



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Universidad de Guanajuato
Campus León
División de Ciencias e Ingenierías

Tesis:

Relación composición-estructura-propiedad en matriz esofágica
descelularizada obtenida de porcinos de diferentes edades

Presenta:

I.B.T Adriana Orozco Vega.

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Aplicadas.

Director de Tesis:

Dr. Birzabith Mendoza Novelo.

Diciembre 2019. León, Guanajuato



Índice general

1	Introducción.....	1
1.1	Ingeniería de tejidos (IT) y medicina regenerativa en el tratamiento de defectos en esófago	1
1.1.1	Anatomía y función del esófago.....	1
1.1.2	Algunas condiciones patológicas en esófago	3
1.1.3	El concepto de la ingeniería de tejido y medicina regenerativa.....	5
1.2	Biomateriales usados como andamios en la regeneración de tejidos esofágico. .	6
1.2.1	Polímeros sintéticos	6
1.2.2	Polímeros Naturales	7
1.3	Tejidos animales descelularizados como fuente de andamios para IT de esófago	8
1.3.1	Matriz extracelular	8
1.3.2	Colágeno.....	9
1.4	Descelularización de tejidos.....	10
1.4.1	Matrices acelulares y cultivo con células	13
2	Antecedentes	15
3	Descripción del proyecto	20
3.1	Justificación	20
3.2	Hipótesis.....	20
3.3	Objetivo General	21



3.3.1	Objetivos específicos.....	21
4	Metodología.....	22
4.1	Obtención y preparación inicial de los tejidos esofágicos.....	22
4.2	Descelularización de los tejidos esofágicos.....	22
4.3	Obtención de hidrolizados de matriz pericárdica	22
4.4	Evaluación de la eficacia de la descelularización y su efecto en la composición residual.....	24
4.4.1	Cuantificación de DNA residual	24
4.4.2	Cuantificación de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) residuales.	24
4.4.3	Cuantificación de proteínas totales residuales	24
4.4.4	Cuantificación de fibronectina residual.....	25
4.5	Análisis de la microestructura por microscopía de Generación de Segundo Armónico (SHG).	25
4.6	Análisis histológico mediante tinción Hematoxilina y Eosina.....	26
4.7	Evaluación de las propiedades mecánicas de tensión.....	26
4.7.1	Preparación de las muestras	26
4.7.2	Equipo	28
4.7.3	Montaje de las probetas y ensayo	28
4.8	Estudios <i>in vitro</i> con células epiteliales.....	32
4.8.1	Cultivos celulares.....	32
4.8.2	Cultivo celular sobre los andamios.....	34
4.8.3	Ensayo live/dead	34
4.8.4	Ensayo de MTT	35



5	Resultados y discusión	36
5.1	Apariencia de los tejidos descelularizados.....	36
5.2	Composición residual en los tejidos descelularizados.....	37
5.2.1	Contenido residual de DNA	38
5.2.2	Retención de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs).....	39
5.2.3	Retención de proteínas	39
5.3	Organización microestructural de los tejidos descelularizados.	41
5.4	Tinción de hematoxilina-eosina	44
5.5	Propiedades mecánicas de tensión	46
5.5.1	Curvas esfuerzo - deformación.....	46
5.5.2	Resistencia a la tensión	48
5.5.3	Deformación máxima y el módulo elástico	49
5.5.4	Anisotropía mecánica.....	51
5.6	Recelularización del andamio con células epiteliales esofágicas a los andamios	52
5.6.1	Viabilidad celular	53
5.6.2	Actividad metabólica.....	54
6	Conclusiones	57
7	Referencias	57
8	APENDICE.....	67
8.1	Composición del medio.....	67
8.2	Resolución axial y lateral del objetivo empleado en microscopia SHG.....	67



Índice de figuras.

Figura 1. Esquema de la estructura histológica esofágica normal de conejo (tinción tricrómico Mallory).	2
Figura 2. Clasificación general de los biomateriales para andamios con sus respectivos ejemplos.....	7
Figura 3. Representación esquemática de los componentes de la matriz extracelular y la interacción entre ellos.	13
Figura 4. Esquema que muestra la colocación de la muestra sobre el portaobjetos cubierto por un cubreobjetos, dejando la capa a observar del lado del cubreobjetos. Las muestras fueron observadas a 20x.	26
Figura 5. Representación esquemática de los tipos de corte (a:longitudinal o axial y b:transversal) para los diferentes muestras de tejido esofágico.	27
Figura 6. Forma de la probeta empleado en tensión uniaxial.....	27
Figura 7. Máquina de ensayo universal Instron 5543.	28
Figura 8. Colocación de la muestra sobre la abrazadera.....	29
Figura 9. Instalación de las abrazaderas al equipo.....	29
Figura 10. Muestra durante la prueba de tensión uniaxial.	30
Figura 11. Ejemplo de una curva esfuerzo vs deformación típica de un tejido biológico. ..	31
Figura 12. Procedimiento para cultivo celular primario de células epiteliales esofágicas de conejo.....	33
Figura 13. Diseño del cultivo celular sobre los diferentes materiales.....	34
Figura 14. Fotografías representativas que muestran la apariencia física de los tejidos nativo y descelularizado, derivados de porcino de tres diferentes edades (1, 21 y 45 días).	37



Figura 15. a) Concentración de DNA purificado y b) GAGs detectado a partir de tejido esofágico porcino nativo (N) y de la matriz descelularizada (D) derivados de lechones de diferentes edades: 1, 21 y 45 días (n=9). c) concentración de proteína total y d) fibronectina extraídas a partir de los mismos materiales.	41
Figura 16. Micrografías representativas de SHG (microscopio ZEISS LSM-710-NLO) para tejido nativo y descelularizado de 1, 21 y 45 días, en la superficie muscular y de la submucosa. Objetivo:20 X, 852 nm: 3.0 %.....	43
Figura 17. Micrografías representativas H&E de tejido esofágico descelularizado para porcinos de diferentes edades: 1, 21 y 45 días. M:Mucosa, S:submucosa, ME: Muscular externa, CI: corte interno, CE: Corte externo. Corte transversal, Objetivo 20 X.....	45
Figura 18. Curvas esfuerzo vs deformación representativas para tejido esófago nativo (N) y descelularizados (D) obtenido de lechones de 1, 21 y 45 días.....	47
Figura 19. Esfuerzo y carga máxima de tensión (en la ruptura) de tejido esofágico nativo (N) y descelularizado (D) obtenido de lechones de 1, 21 y 45 días.....	49
Figura 20. Deformación máxima y módulo elástico en la segunda porción lineal de la curva E-D de tejido esofágico nativo (N) y descelularizado (D) obtenido de lechones de 1, 21 y 45 días.	50
Figura 21. Proporción del esfuerzo máximo entre las direcciones longitudinal/circunferencial.....	52
Figura 22. Micrografías representativas que muestra la viabilidad (un ensayo Live/Dead) de células epiteliales esofágicas.....	55
Figura 23. Actividad metabólica medida mediante una prueba de MTT después del cultivo de células epiteliales esofágicas por a) 24 y b) 48 horas.....	56



Índice de tablas

Tabla 1. Características más importantes de biopolímeros usado como andamios para ingeniería de tejidos.....	11
Tabla 2. Métodos de descelularización reportados en la preparación de andamios derivados de tejidos animales	14
Tabla 3. Comparativa del desempeño de implantes esofágicos artificiales (obtenidos a partir de materiales no degradables) en diferentes modelos animales.	16
Tabla 4. Comparativa del desempeño de diferentes tipos de andamios acelulares en el tratamiento de defectos esofágicos.....	17
Tabla 5. Comparativa del desempeño de andamios de origen natural cultivados con células para sustitución esofágica.....	18
Tabla 6. Descripción de métodos de descelularización aplicados a tejido esofágico de diferentes fuentes.....	19
Tabla 7. Resumen del protocolo para descelularización probados en esófagos de diferentes edades: 1, 21 y 45 días	23
Tabla 8. Diseño de experimentos para pruebas mecánicas.....	27



Agradecimientos

Este trabajo de maestría no hubiera sido posible sin el gran apoyo de mi director de tesis el Dr. Birzabith Mendoza Novelo, al cual quiero agradecer por su confianza, mentoría, paciencia y apoyo en todo este proyecto.

A Guadalupe Luevano (Lupita) por siempre apoyarme en los momentos difíciles, por su paciencia, y por compartirme su conocimiento que enriquecía mi proyecto. También, por ser una buena compañera de viaje y una gran amiga. Al Mtro. Ulises Muñoz por siempre tomarse un tiempo para enseñarme sobre el microscopio, por todas las asesorías y dudas resultas, por todas las pláticas, por su amistad. A mis amigos del laboratorio y la universidad, Fany, Hugo, Juanma y Magda por los conocimientos, el apoyo y el tiempo que compartimos. No hubiera sido lo mismo sin ustedes.

A mis sinodales por sus valiosos comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar y enriquecer este proyecto. Al Dr Francisco Javier Rojo Perez y Dr. Gustavo Guinea del departamento de ciencias de materiales de la Universidad Politécnica de Madrid, por su tiempo y apoyo durante mi estancia. Al Dr. Mauricio Flores Moreno del Centro de Investigaciones en Optica (CIO) por permitirme utilizar el microscopio y por su apoyo.

A la Universidad de Guanajuato por las instalaciones brindadas durante la realización del trabajo, por el financiamiento institucional. A la Secretaría de Innovación, Ciencia y Educación superior (SICES) por el financiamiento otorgado para el fortalecimiento del programa de la Maestría en Ciencias Aplicadas a través del convenio: PNPC/SICES/CONV/190/2019UG. Al CONACYT por el financiamiento del proyecto, que hicieron posible llevar a cabo esta tesis.

Gracias a mis padres Yolanda Vega y Antonio Orozco por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mí, por enseñarme a siempre ser perseverante. Este logro no hubiera podido ser sin ustedes. Gracias a mis hermanos Antonio y Luis Fernando Orozco por su apoyo y confianza. A mis suegros por su apoyo y paciencia durante este proceso.

A Fernando Suarez por siempre creer en mí y motivarme a seguir adelante y por ser el mejor acompañante durante este trayecto.

A Rafael Suarez por ser mi inspiración y motivación.



Abreviaturas

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

BCA: Ácido biciconinico

CC: Control Células

C+A: Células cultivadas sobre andamios solos

C+A+H: Células cultivadas sobre andamios con hidrogel

C+A+H+E: Células cultivadas sobre andamios con hidrogel y ácidos Epoxieicosatrienoides

D X: Descelularizado X= Edad del tejido (1, 21 y 45 días)

DE: Desviación estándar

DOC: Deoxicolato de sodio

DMMB: Azul de dimetilmetileno

EA: Atresia de esófago

E-D: Esfuerzo-Deformación

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EETs: Ácidos epoxieicosatrienoides

GAG's: Glicosaminoglicanos sulfatados

IT: Ingeniería de Tejidos

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

MEC: Matriz Extracelular

N X: Nativo X= Edad del tejido (1, 21 y 45 días)

PBS: Siglas en inglés Phosphate Buffered Saline (Solución buffer salina)

PGA: Ácido Poliglicólico

PLA: Ácido Polilactico

PLGA: Ácido-Poli-Glutámico

PCL: Policaprolactona

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

SHG: Siglas en inglés Second-Harmonic Generation (Generación de Segundo Armónico)

SIS: Intestino Delgado Porcino

UV: Ultravioleta



Resumen

El esófago humano es un conducto hueco muscular que conecta la faringe y el estómago, permitiendo el paso de la comida y los líquidos^{1,2}. Sin embargo, existen algunas condiciones, tanto congénitas como adquiridas, que pueden requerir remplazo del tejido esofágico. Anualmente se reportan 500,000 pacientes alrededor del mundo diagnosticados con enfermedades esofágicas. El tratamiento de la enfermedad esofágica puede requerir resección y reconstrucción del esófago. Sin excepción, estos procedimientos están asociados con una alta morbilidad, calidad de vida comprometida y altas tasas de mortalidad.

En el presente estudio se desarrollaron biomateriales de matriz extracelular esofágica de origen porcino, para sentar las bases del desarrollo de implantes para tratar defectos en esófago, en el futuro inmediato. Estos biomateriales fueron obtenidos por la descelularización de tejido porcino de diferentes edades (1, 21 y 45 días). Para evaluar la eficiencia de la descelularización y su efecto en la composición residual se realizaron ensayos de cuantificación de DNA, proteoglicanos sulfatados (GAG's), proteínas totales y fibronectina. Asimismo, se analizó la microestructura mediante microscopía de Generación de Segundo Armónico (SHG) y las propiedades mecánicas a través de ensayos de tensión uniaxial. Finalmente, para evaluar la biocompatibilidad del tejido descelularizado se cultivaron células epiteliales esofágicas de conejo sobre los tejidos descelularizados, tejido descelularizado con hidrogel y tejido descelularizado con hidrogel y epoxieicosatrienoides.

El método de descelularización empleado es adecuado para obtener una reducción efectiva de DNA, y a su vez es capaz de retener alrededor del 40% de las proteínas totales y el 66% de fibronectina en los tejidos de las diferentes edades. Sin embargo, para los tres grupos se observó una alta reducción en el contenido de GAGs. Las micrografías de SHG demostraron que tanto en la capa submucosa como en la muscular externa las fibras de colágeno se preservaron en los tres tejidos en comparación con los tejidos nativos. Los análisis de tensión uniaxial mostraron que la anisotropía mecánica del tejido esofágico porcino nativo tiende a ser conservada en tejido descelularizado. Finalmente, el esófago descelularizado modificado con hidrogel mostró un mayor incremento en el número de células viables y una mayor actividad metabólica.



1 Introducción

1.1 Ingeniería de tejidos (IT) y medicina regenerativa en el tratamiento de defectos en esófago

1.1.1 Anatomía y función del esófago

Anatomía. El esófago humano es un conducto hueco muscular que conecta la faringe y el estómago, permitiendo el paso de la comida y los líquidos, debido a su actividad peristáltica, la cual es causada por la contracción y relajación de las células del músculo liso^{1,2}. Con un total de 20-25 cm de largo en adultos, el esófago cruza tres distritos anatómicos (cuello, tórax, y el abdomen). El esófago funcional se divide en esfínter esofágico superior, cuerpo y esfínter esofágicos inferior². El esófago consiste en tres tipos diferentes de células, las cuales incluyen células epiteliales escamosas, fibroblastos y células del tejido muscular liso, las cuales forman las cuatro capas del esófago como la mucosa, submucosa, muscularis externa y la adventicia, como se aprecia en la **Figura 1**. Las células epiteliales están presentes en el lumen, los fibroblastos dentro la submucosa mientras que las células de músculo liso están localizadas en la periferia. La capa de mucosa está compuesta de epitelio escamoso no queratinizado con células en diferentes estados de diferenciación, que producen moco para proteger al esófago del estrés causado por el paso de la comida.

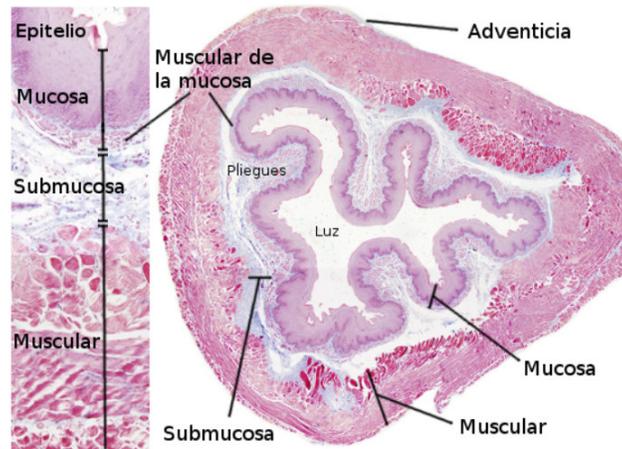


Figura 1. Esquema de la estructura histológica esofágica normal de conejo (tinción tricrómico Mallory). Modificado de Atlas de histología animal y vegetal³

La submucosa está representada mediante una red suelta de fibras de colágeno, principalmente colágeno tipo I y III, constituyendo el tejido conectivo, con glándulas esofágicas interpuestas y vasos sanguíneos. El músculo externo se compone de capas longitudinales circulares y externas. La parte superior de este músculo se compone de músculo esquelético que se transforma en músculo liso distalmente, mientras que ambos tipos de células están presentes en el medio. La adventicia representa la capa externa del esófago y está compuesta de tejido conectivo suelto lleno de sangre y vasos linfáticos, tejido adiposo y células epiteliales escamosas^{1,2}.

Función. El esófago impulsa el bolo y los líquidos al estómago a través de movimiento peristáltico causado por la contracción y la relajación alternativa de células musculares lisas. La contracción peristáltica es iniciada por ya sean vías neuronales extrínsecas o intrínsecas. Los músculos longitudinales delante del bolo se contraen para expandir el esófago, mientras que los músculos circulares detrás del bolo alimenticio se contraen para empujarlo hacia el estómago. La comida normalmente pasa a través del esófago en 10 s².



1.1.2 Algunas condiciones patológicas en esófago

Atresia de esófago (EA). Varias condiciones, tanto congénitas como adquiridas, pueden requerir remplazo del tejido esofágico. Cada año hay 5000-10,000 pacientes diagnosticados con enfermedades esofágicas para las cuales es necesario realizar un reemplazo esofágico^{1,58}. En la población pediátrica, la principal causa para el reemplazo esofágico es la EA con brecha amplia o atresia esofágica tipo 1 que debido a su longitud imposibilita la anastomosis primaria⁴. EA es un defecto raro en el cual el bebe nace sin parte del esófago. En vez de formarse el tubo entre la boca y el estómago, el esófago crece en dos segmentos separados los cuales no se conectan. Además, es una enfermedad letal a menos que sea tratada. El mejor tratamiento es realizar una cirugía para reconectar los dos segmentos. En algunos niños, cuando el segmento faltante es muy largo no puede ser reconectado fácilmente. Esto se conoce como atresia esofágica de largo espacio. E tiene una incidencia de 1:3000 a 1:5000 en recién nacidos vivos y en la mayoría de los casos es posible una anastomosis primaria, con complicaciones relativamente menores¹. En México, se estima que cada año hay entre 500 y 600 casos nuevos de niños con atresia de esófago y no hay predominio de sexo⁴.

Cáncer de esófago. Por el contrario, la indicación más común para el reemplazo esofágico en adultos es el cáncer. Una condición con una incidencia creciente, y un tratamiento difícil, debido principalmente a la baja capacidad regenerativa del tejido esofágico. Los tipos más comunes de cáncer de esófago son: carcinoma espino celular y adenocarcinoma, de los cuales, el riesgo de padecerla está relacionado con: el tabaquismo, el consumo de alcohol, la obesidad, el reflujo esofágico y el esófago de Barret. Esta última es una condición premaligna para la cual en algunos casos se indica la interposición de colón¹. A nivel mundial, el cáncer de esófago es la sexta causa principal de muertes relacionadas con el cáncer^{5,59}.

Ingesta de sustancias corrosivas. Esto puede producir efectos devastadores en el tubo digestivo alto. Los agentes involucrados son sustancias alcalinas o ácidas. El 80% de los



casos son accidentales en niños, siendo el 58% en menores de seis años; en adultos, la mayoría de los casos se relaciona con actos suicidas. La forma en como estas sustancias producen daño a los tejidos es muy diferente, los ácidos producen una necrosis; mientras los álcalis, provocan necrosis por licuefacción. Las cifras de incidencia en el norte de Europa indican que la frecuencia anual alcanza cifras de 5:100,000 pacientes en menores de 16 años, siendo un 94% menores de 5 años. En Estados Unidos anualmente se dan más de 5000 casos de ingestión de sustancias químicas cáusticas al año; de estos 50-80% ocurren en la infancia y el 20% en adultos, de los cuales la mayoría se presenta en mujeres jóvenes por intento suicida⁶.

