



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

**Programa de Doctorado en Medicina**

**Sustitutos traqueales generados por Ingeniería  
Tisular**

**Giovanna Foschini Martínez**

**DIRECTORES**

**Profa. Dra. Carmen Carda Batalla**

**Prof. Dr. Manuel Mata Roig**

**Prof. Dr. Genaro Galán Gil**

**Valencia, enero 2022**



Doña **Carmen Carda Batalla**, Catedrática del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València, Don **Manuel Mata Roig**, Profesor Titular del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y Don **Genaro Galán Gil**, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

### **CERTIFICAN**

Que el trabajo de investigación titulado “**Sustitutos traqueales generados por Ingeniería Tisular**” del que es autora Doña **Giovanna Foschini Martínez**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, reuniendo en nuestra opinión todos los requisitos para ser presentado y defendido para la obtención del Grado de Doctor por esta Universidad.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Valencia a 17 de diciembre de 2021.

Carmen Carda Batalla

Manuel Mata Roig

Genaro Galán Gil



*Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo de varias personas e instituciones a las que el autor quiere mostrar su agradecimiento.*

*En primer lugar, al doctor Don Manuel Mata por su labor como director y tutor durante la que ha demostrado no solo un gran conocimiento, sino también una comprensión y empatía sin las que el trabajo no hubiera sido posible.*

*A todo el equipo de laboratorio del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València y en especial a la doctora Doña Lara Milian por su apoyo en todo momento.*

*A mi esposo por su paciencia y confianza para poder completar este proyecto.*

*A todos aquellos que durante este tiempo han ayudado a que esta tesis sea hoy una realidad.*



## **ABREVIATURAS**

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATL: tampón de lisis tisular

BEGM: medio de cultivo de crecimiento de epitelio bronquial

bFGF: factor de crecimiento fibroblástico básico

°C: grados centígrados

CHAPS: 3 - [(3cholamidopropil) dimetilamonio] -1-propanosulfonato

cm: centímetros

CO<sup>2</sup>: dióxido de carbono

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DE: desviación estándar

DMEM: Dulbecco medio de cultivo compuesto por medio Eagle modificado

DMSO: dimetil sulfóxido

EtOH: etanol

FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo

FGF: factor de crecimiento fibroblástico

GAG: glicosaminoglicanos

H-E: hematoxilina eosina

MEB: microscopio electrónico de barrido

mm: milímetros

MSCs: células madre mesenquimales

N: newtons

NBHE: células epiteliales bronquiales humanas normales

NdYAG: neodymium-doped yttrium aluminium garnet

OCT: optimum cutting temperature

PAS: ácido periódico de Schiff

PBS: tampón fosfato salino

PCL: policaprolactona

PLGA: ácido lacto-co-glicólico

PTFE: politetrafluoroetileno

S: segundos

SBF: suero bovino fetal

SDC: desoxicolato de sódio

SDS: dodecilsulfato sódico

TFG: factor de crecimiento transformante

Trp-63: factor de transcripción proteína 63

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Anatomía y estructura traqueal .....	1
1.1.1 Anatomía y vascularización .....	1
1.1.2 Características histológicas .....	3
1.1.3 Fisiología .....	6
1.2 Estenosis traqueal .....	7
1.2.1 Causas y patogénesis .....	7
1.1.1.1 Estenosis traqueal benigna	
1.1.1.2 Estenosis traqueal maligna	
1.1.1.3 Estenosis traqueal congénita	
1.1.1.4 Estenosis traqueal autoinmune	
1.2.2 Diagnóstico .....	13
1.2.3 Tratamiento .....	14
1.2.4 Resecciones traqueales extensas .....	18
1.2.5 Trasplante de vía aérea .....	19
1.3 Ingeniería tisular de la tráquea .....	22
1.3.1 Introducción .....	22
1.3.2 Matrices descelularizadas .....	29
1.3.3 Epitelización .....	31
1.3.4 Regeneración de cartílago .....	34
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	37
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	39
3.1 Obtención y procesamiento de las tráqueas .....	39
3.2 Preparación de los detergentes .....	40
3.3 Protocolo de descelularización .....	40
3.4 Evaluación de la descelularización mediante tinción fluorescente con DAPI ...	42

