	-	-	-

La matriz descelularizada con desoxicolato y reforzada con el polímero no mostró epitelio ni submucosa y el cartílago con pérdida de condrocitos, sin presencia de fibras musculares, el polímero recubría la superficie externa de la matriz, mostrándose en la tabla 6 y figura 4.

**Figura 4. Características histológicas microscópicas de las matrices**

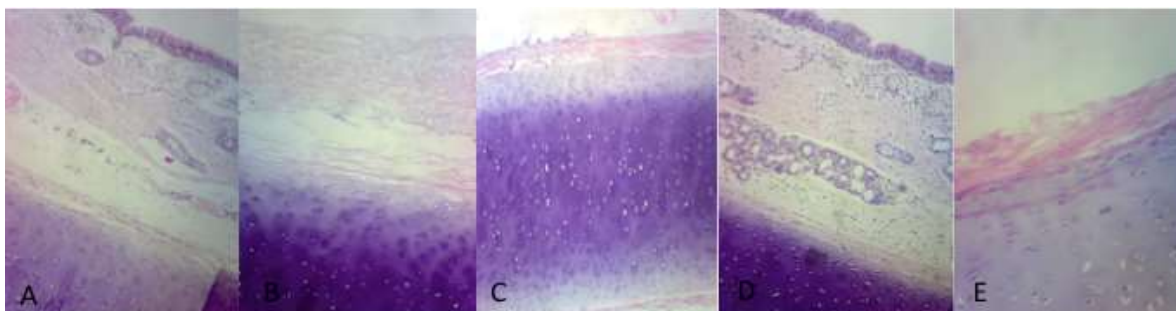


Figura 4. Imágenes histológicas de las matrices. La imagen (A) es la tráquea nativa (N) utilizando el objetivo 10x, la (B) la tráquea descelularizada con tritón X100 (DT) con objetivo 10x, la (C) tráquea descelularizada con desoxicolato con 8 ciclos (DD8) objetivo 10x, la (D) es la tráquea nativa criopreservada (NC) con objetivo 10x, la fotografía (E) tráquea descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos y reforzada con polímero (DD17R) en objetivo 40x.

### **4.3 Evaluación *in vivo***

Todos los animales que recibieron la implantación de las matrices y de la tráquea nativa criopreservada sobrevivieron al experimento y no presentaron datos de inflamación, infección o deterioro en su salud (Figuar 5).

**Figura 5. Animales utilizados como biorreactores naturales**



Figura 5. Los cerdos utilizados como biorreactores naturales al colocar las matrices en el epiplón abdominal, todos sobrevivieron a los procedimientos.

### **4.4 Matrices traqueales regeneradas**

Se obtuvieron las matrices después del proceso de regeneración en el epiplón de los cerdos como biorreactores naturales.

#### **4.4.1 Evaluación mecánica de las matrices regeneradas**

A la evaluación de las propiedades mecánicas, la matriz descelularizada con tritón después de 15 días de regeneración se deformaba fácilmente a la presión mecánica en comparación con la descelularizada con desoxicolato con 8 ciclos que permanecieron 8 días en

regeneración, las cuales demostraron ser más rígidas. La flexibilidad de las matrices regeneradas fue mucho mayor que el control y después de la presión volvían parcialmente a su forma original en comparación con el control. La tráquea nativa criopreservada también perdió rigidez, aumentó su flexibilidad y disminuyó su conformación. La matriz reforzada con el polímero después de la regeneración seguía rígida con la misma disminución de la flexibilidad e incapacidad de regresar a su forma después de la presión (Tabla 7).

**Tabla 7. Evaluación de las propiedades mecánicas de las marices regeneradas**

<b>Tráquea</b>	<b>Tiempo de regeneración</b>	<b>Rigidez</b>	<b>Flexibilidad</b>	<b>Conformación</b>
<b>Nativa (N)</b>	0	80%	22%	100%
<b>Descelularizada Tritón (DT)</b>	15 días	25%	83%	25%
<b>Descelularizada Desoxicolato (DD8)</b>	8 días	30%	73%	50%
<b>Descelularizada Reforzada (DD17R)</b>	8 días	100%	0%	0%
<b>Nativa Criopreservada (NC)</b>	8 días	50%	50%	75%

Tabla 7. Comparación de las propiedades mecánicas de las matrices regeneradas en relación con el tiempo que permanecieron en el epiplón del cerdo como biorreactor. La tráquea nativa (N) no fue sometida a este proceso mostrando sus características normales

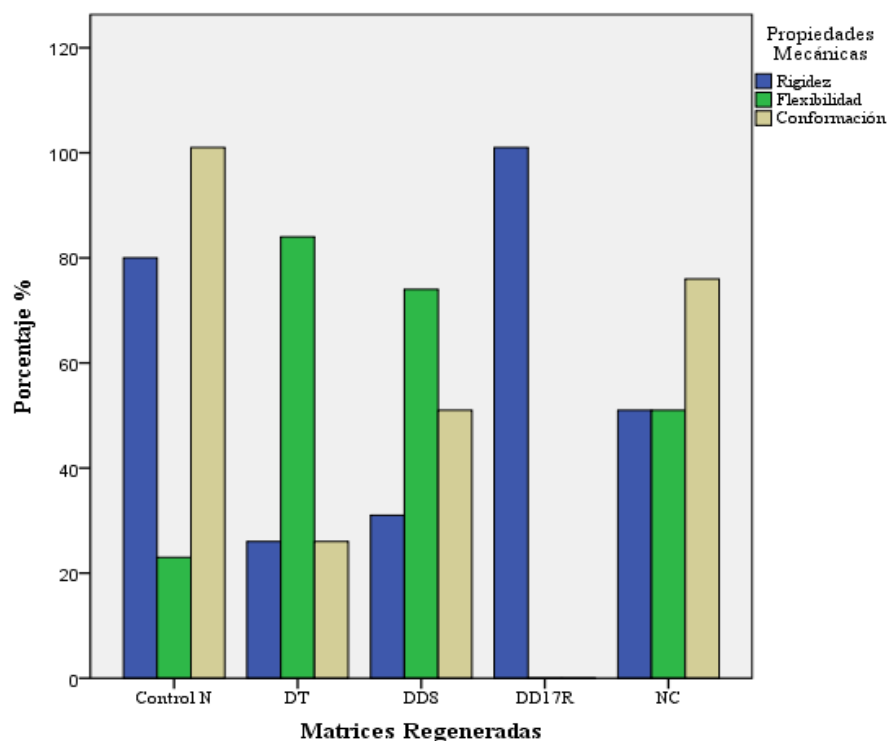
como control. La tráquea descelularizada con tritón (DT) con un tiempo de regeneración de 15 días disminuyó su rigidez mostrando a la presión una luz del 25% la descelularizada con desoxicolato 8 ciclos (DD8) fue del 30% permaneciendo ocho días, la reforzada (DD17R) se encontró muy rígida con una luz del 100% y su permanencia en el biorreactor fue de 8 días al igual que la tráquea nativa criopreservada (NC) la cual también disminuyó su rigidez con un lumen a la presión del 50%.

La flexibilidad y el grado de flexión de una tráquea nativa es de  $140^{\circ}$  o 22%, la matriz descelularizada con tritón y regenerada por 15 días alcanzó los  $30^{\circ}$  u 83% aumentando su flexibilidad  $110^{\circ}$ . La descelularizada con desoxicolato 8 ciclos se flexionó  $50^{\circ}$  aumentando su flexibilidad  $90^{\circ}$  o 73%. La descelularizada con 17 ciclos reforzada con polímero no se flexionó disminuyendo su flexibilidad permaneciendo en posición de  $180^{\circ}$  o 0% y la nativa criopreservada alcanzó  $90^{\circ}$  aumentando su flexibilidad  $50^{\circ}$  o 50%.

La conformación como capacidad de volver a la forma original solo la alcanza totalmente en un 100% la nativa control, la matriz descelularizada con tritón y regenerada 15 días volvía a su conformación en un 25% la descelularizada con desoxicolato con 8 ciclos y regenerada por 8 días fue de un 50%, la DD17R no recuperó su forma 0% y la nativa criopreservada presentó una conformación del 75%.

La evaluación de las propiedades mecánicas de las matrices regeneradas en relación al control se muestran en la gráfica 2.

**Gráfica 2. Propiedades mecánicas de las matrices regeneradas**



Gráfica 2. Las propiedades mecánicas de rigidez, flexión y conformación de la tráquea nativa control (N) es comparada con la matrices regeneradas. La matriz descelularizada con tritón (DT) regenerada mostró una dismunución de su rigidez, y conformación con aumento notable de la flexibilidad. La matriz descelularizada con desoxicolato 8 ciclos (DD8) regenerada presentó menor decremento de la rigidez y conformación con incremento de la flexibilidad. La matriz descelularizada con desoxicolato 17 ciclos (DD17) reforzada con el polímero y regenerada no tuvo cambios, conservando su rigidez, flexibilidad y conformación. La tráquea nativa criopreservada (NC) disminuyó su rigidez y conformación y aumentó su capacidad de flexión.