Intervenciones quirúrgicas. El tratamiento de los trastornos esofágicos implica intervenciones quirúrgicas, las cuales se dividen en dos categorías principales: esofagectomía y tratamientos endoscópicos^{4,5}. En la esofagectomía, un tubo gástrico hecho completo o parcialmente del estómago, es utilizado comúnmente como el órgano reconstruido. Debido a que la esofagectomía es extensa e invasiva, se ha registrado una alta mortalidad (23%) y morbilidad (26-41%). Avances en las técnicas quirúrgicas y cuidados intensivos preoperatorios ha reducido la mortalidad a 1.7%. Existe una incidencia relativamente alta (3-24%) de fuga anastomóticas con esofagogastrostomía, que causa estenosis después de la cicatrización espontánea o conduce a complicaciones sépticas fatales⁴. La disección submucosa endoscópica o la resección de mucosa son ahora el tratamiento estándar para el cáncer esofágico superficial y el esófago de Barret con displasia. Se cree que la resección endoscópica de estas lesiones tempranas malignas y premalignas es un tratamiento curativo mínimamente invasivo con baja morbilidad⁴. Sin embargo, todavía hay una alta incidencia de estenosis en la mayoría de las resecciones endoscópicas, lo que lleva a la disfagia. La tasa de estenosis después de la disección submucosa endoscópica fue de 18% y las tasas después de la resección endoscópica de la mucosa fueron 52-67%⁷. Para prevenir estas complicaciones, se necesita tejido o material adicional para la reconstrucción quirúrgica con el objetivo de proporcionar continuidad e integridad estructural, integración de tejidos y anastomosis de los sitios quirúrgicos.



1.1.3 El concepto de la ingeniería de tejido y medicina regenerativa

La medicina regenerativa tiene el potencial de sanar y reparar tejidos y órganos dañados por la edad, enfermedad o trauma, así como para normalizar los defectos congénitos⁸. El campo de la medicina regenerativa abarca numerosas estrategias, que incluyen el uso de materiales y células madre, así como varias combinaciones de los mismos, para reemplazar el tejido faltante, reemplazándolo eficazmente tanto estructural como funcionalmente, o para contribuir a la cicatrización del tejido⁸.

La IT es un subcampo estrechamente relacionado con la medicina regenerativa que se centra en la reparación, reemplazo y la regeneración de tejidos y órganos con función deteriorada. Ofrece la capacidad de sintetizar tejidos con propiedades únicas para crear tejidos específicos. Las estrategias más comunes implican el uso de andamios tridimensionales (3D) porosos que sirven como plantillas para la formación específica de tejido⁹.

Se ha estudiado una alta variedad de biomateriales en la búsqueda del andamio ideal. Existen factores que son altamente significativos para el éxito de los materiales utilizados en la IT, entre ellos se encuentran los siguientes:

- Biocompatibilidad: que no conduce a una respuesta inmunogénica del huésped;
- Biodegradación: en un período de tiempo adecuado que permita un crecimiento celular suficiente mientras no se produzcan productos de degradación nocivos;
- Propiedades mecánicas: que están en línea con el crecimiento del tejido, es decir, una cantidad significativa de soporte 3D en las primeras etapas sin obstruir la producción celular de matriz extracelular (MEC) en las etapas posteriores¹⁰.



1.2 Biomateriales usados como andamios en la regeneración de tejidos esofágico.

Los materiales de andamiaje más exitosos facilitan la adhesión celular, el crecimiento, la migración y responden a las señales moleculares y físicas del medio *in vivo*⁹. Los andamios utilizados en la IT se pueden clasificar en tres categorías (**Figura 2**) como se describe a continuación:

1.2.1 Polímeros sintéticos

Son macromoléculas altamente sintonizables que se pueden usar para formar andamios para su uso en ingeniería tisular. Carecen de capacidad de señalización biológica y, por lo tanto, requieren conjugación con moléculas y marcadores celulares. Sin embargo, los sintéticos son beneficiosos porque pueden adaptarse específicamente para que tengan las propiedades deseadas de ciertos andamios. Las propiedades químicas y mecánicas se pueden alterar fácilmente para acomodar y estimular el crecimiento de tejidos mediante la adición de moléculas de adhesión celular y grupos funcionales. En relación con los polímeros naturales, los sintéticos tienen inmunogenicidad limitada y bioactividad reducida, que disminuyen el riesgo de rechazo *in vivo*, pero tienen un mayor potencial para provocar respuestas inflamatorias en comparación con otros biomateriales. Otra ventaja de los sintéticos es que se fabrican fácilmente a un costo relativamente bajo⁹. A continuación, se describen las características de los polímeros sintéticos:

- Ácido poli-glicólico (PGA): Exhibe una rápida degradación *in vivo*, convirtiéndolo en un material ideal para el andamio de red de malla, en el cual las células cultivadas o nativas pueden reemplazar rápidamente el andamio⁹.
- Ácido Poli-Láctico (PLA): es una molécula más hidrofóbica que el PGA, haciéndola más estable y resistente a la degradación por hidrólisis.
- Ácido-poli-L-glutámico (PLGA): Es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). Este ácido contiene un carbono (ALFA) asimétrico que se describe típicamente como la forma D o L en términos estereoquímicos clásicos y, a veces, como las formas R y S, respectivamente⁶². Es el biomaterial mejor definido disponible para la



administración de medicamentos con respecto al diseño y rendimiento. Actualmente, es la modalidad de impresión sintética más utilizada en 3D⁹.

- Poli-caprolactona (PCL): la biodegradación ocurre más lento que el PGA y el PLA, haciéndolo el poliéster óptimo para el desarrollo de injertos a largo plazo, como el hueso. Los productos de degradación no son tóxicos y no alteran el pH local^{9,11}.

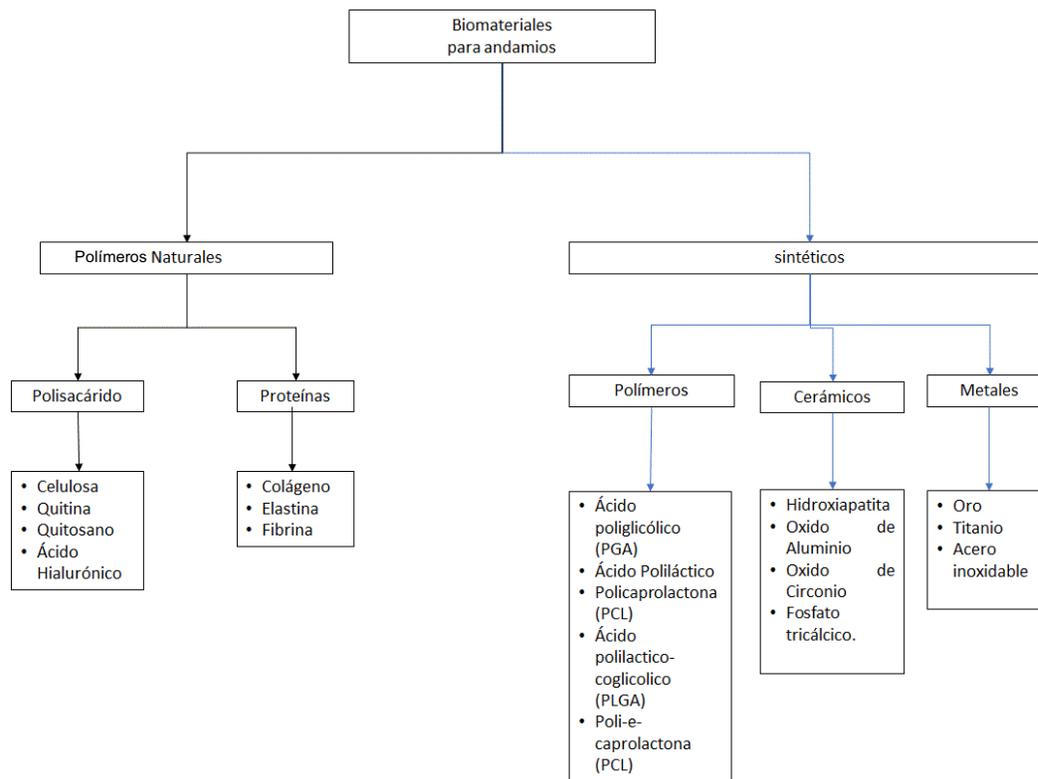


Figura 2. Clasificación general de los biomateriales para andamios con sus respectivos ejemplos. Modificado de^{9,11}.

1.2.2 Polímeros Naturales

Los polímeros de origen natural son un subconjunto de materiales bioactivos que pueden usarse en el cuerpo humano para aplicaciones de ingeniería tisular. Estos se pueden agrupar en dos categorías: polisacáridos y proteínas. Debido a que son compuestos de



origen natural, estos materiales tienen perfiles de compatibilidad favorables in vivo. Por lo tanto, son más adecuados para superar problemas de toxicidad o antigenicidad. Sin embargo, existen desventajas previstas. Los materiales bioactivos no son tan duraderos como sus equivalentes sintéticos y con frecuencia se degradarán con el tiempo. Esto puede ser ventajoso porque las modificaciones en las estructuras pueden controlar la tasa de degradación para satisfacer las necesidades terapéuticas^{11,12}. Los materiales bioactivos deben crearse con el objetivo de restablecer el equilibrio fisiológico del huésped o deben volverse a administrar¹³. Desde el punto de vista de la fabricación, la composición de los materiales bioactivos es mucho más compleja que su contrapunto sintético¹³. La Tabla 1 describe los polisacáridos y proteínas comúnmente utilizados en la fabricación de andamios para la ingeniería de tejidos esofágico.

1.3 Tejidos animales descelularizados como fuente de andamios para IT de esófago

1.3.1 Matriz extracelular

En el cuerpo humano, la MEC funge como andamio o soporte nativo. La MEC está integrada por macromoléculas naturalmente biodegradables que proporcionan muchas funciones biológicas muy importantes, incluyendo un entorno 3D para la interacción célula-célula y matriz-célula, necesaria para la unión celular, migración y proliferación celular. Asimismo, provee de una estructura estable y de igual manera degradable que permite la remodelación tisular de ciertos órganos en respuesta a necesidades fisiológicas y patológicas¹⁴

Existen muchos tipos de MEC de acuerdo con los diversos tejidos y órganos. Los componentes comunes que la integran se observan en la **Figura 3**. Estos incluyen la gran familia de colágeno, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas adhesivas⁴. El colágeno y la elastina sirven como elementos primarios estructurales de la MEC y son las proteínas presentes más abundantes. Los GAGs sirven como reticuladores y reservorios para agua, factores de crecimiento y citoquinas / quimiocinas debido a su carga altamente negativa y sitios de unión para proteínas específicas. Las glicoproteínas adhesivas



se unen a las células y se intercalan a través de la MEC e interactúan tanto con la MEC como con los receptores de integrinas que se encuentran en las superficies celulares¹⁵.

1.3.2 Colágeno

Las proteínas más abundantes de la MEC son miembros de la familia del colágeno⁶⁴. El colágeno es el principal elemento estructural de todos los tejidos conectivos y también se encuentra en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos parenquimatosos, donde contribuyen a la estabilidad de los tejidos y órganos, además, mantienen su integridad estructural⁷³.

El colágeno está compuesto por tres cadenas polipeptídicas en el que los aminoácidos presentan una secuencia repetitiva del tipo (-Gly-X-Y) donde generalmente la X suele ser prolina (Pro) y la Y hidroxiprolina (Hyp) y la glicina se repite cada tres de ellos permitiendo que estas cadenas se enrollen de manera levógira y con ellos forma una triple hélice característica del colágeno⁷⁸. A su vez estas triples hélices se agrupan para formar microfibrillas y posteriormente formar fibras más grandes (macrofibras) hasta formar las fibras de colágeno visibles en los tejidos⁷⁹.

Según su estructura y organización supramolecular, se pueden agrupar en colágenos formadores de fibrillas (I, II, III, V, XI), colágeno asociado a fibrillas (IX, XII, XIV, XIX, XX y XXI), colágeno formador de redes (VIII y X), fibrillas de anclaje (VII), colágeno transmembrana (XIII y XVII), colágeno de membrana basal (IV) y otros con funciones únicas⁶⁴.

El colágeno tipo I, es el más abundante y es el componente principal de los tejidos conectivos como tendones, ligamentos, piel, huesos, además de la MEC⁷¹. Es frecuentemente utilizado como biomaterial debido a sus características como son la actividad homeostática, puede ser degradado de forma natural por medio de proteasas (colagenasas) y es altamente biocompatible⁷².



1.4 Descelularización de tejidos.

La descelularización es el proceso de utilizar varios métodos físicos, enzimáticos o químicos para lisar las células y remover los componentes intracelulares del tejido mientras se preservan los componentes extracelulares nativos¹⁴. La Tabla 2 muestra los métodos más comunes usados en la descelularización de tejidos, así como su modo de acción.

El objetivo principal de un proceso de descelularización eficaz es eliminar los epítomos (Zona específica de la superficie de un antígeno que interactúa con anticuerpos específicos a los cuales se une⁸³) y antígenos celulares que provocan respuestas inmunitarias potencialmente destructivas que resultan en la falla del implante mientras se preserva la composición y la configuración de las macromoléculas de la MEC¹⁴. Cada tejido tiene una composición y organización única de células. Como resultado, el protocolo de descelularización debe optimizarse para cada tejido a fin de maximizar la eliminación del contenido celular a la vez que se conserven las proteínas beneficiosas de la MEC¹⁴.

Tabla 1 Características más importantes de biopolímeros usado como andamios para ingeniería de tejidos.

	Celulosa	Derivado de una alta variedad de plantas, es el polisacárido más abundante en la naturaleza, que se ha usado en aplicaciones de ingeniería tisular. Su estructura consiste en anillos repetidos de β -D-glucopiranososa, que proporcionan resistencia mecánica y soporte a los andamios ⁹ .
Polisacáridos	Quitina/Quitosano	Es el segundo polisacárido natural más abundante y es derivado del exoesqueleto de los crustáceos, dándole una tendencia natural que dicta la figura y forma. Su estructura linear beta 1,4-linked N-acetyl-D-glucosamine, creando cadenas hidrofóbicas. Aunque estas interacciones hidrofóbicas pueden limitar la utilidad de un biomaterial, las propiedades dieléctricas intrínsecas de la quitina lo hacen útil en ingeniería tejidos que requieren conductancia eléctrica, como los nervios. El quitosano ha demostrado propiedades antibacteriales y es utilizado para promover la cicatrización de heridas en veterinaria ¹⁶ .
	Ácido hialurónico	Es un polímero natural no ramificado que pertenece a los glucosaminoglucanos que se encuentran en los tejidos epiteliales, conectivos y nerviosos de los vertebrados ⁶¹ . La estructura primaria del ácido hialurónico es una cadena lineal que contiene unidades de disacárido repetidas unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos. Cada disacarido consiste en N-acetil-D-glucosamina y ácido-D-glucurónico unidos mediante enlaces β -1,3 glucosídicos ⁶⁰ . Los altos pesos moleculares y las fuerzas intramoleculares dan al ácido hialurónico una alta viscoelasticidad que ya ha demostrado ser útil en la reparación de las articulaciones debido a su capacidad simultánea para lubricar y absorber los impactos ⁹ .
Proteínas	Colágeno	La proteína más abundante en la matriz extracelular es el colágeno, está compuesto por tres cadenas polipeptídicas en el que los aminoácidos presentan una secuencia repetitiva del tipo (-Gly-X-Y-) donde generalmente la X suele ser prolina (Pro) y la Y hidroxiprolina (HYP) y la glicina se repite cada tres ⁶⁵ de ellos permitiendo que estas cadenas se enrollen de manera levógiara y con elló forma una triple hélice característica del colágeno. A su vez estas triples hélices se agrupan para formar microfibrillas y posteriormente formar fibras mas grandes ⁶⁴ .



Elastina	Las fibras de elastina son proteínas de la matriz extracelular que dotan a los tejidos vasculares de elasticidad, lo que permite una deformabilidad a largo plazo sin aporte de energía. Además, es altamente hidrófoba que raramente se remodela ¹⁷ . Es notable por su longevidad ⁹ .
Fibrina o pegamento de fibrina)	Consiste principalmente de fibrinógeno y trombina, que forman un coágulo enzimáticamente reticulado al mezclarse ⁴⁴ . Con mayor frecuencia se prepara a partir de plasma humano, se ha probado exhaustivamente in vivo y se utiliza como material inyectable ¹⁸ .

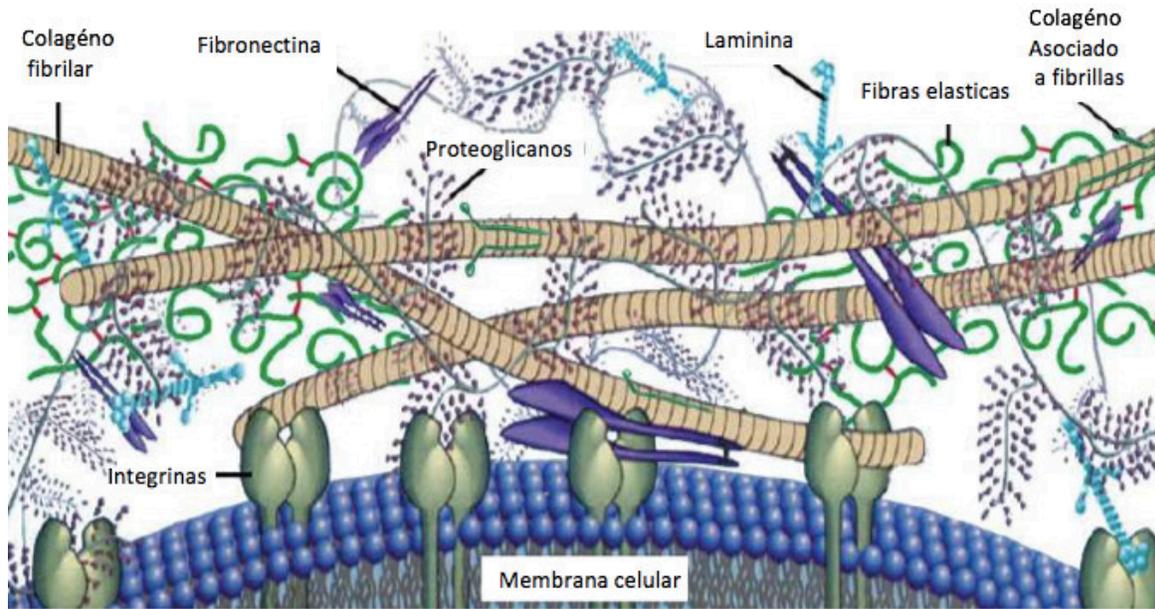


Figura 3. Representación esquemática de los componentes de la matriz extracelular y la interacción entre ellos. Modificado de Aamodt, J. M., & Grainger, D. W. (2016). *SC. Biomaterials*¹⁵.