3.5 Extracción y valoración de ADN .....	42
3.6 Procesamiento histológico de los especímenes.....	43
3.7 Análisis morfométrico de las muestras .....	45
3.8 Aislamiento y cultivo de células epiteliales.....	51
3.9 Aislamiento y cultivo de condrocitos .....	52
3.10 Criogenización de las tráqueas.....	53
3.11 Estudio de biocompatibilidad <i>in vitro</i> de las tráqueas descelularizadas .....	53
3.12 Determinación de parámetros biomecánicos de tráqueas descelularizadas .	54
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1 Efecto de diferentes combinaciones de detergentes para la descelularización de tráqueas porcinas.....	57
4.2 Optimización de la concentración de SDS.....	64
4.3 Evaluación de la biocompatibilidad de las tráqueas descelularizadas .....	68
4.4 Criogenización de tráqueas descelularizadas.....	70
4.5 Evaluación del protocolo de descelularización en tráquea humana.....	72
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>95</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>97</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>105</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Anatomía y estructura traqueal

#### 1.1.1 Anatomía y vascularización

La tráquea presenta una serie de características anatómicas que comportan notables dificultades, desde el punto de vista terapéutico, para su reconstrucción o reemplazo quirúrgico. Estas incluyen su naturaleza no pareada, su semirrigidez lateral y flexibilidad longitudinal, su corta longitud, su limitada elasticidad longitudinal, su proximidad a las principales estructuras vasculares y el suministro de sangre en gran parte por vascularización segmentaria (Grillo, 2004).

La tráquea es un tubo de 1,5 a 2cm de ancho y de 10 a 13cm de largo, dependiendo de la estatura del individuo, que se extiende desde el borde inferior del cartílago cricoides que se sitúa a nivel de la sexta o séptima vértebra cervical, hasta el espón carinal ubicado a nivel de la cuarta o quinta vértebra dorsal y en donde se divide en dos bronquios principales.

La pared del conducto traqueal consiste desde su porción luminal hasta la parte más externa en una mucosa respiratoria que asienta sobre una submucosa y esta se encuentra rodeada por 18 a 22 anillos incompletos de cartílago hialino en forma de C, y que dan soporte estructural a la luz traqueal. En la cara posterior en donde falta el cartílago, observamos la llamada *pars membranosa* que son fascículos longitudinales y transversales de músculo liso. A todo ello se añade un tejido conectivo laxo con un importante componente elástico que contiene glándulas seromucosas cuyos conductos desembocan en el lumen de la tráquea para así mantener su lubricación. La porción más superficial de la pared traqueal está constituida por un conjuntivo adventicial que se continua con el del espacio mediastínico (Brand-Saberi et al., 2014; Grillo, 2004).

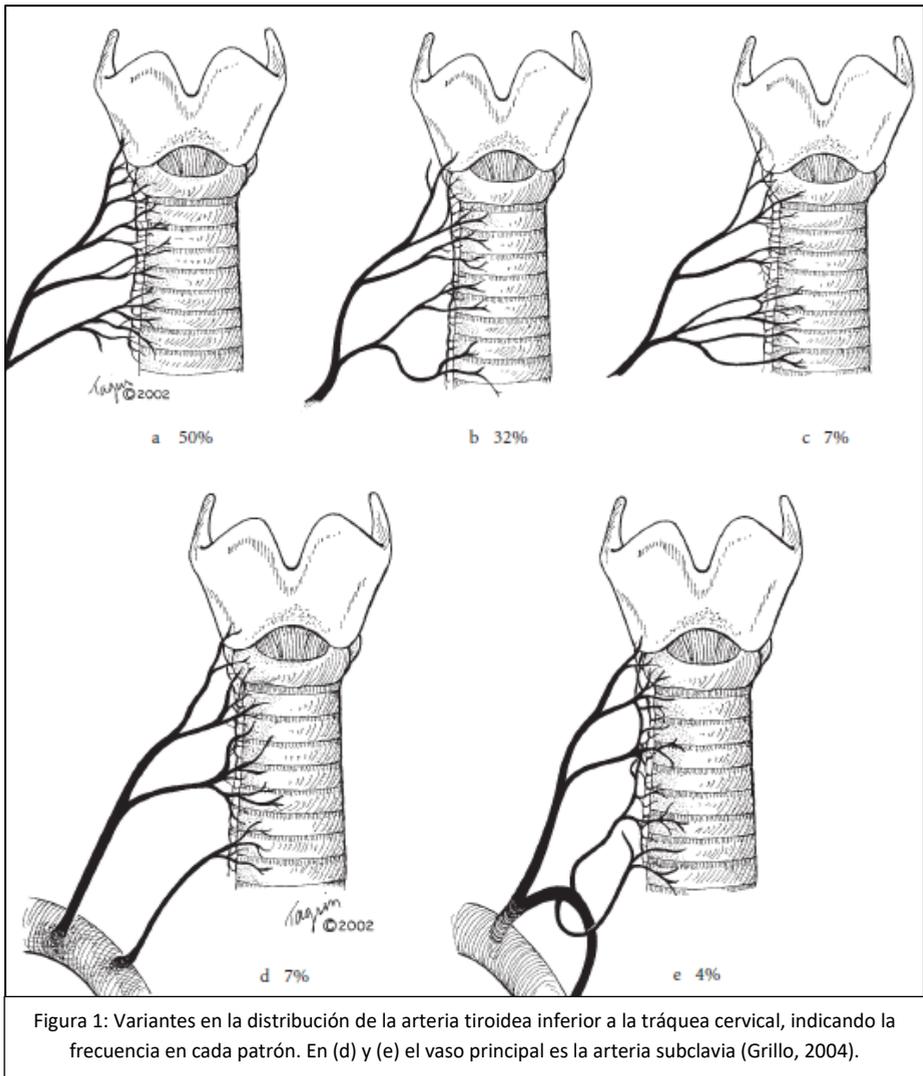
El epitelio de la mucosa traqueal es de tipo pseudoestratificado cilíndrico y está