#### 4.4.2 Evaluación histológica macroscópica de las matrices regeneradas

Las matrices descelularizadas con tritón y desoxicolato regeneradas mostraron evidencias macroscópicas de revascularización en la superficie externa y neoformación de tejido y bien integrado en la superficie externa e interna, no mostraban datos de necrosis o infección. La DT presentaba macroscópicamente mejor definición de los anillos traqueales que las DD8, NC y DD17R. En la tráquea nativa criopreservada se observó tejido inflamatorio superficial con neoformación de tejido y vasos bien integrados a su superficie. Todas conservaron la luz con reducción en su diámetro ya que el espesor total de la pared era mayor al de una tráquea nativa por la regeneración de tejido. En la matriz descelularizada y reforzada con el polímero mostró tejido inflamatorio en la superficie externa y mayormente en la interna que obliteraba la luz en sus extremos (Figura 6).

**Figura 6. Características histológicas macroscópicas de las matrices regeneradas**



Figura 6. La imagen (A) es la tráquea nativa control, (B) la tráquea descelularizada con Tritón X100, regenerada (C) la tráquea descelularizada con desoxicolato con 8 ciclos regenerada, (D) la tráquea nativa criopreservada regenerada, (E) la tráquea descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos reforzada con polímero y regenerada.

#### 4.4.3 Evaluación histológica microscópica de las matrices regeneradas

En la evaluación histológica microscópica la tráquea nativa como control presentó su arquitectura normal con un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado, submucosa, cartílago y capa muscular íntegros. Las matriz DT regenerada presentó un epitelio no respiratorio en la parte central con generación de membrana basal y tejido conectivo laxo, en lugar de la submucosa fibrosis y proliferación de fibroblastos y vasculogénesis (+) el cartílago con pérdida de condrocitos, la neoformación incluyó tejido de reparación (++) tejido adiposo en la porción interna y externa (++) e infiltrado inflamatorio (+). La DD8 presentó como epitelio células alargadas y tejido conectivo laxo en lugar de la submucosa tejido fibrótico, con vasculogénesis (++) el cartílago conservado con tejido de reparación (++) tejido adiposo en la porción interna (++) e infiltrado inflamatorio (++)).

**Tabla 8. Evaluación de las características microscópicas de las matrices regeneradas**

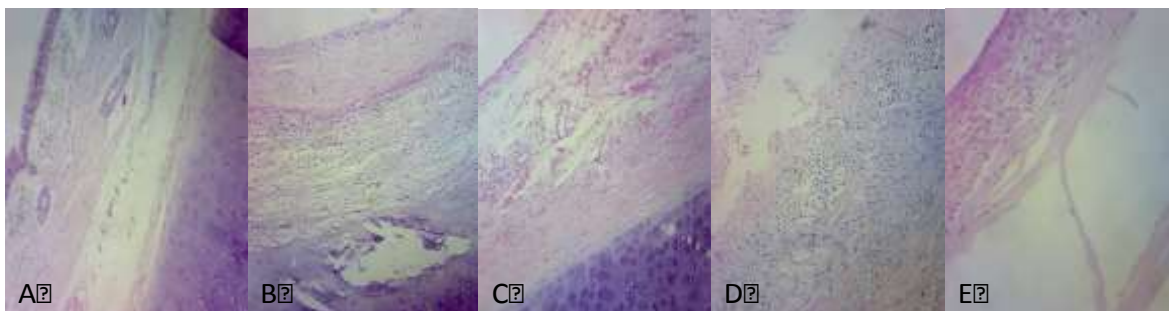
Matriz	Tiempo Regeneración	Epitelio	Submucosa (glándulas)	Cartílago	Vasos sanguíneos	Tejido Reparación (fibrosis)	Tejido Adiposo	Infiltrado inflamatorio
N	0	+	+++++	+++++	+++++	-	-	-
DT	15 días	+	-	+++	+	++	++	+
DD8	8 días	+	-	++++	++	++	++	++
NC	8 días	-	+++	++	++	+++	+++	+++
DD17R	8 días	-	-	-	++	+	+++	+++++

La NC regenerada no presentó epitelio, con glándulas en la submucosa, fibrosis y vasculogénesis (++) el cartílago con pérdida de la matriz el tejido de reparación se valoró



en (+++) y tejido adiposo en la porción interna (+++) con infiltrado inflamatorio (+++). En la DD17R regenerada no se observó epitelio ni submucosa con fibrosis, vasculogénesis (++) y cartílago perdido, el tejido de reparación (+), tejido adiposo en la porción interna (+++), infiltrado inflamatorio (+++++) con células gigantes multinucleares delimitando el polímero que se encontró desprendido en ciertas zonas, esquematizado en la tabla 8 y figura 7.

**Figura 7. Evaluación de las características histológicas microscópicas de las matrices regeneradas**

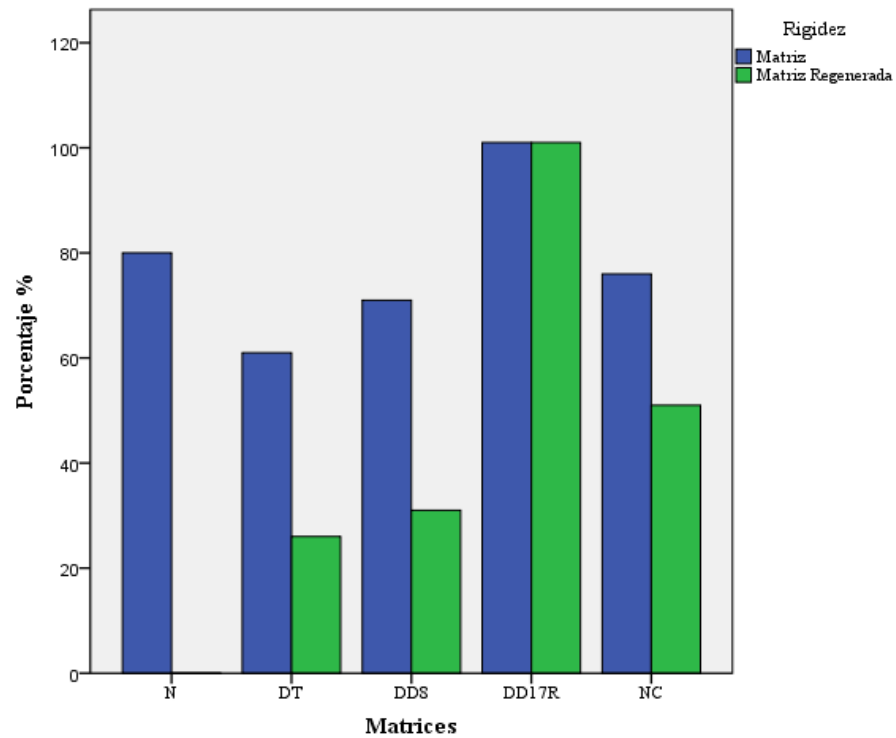


La Figura 7. Cortes histológicos de las matrices traqueales regeneradas (10x). La imagen (A) es la tráquea nativa (N), la (B) es la tráquea descelularizada con tritón X100 (DT). La (C) en la tráquea descelularizada con desoxicolato con 8 ciclos (DD8), la fotografía (D) es la tráquea nativa criopreservada (NC) y la (E) la tráquea descelularizada con desoxicolato y reforzada con polímero y células epiteliales (DD17R).

#### **4.5 Evaluación mecánica comparativa de las matrices y el tejido regenerado**

La evaluación de la característica de rigidez para las matrices y el tejido regenerado de forma comparativa se observa en la gráfica 3.

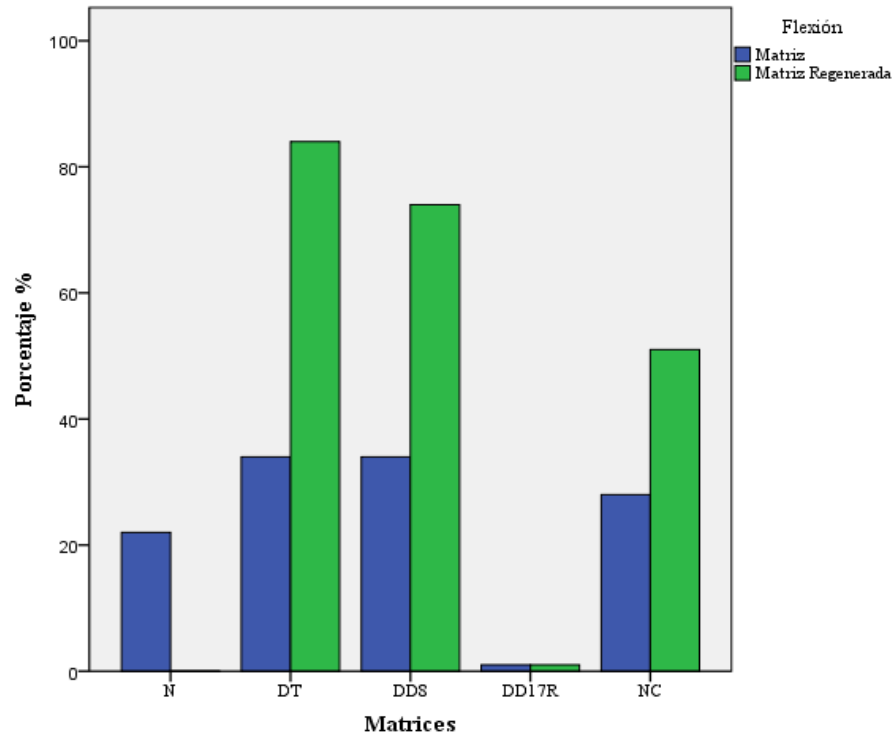
**Gráfica 3. Evaluación mecánica de rigidez de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control**



Gráfica 3. Evaluación de la rigidez de las matrices en comparación con el tejido regenerado.. La tráquea nativa como control (N) presentó una rigidez del 80%. La matriz DT de un 60% después de la regeneración disminuyó a 25%. La DDS antes de la regeneración 70% y después 30%. La rigidez de la matriz DD17R antes y después de la regeneración fue del 100%. Antes del proceso de regeneración la tráquea nativa criopreservada mostró una rigidez del 75% y después un 50% .