1.4.1 Matrices acelulares y cultivo con células

Las matrices acelulares naturales se derivan de órganos o tejidos humanos y animales que han sido tratados para eliminar células y material inmunogénico. No obstante, es importante que retengan la macro y microarquitectura del tejido de origen, con su morfología 3D, que se cree promueve la orientación, el crecimiento y la proliferación celular. Además, los componentes moleculares de la MEC¹⁴ nativa se mantienen en el tejido descellularizado, siendo ricos en colágeno, elastina, fibronectina, laminina y factores de crecimiento, como se discutió anteriormente⁶. Estas tienen ventajas adicionales sobre los andamios sintéticos, como el hecho de no producir productos de degradación potencialmente tóxicos o inducir características de inflamación que pueden ser importantes en la prevención de la estenosis¹⁰.

1.4.1.1 Matrices acelulares cultivadas con células

Las matrices cultivadas con células son matrices que están pre-cultivadas con células huésped⁴. Varios estudios⁴⁰ han demostrado que las matrices cultivadas con células



promueve la remodelación temprana del tejido, y reducen la respuesta inflamatoria en comparación de las matrices acelulares¹⁰.

Tabla 2. Métodos de descelularización reportados en la preparación de andamios derivados de tejidos animales^{19,20,21}

	Método	Modo de acción	
Físico	Congelamiento	Los cristales de hielos intracelulares rompen la membrana celular.	
	Fuerza mecánica	La presión puede reventar las células.	
	Agitación	Produce lisis celular, pero se usa comúnmente para facilitar la exposición al químico y la remoción del material celular.	
Químicos	Alcalinos	Solubiliza los componentes del citoplasma de la célula.	
	Detergente no-iónicos	Tritón X-100	Rompe la interacción lípido-lípido y lípido-proteína, dejando la interacción proteína-proteína intacta.
	Detergentes iónicos	Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) Deoxicolato de sodio Tritón X-200	Solubilizan las membranas celulares y nucleares; además de desnaturalizar proteínas.
	Detergente Switteriónico	CHAPS	Exhibe propiedades de detergentes iónicos y no iónicos.
	EDTA, EGTA		Agentes quelantes que se unen a iones metálicos divalentes, lo que altera la adhesión celular a la MEC.
	Fosfato de Tri-n-butilo		Solvente orgánico que rompe la interacción proteína-proteína.
	Enzimáticos	Tripsina	Fragmenta enlaces peptídicos en el lado Carboxílico de Arg y Lys.
Endonucleasas		Cataliza la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de las cadenas de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.	
Exonucleasas		Cataliza la hidrólisis de los enlaces terminales de las cadenas de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos.	



2 Antecedentes

Ya que el esófago es un órgano importante involucrado en el transporte de alimentos sólidos y líquidos, resulta necesario estudiar estrategias para tratar los defectos esofágicos. Si no se trata, conduce a una calidad de vida deteriorada e incluso puede causar la muerte. Es por eso por lo que se ha trabajado con diferentes tipos de biomateriales.

En sus inicios, se utilizaron los no absorbibles como plástico tales como silicona, teflón. Sin embargo, la falta de biodegradación y la pobre biocompatibilidad a largo plazo de estos materiales se asoció a problemáticas como infecciones, fugas, estenosis y un crecimiento deficiente del tejido²². Esto dio lugar a la sustitución de los materiales no degradables por materiales naturales y sintéticos biodegradables. La **Tabla 3** muestra un resumen de los estudios de otros autores sobre prótesis esofágicas artificiales derivadas de materiales no degradables que se probaron en el tratamiento de defectos en esófago de diferentes modelos animales.

Debido a la retención de su macro y microarquitectura, las matrices acelulares han sido atractivas en el desarrollo de distintos andamios²³. En un estudio previo²⁴, donde se trataba un defecto esofagico en un modelo canino, se desarrollo un parche artificial que consistía en células epiteliales de la mucosa oral (OMEC) cultivadas en submucosa del intestino delgado porcino (SIS, por sus siglas en inglés) y SIS sin células cultivadas. Los resultados de SIS con OMEC mostraron una reepitelización completa sin inflamación y una recuperación más rápida con un aumento del peso corporal. Sin embargo, los animales tratados con SIS sin células cultivadas solo mostraron una reepitelización parcial con inflamación. En general, ambos grupos mostraron una respuesta de curación satisfactoria sin complicaciones como fuga, estenosis y disfagia²⁴. A pesar de los casos de éxito que se han reportado al utilizar matrices acelulares como andamios para tratar los defectos esofágicos, aún existe cierta deficiencia en la obtención de estos andamios. Entre las limitaciones más importantes se encuentran el rechazo inmunológico, la pobre reepitelización y la ausente regeneración muscular. La **Tabla 4** muestra un resumen de otros



estudios que se han realizado por diferentes autores sobre implantes esofágicos derivados de andamios acelulares, las cuales se probaron en el tratamiento de defectos en esófago de diferentes modelos animales. Cuando los implantes esofágicos derivados de origen natural son cultivados con células, su desempeño se mejora, como se discute en la **Tabla 5** donde se muestra una comparación de diferentes estudios realizados anteriormente por diferentes autores utilizando andamios materiales de origen natural sembrados con células.

Tabla 3. Comparativa del desempeño de implantes esofágicos artificiales (obtenidos a partir de materiales no degradables) en diferentes modelos animales.

Modelo Animal (n)	Andamio		Resultados	Pronostico y tiempo de supervivencia
	Tipo	Tamaño	Regeneración en andamio	
Canino ²⁵ (19)	Colágeno con <i>stent</i> de silicón (sin remover)	5 cm brecha circunferencial en esófago cervical	Regeneración epitelial parcial	26% mortalidad
Canino ²⁶ (26)	Colágeno con <i>stent</i> de silicón (retirado entre 2 y 8 semanas)	5cm de brecha circunferencial en esófago cervical	Regeneración epitelial sin estenosis	0% mortalidad cuando el <i>stent</i> es retirado después de 4 semanas.
Canino ²⁷ (7)	Colágeno con <i>stent</i> de silicón (retirado a las 6 semanas)	10 cm de brecha circunferencial en esófago cervical	Regeneración epitelial y muscular parcial sin estenosis	29% mortalidad
Canino ²⁸ (43)	Colágeno con <i>stent</i> de silicón (retirado a las 2, 3 o 4 semanas)	5 cm de brecha circunferencial en esófago cervical	Regeneración epitelial y muscular parcial sin estenosis	0% mortalidad cuando el <i>stent</i> es retirado a las 4 semanas: 1mes (n=6) 3meses(n=2) 6meses(n=2) 12meses(n=6)
Canino ²⁹ (9)	Colágeno con doble capa de silicón	5 cm de brecha circunferencial en esófago torácico	Regeneración epitelial, no muscular, porción medial con estenosis	11% mortalidad Los perros fueron sacrificados de la siguiente manera: 1, 2, 3, 3, 6, 10, 12, y 24 meses después de la cirugía



Respecto al proceso de descelularización de tejido esofágico, la **Tabla 6** muestra una comparativa entre los métodos de descelularización y su eficacia por diferentes autores. En esta tabla se puede apreciar que los métodos de descelularización combinan el uso de detergentes no iónicos y catiónicos, así como proteasas y nucleasas.

Tabla 4. Comparativa del desempeño de diferentes tipos de andamios acelulares en el tratamiento de defectos esofágicos.

Modelo Animal (n)	Andamio		Resultados	Pronostico y tiempo de supervivencia
	Tipo	Tamaño	Regeneración en andamio	
Canino ³⁰ (15)	Matriz extracelular de submucosa intestinal (n=12) o submucosa de vejiga urinaria(n=3)	5 cm circunferencial o brecha circunferencial en esófago cervical	Regeneración mucosa y muscular, estenosis en caso de defecto circunferencial completo	0 % mortalidad
Rata ³¹ (85)	Injerto en parche de submucosa intestinal o interposición tubular	Defecto semicircunferencial o escisión esofágica segmentaria	Fracaso en interposición tubular. Regeneración mucosa y muscular a 150 días en el grupo parche	100% de supervivencia para el grupo del parche 0% sobrevivieron para el grupo de interposición tubular a 28 días.
Cerdo ³² (14)	SIS tubular	4cm de defecto esofágico cervical	La prótesis no se encontró macroscópicamente o histológicamente	Únicamente sobrevivió 1 cerdo las 4 semanas de estudio. Los demás se sacrificaron por la estenosis severa. 10 días (n=1), 16días(n=1), 18días (n=1), 19días (n=3), 20 días (n=3), 21 días (n=2), 22días (n=1), 24 días(n=1), 31días(n=1)
Humano ³³ (5)	Mucosa porcina de intestino delgado	8 a 13 cm resección en bloque de mucosa y submucosa de carcinoma superficial	Restauración de mucosa normal tan temprano como 4 meses	Estenosis; perforación en un paciente
Humano ³⁴ (1)	Mucosa porcina de intestino delgado	5x3 cm de defecto en esófago cervical	Esófago intacto con calibre normal	No se encontraron complicaciones



Tabla 5. Comparativa del desempeño de andamios de origen natural cultivados con células para sustitución esofágica.

Modelo animal (n)	Andamio		Resultados	Pronóstico y tiempo de supervivencia
	Tipo	Tamaño	Regeneración en andamio	
Ratas ³⁵ (10)	Esófago cultivado con células estromales, alogénicas.	Segmentos con una Longitud de 15 mm, correspondiente al 20 % del total del largo.	Regeneración de la mayoría de las células y componentes tisulares del esófago incluyendo epitelio funcional, fibras musculares, nervios y vasculatura	Todos los animales sobrevivieron los 14 días.
Puercos ³⁶ (6)	Esófago porcino descelularizado como matriz acelular con (MC) y sin (MA) células autólogas musculares lisas.	2 cm de diámetro	MA: mostró una respuesta inflamatoria más severa y dio negativo a la presencia de células lisas epiteliales. MC: presenta crecimiento de células musculares lisas, mostrando una organización temprana en fascículos más pequeños	Todos los animales sobrevivieron las 3 semanas: MC: n=3 MA: n=3.
Corderos ³⁷ (4)	Andamios de colágeno de bovino entrecruzado con glutaraldehído sembrados con fibroblastos y posteriormente con células	4 cm de longitud	A las 12 semanas se puede observar se observa crecimiento vascular en las regiones periféricas. Además, se observó crecimiento celular del lado luminal No se observó inflamación	Todos los animales sobrevivieron las 8 (n=2) y 12 (n=2) semanas
Canino ³⁸ (24)	Parches de SIS porcino sin (SSC) y con	5 cm de largo que equivale a un defecto del	SCC a 4 semanas: se observó una completa	Todos los animales sobrevivieron las



(SCC) células autólogas epiteliales de la mucosa oral	50 % del diámetro	reepitelización y muy baja respuesta inflamatoria SSC: se observó una epitelización parcial con inflamación. 8semanas: El epitelio escamoso cubrió completamente el injerto en ambos grupos. Sin embargo, la regeneración muscular se observó únicamente en SCC.	4 (SSC: n=6 y SCC: n=6) y 8 semanas (SSC: n=6, SCC: n=6).
---	-------------------	---	---

Tabla 6. Descripción de métodos de descelularización aplicados a tejido esofágico de diferentes fuentes.

	Rata ³⁹	Puerco ⁴⁰	Rata ⁴¹	Puerco ⁴²	Puerco ⁴³
Forma	Esófago completo	Esófago completo	Esófago completo	Esófago completo	Mucosa y submucosa
Método de descelularización	Inmersión y agitación	Inmersión	Inmersión y agitación	Perfusión	Inmersión y agitación
Resumen del protocolo de descelularización	48 h 10 mM Tris 48 h 1 % tritón X-100 6 h 400 U/mL DNasa/0.125 mg/mL Rnasa-A 48h 0.5% SDS	5 ciclos de 72 h Agua destilada 4 h con 4 % deoxicolato de sodio 3 h 2000 KU DNasa-I	24 h 4% deoxicolato de sodio 12 h 2 mg/mL DNasa-1	3 ciclos de 24 h agua desionizada 4 h con 4 % deoxicolato de sodio 3 h 2000 kU DNasa-1	1 h 1% tripsina/0.05 %EDTA 30 min 1M sucosa 48 h 3% tritón X-100 4 h 10 % deoxicolato de sodio 2 h 0.1 % ácido peracético/4 % etanol 2 h 100 U/mL DNasa-I
Evaluación de la eficacia de la descelularización	No presenta núcleos en la sección teñida con H&E	No presenta núcleos en la sección teñida con H&E	No presenta núcleos en la tinción H&E Concentración de DNA: 140 ng/mg	No núcleos en la tinción H&E Concentración de DNA de 500 ng/mg	No presenta núcleos en la sección teñida con H&E. Concentración de DNA: 50 ng/mg



3 Descripción del proyecto

3.1 Justificación

Diversas patologías que se presentan en el esófago requieren, para su tratamiento, de la sustitución del tejido enfermo con implantes, los cuales son diseñados a partir de biomateriales derivados de origen natural o sintético. La necesidad clínica de estos implantes puede describirse en términos de dos escenarios. (i) Los implantes disponibles por la clínica en México se asocian con tasa de recidivas alta ya que no están diseñados para cumplir los requerimientos mínimos o imitar las características de los tejidos a sustituir. (ii) Los implantes para sustituir tejidos enfermos no están disponibles por cuestiones socioeconómicas o simplemente porque no se encuentran en el mercado local. En nuestro grupo de investigación se ha logrado la obtención de implantes integrados por matriz extracelular pericárdica descelularizada, mismo que se ha propuesto como precursores de hidrogeles biomédicos y mallas quirúrgicas para el tratamiento de defectos en pared abdominal. En este proyecto se propone la generación de conocimiento entorno al desarrollo de biomateriales de matriz extracelular esofágica de origen porcino, para que se sienten las bases del desarrollo de implantes para tratar defectos en esófago, en el futuro inmediato. En particular, se propone la evaluación del efecto de la edad del tejido porcino de partida sobre las propiedades de biomaterial descelularizado resultante. Esto con la intención de contar con biomateriales tubulares de diferentes diámetros.

3.2 Hipótesis

Las propiedades mecánicas y estructurales, así como la composición bioquímica residual de biomateriales derivados de matriz esofágica se ven afectadas por la edad del tejido porcino de partida.



3.3 Objetivo General

Diseñar y evaluar biomateriales de matriz esofágica obtenidos por descelularización de tejido porcino de diferentes edades.

3.3.1 Objetivos específicos

- Manufacturar biomateriales descelularizados a partir de tejidos animales tubulares, de acuerdo con los requerimientos de aplicabilidad durante la implantación y las características de los tejidos a sustituir (diseño).
- Estandarizar el proceso de descelularización para el esófago porcino (lechón de tres diferentes edades).
- Evaluar la eficacia de la descelularización y su efecto en la composición residual
- Evaluar las características mecánicas del biomaterial resultante.
- Evaluar las características estructurales del biomaterial resultante, así como la capacidad para permitir el cultivo celular.
- Determinar si el uso de hidrogel y los ácidos Epoxieicosatrienoides ofrecen mayor actividad metabólica y viabilidad celular de las células cultivadas sobre el tejido descelularizado.



4 Metodología

4.1 Obtención y preparación inicial de los tejidos esofágicos

Se obtuvieron tejidos esofágicos de lechones de diferentes edades: 1, 21 y 45 días, inmediatamente después del sacrificio del animal. Los tejidos fueron donados por la Granja Barbosa ubicada en Cortázar de la Victoria, Guanajuato. Estos fueron transportados en hielo hasta la División de Ciencias e Ingenierías de la Universidad de Guanajuato campus León, para poder ser lavados con solución salina (NaCl, 0.9%) y agua destilada estéril, cuidando mantener la arquitectura tubular y todas las capas que componen al esófago (Músculo, mucosa, submucosa y adventicia). Una vez lavado el tejido, se colocaron en una gasa estéril y se envolvieron en aluminio para ser almacenados a -20°C para su uso posterior.

4.2 Descelularización de los tejidos esofágicos

Antes de iniciar la descelularización, los esófagos se descongelaron en solución salina (0.9% NaCl) estéril. A partir de aquí los tejidos se sometieron al proceso descrito en la Tabla 7. El DOC es una sal biliar que trabaja junto con los lípidos / grasas / colesterol y forman micelas mixtas en el intestino. Estas micelas ayudan en la digestión y absorción de grasa a través de la pared intestinal. El Tritón X-100 es un tensoactivo y emulsionante de uso común en aplicaciones bioquímicas para solubilizar proteínas. Se considera un detergente comparativamente suave, no desnaturizante, que permite lisar células para extraer proteínas y orgánulos celulares²¹.

El DOC es una sal biliar que trabaja junto con los lípidos / grasas / colesterol y forman micelas mixtas en el intestino. Estas micelas ayudan en la digestión y absorción de grasa a través de la pared intestinal. El Tritón X-100 es un tensoactivo y emulsionante de uso común en aplicaciones bioquímicas para solubilizar proteínas. Se considera un detergente comparativamente suave, no desnaturizante, que permite lisar células para extraer proteínas y orgánulos celulares²¹.



4.3 Obtención de hidrolizados de matriz pericárdica

Se utilizó pericardio bovino adulto descelularizado para obtener los hidrolizados en ácido clorhídrico al 0.01M (pH=3) y pepsina al 1 mg/mL, usando una proporción de 10mg de tejido por cada mL de solución. La hidrólisis se realizó por 7 días a 4°C con agitación constante. Posteriormente se filtró con una gasa estéril donde se obtuvo una concentración de proteína total de 7 mg/mL. Finalmente, la solución se almaceno a 4°C para su uso posterior^{44,45}.

Tabla 7. Resumen del protocolo para descelularización probados en esófagos de diferentes edades: 1, 21 y 45 días

Esófago de 45 días	Esófago de 21 días	Esófago de 1 día
Hinchamiento:		
Solución óxido de calcio (0.8% CaO) y Tritón X-100 (1%) en agitación durante 10-15 minutos, posteriormente se dejan a 4 °C durante toda la noche.		
Deshinchamiento:		
Sulfato de amonio por 40 min. (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 %, (3 x, 20 min c/u)		
Lavado		
30 min en PBS a 4 °C		
Eliminación de células		
Perfusión y agitación con DOC 4 % disuelto en PBS a temperatura ambiente (3 h).		
Perfusión y agitación con PBS y Tritón X-100 al 1% a temperatura ambiente (3 h).		
Lavados		
PBS durante toda la noche a 4 °C		
Eliminación de células		Eliminación de células
Perfusión y agitación con DOC 4 % disuelto en PBS a temperatura ambiente (2 x,5 h)		Perfusión y agitación con DOC 4 % disuelto en PBS a temperatura ambiente (2 x,1.5 h)
Lavados- Agitación con PBS y tritón X-100 durante toda la noche a 4 °C		
Tratamiento con nucleasas 6 h en agitación con nucleasas a 37 °C (150 µL de RNasa 0.02mg/mL y 300µL DNasa (RQ1 RNasa-Free Dnasa (1,000u/mL), PROMEGA), disuelta en MgCl ₂ 2.5 mM, CaCl ₂ 0.5	Tratamiento con nucleasas 4 h en agitación con nucleasas a 37 °C (150 µL de RNasa 0.02 mg/mL y 200µL de DNasa RQ1 RNasa-Free Dnasa (1,000u/mL), PROMEGA), disuelta en MgCl ₂ 2.5mM, CaCl ₂	Tratamiento con nucleasas 3 h en agitación con nucleasas a 37 °C (100 µL RNasa 0.02 mg/mL y 100 µL de DNasa RQ1 RNasa-Free Dnasa (1,000u/mL), PROMEGA, disuelta en MgCl ₂ 2.5 mM, CaCl ₂



mM, Tris HCl 10 mM, (pH 7.6). 0.5mM, Tris HCl 10 mM, (pH 7.6). 0.5mM, Tris HCl 10 mM, (pH 7.6).