constituido principalmente por células caliciformes y ciliadas. La dirección de movimiento de los kinocilios hacia la laringe facilita el transporte y eliminación de partículas y detritus celulares de los pulmones hacia el exterior del cuerpo (Brand-Saberi et al., 2014).

Antes del desarrollo de la cirugía traqueal, se desconocía la descripción detallada del suministro de sangre arterial de la tráquea. Usando radiografías de muestras inyectadas de la tráquea humana, se puso de manifiesto que el suministro de sangre de la tráquea cervical se origina en la arteria tiroidea inferior en un patrón variable (Fig. 1: Grillo, 2004). La irrigación sanguínea de la tráquea cervical superior se origina en la arteria tiroidea inferior mientras que la tráquea cervical inferior es irrigada por una rama de la arteria subclavia.

Las arterias bronquiales irrigan la carina y a la tráquea inferior. La arteria bronquial superior, tiene una rama anterior que va hacia el bronquio principal izquierdo. Y sus ramas principales y posteriores al bronquio principal derecho. La arteria bronquial media circula alrededor de la cara medial del bronquio izquierdo y se anastomosa en la carina con la arteria bronquial superior. La arteria bronquial inferior irriga principalmente el árbol bronquial izquierdo. El bronquio principal izquierdo suele estar provisto de dos ramas aórticas del lado izquierdo.

Las arterias traqueales pasan a la pared traqueal, ramificándose hacia arriba y hacia abajo sobre el ancho de varios anillos. Estas finas ramas se conectan formando anastomosis longitudinales finas en la pared de la tráquea. Luego, las arterias intercartilaginosas transversales se extienden profundamente hacia la pared traqueal y se anastomosan con las del lado opuesto en la línea media. Estos vasos se ramifican en la submucosa y terminan en la *pars membranosa*. Los cartílagos traqueales se nutren únicamente de éste plexo submucoso por lo que resulta bastante complejo restaurar dicha vascularización una vez ha sido interrumpida.



### 1.1.2 Características histológicas

La tráquea se desarrolla inicialmente a partir del epitelio ventral que forma el divertículo traqueo-bronquial, durante la cuarta semana de desarrollo y crece caudalmente antes de ramificarse en las yemas pulmonares que luego se alargarán para formar los bronquios principales. El revestimiento interno de la tráquea es de origen endodérmico. Sin embargo, es un excelente ejemplo de interacciones epitelio-

mesénquima que ocurren comúnmente durante la organogénesis, porque el tubo endodérmico experimenta movimientos morfogenéticos como el crecimiento y la ramificación solo bajo la influencia del mesodermo esplácnico circundante. Las interacciones se basan en señales de las principales vías de señalización, como el factor de crecimiento de fibroblástico, Sprouty, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de hepatocitos y otros factores de transcripción. Durante la cuarta semana de desarrollo, la tráquea se ramifica y forma el brote pulmonar derecho e izquierdo. El desarrollo de la tráquea, por lo tanto, constituye el requisito previo para la formación de los pulmones mediante repetidos eventos de bifurcación (Brand-Saberi et al., 2014).