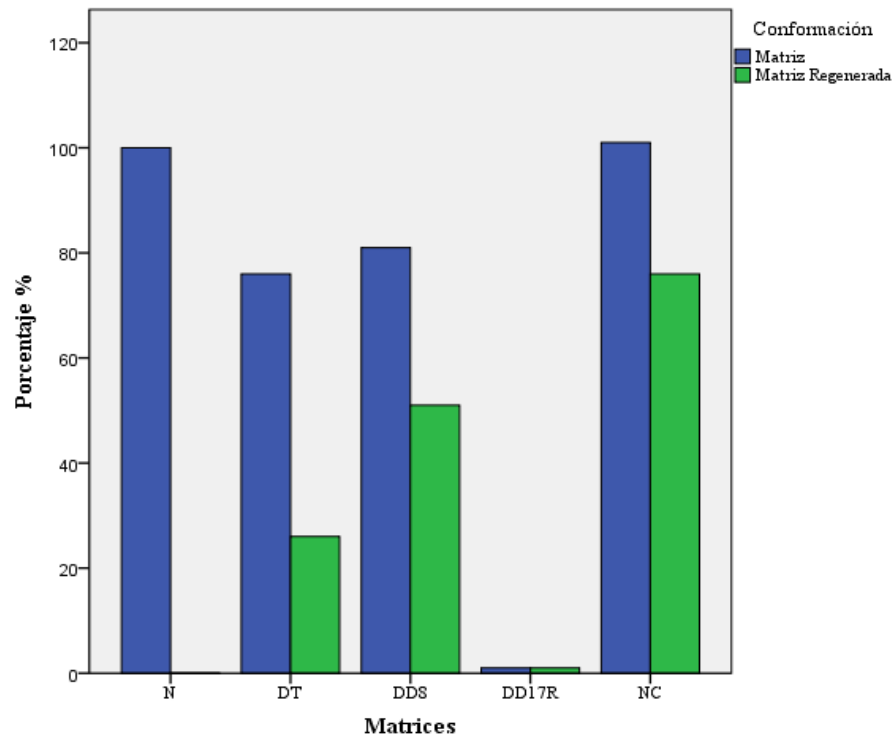
La evaluación mecánica comparativa de la propiedad de flexión de las matrices y el tejido regenerado se muestra en la siguiente gráfica.

**Gráfica 4. Evaluación mecánica de flexión de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control**



Gráfica 4. Propiedades de flexión de las matrices en comparación con el tejido regenerado. La N representa la capacidad de flexión de la tráquea nativa como control con un 22%. La matriz DT con una flexibilidad del 33% aumentó en la regeneración a 83%. La DDS antes del proceso de regeneración se flexionaba en un 33% y después llegaba a un 73%. La DD17R no presentó flexibilidad antes y después con un 0%. La tráquea nativa criopreservada (NC) presentó un 27% y regenerada se incrementó a un 50%.

**Gráfica 5. Evaluación mecánica de conformación de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control**



Gráfica 5. Evaluación de la conformación de las matrices y del tejido regenerado. La N representa la conformación normal de la tráquea nativa como control con un 100% de capacidad de volver a su forma original. La matriz DT volvía a su forma en un 75% y regenerada el 25%. La DD8 como matriz permitía una conformación del 80% y después de la regeneración disminuyó a 50%. La DD17R antes y después del proceso de regeneración perdió esta capacidad con un 0%. La nativa criopreservada de un 100% después del tratamiento de regeneración llegó a 75%.

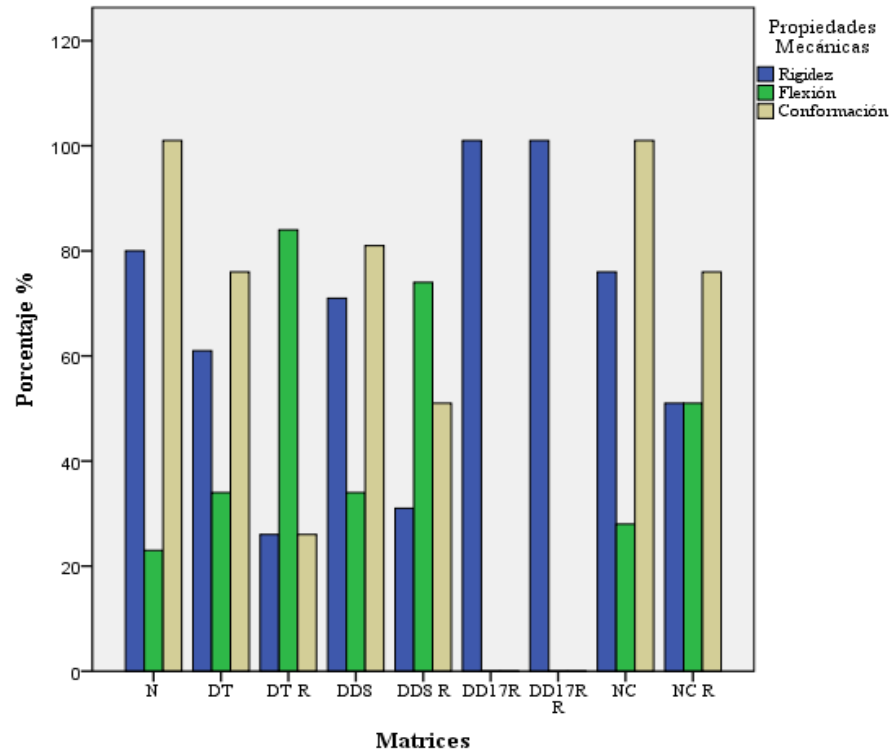
La evaluación comparativa entre las matrices y los tejidos regenerados de las características mecánicas de rigidez, flexibilidad y conformación se observan en la siguiente tabla.

**Tabla 9. Evaluación mecánica comparativa de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control**

Tráquea	Rigidez		Flexibilidad		Conformación	
	Matriz	Regenerada	Matriz	Regenerada	Matriz	Regenerada
<b>Nativa Control (N)</b>		<b>80%</b>		<b>22%</b>		<b>100%</b>
<b>Descelularizada Tritón (DT)</b>	60%	<b>25%</b>	33%	<b>83%</b>	75%	<b>25%</b>
<b>Descelularizada Desoxicolato (DD8)</b>	70%	<b>30%</b>	33%	<b>73%</b>	80%	<b>50%</b>
<b>Descelularizada Reforzada (DD17R)</b>	100%	<b>100%</b>	0%	<b>0%</b>	0%	<b>0%</b>
<b>Nativa Criopreservada (NC)</b>	75%	<b>50%</b>	27%	<b>50%</b>	100%	<b>75%</b>

Tabla 9. Relación de las características mecánicas de las matrices con el tejido regenerado y el control. La tráquea nativa control (N) muestra valores normales de rigidez, flexibilidad y conformación. La DT disminuyó su rigidez de 60% a 25% y su conformación de 75% a 25% y aumentó su flexibilidad de 33% a 83%. La DD8 decreció su rigidez de 70% a 30%, y su conformación de 80% a 50% y aumentó su flexibilidad de 33% a 73%. La DDR17 inició y terminó con una rigidez del 100% con nula capacidad de flexión y conformación (0%). La nativa criopreservada (NC) con rigidez del 75% pasó a 50% aumentando su flexibilidad de 27% a 50% con pérdida en la conformación de 100% a 75%.

**Gráfica 6. Características mecánicas de rigidez, flexibilidad y conformación de las matrices en relación con el tejido regenerado y el control**



Gráfica 6. Evaluación comparativa de las características mecánicas de las matrices y del tejido regenerado. Se muestran comparativamente las características de rigidez, flexibilidad y conformación, las matrices no mostraron diferencias significativas excepto la DD17R. Después del proceso de regeneración se encontraron en todas las características cambios significativos en relación a las matrices y al control.

Las siguientes figuras muestran las diferencias en las características macroscópicas entre las matrices antes y después del proceso de regeneración en el biorreactor natural.