Enjuague de nucleasas- Dos lavados con EDTA 0.03 M, Tris HCl 0.1 M (2x, 15 min c/u). Lavados con agua destilada (3x, 20 min c/u y 48 h en agitación a 4 °C).

4.4 Evaluación de la eficacia de la descelularización y su efecto en la composición residual

4.4.1 Cuantificación de DNA residual

Se aisló DNA genómico usando el kit *DNA purification and Extraction* (Promega) y se cuantificó leyendo la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 260 nm, mediante un espectrofotómetro con un sistema de microgota (*microdrop*, 5µL). Se obtuvo una muestra de 5 mg de peso seco, para reportar los resultados en ng de DNA por mg de tejido peso seco.

4.4.2 Cuantificación de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) residuales.

Se cuantificó el contenido GAGs en el material descelularizado mediante el método colorimétrico de azul de dimetilmetileno (DMMB). Se digirieron 10 mg de peso seco de tejido nativo y descelularizado de los esofagos de 1, 21 y 45 días, siguiendo un protocolo previamente descrito⁶³, donde se agregó 0.987 mL de solución de un amortiguador de fosfato con cisteína y 0.0125 mL de papaína a 60 °C durante 3 h. De las muestras digeridas se utilizó 0.018 mL de cada una y 0.192 mL de solución de DMMB. La cuantificación se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 525 nm. Para los estándares se utilizó sulfato de condroitina a diferentes concentraciones: 50, 40, 30, 20, 10, 5 µg/mL. Los resultados se reportan en µg de glicosaminoglicanos por mg de tejido peso seco.

4.4.3 Cuantificación de proteínas totales residuales

Se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método colorimétrico (BCA *protein Assay*, thermoScientific) usando un espectrofotómetro con una longitud de onda de 652 nm. Para extraer las proteínas de los tejidos se utilizó una solución de extracción *Tissue Extraction reagent I* (thermo Fisher), el cual contenía un inhibidor de proteasa, donde se



agregó 5mL de solución por cada 0.5 g de tejido y se dejó en agitación durante toda la noche a 4 °C. Finalmente el tejido fue homogenizado y posteriormente centrifugado a 11,200 xg durante 5 min a 4 °C, donde se recolectó el sobrenadante. Los resultados obtenidos se reportan como μg de proteínas totales/mg de tejido húmedo.

4.4.4 Cuantificación de fibronectina residual

Se cuantificó el contenido de fibronectina de las muestras de proteínas totales, mediante el *kit Human Fibronectin Coated Elisa* (invitrogen). Las lecturas se realizaron utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se reportan en ng de fibronectina/ μg de proteínas totales.

4.5 Análisis de la microestructura por microscopía de Generación de Segundo Armónico (SHG).

Para observar el efecto de la descelularización sobre la microestructura del tejido esofágico, se observaron la capa muscular y mucosa de las muestras nativas y descelularizadas empleando un microscopio confocal multi fotónico de generación de segundo armónico (SHG, ZEISS LSM-710-NLO) y aprovechando las propiedades ópticas no lineales del colágeno fibrilar del tipo I. Estas muestras se recortaron en cuadros de 0.5x0.5 cm y un espesor de 1.1 mm para la capa muscular y 0.7 mm para la submucosa y se colocaron sobre un portaobjetos, como se muestra en la **Figura 4**. Las muestras se observaron con un objetivo clase LD Plan-Neofluar, con magnificación 20x, con apertura numérica 0.4 (Carl Zeiss, Cat. No. 421350-9971-000), zoom 1.0, con láser Coherent, modelo Chameleon de 80 MHz y a una longitud de onda de 852 nm. El divisor del haz utilizado fue MBS: Plate, MBS_InVis: MBS 760+, FW1: BS-MP 355/690+(R). El modo de escaneo fue plano. La resolución de la imagen se definió como 1024 x 1024 pixeles a una profundidad de 8 bit. El tamaño de la imagen fue de x: 424.68 μm , y: 424.68 μm . El "Pixel dwell" fue de 12.6 μs y la ganancia maestra de 883. Finalmente, para el procesamiento de las imágenes se empleó el *software* "ZEN". Todas estas pruebas se realizaron en el Centro de Investigaciones en Óptica, sede León, Guanajuato.

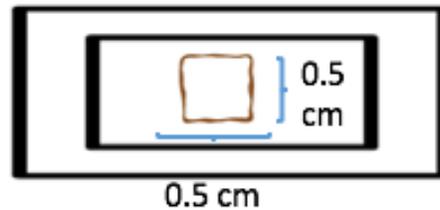


Figura 4. Esquema que muestra la colocación de la muestra sobre el portaobjetos cubierto por un cubreobjetos, dejando la capa a observar del lado del cubreobjetos. Las muestras fueron observadas a 20x.

4.6 Análisis histológico mediante tinción Hematoxilina y Eosina

Se realizó un análisis histológico del tejido esofágico descelularizado de las tres edades: 1, 21 y 45 días para inspeccionar la apariencia histológica de las cuatro capas principales del esófago: mucosa, submucosa, muscular externa y adventicia y comprobar la efectividad de la descelularización. Esta técnica se realizó en colaboración con el Mtro. Fernando Tenorio Rocha de la Universidad Nacional Autónoma de México, Escuela Nacional de Estudios Superiores unidad León.

4.7 Evaluación de las propiedades mecánicas de tensión

En la etapa de descelularización se puede alterar la estructura nativa del esófago, lo que comprometería las propiedades mecánicas. Por lo tanto, se realizaron ensayos de tensión uniaxial para estudiar la relación entre la descelularización y la respuesta mecánica del segmento tubular.

4.7.1 Preparación de las muestras

Se emplearon diferentes muestras de esófago tanto nativo como descelularizado para las diferentes edades; 1, 21 y 45 días. Además, estos ensayos se realizaron con todas las capas en conjunto y separadas en: capa muscular y capa submucosa y mucosa. Para estas muestras se realizaron cortes rectangulares (probetas) en el material liofilizado de manera longitudinal y circunferencial, como se muestra en la **Figura 5**. Dichas probetas tienen

dimensiones promedio de 20 mm de longitud, 3 mm de ancho y el grosor depende del tipo de muestra (**Figura 6**). Previo a los ensayos, las muestras fueron sumergidas en suero fisiológico (NaCl, 0.9%) durante 24 h a 4 °C para poder ser hidratadas. La **Tabla 8** muestra un resumen de los diferentes grupos de muestras analizadas.

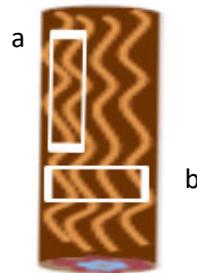


Figura 5. Representación esquemática de los tipos de corte (a:longitudinal o axial y b:transversal) para los diferentes muestras de tejido esofágico.

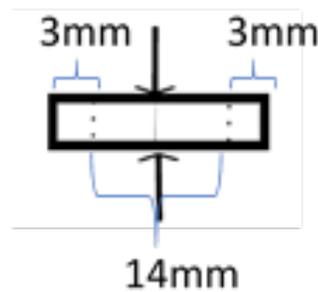


Figura 6. Forma de la probeta empleado en tensión uniaxial.

Tabla 8. Diseño de experimentos para pruebas mecánicas. * indica las edades de los esófagos a los cuales fueron separadas las capas de músculo y submucosa y mucosa para su posterior análisis.

Edad (días)	Nativo/ Descelularizado	
	Tensión Uniaxial	
	Corte longitudinal	Corte circunferencial
1	Tipo de muestra: -Esófago con multicapas	Tipo de muestra: -Esófago con multicapas
21*	Esófago separado:	Esófago separado:
45*	-Músculo	-Músculo
	-Submucosa y mucosa	-Submucosa y mucosa



4.7.2 Equipo

Los ensayos se realizaron utilizando la maquina universal Instron 5543, que se aprecia en la **Figura 7**. El sistema está equipado con una celda de carga de 100 N y un transductor de desplazamiento. La celda de carga mide la fuerza mientras que el transductor de desplazamiento registra el desplazamiento. Tanto la celda de carga y el transductor están conectados con la computadora mediante el *software bluehill*. Con los datos de fuerza, desplazamiento y grosor de las muestras, se adquieren las curvas esfuerzo-deformación (E-D).



Figura 7. Máquina de ensayo universal Instron 5543.

4.7.3 Montaje de las probetas y ensayo

Para colocar las probetas sobre la mordaza y prevenir cualquier movimiento, se pegó 3 mm de muestra de cada lado con pegamento instantáneo marca Axton, como se muestra en **Figura 8a**. Después se colocó la parte superior de la mordaza y se aseguró con tornillos, como se muestra en la **Figura 8b**. El espacio efectivo entre mordazas (longitud inicial) de las probetas tuvo una distancia de 10 mm. Una de las mordazas se colocó en la parte inferior fija del Instron 5543 mientras que la otra se colocó al haz móvil de la máquina (**Figura 9**). En esta prueba se debió evitar el pretensado y la torsión.



Figura 8. Colocación de la muestra sobre la abrazadera.



Figura 9. Instalación de las abrazaderas al equipo.

Las pruebas se realizaron a temperatura ambiente y a una velocidad constante de 0.8 mm/s. Para mantener húmeda las probetas durante todo el ensayo, se colocó un vaporizador marca Home, como se aprecia en la **Figura 10a**. Los datos de fuerza y desplazamiento se registraron hasta que la muestra se rompe completamente (**Figura 10b**). Las propiedades mecánicas de los materiales se miden a partir de una curva esfuerzo (σ) vs deformación (ϵ) empleando las ecuaciones 1 y 2.

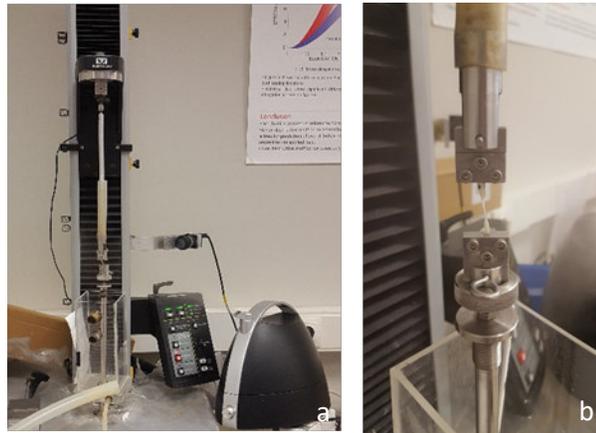


Figura 10. Muestra durante la prueba de tensión uniaxial.

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad \text{Ec.1}$$

$$\varepsilon = \frac{l}{l_0} \quad \text{Ec.2}$$

Donde:

F = Fuerza

A_0 = Area transversal inicial

l_0 = Longitud inicial

l = Longitud

La respuesta esfuerzo-deformación se analizó al graficar las curvas E-D para cada muestra. Para analizar la rigidez de los tejidos nativo y descelularizado se determinó el módulo elástico de cada muestra en la segunda porción lineal de la curva E-D. Para esto, el módulo elástico se calculó mediante la ecuación 3.

$$E = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1} \quad \text{Ec.3}$$

Donde:

σ_i = esfuerzo nominal en dos puntos de la segunda sección lineal

ε_i = deformación nominal en dos puntos de la segunda sección lineal



La rotura de las probetas fue tomada como la primera caída en la carga conforme la muestra fue continuamente extendida. La resistencia y la deformación máxima de tensión uniaxial fueron determinadas como el esfuerzo y la deformación en la rotura. En adición, se reporta el valor de tensión máxima, el cual representa la carga por unidad de ancho de las tiras de tejido en el punto de rotura.

En la **Figura 11** se observa una curva esfuerzo vs deformación generalizada de un tejido biológico la cual, puede dividirse en tres regiones distintas. En la región 1 o región "toe", donde las fibras de colágeno pueden ser deformadas con poco esfuerzo. En la segunda región, las fibras empiezan a soportar la carga y como resultado se alinean en la dirección de la misma⁸⁴. Además, representa la región donde el tejido funciona bajo tensiones fisiológicas normales^{80,81}. Finalmente, en la región 3 las fibras continúan elongándose hasta eliminar por completo las ondulaciones y muestran una relación esfuerzo-deformación lineal. En algunos casos se presenta una región no lineal después de la zona lineal hasta terminar con la ruptura⁸⁴.

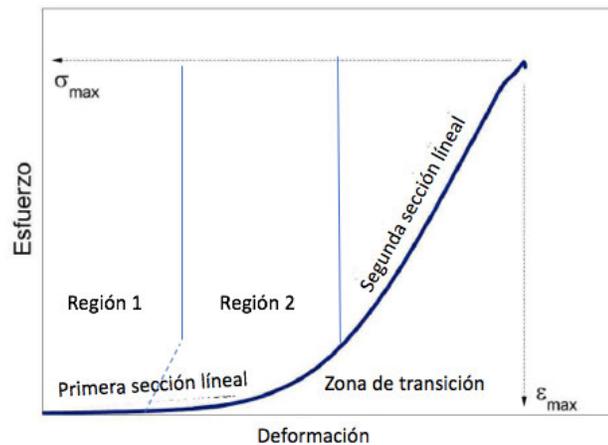


Figura 11. Ejemplo de una curva esfuerzo vs deformación típica de un tejido biológico.
*Modificado de*⁸⁴



4.8 Estudios *in vitro* con células epiteliales.

Para conocer el efecto de los diferentes materiales (**Figura 13**) sobre la respuesta de las células epiteliales se realizaron ensayos de actividad metabólica (MTT) y de viabilidad celular por la técnica live/dead como se menciona a continuación.

4.8.1 Cultivos celulares

Las células epiteliales esofágicas de conejo se aislaron adaptando un procedimiento previamente publicado^{31,32}, como se menciona a continuación: El esófago se lavó con solución salina al 0.9 % de NaCl y se colocó una sonda través del lumen para eliminar los restos que pudieron quedar, el esófago se cortó longitudinalmente para exponer la mucosa y ser enjuagado en PBS con antibióticos a 4 °C. Con ayuda de unas tijeras delgadas la capa muscular se separó de la mucosa. La mucosa separada se cortó en tiras para ser incubadas con dispasa y antibióticos durante toda la noche a 4 °C. Al siguiente día utilizando unas tijeras se separó la capa epitelial de la mucosa. La capa epitelial se colocó en PBS para eliminar la dispasa, posteriormente se incubó con tripsina al 0.05 % y EDTA 0.053 mM durante 10 min a 37°C en agitación. Se agregó suero fetal bovino al 10 % más medio para neutralizar la tripsina, después se centrifugó a 10,000 rpm durante 8 min. Finalmente, la pastilla se resuspendió en medio de cultivo. Dicho procedimiento se muestra en la **Figura 12**.

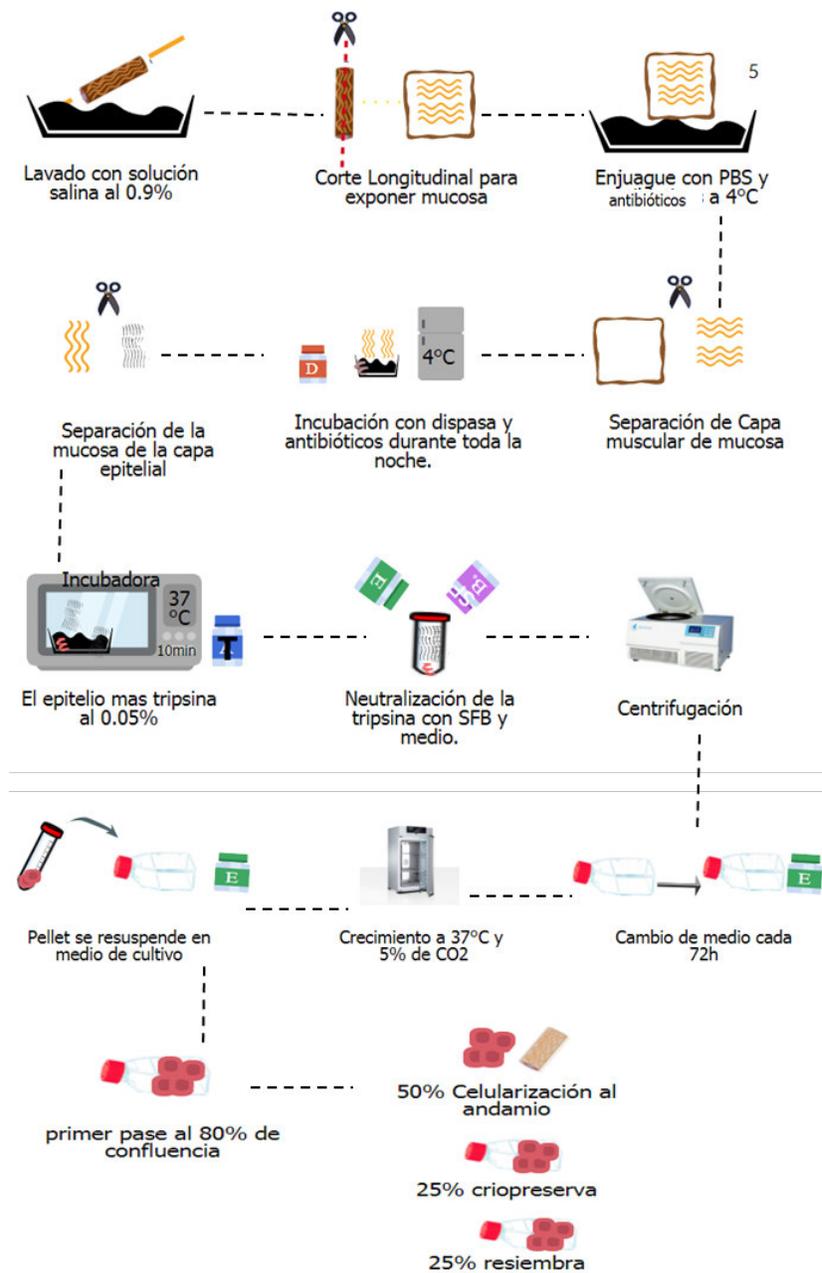


Figura 12. Procedimiento para cultivo celular primario de células epiteliales esofágicas de conejo^{46,47}.

En el apéndice 9.1 se muestra la composición de los medios que presentan mejores resultados en cuanto a crecimiento celular reportados en la literatura^{46,47}.



4.8.2 Cultivo celular sobre los andamios.

Una vez obtenida las células, éstas se colocaron sobre los diferentes materiales como se esquematiza en la **Figura 13**. Se cultivaron 2×10^4 de células epiteliales esofágicas de conejo sobre los tejidos descelularizados y liofilizado de 21 días (andamios). El material se recortó en cuadros de 5x5 mm, y se colocaron sobre una placa de 96 pocillos. El cultivo se realizó con medio EpiLife® suplementado con *growth factor keratinocyte* GFK® al 10%, el cultivo se mantuvo durante 24 y 48 h (37 °C, 5 % CO_2). Los grupos evaluados fueron:

- Células cultivadas sobre andamios solos,
- Células cultivadas sobre andamios con hidrogel (H)
- Células cultivadas sobre andamios con hidrogel y epoxieicosatrienoides (H+E),
- Células sin andamio ni hidrogel, control. (CC)

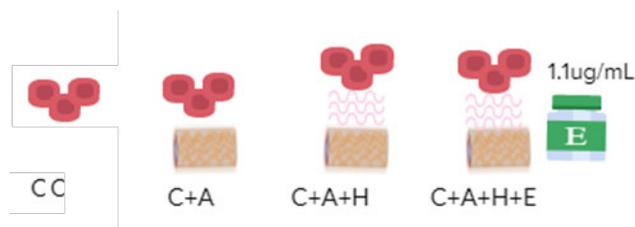


Figura 13. Diseño del cultivo celular sobre los diferentes materiales. CC: Células control, C+A: Células cultivadas sobre andamios solos, C+A+H: Células cultivadas sobre andamios con hidrogel, C+A+H+E: Células cultivadas sobre andamios con hidrogel y ácidos epoxieicosatrienoicos.