**Figura 8. Características macroscópicas de la matriz descelularizada con tritón y regenerada en el biorreactor natural**

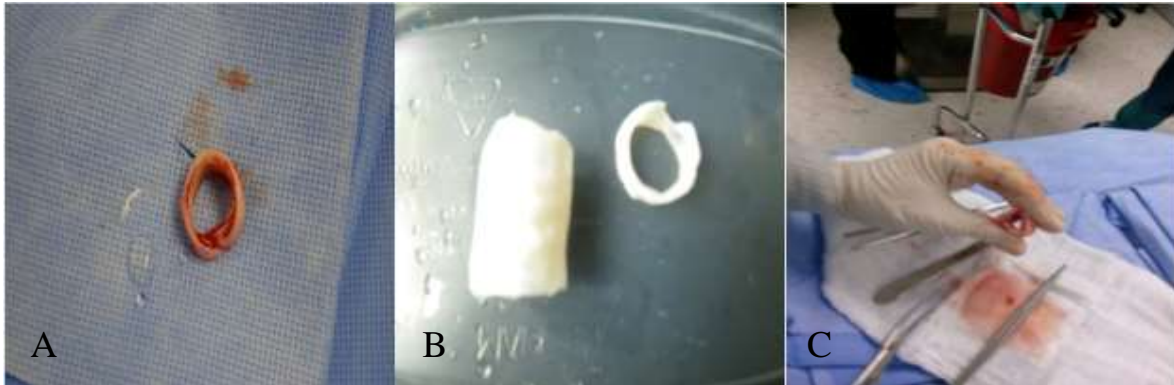


Figura 8. Imágenes de la tráquea nativa como control (A), la matriz descelularizada con tritón, (B) y después de la regeneración en el biorreactor natural (C).

**Figura 9. Características macroscópicas de la matriz descelularizada con desoxicolato con ocho ciclos y regenerada en el biorreactor natural**

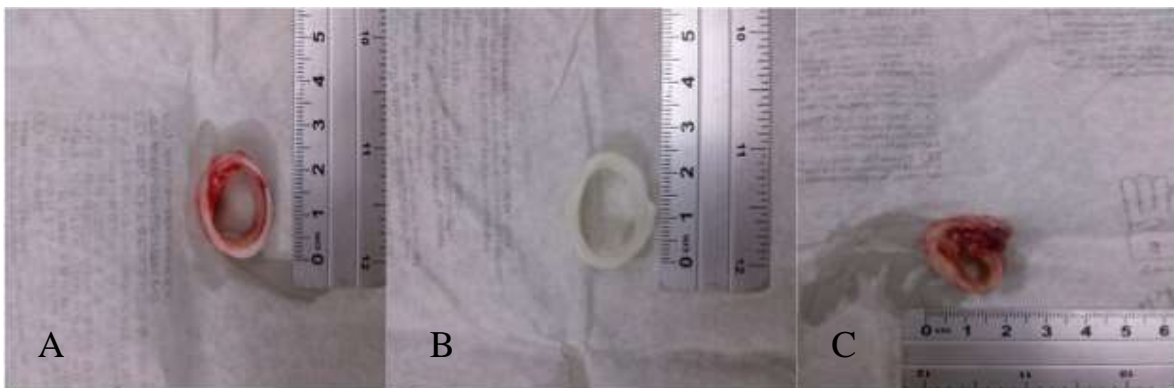


Figura 9. Imágenes de la tráquea nativa como control (A), la matriz descelularizada con desoxicolato con ocho ciclos (B) y después de la regeneración en el biorreactor natural (C).

**Figura 10. Características macroscópicas de la matriz  
descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos reforzada con polímero  
y regenerada en el biorreactor natural**



Figura 10. Imágenes de la tráquea nativa como control (A), la matriz descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos y reforzada con polímero (B) y después de la regeneración en el biorreactor natural (C).

**Figura 11. Características macroscópicas de la tráquea nativa criopreservada y  
regenerada en el biorreactor natural**

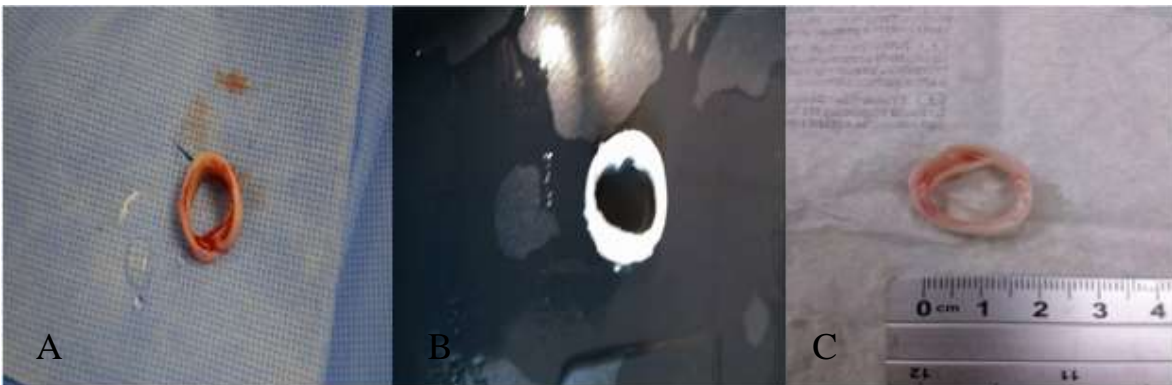


Figura 11. Imágenes de la tráquea nativa como control (A), la tráquea nativa criopreservada (B) y después de la regeneración en el biorreactor natural (C).



## 5. Conclusiones

### 5.1 Métodos para la descelularización y obtención de las matrices

Por medio de ingeniería tisular se obtuvieron las matrices, se utilizó tritón como detergente no enzimático y desoxicolato como método enzimático, promoviendo la eliminación de células como el epitelio para reducir la inmunogenicidad, los condrocitos fueron más resistentes a este proceso debido a que son menos accesibles. En la DT y DD8 se conservaron algunas fibras musculares y fueron eliminadas totalmente en la DD17R demostrando más eficiencia en la descelularización realizando más ciclos con desoxicolato (Liu, 2000; Jungebluth, 2012). El proceso con tritón fue más rápido, sencillo y económico que el utilizado con desoxicolato con 8 ciclos sin tener muchas diferencias en las matrices obtenidas. A la evaluación de las características mecánicas, las matrices no mostraron diferencias significativas en relación con la tráquea nativa control debido a que se conservó la integridad estructural del cartílago (Hung SH, 2016).

Se probó el método detergente enzimático ya que otros autores presentan evidencias de su utilidad para generar matrices al estimular *in vivo* el crecimiento de células y la formación de matriz extracelular para la neoformación de tejido durante el proceso de regeneración (Remlinger, 2010; Martinod, 2013, Hamilton, 2014), sin embargo después de este proceso no hubo diferencias en la formación de tejido en la DT. La tráquea nativa criopreservada no fue sometida a ningún método de descelularización y solo fue preservada en congelación, conservando su epitelio, arquitectura, por tanto su inmunogenicidad y sus características mecánicas no mostraron cambios en relación al control. Otros autores reportan que este método de preservación puede descelularizar el epitelio tráqueal, hecho que no fue

confirmado en este trabajo (Candas F, 2016).

## **5.2 Los cerdos como biorreactores**

La regeneración de las matrices se realizó en el epiplón de cerdos como biorreactores naturales para promover la neoformación de tejido y vasos sanguíneos. Se optó por este método debido a lo costoso de los biorreactores mecánicos y la dificultad en mantener los cultivos celulares primarios. Todos los cerdos utilizados sobrevivieron a los procedimientos y no presentaron evidencia de inflamación o infección. Las matrices en el biorreactor generaron tolerancia inmunológica confirmando el éxito del proceso de descelularización. Fueron probados diferentes tiempos de permanencia de las matrices en el biorreactor, la exitosa implantación en el epiplón permitió la interacción de las matrices con elementos indispensables como células madre (por ser un tejido adiposo) y moléculas en un medio dinámico, controlable y reproducible así como esterilidad por estar protegido por el sistema inmunológico con ayuda del antibiótico sistémico administrado (Lin, 2009; Jana, 2013; Jungebluth, 2012). Como sistema hermético el biorreactor natural permite el suministro de nutrientes, eliminación de desechos y apoya la actividad metabólica por su gran vascularización (Zheng, 2014; Delaere, 2010).

## **5.3 Regeneración de las matrices**

El tiempo que permanecieron las matrices en el biorreactor está relacionada con las modificaciones de las características mecánicas del tejido regenerado. La matriz descelularizada con tritón después de 15 días era menos rígida en comparación con la DD8 que permaneció 8 días debido probablemente a la falta de fuerzas de tensión y

cizallamiento durante su permanencia en el epiplón (Kajbafzadeh, 2014). Otros factores relacionados con las alteraciones mecánicas se debieron probablemente a un tratamiento drástico en la descelularización de las matrices o a la criopreservación. Por tanto se decidió reforzar el tejido descelularizado con desoxicolato con un polímero antes del proceso de regeneración para mejorar las características mecánicas, se logró incrementar la rigidez pero disminuyó la flexibilidad y la capacidad de regresar a la forma original después de la presión.

La regeneración en las matrices se logró satisfactoriamente ya que macroscópicamente las DT y DD8 presentaron evidencia de revascularización en la superficie externa y neoformación de tejido bien integrado a la matriz y no presentaron necrosis o infección. No se encontraron diferencias significativas salvo la definición más clara de los anillos traqueales en la DT en comparación con las DD8, NC y DD17R. En la tráquea nativa criopreservada se observó neoformación de tejido predominantemente inflamatorio debido a que conservó su inmunogenicidad al conservar su epitelio y expresar complejo mayor de histocompatibilidad, sin embargo la respuesta no fue tan intensa como la inducida por un tejido fresco debido a la criopreservación. Todas conservaron la luz con reducción en su diámetro ya que el espesor total de la pared era mayor al de una tráquea nativa por la regeneración de tejido. En la matriz descelularizada y reforzada con el polímero la regeneración se presentó sobre todo en la porción interna ya que el polímero impidió la neoformación en la pared externa y limitó la revascularización, también fue reconocido como cuerpo extraño generando una respuesta inflamatoria intensa obliterando la luz.

Microscópicamente las matriz DT regeneró un epitelio que no era el respiratorio y una membrana basal con tejido conectivo laxo debido a la falta de factores de crecimiento

específicos, la submucosa se fibrosó con proliferación de fibroblastos como tejido de reparación por la infiltración de células inflamatorias, hubo una exitosa revascularización que permitió la neoformación de tejido predominantemente adiposo y evitó la necrosis, pero en menor proporción que las otras matrices y el cartílago perdió condrocitos. En la DD8 también se formó un tejido parecido a un epitelio pero no el respiratorio y tejido conectivo laxo sin membrana basal, en la submucosa se logró la generación de vasos sanguíneos mayor que DT pero con tejido fibrótico como tejido de reparación, células inflamatorias y el cartílago se observó conservado, en la superficie externa se generó tejido adiposo que no se presenta en la tráquea normal. En la tráquea nativa criopreservada no se encontró el epitelio debido a su destrucción por la respuesta inmunológica del biorreactor ya que conservó su inmunogenicidad y por ello el proceso inflamatorio fue mayor responsable de la pérdida de matriz en el cartílago así como el tejido de reparación y la formación de tejido adiposo, la vasculogénesis en la misma proporción que la DD8. La matriz descelularizada con desoxicolato con 17 ciclos y reforzada con el polímero no mostró epitelio a pesar de la inoculación de células epiteliales respiratorias, tampoco submucosa con gran infiltración de células inflamatorias como respuesta inmunológica al polímero, este también impidió la formación de tejido. El tejido adiposo y la vasculogénesis fue igual a la DD8, el cartílago no se conservó y la integración del polímero al tejido fue muy mala ya que se encontraron zonas desprendidas. El tiempo de regeneración en el biorreactor indica que al permanecer por más tiempo permite la formación de membrana basal pero se pierden condrocitos. La menor vasculogénesis en la DT puede deberse a factores promotores específicos o que al utilizar tritón inhibe este proceso, sin embargo la infiltración inflamatoria fue menor en esta matriz que en el resto explicándose por la poca

inmunogenicidad.

#### **5.4 Consideraciones finales**

Las matrices obtenidas por diferentes métodos de descelularización no mostraron cambios significativos en cuanto a sus características mecánicas, sin embargo el método con tritón demostró ser más rápido y sencillo e histológicamente se observó mayor definición de los anillos traqueales como ventaja sobre otras matrices para trabajos futuros. Estas matrices podrían ser una excelente opción para ser utilizadas como remplazos traqueales sin la regeneración al no ser inmunogénicas, en lugar de otros materiales utilizados en la actualidad.

El tejido regenerado para cumplir con los requisitos de un injerto debe tener las características de rigidez, flexibilidad, conformación y vascularización parecidas a la tráquea nativa así como la presencia de epitelio respiratorio (Zheng,2014). Los tejidos que fueron regenerados presentaban neoformación, integración y vascularización independientemente del tiempo que permanecieron en el biorreactor 15 u 8 días, sin embargo no se logró la regeneración del epitelio cilíndrico ciliado esencial en la función del tejido traqueal y las características mecánicas no fueron las adecuadas en todos los casos. Para modificar dichos resultados sería conveniente reducir el tiempo de regeneración de la matriz DT a 8 días para determinar si es un factor determinante en las características mecánicas del tejido neoformado. Y durante dicho proceso en el biorreactor natural se deben utilizar líneas celulares y factores de crecimiento adecuados para lograr la diferenciación específica de ese epitelio no respiratorio al cilíndrico ciliado, y la neoformación del tejido de acuerdo a la estructura traqueal. A pesar de que la

vasculogénesis fue menor que la DD8 todo indica que fue suficiente ya que no hubo zonas de necrosis. La regeneración *in vivo* utilizando el epiplón abdominal del cerdo puede ser una alternativa para la revitalización de las matrices o injertos nativos. Mantiene las condiciones de esterilidad, permite su interacción con células madre y por estar muy vascularizado provee nutrientes y factores de crecimiento. Es un procedimiento sencillo, factible, económico y proporciona un modelo apropiado para evaluar la repoblación y la regeneración funcional.

Es esencial en posteriores trabajos mejorar las características mecánicas del tejido garantizando las fuerzas de cizallamiento durante la regeneración o utilizar un reforzamiento probando diferentes materiales que den la rigidez necesaria, la flexibilidad y conformación traqueal, sin ser tóxicos o inmunogénicos y que permitan la adecuada neoformación del tejido, así como la vascularización. Debido a que la formación del epitelio cilíndrico ciliado es indispensable es de vital importancia mejorar los cultivos celulares primarios para tener disponibles condrocitos y células epiteliales respiratorias con el propósito de sembrar las matrices e incorporar los factores de crecimiento específicos durante el proceso de regeneración.

Esta prueba piloto en un modelo animal nos abre múltiples posibilidades para mejorar las metodologías de ingeniería tisular y continuar explorando la capacidad de generar tejidos no inmunogénicos, útiles como injertos para su aplicación clínica al realizar en un futuro trasplantes traqueales exitosos. Ya que es la única terapia resolutive en la estenosis traqueal extensa una patología frecuente por diversas causas y con una significativa morbimortalidad en los pacientes afectados en nuestro medio y sin solución aceptable.

## 6. Referencias bibliográficas

Acosta L, Cruz PV, Zagalo C, Santiago N. (2004) Iatrogenic tracheal stenosis following endotracheal intubation: a study of 20 clinical cases. *Acta Otorrinol Esp.* 54(3): 202-10.

Ahearne M, Yang Y, El Haj AJ, Then KY, Liu KK. (2005) Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *J R Soc Interface.* 22;2(5):455-63.

Antón-Pacheco Sánchez JL, Cuadros García J, Villafruela Sanz MA, Cano Novillo I, García Vázquez A, Berchi García FJ. (2002) Tracheal stenosis: individualized treatment. *Cir Pediatr.* 15(1):8-14.

Aronstam EM, Nims RM, Winn DF. (1961) Studies in segmental replacement of the thoracic trachea. *J Surg Res.* 1:108–110.

ASHI. Laboratory Manual, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (4a. ed.). Lenexa, KS; 2000.

Asnaghi MA, Jungebluth P, Raimondi MT, et al. (2009) A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue engineered hollow organs: from concept to clinical trial. *Biomaterials.* 30:5260–5269.

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. (2006) Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 367(9518):1241-6.

Bader A1, Macchiarini P. (2010) Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach. *J Cell Mol Med.*14(7):1877-89.

Badylak S. F., Weiss D. J., Caplan A., Macchiarini P.(2012) Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet.* 379 (9819), 943–952.

Baiguera S, Jungebluth P, Mazzanti B, Macchiarini P. (2012) Mesenchymal stromal cells for tissue-engineered tissue and organ replacements. *Transpl Int.* (4):369-82.

Baiguera S., Birchall M. A., Macchiarini P. (2010) Tissue-engineered tracheal transplantation. *Transplantation.* 89(5), 485–491.

Baiguera S., D'Innocenzo B., Macchiarini P. (2011) Current status of regenerative replacement of the airway. *Expert Rev Respir Med.* 5(4), 487-94.

Bakhle YS. (1990) Pharmacokinetic and metabolic properties of the lung. *Br J Anaesth.* 65:79-93.

Bayrak A., Tyralla M., Ladhoff J., et al., (2010) Human immune responses to porcine xenogeneic matrices and their extracellular matrix constituents in vitro. *Biomaterials.* 31(14), 3793–3803.

Beigel A, Steffens-Knutzen R, Müller B, et al. (1984) Demonstration of transplantation antigens on the tracheal mucosa of inbred rat strains. *Arch Otorhinolaryngol.* 241:1–8.

Birchall M, Macchiarini P. (2008) Airway transplantation: a debate worth having?



Transplantation. 85(8):1075-80.

Bjork VO, Rodriguez LE. (1958) Reconstruction of the trachea and its bifurcation; an experimental study. *J Thorac Surg.* 35:596–603.

Borro JM, Chirivella M, Vila C, et al. (1992) Successful revascularization of large isolated tracheal segments. *Eur J Cardiothorac Surg.* 6:621–623.

Brichet A, Verkindre C, Dupont J, et al. (1999) Multidisciplinary approach to management of postintubation tracheal stenoses. *J Eur Respir.* 13(4):888-93.

Britt JC, Park SS. (1998) Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 124:671–677.

Bujia J, Wilmes E, Hammer C, et al. (1990) Tracheal transplantation: demonstration of HLA class II subregion gene products on human trachea. *Acta Otolaryngol.* 110:149–154.  
99.

Candas F, Gorur R, Haholu A, Yildizhan A, Yucel O, Ay H, Memis A, Isitmangil T. (2016) Is Tracheal Transplantation Possible With Cryopreserved Tracheal Allograft and Hyperbaric Oxygen Therapy? An Experimental Study. *Ann Thorac Surg.* (3):1139-44.

Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, Garzón I, García-García S, Sáez-Moreno JA, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. (2013) Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *J Neural Eng.* 6(1), 107.