En esta etapa se evaluó si los hidrogeles formados sobre los andamios de 21 días favorecen la incorporación de células, así como de ácidos epoxieicosatrienoides (ETT).

4.8.3 Ensayo live/dead

Se verificó la viabilidad celular con el kit LIVE/DEAD Viability/Citotoxicity (Invitrogen). Se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS tres veces, se mezclaron cuatro partes de homodímero de etidio 2 mM con una parte calceína 4 mM en PBS estéril, se añadieron 150 μ L por cada muestra, se incubaron las muestras durante 45min



a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se observaron con un microscopio confocal (Zeiss, objetivo 10X). Excitación/Emisión, Calceína 494/517 nm, homodímero de etidio 528/617 nm.

4.8.4 Ensayo de MTT

Para medir la actividad metabólica de las células sobre los diferentes materiales, se cultivaron las células durante 24 y 48 h (37 °C, 5 % CO_2). Posteriormente, el medio de cultivo se retiró y almacenó; y los materiales se colocaron en un pocillo vacío. Tanto a los pocillos donde se cultivaron las células sobre los materiales inicialmente, como a los materiales colocados en los pocillos posterior al cultivo se agregaron 10 μ L de Bromuro de 3-(4,5-dimetiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en conjunto con medio de cultivo fresco (epiLife), se cultivaron durante 3 h a 37 °C, 5 % CO_2 . Después de las 3 h, se retiró el medio y se verificó la presencia de cristales de formazan, estos se disolvieron en alcohol isopropílico, finalmente se midió con un espectrofotómetro a una absorbancia de 560 nm.



5 Resultados y discusión

5.1 Apariencia de los tejidos descelularizados.

El esófago exhibe una forma casi cilíndrica con un lumen de diámetro variable rodeado por una pared compuesta por cuatro capas principales: de mucosa, submucosa, muscular externa y adventicia. En la **Figura 14** se observa la apariencia macroscópica de los esófagos de diferentes edades durante el proceso de descelularización. El tratamiento de descelularización generó una matriz extracelular translúcida que mantuvo una arquitectura similar a la del esófago nativo para el caso de los tejidos de 21 y 45 días, en cambio, para el tejido de 1 día se presentaron cambios mínimos en su arquitectura. Las multicapas del tejido descelularizado se preservaron para el tejido de 21 y 45 días, en cambio el tejido descelularizado de 1 día sufrió deterioro en la capa de la mucosa, presumiblemente debido a la etapa de perfusión durante el proceso de descelularización.

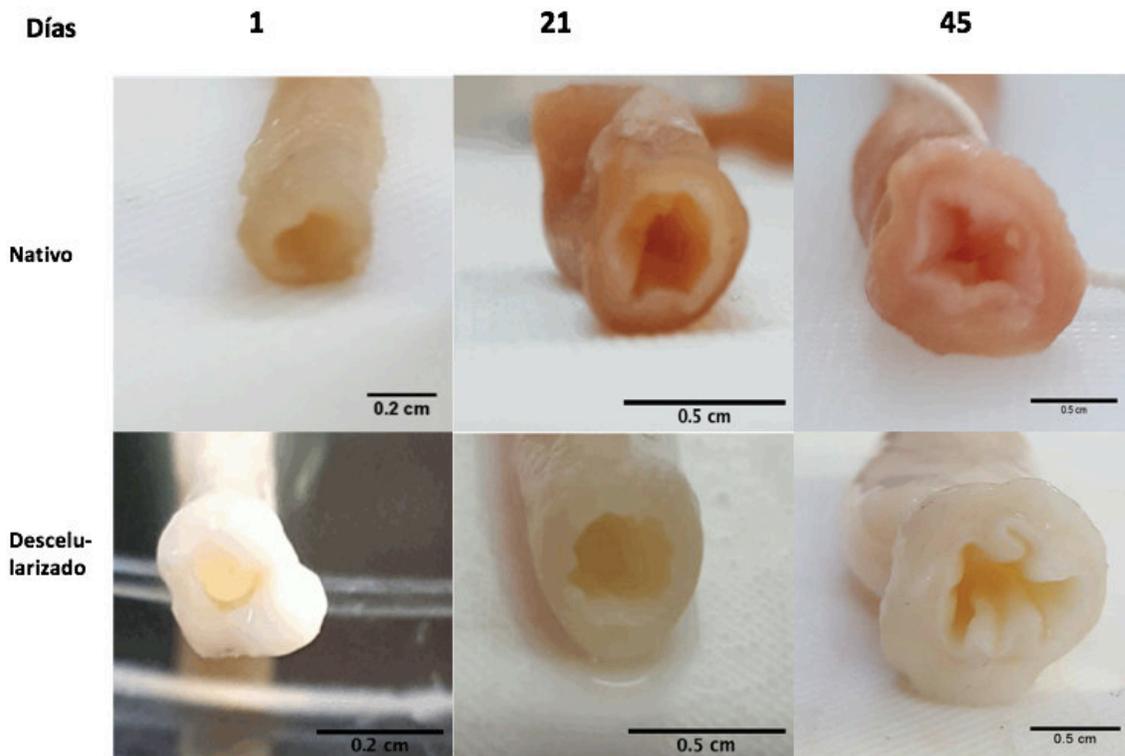


Figura 14. Fotografías representativas que muestran la apariencia física de los tejidos nativo y descelularizado, derivados de porcino de tres diferentes edades (1, 21 y 45 días).

5.2 Composición residual en los tejidos descelularizados.

El proceso de descelularización es de suma importancia para la eliminación de los componentes celulares de los tejidos y así poder reducir la inflamación, reducir los riesgos de transmisión de enfermedad y disminuir el riesgo de rechazo después de la implantación. Sin embargo, la técnica ideal de descelularización debe remover los remanentes celulares sin destruir la arquitectura original o eliminar sus componentes de la MEC y mantener las propiedades mecánicas intactas⁴⁸. En la **Figura 15** se reportan los resultados de la composición residual de la MEC esofágica descelularizada comparada con la composición del tejido no tratado (nativo).



5.2.1 Contenido residual de DNA

Los criterios empleados para evaluar la descellularización efectiva de acuerdo con informes recientes²⁰, utiliza el contenido de ácido nucleico como base. Estos criterios incluyen: núcleos no visibles tras la evaluación histológica a través de tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), y reducción de la cantidad de DNA²⁰. Se cuantificó el contenido residual de DNA de las muestras descellularizadas y nativas de las diferentes edades (**Figura 15a**). Estos resultados mostraron una reducción altamente significativa de los ng de DNA por mg de peso seco en el tejido descellularizado en comparación del nativo. Los resultados de la remoción nuclear son comparables a otros protocolos similares¹⁰ de descellularización con deoxicolato de sodio en tejido esofágico de ratón, donde se preservó la matriz extracelular, además de presentar un bajo contenido de DNA en comparación con otros detergentes. En un reporte previo, se observó que la remoción de DNA de tejidos de porcino adulto es mayor que de lechón, tanto al usar deoxicolato de sodio (detergente catiónico) como docecil sulfato de sodio (detergente iónico)⁴⁹. En el mismo trabajo se reportó que los métodos que combinan perfusión y agitación tienden a producir una mayor remoción de DNA comparado con el método de perfusión, tanto en submucosa intestinal como esofágica. Finalmente en otro estudio⁴² donde se descellulariza tejido esofágico de puerco mediante perfusión con detergente deoxicolato de sodio, obtuvieron mayores concentraciones de ADN (127 ng/mg) y concentraciones similares de GAGs (0.35 µg/mg) demostrando que el protocolo propuesto disminuye de manera significativa la cantidad de ADN preservando la concentración de GAGs en comparación de otros protocolos.

La reducción en los núcleos celulares presentes en el tejido esofágico porcino después del proceso de descellularización aplicado a los tres diferentes tejidos fue confirmada por análisis histológico (ver más adelante **Figura 17**). Estos resultados de la tinción de H&E indicaron, además, la preservación de microestructura en los tejidos descellularizados.



5.2.2 Retención de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs)

La bioactividad de andamios de MEC está influenciada por las macromoléculas residuales que permanecen después de la descelularización. Entre ellos, diferentes tipos de colágeno, proteoglicanos, proteínas matriciales multiadhesivas y los factores de crecimiento son de gran importancia en la biofuncionalidad de los andamios. Estos componentes se distribuyen dentro de la MEC, empaquetados tanto en la lámina basal como en el tejido conectivo.

Los GAGs presentes en el tejido esofágico descelularizado presentaron una retención del 48% en el tejido de 1 día, 64.42% tejido de 21 días y 52.73% para el tejido de 45 días (**Figura 15b**). Para los tres grupos se observó una alta reducción en el contenido de GAGs. De acuerdo con reportes previos, los procesos de descelularización, donde se usa perfusión, han demostrado una reducción significativa en la concentración de GAGs en comparación de los métodos de inmersión o agitación³³. Además de la técnica de perfusión, la exposición prolongada con endonucleasas puede reducir la concentración de glicosaminoglicanos²¹. La retención de GAGs se ha relacionado con la respuesta viscoelástica de la matriz resultante del proceso de descelularización de varios tejidos animales^{43,50}.

5.2.3 Retención de proteínas

Resulta razonable considerar que la cantidad de macromoléculas distribuidas dentro de la MEC esofágica se vea reducida después del proceso de descelularización, lo que se confirmó con los resultados presentes. Para los tres grupos se observó que la cantidad de proteína extraída fue menor en los tejidos descelularizados respecto de los tejidos nativos (**Figura 15c**). ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. En un estudio previo, se reportó la retención de hasta 50 % de proteína total en la submucosa del intestino porcino descelularizado con DOC, mientras la retención fue sólo del 6.5 % cuando la descelularización se llevó a cabo con dodecil sulfato de sodio⁴⁹. A su vez, la matriz de



submucosa del esófago porcino de adulto y de lechón descelularizadas con DOC retuvo 61.6 % y 23.8 % de las proteínas totales, respectivamente. Los resultados del presente estudio sugieren que el método de descelularización empleado aquí es adecuado para retener en la matriz esofágica derivada de lechones de 1 a 45 días alrededor del 40 % de las proteínas totales extraíbles.

Las fibronectinas son proteínas conectivas de la MEC que interactúan con factores de crecimiento que regulan las respuestas celulares a los microentornos. Los resultados indican que la cantidad de fibronectina se reduce en los tejidos descelularizados respecto de los tejidos nativos, pero aún se preserva al menos un 66% de la cantidad inicial (**Figura 15c**). Esto sugiere que la matriz esofágica derivada de lechones de 1 a 45 días podría exhibir bioactividad relacionada con la composición bioquímica residual.

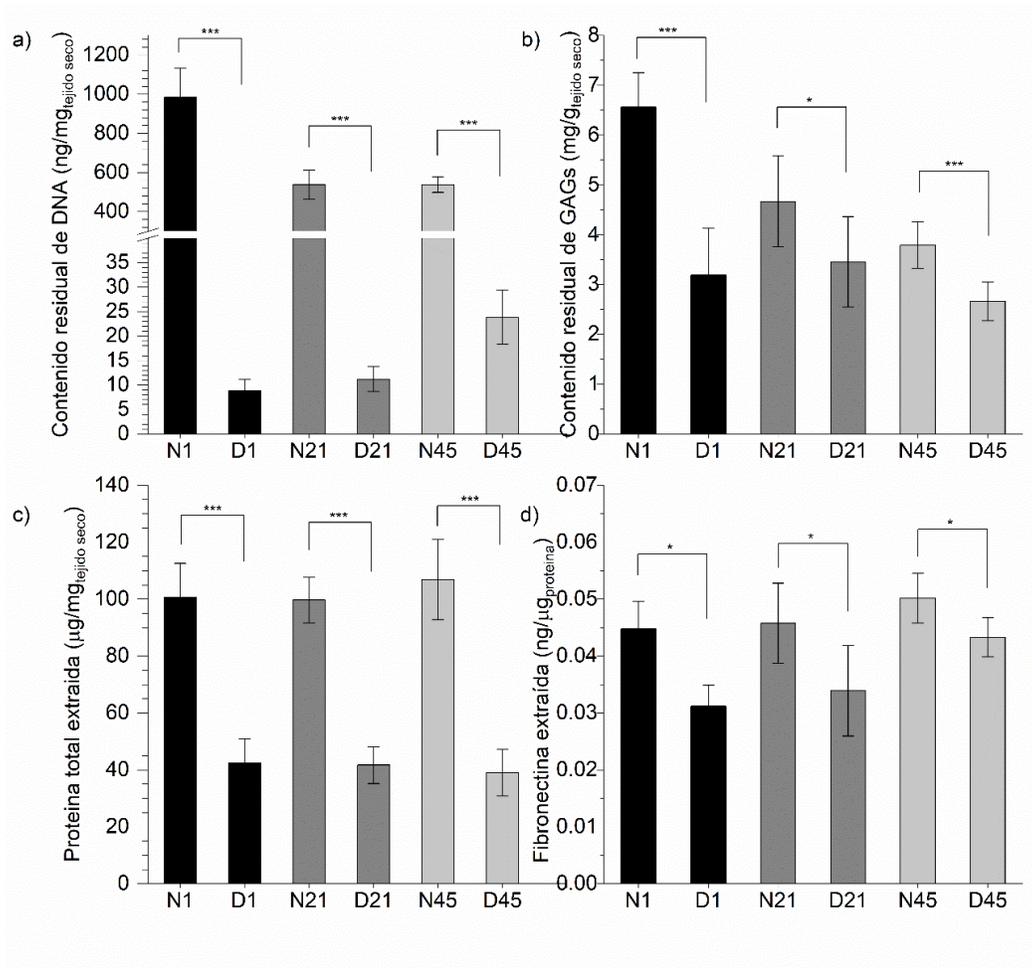


Figura 15. a) Concentración de DNA purificado y b) GAGs detectado a partir de tejido esofágico porcino nativo (N) y de la matriz descelularizada (D) derivados de lechones de diferentes edades: 1, 21 y 45 días (n=9). c) concentración de proteína total y d) fibronectina extraídas a partir de los mismos materiales (n=6). Media ± D.E., *, * indican diferencia significativa entre grupos marcados con valores de $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente.**

5.3 Organización microestructural de los tejidos descelularizados.

La microscopía SHG, introducida alrededor de 1986, es una alternativa atractiva a la histología convencional para estudiar la composición de los tejidos y visualizar la estructura molecular del colágeno debido a su alta sensibilidad y especificidad⁷⁷, además tiene la capacidad de seccionamiento óptico que proporciona un medio para obtener imágenes de tejido en 3 dimensiones en sistemas moleculares no centrosimétricos^{76,51,52}.



EL SHG es un proceso que ocurre cuando dos fotones se combinan en un medio ópticamente no lineal, que carece de simetría central (como el colágeno), creando un fotón con una longitud de onda exactamente la mitad de la longitud de onda de excitación de los fotones iniciales (o el doble de la frecuencia, ω). La microscopía SHG se ha utilizado como una técnica estándar para identificar principalmente las fibras de colágeno fibrilares tipo I y III, ya que es sensible al orden de polarización de largo alcance de las fibrillas⁵¹⁻⁵².

Se empleó la microscopía SHG para observar el efecto de la descelularización sobre la microestructura del tejido esofágico sobre las capas muscular y submucosa de las muestras nativas y descelularizadas de las diferentes edades (**Figura 16**).

El componente principal de la submucosa es el colágeno tipo I y tipo III ensambladas en fibrillas, y a su vez organizadas en fibras gruesas dispuestas en una red con un patrón cruzado. En contraste, la mucosa se integra por fibrillas de colágeno muy finas organizadas en una red laxa y aleatoria⁵⁴. Las micrografías de SHG mostraron que, en la capa de submucosa, los haces de fibras de colágeno con ondulaciones de los tejidos nativos se preservan en los tejidos descelularizados (**Figura 16**).

La muscular externa está compuesta principalmente de músculo liso y estriado y puede subdividirse en dos capas según la dirección principal de las fibras musculares. En la capa interna, la orientación es circunferencial; en la capa externa es axial. La adventicia es una capa delgada compuesta por un tejido conectivo blando y suelto, rico en vasos sanguíneos y linfáticos y tejido adiposo y un epitelio simple de cobertura escamoso⁵⁴. Se observó una capa de fibras de colágeno en la superficie muscular de los tres tejidos nativos (**Figura 16**). Después de la descelularización, dicha organización de fibras se preservó en los tres tejidos. Las fibras se observaron como capas organizadas con múltiples direcciones.

Asimismo, se realizó un análisis histológico del tejido esofágico para inspeccionar la apariencia histológica de las cuatro capas principales del esófago: mucosa, submucosa, muscular externa y adventicia (**Figura 17**). La característica microestructural de la matriz esofágica es esencial para la evaluación de la mecánica de la pared esofágica.