Chien CS, Ho HO, Liang YC, Ko PH, Sheu MT, Chen CH. (2006) Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis Cartilage*. 14(2):179-89.

Chien CS<sup>1</sup>, Ho HO, Liang YC, Ko PH, Sheu MT, Chen CH. (2012) Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 100(4):948-55.

Cicciarelli JC. (2004) HLA typing immunogenetics and transplantation. *Cur Op Org Transplant* 9: 1-7.

Conconi M. T., De Coppi P., Di Liddo R., Vigolo S., Zanon G. F., Parnigotto P. P., Nussdorfer G. G., (2005). Tracheal matrices, obtained by a detergent-enzymatic method, support in vitro the adhesion of chondrocytes and tracheal epithelial cells. *Transpl Int*. 18 (6), 727-34.

Daniel RA. (1948) The regeneration of defects of the trachea and bronchi; an experimental study. *J Thorac Surg*. 1948; 17:335–349.

Dausset J. (1990) The HLA adventure. In *History of HLA: Ten recollections*.(ed. Terasaki PI). Los Angeles, CA: UCLA Tissue Typing Laboratory; p. 3-17.

Davies OG, (1952) Edmiston JM, McCorkle HJ. The repair of experimental tracheal defects with fresh and preserved homologous tracheal grafts. *J Thorac Surg*. 23:367–376.

De-Leo-Cervantes C. (2005) Pruebas de histocompatibilidad en el Programa de

Trasplantes. *Rev Invest Clin.* 57 (2): 142-146.

Delaere P., Vranckx J., Verleden G., De Leyn P., Van Raemdonck D., Leuven, (2010).

Tracheal Transplant Group Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med.* 362(2), 138-45.

Delaere PR, Liu Z, Sciort R, et al. (1996) The role of immunosuppression in the long-term survival of tracheal allografts. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 122: 1201–1208.

Delaere PR, Liu ZY, Hermans R, et al. (1995) Experimental tracheal allograft revascularization and transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 110:728–737.

Delaere PR, Vranckx JJ, Den Hondt M; (2014) Leuven Tracheal Transplant Group. Tracheal allograft after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med.* 370(16): 1568-70.

Demirbag B., Huri P. Y., Kose G. T., Buyuksungur A., Hasirci V. (2011) Advanced cell therapies with and without scaffolds. *Biotechnol J.* 6 (12), 1437-53.

Deresinski SC, Stevens DA. (2003) Caspofingin. *Clin Infect Dis.* 36: 1445-1457.

Edgerton MT, Zovickian A. (1946) Reconstruction of the trachea and infraglottic larynx. *Plast Reconstr Surg.* 1954;13:167–192.

Elliott M. J., De Coppi P., Speggiorin S., et al., (2012) Stem-cell-based, tissue engineered tracheal replacement in a child: a 2-year follow-up study. *Lancet.* 380 (9846), 994–1000.

Engel E, Michiardi A, Navarro M, Lacroix D, Planell JA. (2008) Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends in Biotechnologies*. (26):39.

Ershadi R, Rahim M, Jahany S, Rakei S. (2017) Transplantation of the decellularized tracheal allograft in animal model (rabbit). *Asian J Surg*. 1015-9584(17) 30005-2.

Escalante Cobo JL, Del Río Gallegos F. (2009) Preservación de órganos. *Medicina intensiva*. 33(6):282-292.

Falke G. Atala (2000) Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch argent pediatr*. 98(2):103.

Fell SC, Mollenkopf FP, Montefusco CM, et al. (1985) Revascularization of ischemic bronchial anastomoses by an intercostal pedicle flap. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 90:172–178.

Fishman JM, Lowdell M, Birchall MA. (2014) Stem cell-based organ replacements Airway and lung tissue engineering. *Seminars in Pediatric Surgery*. 23:3,119-126.

Freed LE, Guilak F, Guo XE, et al. (2006) Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. *Tissue Eng*. 12:3285–3305.

García-Araque H.F, Gutiérrez-Vidal S.E . (2015) Aspectos básicos del manejo de la vía aérea: anatomía y fisiología. *Rev Mex de anestesiología*. Vol. 38. No. 2 pp 98-107.

Garrido-Cardona RE, Rico-Escobar E, Barrera-Ramírez E. (2015) Historia y avances en

trasplante de tráquea en México. *Gac Med Mex.* 151:553-6.

Geler DA, Sykes LK, Geler MR. (2007) A review of thimerosal (merthiolate) and its ethylmercury breakdown product specific historical consideration regarding safety and effectiveness. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 10:575-596.

Gilbert RW, Neligan PC. (2005) Microsurgical laryngotracheal reconstruction. *Clin Plast Surg.* 32:293–301.

Gong Y, Xue JX, Zhang WJ, et al. (2011) A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes. *Biomaterials.* 32:2265–2273.

Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. (2002) *Ann Thorac Surg.* 73(6):1995-2004.

Guerrissi JO, Guerrissi JA, Miranda MG. (2009) Functional re-construction of the trachea: pre laminated chondromus- cular flap. *J Craniofac Surg.* 20:868–871.

Hamilton N., Bullock A. J., Macneil S., Janes S. M., Birchall M., (2014). Tissue engineering airway mucosa: a systematic review. *Laryngoscope.* 124(4), 961-8.

Harrington DA, Sharma AK, Erickson BA, Cheng E. (2008) Bladder tissue engineering through nanotechnology. *World Journal of Urology.* (2) 6, 315.

Haykal et al. (2014) *Advances in Tracheal Reconstruction PRS GO* 1-11.

Haykal S, Salna M, Zhou Y, Marcus P, Fatehi M, Frost G, Machuca T, Hofer SO, Waddell

TK. (2014) Double-chamber rotating bioreactor for dynamic perfusion cell seeding of large-segment tracheal allografts: comparison to conventional static methods. *Tissue Eng Part C Methods*. 20(8):681-92.

He J, Xu X, Chen M, et al. (2009) Novel method to repair tracheal defect by pectoralis major myocutaneous flap. *Ann Thorac Surg*. 88:288–291.

Hirata T, Yamazaki F, Fukuse T, et al. (1992) Omentopexy for revascularization of free tracheal grafts in rats. *Thorac Cardiovasc Surg*. 40:178–181.

Hoyos Serrano M., Flores P., Lesly P. (2013) Tipos de Radiación, Aplicaciones, Beneficios y Riesgos. *Rev. Act. Clin. Med [online]*, 37, 1798-1803.

Hung SH, Su CH, Lin SE, Tseng H. (2016) Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization. *Laryngoscope*.126(11):2520-2527.

Imaizumi M, Nomoto Y, Sato Y, et al. (2013) Evaluation of the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the regeneration of tracheal cartilage. *Cell Transplant*. 22:341–353.

Jackson TL, O'Brien EJ, Tuttle W, et al. (1950) The experimental use of homogenous tracheal transplants in the restoration of continuity of the tracheobronchial tree. *J Thorac Surg*. 20:598–612.

Jacobs JR. (1998) Investigations in to tracheal prosthetic reconstruction. *Laryngoscope*. 98(11):1239-45.

Jana T., Khabbaz E., Bush C. M., et al., (2013) The body as a living bioreactor: a feasibility study of pedicle flaps for tracheal transplantation. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 270, 181–186.

Johnson C, Sheshadri P, Ketchum JM, Narayanan LK, Weinberger PM, Shirwaiker RA. (2016) In vitro characterization of design and compressive properties of 3D-biofabricated/decellularized hybrid grafts for tracheal tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater.* 59:572-85.

Jones M. C., Rueggeberg F. A., Cunningham A. J., Faircloth H. A., Jana T., Mettenburg D., Waller J. L., Postma G. N., Weinberger P. M. (2015) Biomechanical changes from long-term freezer storage and cellular reduction of trachealscaffoldings. *Laryngoscope.* 125(1), 16-22.

Jonsen, A.R. (1989) Casuistry as Methodological. *JAMA.* pp. 298.

Jungebluth P, Alici E, Baiguera S, Blomberg P, Bozóky B, Crowley C, Einarsson O, Gudbjartsson T, Le Guyader S, Henriksson G, Hermanson O, Juto JE, Leidner B, Lilja T, Liska J, Luedde T, Lundin V, Moll G, Roderburg C, Strömblad S, Sutlu T, Watz E, Seifalian A, Macchiarini P. (2011) Tracheobronchial transplantation with a stem-cell-seeded bioartificial nanocomposite: a proof-of-concept study. *Lancet.* 10;378(9808):1997-2004.

Jungebluth P, Bader A, Baiguera S, Möller S, Jaus M, Lim M L, Fried K, Kjartansdóttir K R, Go T, Nave H, Harringer W, Lundin V, Teixeira AI, Macchiarini P (2012) The concept

of in vivo airway tissue engineering. *Biomaterials*. 33(17), 4319-26.

Jungebluth P, Haag JC, Sjöqvist S, Gustafsson Y, Beltrán Rodríguez A, Del Gaudio C, Bianco A, Dehnisch I, Uhlén P, Baiguera S, Lemon G, Lim ML, Macchiarini P., (2014) Tracheal tissue engineering in rats. *Nat Protoc*. (9):2164-79.

Jungebluth P, Moll G, Baiguera S, Macchiarini P (2012) Tissue-engineered airway: a regenerative solution. *Clin Pharmacol Ther*. 91(1), 81-93.

Jungebluth P., Go T., Asnaghi A., Bellini S., Martorell J., Calore C., Urbani L., Ostertag H., Mantero S., Conconi M. T., Macchiarini P. (2009) Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 138(3), 586-593.

Kajbafzadeh A. M, Sabetkish S, Sabetkish N, Muhammadnejad S, Akbarzadeh A, Tavangar S. M, Mohseni M. J., Amanpour S. (2015) In-vivo trachea regeneration: fabrication of a tissue-engineered trachea in nude mice using the body as a natural bioreactor. *Surg Today*. 45(8):1040-8.

Kalathur M, Baiguera S, Macchiarini P. (2010) Translating tissue-engineered tracheal replacement from bench to bedside. *Cell Mol Life Sci*. 67:4185–4196.

Khalil-Marzouk JF. (1993) Allograft replacement of the trachea. Experimental synchronous revascularization of composite thyrotracheal transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 105:242–246.



Kim SS, Kaihara S, Benvenuto MS, et al. (1999) Regenerative signals for intestinal epithelial organoid units transplanted on biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering of small intestine. *Transplantation*. 67:227–33.

Kojima K, Ignatz RA, Kushiibiki T, Tinley KW, Tabata Y Vacanti CA. (2004) Tissue engineered trachea from sheep marrow stromal cells with transforming growth factor beta 2 released from biodegradable microspheres in a nude rat recipient. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 128:147-153.

Kumaran S, Nambi GI, Kingsly Paul M, et al. (2009) Post-electrical burn tracheal defect reconstruction with prefabricated deltopectoral flap a case report. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 62:93–94.

Kunachak S, Kulapaditharom B, Vajaradul Y. (2000) Rochanawutanon M Cryopreserved, irradiated tracheal homograft transplantation for laryngotracheal reconstruction in human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 122: 911-916.

Kunachak S, Vajaradul Y, Rerkamnuaychok B, Praneetvatakul V, Rochanawutanon M. (2007) Fate of mucosal healing in transplanted deep frozen irradiated tracheal homograft. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 136: 1010-1013.

Kunisaki SM1, Freedman DA, Fauza DO. (2006) Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes. *J Pediatr Surg*. 41(4):675-82.

Kutten JC, McGovern D, Hobson CM, Luffy SA, Nieponice A, Tobita K, Francis RJ, Reynolds SD, Isenberg JS, Gilbert TW. (2015) Decellularized tracheal extracellular matrix supports epithelial migration, differentiation, and function. *Tissue Eng Part A*. 21(1-2):75-84.

Laurencin CT, Nair LS. (2008) *Nanotechnology and Tissue Engineering. The Scaffold*. CRC Press.

Lechler R, Warrens A. (2000) *HLA in health and disease* (2a. ed.). London: Academic Press; p. 73-99.

Lenot B, Macchiarini P, Dulmet E, et al. (1993) Tracheal allograft replacement. An un successful method. *Eur J Cardiothorac Surg*. 7:648–652.

Levashov YuN, Yablonsky PK, Cherny SM, et al. (1993) One stage allotransplantation of thoracic segment of the trachea in a patient with idiopathic fibrosing mediastinitis and marked tracheal stenosis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 7:383–386.

Lin CH, Hsu SH, Huang CE, Cheng W, Su J. (2009) A scaffold-bioreactor system for a tissue-engineered trachea. *Biomaterials*. 30, 4117–4126.

Liu Y, Nakamura T, Yamamoto Y, et al. (2000) Immunosuppressant- free allotransplantation of the trachea: the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 120:108–114.

Liu Y., Nakamura T, Yamamoto Y., et al. (2000) Immunosuppressant free allotransplantation of the trachea: the antigenicity of tracheal grafts can be reduced by removing the epithelium and mixed glands from the graft by detergent treatment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 120, 108–114.

Lopez-Vidriero MT. (1989) Mucus as a Natural Barrier. *Respiration.* 55:28–32.

Lovat V, Pantarotto D, Lagostena L, Cacciari B, Grandolfo M, Righi M, Spalluto G, Prato M, Ballerini L. (2005) Carbon Nanotube Substrates Boost Neuronal Electrical Signaling. *Nano Letters* (5), 1107.

Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. (2008) Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 372:2023–2030.

Macchiarini P, Walles T, Biancosino C, Mertsching H. (2004) First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 128:638-41.

Maron BA, Leopold J. (2014) The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ.* 4(2): 200–210.

Marschall RP. (2003) The pulmonary renin-angiotensin system. *Curr Pharm Des.* 9:715-722.

Martinod E, Seguin A, Radu DM, Boddaert G, Chouahnia K, Fialaire-Legendre A, Dutau H, Vénissac N, Marquette CH, Baillard C, Valeyre D, Carpentier A, French Group for Airway Transplantation (FREGAT). (2013) Airway transplantation: a challenge for

regenerative medicine. *Eur J Med Res.* 29, 18-25.

Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. (2009) Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater.* 4;21(32-33):3307-29.

Messineo A, Filler RM, Bahoric B, et al. (1991) Successful tracheal autotransplantation with a vascularized omental flap. *J Pediatr Surg.* 26:1296–1300.

Minnich DJ. (2007) Anatomy of the trachea, carina, and bronchi. *Thorac Surg Clin.* 17:571-585.

Nakamura T., Ohmori K., Kanemaru S. (2011) Tissue-engineered airway and in situ tissue engineering. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 59(2), 91-7.

Nakanishi R, Hashimoto M, Muranaka H, Umesue M, Kohno H, Yasumoto K. (1999) Maximal period of cryopreservation with the Bicell biofreezing vessel for rat tracheal isografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 117:1071-1076.

Nakanishi R, Umesue M, Hashimoto M, Muranaka H, Hachida M, Yasumoto K. (2000) Limit of warm ischemia time before cryopreservation in rat tracheal isografts. *Ann Thorac Surg.* 70:1800-1804.

Nataraj C, Ritter G, Dumas S, Helfer F, Brunelle J, Sander TW. Extracellular Wound (2007) Matrices: Novel Stabilization and Sterilization Method for Collagen-based Biologic Wound Dressings. *Disclosures Wounds.* 19(6):148-156.

Neville W. E., Bolanowski P. J., Kotia G. G. (1990) Clinical experience with the silicone tracheal prosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 99, 604.

Neville WE, Bolanowski PJ, Soltanzadeh H. (1976) Homograft replacement of the trachea using immunosuppression. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 72:596–601.

Okumuş A, Cizmeci O, Kabakas F, Kuvat SV, Bilir A, Aydin A.(2005) Circumferential trachea reconstruction with a prefabricated axial bio-synthetic flap: experimental study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 69(3):335-44.

Olmos-Zúñiga J. R., Eguiza-Rubí V., Jasso-Victoria R., Sotres-Vega A., Gaxiola- Gaxiola M., Santibáñez-Salgado J. A., Baltazares-Lipp M., Santillán-Doherty P., Villalba-Caloca. (2006) Trasplante experimental de tráquea cervical combinado con la aplicación de factor de crecimiento de fibroblastos. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 19 (3), 172-179.

Olender E, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, Kaminski A. (2011) Revitalization of biostatic tissue allografts: new perspectives in tissue transplantology. *Transplant Proc.* 2011 43(8):3137-41.

Ostertag H., Mantero S., Conconi M. T., Macchiarini P. (2009) Structural and morphologic evaluation of a novel detergent-enzymatic tissue-engineered tracheal tubular matrix. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 138(3), 586-593.

Pacheco CR, Rivero O, Porter JK. (1954) Experimental reconstructive surgery of the trachea. *J Thorac Surg.* 27: 554–564.

Partner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, et al. (2005) Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 100: 235–245.

Peloso A, Dhal A, Zambon JP, Li P, Orlando G, Atala A, Soker S. (2015) Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering. *Stem Cell Res Ther.* 1;6:107.

Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. (2012) Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs.* 195(3):222-31.

Pörtner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, et al. (2005) Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2100: 235–245.

Ratner BD, Bryant SJ. (2004) Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng.* 6:41-75.

Remlinger NT, Czajka CA, Juhas ME, Vorp DA, Stolz DB, Badylak SF, Gilbert S, Gilbert TW. (2010) Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction *Biomaterials.* (13):3520-6.

Remlinger NT, Czajka CA, Juhas ME, Vorp DA, Stolz DB., Badylak SF, Rock JR, Randell SH, Hogan BL. (2010) Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech.* 3:545–556.

Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. (1979) Tracheal allotransplantation in man. *Lancet.* 1:433.

Saavedra J, Zúñiga L, Vásquez J, Navia C, Mosquera L, Bernal S. (2015) La matriz extracelular; un ecosistema influyente en la forma y comportamiento de las células. *Morfología*. Vol. 7 (1) 12-21.

Sachs LA, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. (2003) Effects of media on differentiation of cultured human tracheal epithelium. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 239:56–62.

Salassa JR, Pearson BW, Payne WS. (1977) Gross and microscopical blood supply of the trachea. *Ann Thorac Surg*. 24:100–107.

Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*.;459:262–5.

Schaefer L, Schaefer RM. (2010) Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 339(1):237-46.

Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. JR. (2005) Characterizing the viscoelastic properties of thin hydrogel-based constructs for tissue engineering applications. *Soc Interface*. 22;2(5):455-63.