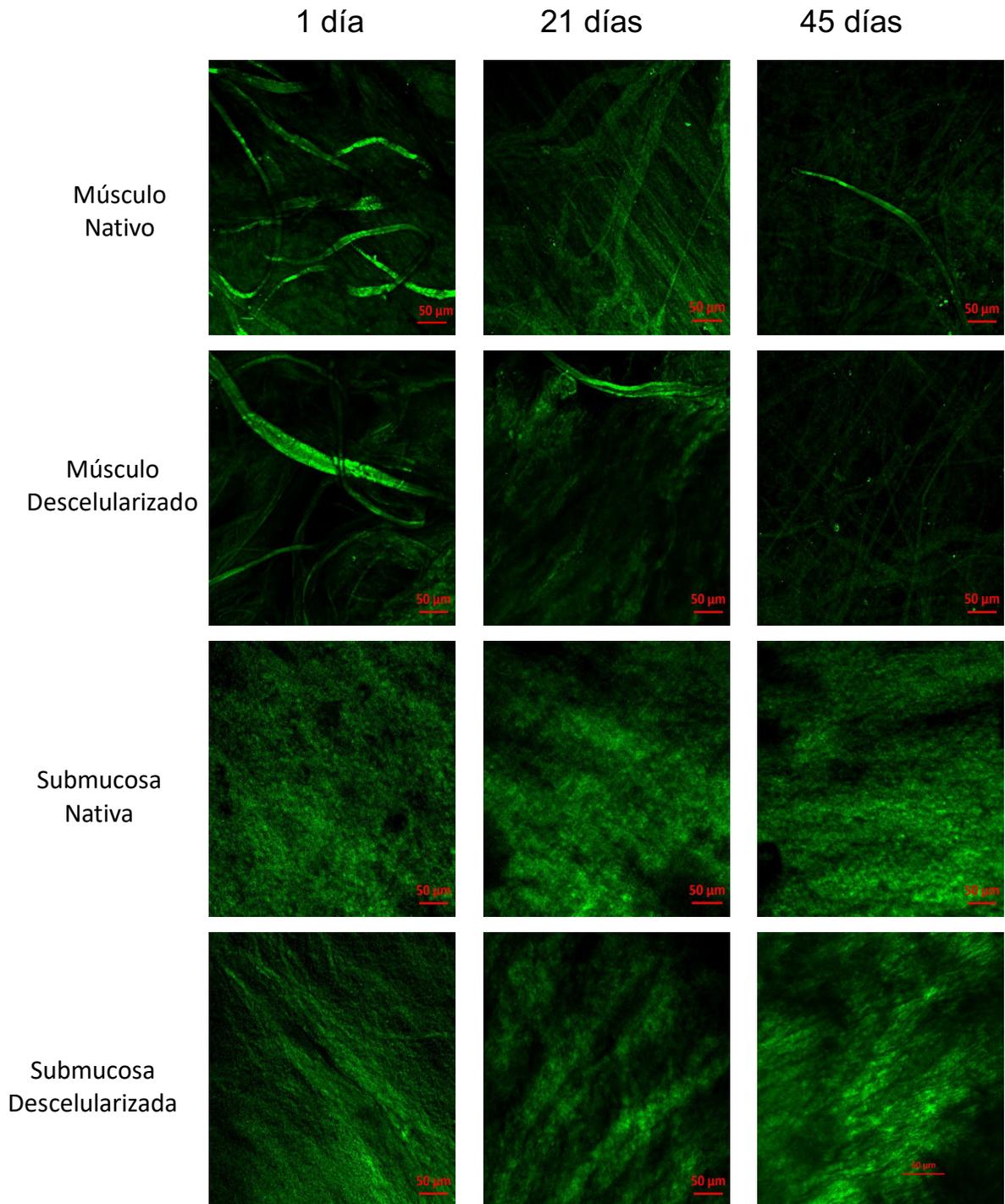


Figura 16. Micrografías representativas de SHG (microscopio ZEISS LSM-710-NLO) para tejido nativo y descelularizado de 1, 21 y 45 días, en la superficie muscular y de la submucosa. Objetivo:20 X, 852 nm: 3.0 %.



5.4 Tinción de hematoxilina-eosina

La tinción hematoxilina-eosina (H&E) se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos⁶⁹. Esta técnica supone la aplicación del colorante hematoxilina, que, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos en tonos color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Sin embargo, la tonalidad de los resultados diferirá según la hematoxilina utilizada y no según la eosina⁷⁰.

El análisis histológico de los tejidos descelularizados para las diferentes edades: 1, 21 y 45 días, confirmó la ausencia de núcleos y demostró la preservación de la arquitectura del esófago al presentar la capa de mucosa, submucosa y la capa muscular, como se muestra en la **Figura 17**.

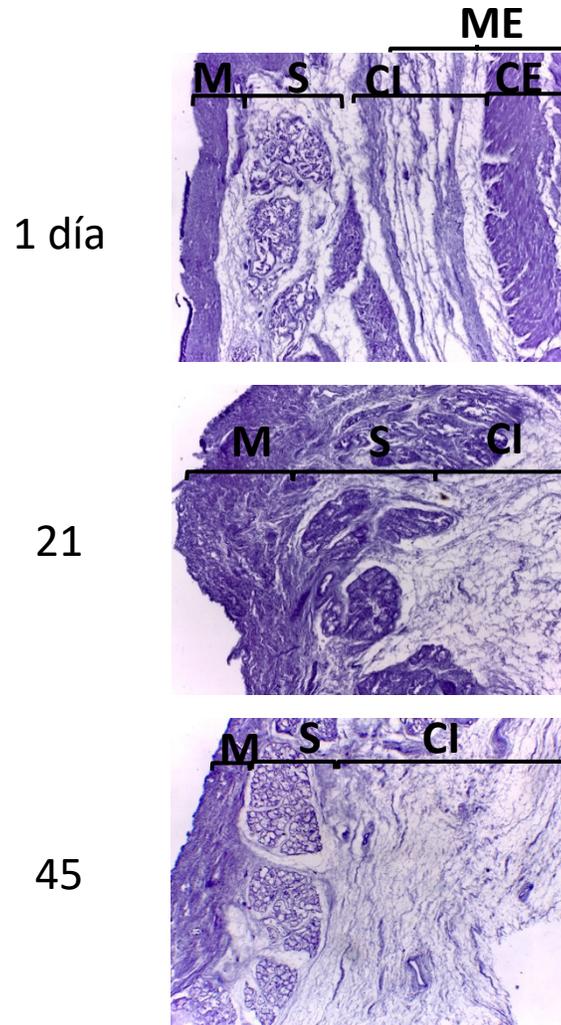


Figura 17. Micrografías representativas H&E de tejido esofágico descelularizado para porcinos de diferentes edades: 1, 21 y 45 días. M: Mucosa, S: submucosa, ME: Muscular externa, CI: corte interno, CE: Corte externo. Corte transversal, Objetivo 20 X.



5.5 Propiedades mecánicas de tensión

Teniendo en cuenta los resultados que indicaron la eliminación efectiva de las células, la reducción del contenido de GAGs y la conservación de la microestructura tisular, se evaluaron las propiedades mecánicas de tensión de los tejidos nativo y descelularizado. Para esto, se analizaron las muestras de esófago con sus capas completas, así como las capas de submucosa y muscular por separado. Adicionalmente, las muestras se caracterizaron en dos direcciones ortogonales: longitudinal y circunferencial.

5.5.1 Curvas esfuerzo - deformación.

Al tomar en cuenta las características histológicas, el tejido y la matriz descelularizada esofágico se puede analizar, desde un punto de vista mecánico, como un compuesto anisotrópico multicapa. Cada capa se caracteriza por un comportamiento anisotrópico debido a la orientación específica de las fibras de refuerzo. Dado esto, los tejidos esofágicos se caracterizan por un comportamiento mecánico no lineal y pueden experimentar fenómenos de desplazamiento⁵⁴. La **Figura 18** muestra las curvas esfuerzo-deformación (E-D) representativas para tejidos esofágicos ensayado con todas sus capas. En ella se puede apreciar que la respuesta E-D fue afectada por las direcciones de los tejidos seleccionadas para la caracterización mecánica del tejido esofágico. Las curvas E-D para especímenes analizados con todas las capas, y especímenes separados en las capas submucosa y muscular confirmaron un comportamiento no lineal (exponenciales) y anisotrópico, así como un comportamiento marcadamente más rígido para los tejidos orientados longitudinal (**Figura 18a**). Al analizar la región “toe”, la cual es típica de tejidos ricos en fibras de colágeno, se observó que la transición de entre las dos regiones lineales ocurrió a deformaciones más altas en los especímenes cortado en dirección circunferencial (**Figura 18d**) que en los especímenes axiales (**Figura 18c**).

De estas curvas se obtuvieron datos de las propiedades de ruptura bajo ensayo de tensión: esfuerzo y deformación máxima, y la carga en la ruptura. Estos resultados se



muestran en las **Figura 19** y **Figura 20**. Asimismo, se muestran los resultados de módulo elástico obtenido en la segunda porción lineal de la curva E-D en la **Figura 20**.

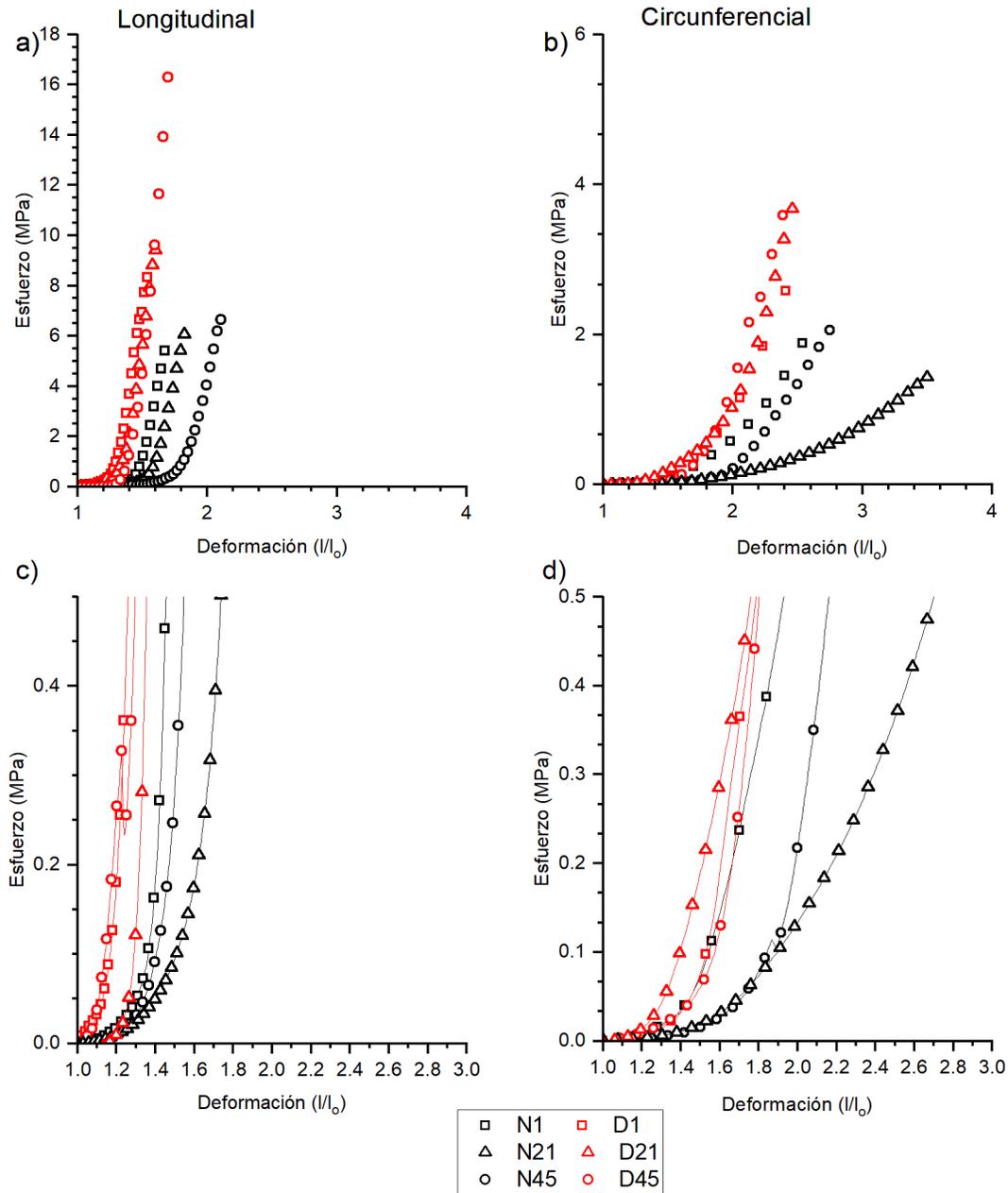


Figura 18. Curvas esfuerzo vs deformación representativas para tejido esófago nativo (N) y descelerizados (D) obtenido de lechones de 1, 21 y 45 días. Se muestran las curvas para tejidos analizados con todas las capas: corte longitudinal (a, c) y circunferencial (b, d), así como las curvas completas (a, b) y ampliación de estas en la porción inicial (c, d).



5.5.2 Resistencia a la tensión

En primera instancia se evaluó el efecto de la descelularización sobre la resistencia a la tensión. El proceso de descelularización puede provocar cambios en la estabilidad de los componentes de la MEC y consecuentemente modificar el comportamiento mecánico de la matriz resultante. La descelularización parece aumentar el esfuerzo máximo que resiste el material antes de la rotura (**Figura 19**). Sin embargo, los resultados de carga en la rotura, que resulta de dividir la carga en la ruptura entre el ancho del espécimen, indican una disminución después de la descelularización. Estas diferencias podrían relacionarse con una disminución significativa del espesor del tejido esofágico después de la descelularización. Es posible que en el tejido nativo no tratado se presente una sobreestimación del valor del espesor del material, lo que arrojaría un valor sobreestimado para el área transversal y un valor subestimado para el esfuerzo. El efecto de la descelularización sobre la carga en la fractura de los tejidos parece ser más notoria en tejidos de 21 días que en tejidos de 45 días, lo que sugiere una modificación de la resistencia de las fibras estructurales. Se observó también que conforme aumenta la edad de 1 a 21 y 45 días de los lechones donantes de tejidos, la resistencia a la tensión de los especímenes aumenta. Esto es congruente con el crecimiento del animal y la maduración de los tejidos. Como se observó mediante microscopía SHG, la red de fibras de colágeno fue preservada en los tres tejidos procesados respecto del nativo; sin embargo, no fue posible observar una variación con la edad.

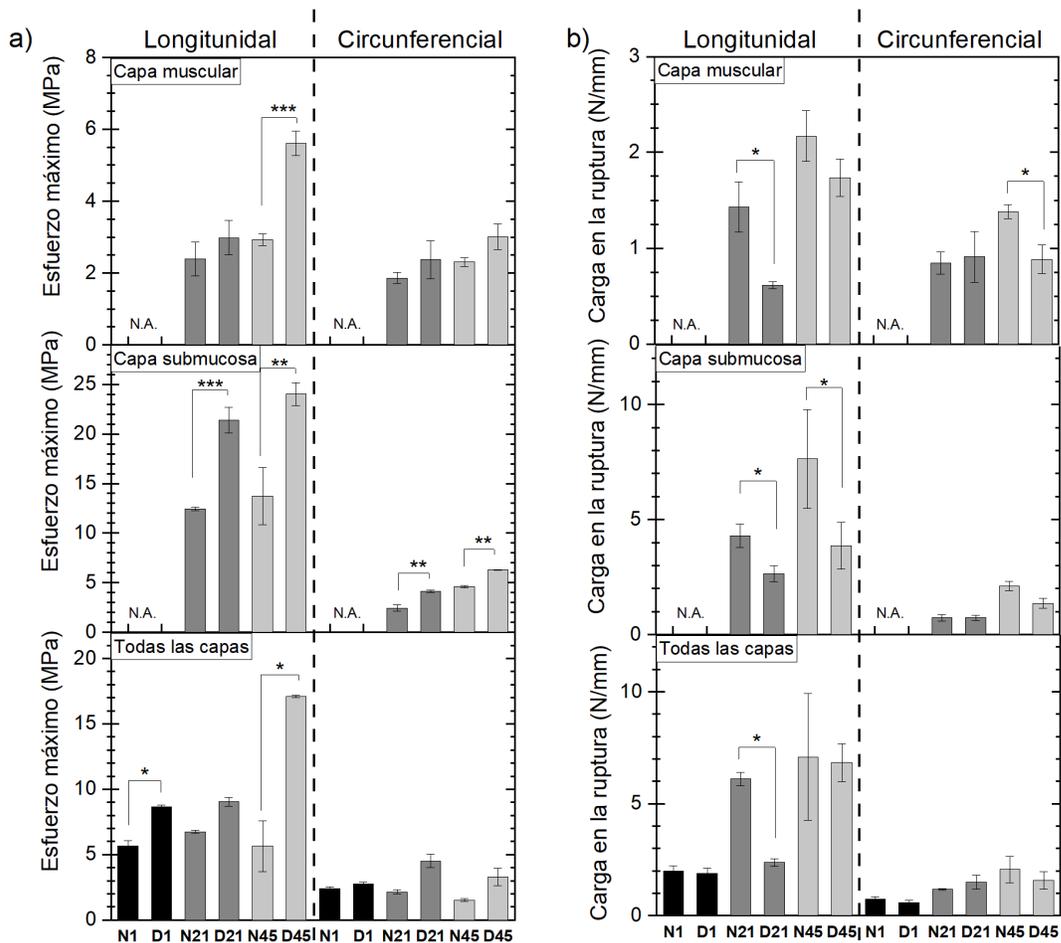


Figura 19. Esfuerzo y carga máxima de tensión (en la ruptura) de tejido esofágico nativo (N) y descellularizado (D) obtenido de lechones de 1, 21 y 45 días. Se comparan las propiedades exhibidas por tejidos con todas las capas del tejido, con la capa submucosa y con la capa muscular, así como las direcciones longitudinal y circunferencial. *, **, *** indican diferencia significativa entre grupos marcados con valores de $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$, respectivamente; $n = 5$. N.A. indica tejidos no analizados ya las capas no se pudieron separar.

5.5.3 Deformación máxima y el módulo elástico

La **Figura 20** muestra la deformación en la rotura y el módulo elástico obtenido de la segunda porción lineal de la curva E-D. La descellularización de tejido esofágico nativo produjo una disminución en la deformación máxima para los tejidos derivados de lechones de las tres edades y de las dos direcciones seleccionadas. La deformación máxima para tejidos no tratados (nativo) parece aumentar conforme aumenta la edad del donante, pero



este efecto parece aminorarse en el caso de los tejidos descelularizados. La misma tendencia fue exhibida por los tejidos analizados con las capas completas o por separado.

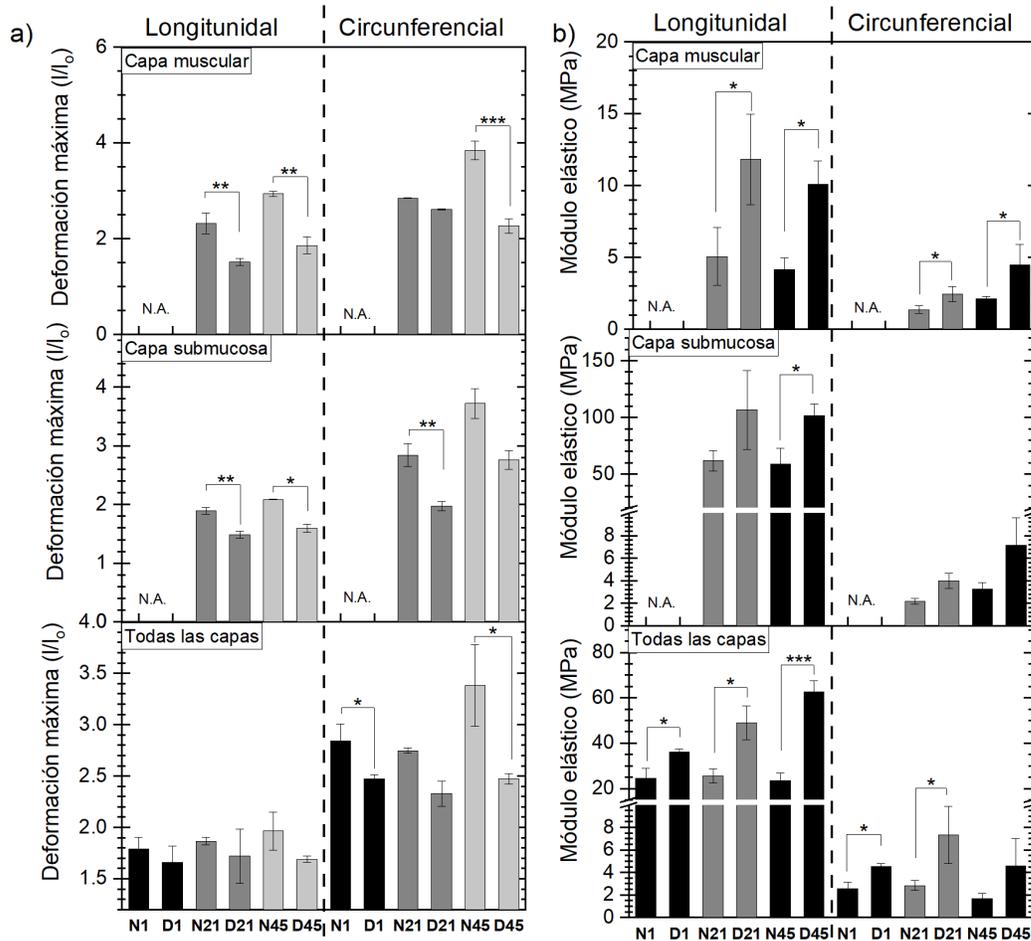


Figura 20. Deformación máxima y módulo elástico en la segunda porción lineal de la curva E-D de tejido esofágico nativo (N) y descelularizado (D) obtenido de lechones de 1, 21 y 45 días. Se comparan las propiedades exhibidas por tejidos con todas las capas del tejido, con la capa submucosa y con la capa muscular, así como las direcciones longitudinal y circunferencial. *, **, * indican diferencia significativa entre grupos marcados con valores de $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$; $n = 5$. N.A. indica tejidos no analizados ya que las capas no se pudieron separar.**

En el caso del módulo elástico, por el contrario, la descelularización del tejido esofágico nativo produjo un incremento para todos los tejidos analizados. Por ejemplo, este incremento fue del 48, 92 y 166% en la dirección longitudinal cuando los tejidos se analizaron con las capas completas y provenían de lechones de 1, 21 y 45 días,



respectivamente. Estos resultados sugieren que la habilidad de reorientación de las fibras de colágeno en la dirección de la carga se ve favorecida en tejidos de mayor edad.