Sotres VA. (2010) Evaluación de las alteraciones macroscópicas, microscópicas y en la expresión de caspasa-3 en el tejido traqueal criopreservado por efecto de la solución, de la temperatura y del tiempo de congelación [tesis doctoral]. México, D.F.: UAM-X;

Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Jasso-Victoria R, et al. (2006) Cryopreserved tracheal grafts: a review of the literature. *J Invest Surg*. 19:129-135.

Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, et al. (1996) Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol.* 156(2, Part 2):571–577.

Svenja, H., Schenke-Layland, K. (2013) Tracheal tissue engineering: building on a strong foundation. *Expert Rev Med Devices.* 10 (1), 33–35.

Tan Q, Steiner R, Hoerstrup SP, et al. (2006) Tissue-engineered trachea: history, problems and the future. *Eur J Cardiothorac Surg.* 30:782–786.

Tanabe K, Takahashi K, et al. (1998) Long-Term results of ABO-Incompatible living kidney transplantation. *Transplantation.* 65: 224-8.

Tsukada H, Ernst A, Gangadharan S, et al. (2010) Tracheal replacement with a silicone-stented, fresh aortic allograft in sheep. *Ann Thorac Surg.* 89:253–258.

Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, Sakata J, Upton J, Vacanti JP. (1994) Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg.* 29(2):201-4.

Villalba CJ. (2007) Respuesta tisular del aloinjerto traqueal liofilizado y criopreservado combinado con terapia de inmunosupresión y aplicación tópica del factor de crecimiento del endotelio vascular [tesis doctoral]. México, D.F.: Escuela Superior de Medicina, IPN;

Villalba-Caloca J. Sotres-Vega A. Santibáñez-Salgado J.A, Baltazares- Lipp M, Gaxiola-Gaxiola M Villegas-Castrejón H et al. (2010) Criopreservación de segmentos traqueales: Efecto del tiempo de congelación sobre la integridad estructural del cartílago *Neumol Cir*



Torax. Vol. 69, No. 1, 7-13.

Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B, et al. (1999) Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res.* 17:130–138.

Walles T, Giere B, Hofmann M, Schanz J, Hofmann F, Mertsching H, et al. (2004) Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 128:900-6.

Watson CJ, Dark JH. (2012) Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth.* 108 (1):29-42.

Wee Ling H. Boon Hean O. Yeong Phang L. Chong Hee L. (2013) Human tracheal Allograft Banking: A Singapore experience and review on recent progress. *J Transplant Technol Res.* 3:2.

Weidenecher M, Tucker HM, Awadallah A, et al. (2008) Fabrication of a neotrachea using engineered cartilage. *Laryngoscope.* 118:593–598.

Weinberger SE. (2004) *Principles of Pulmonary Medicine.* 4th ed. Philadelphia, PA: W. B. Saunders.

Wurtz A, Hysi I, Zawadzki C, et al. (2012) Construction of a tube- shaped tracheal substitute using fascial flap-wrapped revascularized allogenic aorta. *Eur J Cardiothorac Surg.* 41:663–668.

Yamaya M, Finkbeiner WE, Chun SY, et al. (1992) Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. *Am J Physiol.* 262 (6, Part 1): L713–L724.

Yang L, Korom S, Welti M, et al. (2003) Tissue engineered cartilage generated from human trachea using DegraPol scaffold. *Eur J Cardiothorac Surg.* 24:201–207.

Yokomise H, Inui K, Wada H, et al. (1994) High-dose irradiation prevents rejection of canine tracheal allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 107:1391–1397.

Zhang L, Webster TJ. (2009) Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today.* vol.(4), 66.

Zheng H., Hu X., Li C., Xie H., Gao W., Chen C. (2014) Re-epithelialization by epithelial inoculation with recipient phenotype in heterotopically transplanted rat allografts. *Chin Med J (Engl).* 127(10):1913-8.

## Anexos

### Anexo I. Modelo de evaluación de las características mecánicas del tejido

Se desarrolló un modelo para la evaluación de las características mecánicas del tejido traqueal.

Rigidez	0%	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%	100%
---------	----	-------	--------	--------	---------	------

Para evaluar la rigidez se registró el porcentaje en la disminución de la luz traqueal al comprimirla manualmente sin forzarla o lesionarla, en una escala en donde el 0% refleja el lumen cerrado y el 100% totalmente abierto.

Flexibilidad	180 <sup>0</sup> (0 <sup>0</sup> ) 0%	140 <sup>0</sup> (40 <sup>0</sup> ) 22%	130 <sup>0</sup> (50 <sup>0</sup> ) 27%	120 <sup>0</sup> (60 <sup>0</sup> ) 33%	110 <sup>0</sup> (70 <sup>0</sup> ) 38%	90 <sup>0</sup> (90 <sup>0</sup> ) 50%	50 <sup>0</sup> (130 <sup>0</sup> ) 72%	30 <sup>0</sup> (150 <sup>0</sup> ) 83%
--------------	---------------------------------------------	-----------------------------------------------	-----------------------------------------------	-----------------------------------------------	-----------------------------------------------	----------------------------------------------	-----------------------------------------------	-----------------------------------------------

La flexibilidad o capacidad de flexión del tejido se determinó doblando suavemente la tráquea iniciando con el tejido sin flexionar con 180° asignando un valor de 0<sup>0</sup> o 0% hasta llegar a flexionarla totalmente a 30<sup>0</sup> con una flexibilidad de 150<sup>0</sup> y 83% de flexibilidad.

Conformación	0%	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%	100%
--------------	----	-------	--------	--------	---------	------

La conformación fue evaluada después de la compresión de la tráquea y liberándola valorando el porcentaje en la recuperación de la forma original, si es total es del 100% y si no hay recuperación será de 0% con valor de 0.

## **Anexo II. Modelo de evaluación de las características microscópicas del tejido**

### **traqueal**

Se desarrolló un modelo para evaluar las características microscópicas del tejido traqueal, destacando los componentes histológicos determinantes.

Matriz	Tiempo Regeneración	Epitelio	Submucosa (Glándulas)	Cartílago	Vasos sanguíneos	Tejido Reparación	Tejido Adiposo	Infiltrado inflamatorio
N	0	+	+++++	+++++	+++++	-	-	-

La evaluación de las características microscópicas del tejido traqueal se basa en su arquitectura normal como la presencia de epitelio (+) presencia de glándulas en la submucosa (+++++), integridad del cartílago (+++++), vasos sanguíneos o vasculogénesis (+++++). En caso del tejido regenerado también se contempla en tiempo de regeneración, la presencia de tejido de reparación como fibrosis que no se encuentra presente en el tejido normal (-), así como tejido adiposo (-), e infiltrado inflamatorio (-).

### **Anexo III. Ponencias**

Elisa Barrera Ramírez, Rubén E. Garrido Cardona, Edna Rico Escobar, Alejandro Martínez Martínez, Luis Fernando Plenge Tellechea, Alfredo Hernández, Enrique Vanegas Venegas, Rubén Rincón. Tracheal regenerative replacement in vivo with scaffolds in a pig model. American Thoracic Society. Washington, DC, Mayo 19-24, 2017.

Elisa Barrera Ramírez. Ingeniería tisular para la preparación de un injerto traqueal

regenerado a partir de una matriz biológica de cerdo. Jornadas de Investigación 2016. Ciudad Juárez Chih., Octubre 20, 2016.

Barrera Ramírez E., Garrido Cardona R.E., Rico Escobar E., Martínez Martínez A., Plenge Tellechea F., Vanegas Venegas E., Hernández A., Rincón R. Ingeniería tisular para la regeneración de un injerto traqueal. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética. Ciudad Juárez Chih., Septiembre 19-22, 2016.

Elisa Barrera Ramírez. Implementación de métodos de ingeniería tisular para la preparación de una matriz biológica utilizando tráquea de cerdo. Congreso Interno del Colegio de Chihuahua. Ciudad Juárez Chih., Abril 25, 2016.

Elisa Barrera Ramírez. Implementación de métodos de ingeniería tisular para la preparación de una matriz biológica utilizando tráquea de cerdo. Jornadas de Investigación 2015. Ciudad Juárez Chih., Septiembre 17, 2015.

Elisa Barrera Ramírez. Implementación de métodos de ingeniería tisular para la preparación de una matriz biológica utilizando tráquea de cerdo. Congreso Interno del Colegio de Chihuahua. Ciudad Juárez Chih., Abril 29, 2015.

Elisa Barrera Ramírez. Implementación de métodos de ingeniería tisular para la preparación de una matriz biológica utilizando tráquea de cerdo. 2º Coloquio de Doctorado en Investigación. Ciudad Juárez Chih., Diciembre 1-5, 2014.

Elisa Barrera Ramírez. Implementación de métodos de ingeniería tisular para la preparación

de una matriz biológica utilizando tráquea de cerdo. Jornadas de Investigación 2014. Ciudad Juárez Chih., Agosto 22, 2014.

#### **Anexo IV. Artículos Publicados**

E. Barrera Ramírez, et al. (2016) Ingeniería tisular aplicada a la tráquea como injerto. Gac Med Mex. 152:120-3.

Elisa Barrera

Ramírez et al. (2016) Preparación de un injerto traqueal a partir de una matriz biológica de cerdo. Ciencia en la Frontera. 14:89-98.