5.5.4 Anisotropía mecánica

Al analizar los resultados entre las dos direcciones se observó que la resistencia máxima (**Figura 19b**) y el módulo elástico (**Figura 20b**) en la dirección longitudinal fueron mayores que en la circunferencial, mientras que la deformación máxima mostró una tendencia contraria (**Figura 20a**). Este fenómeno se ha asociado a la orientación preferencial de las fibras de colágeno en una zona específica del tejido, en este caso, la dirección axial en el esófago. De los resultados, se observa un comportamiento anisotrópico del tejido esofágico nativo. Asimismo, los resultados sugieren que la anisotropía mecánica del tejido esofágico porcino nativo tiende a ser conservada en tejido descelularizado. En mediciones usando un ensayo de tensión biaxial, se reportó un comportamiento antrópico similar en tejido esofágico porcino nativo y descelularizado⁵⁴⁻⁵⁵. La proporción de la resistencia máxima de tensión, así como del módulo elástico entre las direcciones longitudinal y circunferencial sugiere que la anisotropía mecánica del tejido esofágico depende primordialmente de la capa submucosa (**Figura 21**).

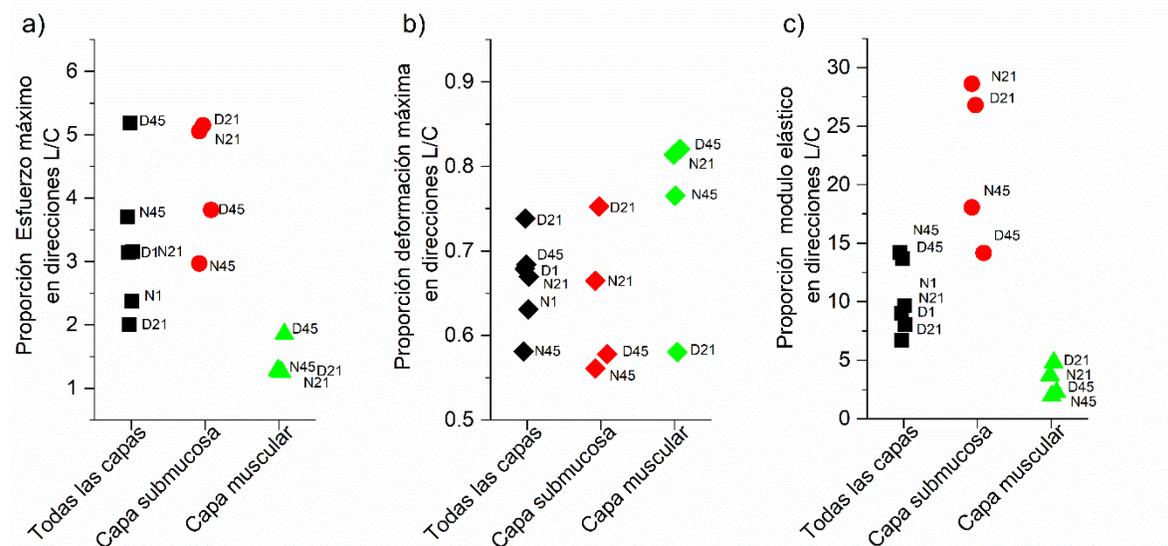




Figura 21. Proporción del esfuerzo máximo entre las direcciones longitudinal/circunferencial.

Previamente, se reportó para el esófago porcino, una proporción 2.3 más alta de resistencia a la tensión en la dirección axial respecto de la circunferencial para las capas mucosa-submucosa, y una proporción de 1.3 cuando se analizó solo la capa muscular. Mientras que la proporción para la resistencia máxima entre las capas mucosa-submucosa y muscular porcina fue de 5.5 en la dirección axial y 3.0 en la dirección circunferencial⁵⁶. Estas diferencias entre las capas mucosa y muscular se puede explicar por el aumento de la cantidad de fibras de colágeno en la mucosa en comparación con la capa muscular. Se ha sugerido que las diferencias de las relaciones de resistencia a la tensión de esófagos porcinos y ovinos podrían ser el resultado de las diferentes relaciones de grosor entre el músculo y las capas mucosa-submucosa entre las dos especies. Aunque los resultados de este trabajo no aportan datos concluyentes del efecto de la edad de la fuente del tejido esofágico porcino sobre la anisotropía mecánica de la matriz resultante, indican que los procesos de descelularización no impactan de forma significativa la anisotropía del tejido esofágico porcino. Lo que podría tener una implicación positiva en diseño de alternativas basadas en tejidos descelularizados comparable al tejido natural, en términos del comportamiento biomecánico anisotrópico, heterogéneo y no lineal⁵⁷.

5.6 Recelularización del andamio con células epiteliales esofágicas a los andamios

En este trabajo se compararon dos estrategias para el cultivo de los andamios de tejido descelularizado de 21 días con células epiteliales obtenidas de cultivo primario de esófago de conejo. La primera implicó el recubrimiento del andamio con un hidrogel derivado de MEC pericárdica. El pericardio bovino es una capa de tejido conectivo que rodea al corazón rico en colágeno tipo I (principal componente de la MEC)⁷⁴. El colágeno tiene diversas ventajas, entre ellas son que puede inducir procesos de señalización, proliferación, migración y la diferenciación celular^{71,75}. Además de bajas respuestas inflamatorias y citotóxicas y la alta biodegradabilidad^{68,71,75}.



La segunda estrategia fue el uso de una agente con actividad biológica (ácidos epoxieicosatrienoicos) estos ácidos son mediadores autócrinos y parácrinos y tienen efectos benéficos como son; el control de la inflamación leucocitaria, atenúa los mediadores proinflamatorios, tienen efectos proliferativos sobre las células epiteliales y son reconocidos como moléculas señales capaces de estimular varios pasos del proceso de angiogénesis^{66,67}. Los dos criterios evaluados de la respuesta celular fueron la viabilidad celular y la actividad metabólica, como se aprecia en la **Figura 22** y la **Figura 23**, respectivamente.

5.6.1 Viabilidad celular

Los resultados de viabilidad de las células epiteliales esofágicas se mostraron tiñendo las células viables en verde y las muertas en rojo, después de 24 y 48 horas de cultivo sobre los diferentes andamios (**Figura 22**). Se observó un mayor número de células viables después de ambos tiempos de cultivo sobre los andamios modificados con hidrogeles. Estos resultados sugieren que la modificación con hidrogeles de MEC pericárdica incrementa el número de células viables sobre de la matriz esofágica porcina. La densidad de células viables sobre los materiales puede explicarse como resultado no sólo de la composición residual del andamio, sino también a la modificación con hidrogel bioactivo y funcionalizado.

En un estudio previo con células de macrófago se reportó un efecto citotóxico a altas concentraciones de ácidos epoxieicosatrienoicos en hidrogeles de MEC⁴⁹. En el presente trabajo, se observó que el número de células epiteliales viables no se ve afectado por la incorporación de estos agentes bioactivos en los hidrogeles que recubren el andamio esofágico. Así, se abre la puerta a una opción de cocultivo de células de macrófagos y epitelio sobre los andamios de MEC esofágica en presencia de un compuesto modulador de la respuesta inmune.



5.6.2 Actividad metabólica

Otro parámetro evaluado fue la actividad metabólica de las células epiteliales cultivadas sobre los diferentes andamios (**Figura 23**). En este experimento, que determina la actividad metabólica asociada con la cadena respiratoria mitocondrial, se evaluaron tanto la actividad detectada sobre los andamios como sobre los pocillos donde inicialmente se dio el cultivo celular. La actividad metabólica total fue mayor para las células epiteliales cultivadas sobre los andamios modificados con hidrogel respecto de los no modificados, en ambos tiempos de cultivo. De este total para el cultivo de 24 h, 51, 60, y 56% de la actividad fue detectada sobre el andamio solo, el andamio recubierto con hidrogel y el modificado con ácidos epoxieicosatrienoides, respectivamente. En el de 48 h de cultivo, estos valores alcanzaron el 60, 60 y 58%, respectivamente. En un estudio previo, se observó una dependencia de la actividad metabólica de macrófagos estimulados con ácidos epoxieicosatrienoides, de manera similar a lo discutido sobre el efecto en la viabilidad celular. La modificación de matriz esofágica descelularizada con hidrogeles de MEC pericárdica se presenta con una opción para mejorar tanto la viabilidad como la actividad metabólica de células epiteliales.

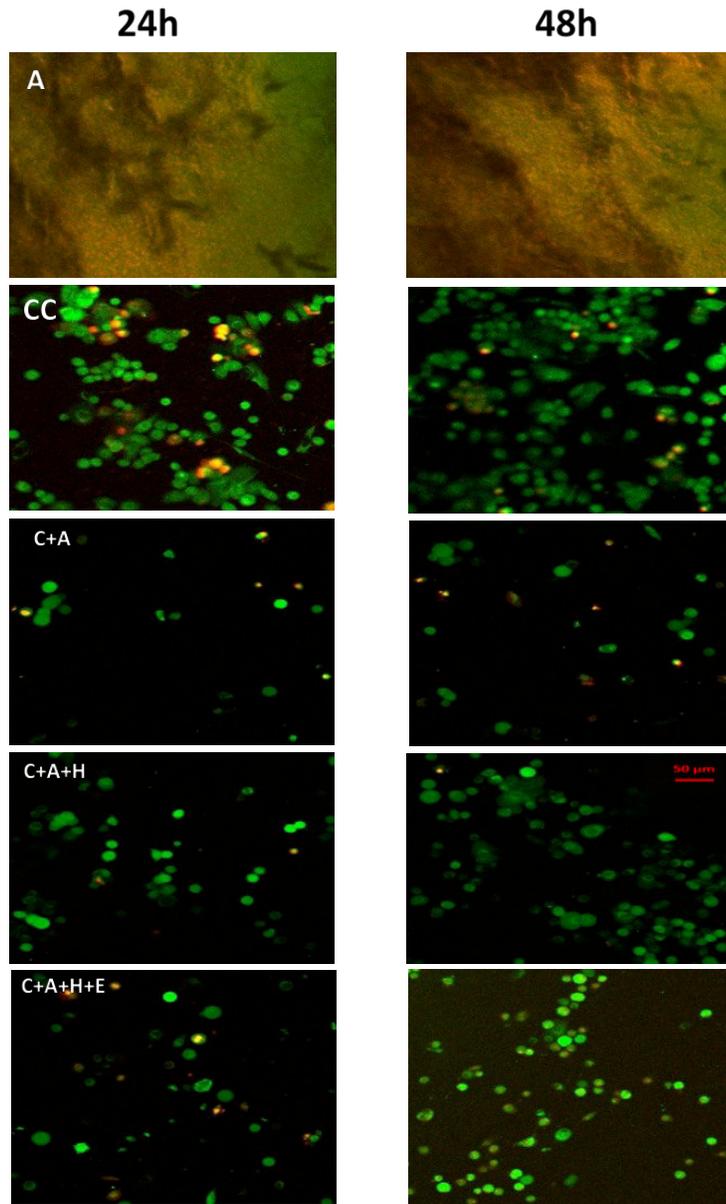


Figura 22. Micrografías representativas que muestra la viabilidad (un ensayo Live/Dead) de células epiteliales esofágicas (verde=vivos, rojo=muertos,10X), A: andamio sin células (control negativo), CC: células en el pocillo (2D, control positivo); C+A: células sobre el andamio solo, C+A+H: Células sobre el andamio recubierto con hidrogel de MEC pericárdica; C+A+H+E: células sobre el andamio recubierto con hidrogel de MEC pericárdica y modificado con ácidos epoxieicosatrienoicos.

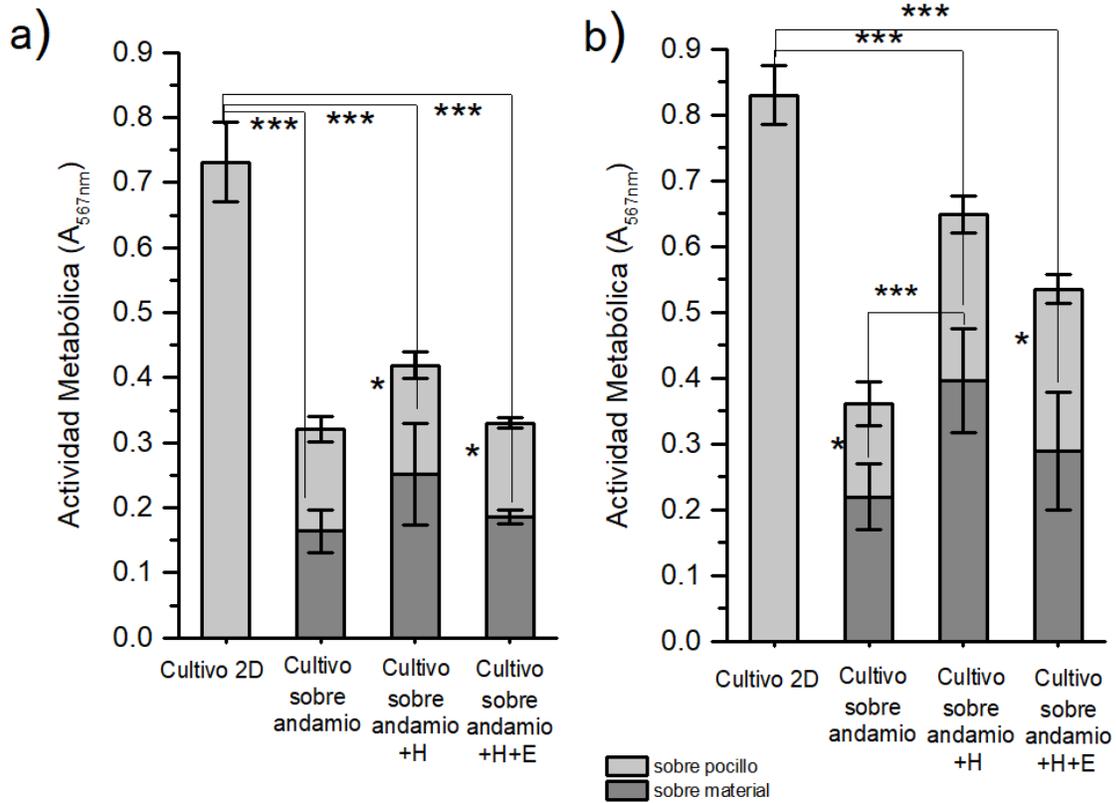


Figura 23. Actividad metabólica medida mediante una prueba de MTT después del cultivo de células epiteliales esofágicas por a) 24 y b) 48 horas sobre los diferentes materiales: cultivo 2D – células sembradas sin material (control), células sembradas sobre andamio descelularizado solo o recubierto con un hidrogel de MEC (H) y ácidos epoxieicosatrienoicos (E). Después del cultivo, los materiales se colocaron en un nuevo pocillo para realizar las mediciones de actividad por separado sobre los materiales y sobre los pocillos. Los resultados se analizaron con un ANOVA de una vía, seguido por de una prueba de Tukey. *, **, * indican diferencia significativa entre grupos marcados con valor de $p < 0.05$, $p < 0.01$, y $p < 0.001$. Media \pm D.E., $n=4-5$.**



6 Conclusiones

En el presente estudio se desarrollaron biomateriales de matriz esofágica obtenidos por descelularización de tejido porcino de diferentes edades, donde se caracterizaron las propiedades mecánicas y estructurales, así como la composición bioquímica residual y de biocompatibilidad. Dando como resultado un protocolo reproducible de descelularización donde se logró la eliminación efectiva de las células, reducción del contenido de GAG`s, la conservación de la microestructura tisular y las propiedades mecánicas en los tres andamios obtenido de lechones de diferentes edades. Finalmente, el andamio descelularizado fue biocompatible con las células al presentar un incremento en el número de células epiteliales esofágicas viables y su actividad metabólica. Por lo que este método es una alternativa para el diseño y desarrollo de implantes basados en MEC para tratar defectos en esófago, en el futuro.

7 Referencias

1. Regenerative medicine applications in organ transplantation, Edited by G. Orlando, J.P. Lerut, S. Soker, R.J. Stratta. First edition 2014, Academic Press, Elsevier.
2. S.F. Badylak. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* 2015;23:S17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.016>
3. Claudio-rizo, J. A. Rangel-argote, M., Castellano, L. E. Delgado, J. Mata-mata, J. L., & Mendoza-novelo, B. (2017). Influence of residual composition on the structure and properties of extracellular matrix derived hydrogels. *Materials Science & Engineering C*, 79, 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.118>
4. K. Sin Chian, Et al. Regenerative medicine for esophageal reconstruction after cancer treatment. *Lancet Oncol.* 2015;16:e84. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70410-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70410-3)



5. S. Sjoqvist, Et al. Experimental orthotopic transplantation of a tissue-engineered esophagus in rats. *Nature Comm.* 2015:5:3562. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4562>
6. Ramón, Ó. Chávez, G., González, S. B., Solís, A. R. Guadalupe, F., Virgen, S. & López, G. Manejo quirurgico de reconstrucción esofágica por cáusticos. (2012). *Md* 2012, 3(04), 211–216.
7. Baiguera, S., Jungebluth, P. Burns, A., Mavilia, C. Haag, J., De Coppi, P. & Macchiarini, P. (2010). Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials*, 31(34), 8931–8938. <http://dx.doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.005>
8. Mao, A. S. & Mooney, D. J. (2015). Regenerative medicine : Current therapies and future directions, 112(47). <https://doi.org/10.1073/pnas.1508520112>
9. Edgar, L., Mcnamara, K., Wong, T. Tamburrini, R., Katari, R., & Orlando, G. (2016). Heterogeneity of Scaffold Biomaterials in Tissue Engineering. <https://doi.org/10.3390/ma9050332>
10. Totonelli, G., Maghsoudlou, P. & De Coppi, P. (2014). Esophagus Bioengineering. Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation. Elsevier Inc. <http://dx.doi:10.1016/B978-0-12-398523-1.00060-4>
11. Cases, C. (2015). World Journal of Clinical Cases © 2015, 3(1). <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i1.52>
12. Lee, C. H., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen, 221, 1–22.
13. Link, A. J. Mock, M. L., & Ñ, D. A. T. (n.d.). Non-canonical amino acids in protein engineering, 603–609. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.011>
14. Lopresti, S. T., & Brown, B. N. (2015). Host Response to Naturally Derived Biomaterials. Host Response to Biomaterials. Elsevier Inc. <http://dx.doi:10.1016/B978-0-12-800196-7.00004-9>
15. Aamodt, J. M., & Grainger, D. W. (2016). SC. *Biomaterials*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.003>



16. Pierre, G., Dubessay, P., & Dols-lafargue, M. (n.d.). applied sciences Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives. <https://doi.org/10.3390/app9071321>
17. Chuang, T., Stabler, C. Simionescu, A., Ph, D. Simionescu, D. T., & Ph, D. (2009). Polyphenol-Stabilized Tubular Elastin Scaffolds for Tissue Engineered Vascular Grafts, *15*(10).
18. Straley, K. S., Wong, C. Foo, P. & Heilshorn, S. C. (2010). Biomaterial Design Strategies for the Treatment of Spinal Cord Injuries, *19*(January), 1–19.
19. Gilpin, A., & Yang, Y. (2017). Decellularization Strategies for Regenerative Medicine : From Processing Techniques to Applications, *2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>
20. Keane, T. J., Swinehart, I. T., & Badylak, S. F. (2015). Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*, *84*, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>
21. Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs, *27*, 3675–3683. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
22. Tan, J. Y., Chua, C. K., Leong, K. F., Chian, K. S., Leong, W. S., & Tan, L. P. (2012). Esophageal Tissue Engineering : An In-Depth Review on Scaffold Design, *109*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/bit.23323>
23. Totonelli, G., Maghsoudlou, P. Fishman, J. M., Orlando, G., Ansari, T., Sibbons, P., ... Jonathan, M. (2012). Esophageal tissue engineering : A new approach for esophageal replacement, *18*(47), 6900–6907.
24. Saxena, A. K. (2014). Esophagus Tissue Engineering : Designing and Crafting the Components for the “ Hybrid Construct ” Approach, 246–263.
25. Takimoto Y, Okumura N, Nakamura T, Natsume T, Shimizu Y. Long-term follow-up of the experimental replacement of the esophagus with a collagen-silicone composite tube. *ASAIO J* 1993;39:7369



26. Takimoto Y, Nakamura T, Teramachi M, Kiyotani T, Shimizu Y. Replacement of long segments of the esophagus with a collagen silicone composite tube. *ASAIO J* 1995;41:6058.
27. Takimoto Y, Nakamura T, Yamamoto Y, Kiyotani T, Teramachi M, Shimizu Y. The experimental replacement of a cervical esophageal segment with an artificial prosthesis with the use of collagen matrix and a silicone stent. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;116:98106.
28. Yamamoto Y, Nakamura T, Shimizu Y, Matsumoto K, Takimoto Y, Kiyotani T, et al. Intrathoracic esophageal replacement in the dog with the use of an artificial esophagus composed of a collagen sponge with a double-layered silicone tube. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;118:27686.
29. Badylak S, Meurling S, Chen M, Spievack A, Simmons-Byrd A. Resorbable bioscaffold for esophageal repair in a dog model. *J Pediatr Surg* 2000;35:1097103
30. Nieponice A, Gilbert TW, Badylak SF. Reinforcement of esophageal anastomoses with an extracellular matrix scaffold in a canine model. *Ann Thorac Surg* 2006;82:20508
31. Nieponice A, Gilbert TW, Badylak SF. Reinforcement of esophageal anastomoses with an extracellular matrix scaffold in a canine model. *Ann Thorac Surg* 2006;82:20508.
32. Lopes MF, Cabrita A, Ilharco J, Pessa P, Patrício J. Grafts of porcine intestinal submucosa for repair of cervical and abdominal esophageal defects in the rat. *J Invest Surg* 2006;19:10511.
33. Doede T, Bondartschuk M, Joerck C, Schulze E, Goernig M. Unsuccessful alloplastic esophageal replacement with porcine small intestinal submucosa. *Artif Organs* 2009;33:32833.
34. Clough A, Ball J, Smith GS, Leibman S. Porcine small intestine submucosa matrix (Surgisis) for esophageal perforation. *Ann Thorac Surg* 2011;91:156.
35. Sjöqvist, S. Jungebluth, P. Lim, M. L. Haag, J. C. Gustafsson, Y. Lemon, G., ... Macchiarini, P. (2014). Experimental orthotopic transplantation of a tissue-



- engineered oesophagus in rats. *Nature Communications*, 5, 3562.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4562>
36. Poghosyan, T. Sfeir, R. Michaud, L. Bruneval, P. Domet, T. Vanneaux, V. Cattan, P. (2015). Circumferential esophageal replacement using a tube-shaped tissue-engineered substitute: An experimental study in minipigs. *Surgery (United States)*, 158(1), 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.01.020>
37. Marzaro, M., Vigolo, S. Oselladore, B. Conconi, M. T. Ribatti, D., Giuliani, S. ... Parnigotto, P. P. (2006). In vitro and in vivo proposal of an artificial esophagus. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>
38. Saxena, A. K. (2014). Esophagus Tissue Engineering : Designing and Crafting the Components for the “ Hybrid Construct ” Approach, 246–263.
39. Farwell, D. G., Giachelli, C. M., Ph, D., Ratner, B. D., & Ph, D. (2006). Matrix Tissue Scaffold, 12(2).
40. Marzaro, M., Vigolo, S. Oselladore, B. Conconi, M. T. Ribatti, D., Giuliani, S. ... Parnigotto, P. P. (2006). In vitro and in vivo proposal of an artificial esophagus. <https://doi.org/10.1002/jbm.a>
41. Suwandi, J. S. Toes, R. E. M. Nikolic, T., & Roep, B. O. (2015). Inducing tissue specific tolerance in autoimmune disease with tolerogenic dendritic cells. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 33, 97–103. [doi:10.1002/jbm.a](https://doi.org/10.1002/jbm.a)
42. Totonelli, G., Maghsoudlou, P. & Georgiades, F. (2013). Detergent enzymatic treatment for the development of a natural acellular matrix for oesophageal regeneration, 87–95. <https://doi.org/10.1007/s00383-012-3194-3>
43. Keane, T. J. Londono, R., Turner, N. J., & Badylak, S. F. (2012). Biomaterials Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 33(6), 1771–1781. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.054>
44. Mendoza-novelo, B., Avila, E. E. Cauch-rodríguez, J. V, Jorge-herrero, E. Rojo, F. J. & Mata-mata, J. L. (2011). Acta Biomaterialia Decellularization of pericardial tissue and



- its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1241–1248. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.017>
45. Claudio-rizo, J. A., Rangel-argote, M. Castellano, L. E. Delgado, J. Mata-mata, J. L. & Mendoza-novelo, B. (2017). Influence of residual composition on the structure and properties of extracellular matrix derived hydrogels. *Materials Science & Engineering C*, 79, 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.118>
46. I, X. I. U. U. N. L., Uo, X. I. A. O. Z., Hi, W. E. I. Z., Ang, P. E. N. G. Y., Ie, H. U. I. I. X., & Ang, Z. H. I. I. N. G. Y. (2009). Grafts of Porcine Small Intestinal Submucosa with Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelial Cells for Esophageal Repair in a Canine Model, 453–461. <https://doi.org/10.3181/0901-RM-5>
47. Beckstead, B. L. Pan, S. Bhrany, A. D. Bratt-Leal, A. M., Ratner, B. D. & Giachelli, C. M. (2005). Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(31), 6217–6228. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.010>
48. Manuscript, A., & Tissue, D. (2015). NIH Public Access, 32(2), 462–484. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.012>. Decellularized
49. Montes-Rodríguez, tesis de maestría: FUNCIONALIZACIÓN DE BIOMATERIALES DE MATRIZ EXTRACELULAR DE SUBMUCOSA PORCINA CON ÁCIDOS EPOXIEICOSATRIENOICOS PARA INGENIERÍA TISULAR ESOFÁGICA. Universidad de Guanajuato 2017
50. B. Mendoza-Novelo, Et al. Decellularized laminate tissues and their derivatives as templates intended for abdominal wall regeneration. *Mater. Letters* 2016;164:659. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2015.11.048>
51. Roth S, Freund I. Second harmonic generation in collagen. *J Chem Phys* 1979; 70: 1637–1643.
52. Freund I, Deutsch M, Sprecher A. Connective tissue polarity. Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation, and small-angle scattering in rat-tail tendon. *Biophys J* 1986; 50: 693–712.



53. Arturo N. Natali, Emanuele L. Carniel, Hans Gregersen. Biomechanical behaviour of oesophageal tissues: Material and structural configuration, experimental data and constitutive analysis. *Medical Engineering & Physics* 31 (2009) 1056–1062
54. Timothy J. Keane, Ricardo Londono, Ryan M. Carey, Christopher A. Carruthers, Janet E. Reing, Christopher L. Dearth, Antonio D'Amore, Christopher J. Medberry, Stephen F. Badylak. Preparation and characterization of a biologic scaffold from esophageal mucosa. *Biomaterials* 34 (2013) 6729-6737
55. Guillaume Luc, Guillaume Charles, Caroline Gronnier, Magali Cabau, Charlotte Kalisky, Mallory Meulle, Reine Bareille, Samantha Roques, Lionel Couraud, Johanna Rannou, Laurence Bordenave, Denis Collet, Marlene Durand. Decellularized and matured esophageal scaffold for circumferential esophagus replacement: Proof of concept in a pig model. *Biomaterials* 175 (2018) 1-18
56. Yang W, Fung TC, Chian KS, Chong CK. Directional, regional, and layer variations of mechanical properties of esophageal tissue and its interpretation using a structure-based constitutive model. *J Biomech Eng* 2006;128:409–18.
57. Gerhard Sommer, Andreas Schriefl, Georg Zeindlinger, Andreas Katzensteiner, Herwig Ainödhofer, Amulya Saxena, Gerhard A. Holzapfel. Multiaxial mechanical response and constitutive modeling of esophageal tissues: Impact on esophageal tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 9379–9391
58. Francesca, S. La, Aho, J. M. Barron, M. R. Blanco, E. W., Soliman, S. Kalenjian, L., ... Wigle, D. A. (2018). Long-term regeneration and remodeling of the pig esophagus after circumferential resection using a retrievable synthetic scaffold carrying autologous cells. *Scientific Reports*, (February), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22401-x>
59. Wheeler, J. B., & Reed, C. E. (2012). Epidemiology of Esophageal Cancer. *Surgical Clinics of NA*, 92(5), 1077–1087. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2012.07.008>
60. Fallacara, A. (2018). Hyaluronic Acid in the Third Millennium. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>



61. Kogan, G. Commission, E. Stern, R., & Francisco, S. (2007). Hyaluronic acid: A natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications Hyaluronic acid : a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications, (February). <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9219-z>
62. Manuscript, A., Lactic-, P., Drug, C., & Carrier, D. (2012). NIH Public Access, 3(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/polym3031377.Poly>
63. Coulson-Thomas, V. . and Gesteira, T. F. (2014). Dimethylmethylene Blue Assay (DMMB). *Bio-protocol* 4(18): e1236. DOI: [10.21769/BioProtoc.1236](https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1236).
64. Gelse, K., Po, E., & Aigner, T. (2003). Collagens — structure , function , and biosynthesis, 55, 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
65. Fessler, J. H., & Fessler, L. (1978). Biosynthesis of procollagen +970.
66. Spector, A. A. & Norris, A. W. (2007). Action of epoxyecosatrienoic acids on cellular function, 996–1012. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00402.2006>.
67. Webler, A. C., Michaelis, U. R. Barbosa-sicard, E., Murugan, A., Falck, J. R. Fisslthaler, B., & Fleming, I. (2008). Epoxyecosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00230.2008>.
68. Roberts, J. J. & Martens, P. J. (2016). 9 - *Engineering biosynthetic cell encapsulation systems. Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-105-4.00009-2>
69. Salazar, L., & Moreno, F. (2016). Comparación de tres tipos de tinciones histoquímicas en secciones histológicas de paladar y lengua de rata Wistar ., 2(2), 12–23.
70. Eduardo, C. & Arenas, M. (2010). Técnica histológica, 1–12.
71. Helena, M., Silva, R. M., Dumont, V. C. Neves, J. S. Mansur, H. S., Guilherme, L., & Heneine, D. (2013). Extraction and characterization of highly purified collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications, 33, 790–800. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.003>



72. R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod, *Materials* 3 (2010) 1863–1887.
73. Sato, K., Yomogida, K. Wada, T., Yoriuzzi, T. Nishimune, Y. Hosokawa, N., & Nagata, K. (2002). Type XXVI Collagen, a New Member of the Collagen Family, Is Specifically Expressed in the Testis and Ovary *, 277(40), 37678–37684.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M205347200>
74. Athar, Y., Lailatul, S., Zainuddin, A., Berahim, Z., & Hassan, A. (2014). Bovine Pericardium: A Highly Versatile Graft Material Bovine Pericardium: A Highly Versatile Graft Material, (July).
75. Claudio-rizo, J. A., Quintero-Ortega, A. Delgado, J. Mata-mata, J. L. & Mendoza-novelo, B. Decellularized. (2018). ECM-Derived Hydrogels: Modification and Properties. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.78331>.
76. Mostaçõ-guidolin, L., Rosin, N. L., & Hackett, T. (2017). Imaging Collagen in Scar Tissue : Developments in Second Harmonic Generation Microscopy for Biomedical Applications. <https://doi.org/10.3390/ijms18081772>
77. Manuscript, A. (2015). NIH Public Access, 7(4), 654–669.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.009.Second>
78. Ricard-blum, S. (2011). The Collagen Family, 1–19.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
79. J H Fessler a, Fessler LI. Biosynthesis of Procollagen. *Annual Review of Biochemistry*.1978;47:129-62.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.001021>
80. C.H Turner (1993) Basic Biomechanical measurements of bone; A tutorial. 12,595-608.
81. Roeder, R. K. (2013). *Mechanical Characterization of Biomaterials*.
82. Fuller, B. E., & Kirby, K. A. (2018). Subtalar Joint Equilibrium and Tissue Stress Approach to Biomechanical Therapy of the Foot and Lower Extremity, (February).
83. Sanchez-trincado, J. L., Gomez-perosanz, M., & Reche, P. A. (2017). Review Article Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction, 2017.



84. M.C. Mendoza Novelo, B. (2011) tesis de doctorado: Caracterización fisicoquímica de un biomaterial cardiovascular basado en pericardio bovino y prepolímeros de poliuretano. Universidad de Guanajuato.



8 APENDICE

8.1 Composición del medio

Medio EpiLife ³²		
	Reactivo	Concentraciones
	PBS	1X
Enjuague del tejido	Sodio G penicillina, Sulfato de streptomicina y ampotericina B	100u/L 100mg/mL 0.25mg/mL
Enzima con antibióticos	Dispase con antibioticos tripsina	(50 caseinolytic U/mL) 0.05%
Enzima	EDTA	0.53mmol/L
	Medio de cultivo + SFB	SFB 10% (neutralizar tripsina)
Medio	EpiLife® Medium, with 60uM calcium	0.03mmol de calcio
	Pituitary Extract Bovine	0.40%
	insulin from bovine pancreas	5ug/mL
suplementos	hydrocortisone	0.5ug/mL
	Gentamicin	5µg/mL
	Human epidermal growth factor	0.5 ng/mL
	transferina	10ug/mL

Figura 23. Lista de reactivos y concentraciones dependiendo del medio a emplear

8.2 Resolución axial y lateral del objetivo empleado en microscopia SHG.



León, Gto a 12 de noviembre de 2019

Dr. David Yves Ghislain Delepine
Director de la División de Ciencias e Ingenierías
Campus León-UG
Presente

Por este medio me permito informar que he revisado y discutido el documento escrito de la tesis de Maestría de la I.B.T. Adriana Orozco Vega, del programa de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, cuyo título es **"Relación composición-estructura-propiedad en matriz esofágica descelerizada obtenida de porcinos de diferentes edades"**. Manifiesto que estoy de acuerdo con el documento y que la defensa de la tesis se pueda programar.

Agradezco de antemano sus atenciones a la presente y me despido cordinalmente.

Atentamente

"La Verdad Os Hará Libres"

Laura E. Castellano
Dra. Laura Edith Castellano Torres
Profesor Investigador

División de Ciencias e Ingenierías
Campus León
Loma del Bosque 103, Col. Lomas del Campestre, León, Gto., CP 37000
Tel. (477) 788 5100 ext. 8534
www.dci.ugto.mx



León, Guanajuato a 25 de noviembre de 2019

Asunto: Conformidad de tesis

Dr. David Yves Ghislain Delepine
Director de la División de Ciencias e Ingenierías
Universidad de Guanajuato

P R E S E N T E

Estimado Dr. Ghislain Delepine

Me dirijo a Usted para informarle que he revisado el manuscrito del trabajo de tesis desarrollado por la alumna **I.B.T Adriana Orozco Vega** para la obtención de grado de Maestra en Ciencias Aplicadas, el cual se intitula “Relación composición-estructura-propiedad en matriz esofágica descelularizada obtenida de porcinos de diferentes edades”.

Considero que el trabajo reúne las características de nivel y calidad necesarias para una tesis de Maestría. Por lo que recomiendo ampliamente que la alumna I.B.T Adriana Orozco Vega presente la disertación de su tesis ante el jurado que ha sido designado para tal fin.

Sin más por el momento quedo de Usted para cualquier duda o aclaración y aprovecho la ocasión para enviarle un saludo cordial.

Atentamente
“La Verdad Os Hará Libres”



Dr. Arturo Vega González



Oficio número: IDH-Docencia-AOV-19
Asunto: Revisión de tesis

León, Gto., a 27 de noviembre de 2019

DR. DAVID YVES GHISLAIN DELEPINE
DIRECTOR DE LA
DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
P R E S E N T E

Por este medio le informo que he revisado el documento de tesis de la C. **Adriana Orozco Vega**, y entregado mis observaciones para corregirlo, las cuales la estudiante se ha comprometido a incorporar en la versión final. Doy mi aprobación para que se proceda al examen recepcional, una vez que se cumplan los procedimientos administrativos correspondientes.

Sin más por el momento nos despedimos de Ud. enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA VERDAD OS HARÁ LIBRES"

DRA. MA. ISABEL DELGADILLO CANO



GOBIERNO DE
MÉXICO



"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

León, Gto a 28 de noviembre de 2019

Dr David Yves Ghislain Delepine

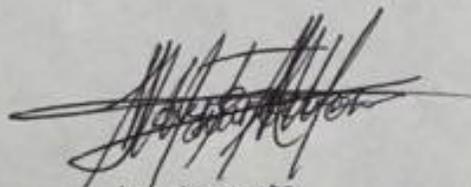
Director de la división de Ciencias e Ingenierías

Campus León-UG

Presente

Por este medio me permito informar que he revisado y discutido el documento escrito de la tesis de Maestría de la I.B.T Adriana Orozco Vega, del programa de la Maestría en Ciencias Aplicadas de la División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, cuyo título es **"Relación composición-estructura-propiedad en matriz esofágica descelularizada obtenida de porcinos de diferentes edades"**. Manifiesto que estoy de acuerdo con el documento y que la defensa de la tesis se puede programar.

Agradezco de antemano sus atenciones de la presente y me despido cordialmente.



Atentamente

Dr. Jorge Mauricio Flores Moreno