Un análisis detallado del epitelio cilíndrico pseudoestratificado de la tráquea ha revelado la presencia de varios tipos de células altamente especializadas como las ciliadas, las mucosecretoras o las basales encargadas de la regeneración del epitelio traqueal. Además, distinguimos otros tipos celulares como las células en cepillo y las células neuroendocrinas que se asemejan a las células enteroendocrinas del tracto gastrointestinal. Las células en cepillo contienen fibrilina y vilina, son células colinérgicas y actúan como sensores químicos de las vías respiratorias superiores. Su morfología se asemeja a la de células que expresan componentes moleculares de la vía de transducción del sabor, por lo que influyen en el control de la respiración protegiendo las vías respiratorias inferiores al testar la composición de líquido a nivel endoluminal dentro de la tráquea y los bronquios (Junqueira et al., 2015).

La regeneración del epitelio de las vías respiratorias depende de una subpoblación de células basales que se activan, se dividen, diferencian y pueden reemplazar a todas las células del epitelio de revestimiento. Las células madre progenitoras pueden caracterizarse por la presencia del factor de transcripción Trp-63 (p63) y citoqueratinas 5 y 14. Concretamente el Trp-63 está involucrado en el desarrollo del epitelio respiratorio, entre otros, y en particular en el establecimiento de las células basales (Brand-Saberi et al., 2014). En contraste con los roedores en los que estas células madre progenitoras se encuentran presentes sólo en la tráquea, en los

humanos, se producen a lo largo del tracto respiratorio, incluyendo los bronquios segmentarios (Brand-Saberi et al., 2014).

Respecto a la renovación glandular se han descrito, desde hace mucho tiempo, células madre progenitoras en las glándulas seromucosas que recubren la vía aérea. Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de células madre localizadas en los conductos de las glándulas traqueales del ratón, que han demostrado ser un linaje multipotente de células madre progenitoras que puede dar lugar a túbulos serosos y mucosos, células ductales y también epitelio superficial ciliado. Lo que las hace únicas es su capacidad para sobrevivir a lesiones severas hipóxico-isquémicas. Aunque la situación difiere entre el ratón y los humanos, estos hallazgos contribuyen con ideas importantes en la histología del epitelio traqueal, en particular en el contexto patológico (Brand-Saberi et al., 2014).

El corion o lámina propia de la mucosa respiratoria así como la submucosa está constituido por un conjuntivo rico en células de defensa y en fibras elásticas. En síntesis, la tráquea es una continuación de la laringe y termina por ramificarse en dos bronquios extrapulmonares y es un tubo revestido por dentro por epitelio de tipo respiratorio. La lámina propia es de tejido conjuntivo laxo, con abundantes fibras elásticas y contiene glándulas seromucosas, cuyos conductos se abren a la luz traqueal. La secreción, tanto de las glándulas como de las células caliciformes, forma un tubo viscoso continuo que el movimiento ciliar lleva hacia la faringe para eliminar las partículas que ingresar con el aire inspirado. Además, existe otro sistema de defensa contra el medio, la barrera inmunitaria que comprende linfocitos aislados, nódulos y ganglios linfáticos distribuidos a lo largo de la porción conductora del sistema respiratorio (Junqueira et al., 2015).

Como se describió anteriormente, la tráquea presenta una cantidad variable de anillos incompletos de cartílagos hialinos, cuyos extremos libres se orientan hacia la parte posterior del órgano. Los ligamentos fibroelásticos y los haces musculares lisos (*pars membranosa*) se fijan al pericondrio y unen los extremos libres de las piezas

cartilagosas. Dichos ligamentos impiden la dilatación excesiva de la luz y los haces musculares posibilitan su regulación. Por fuera, la tráquea se halla cubierta por tejido conjuntivo de densidad moderada, una capa adventicia, que une el órgano a los tejidos adyacentes (Junqueira et al., 2015).

### **1.1.3 Fisiología**

En cuanto a la fisiología de la tráquea podemos hablar de tres funciones principales: conducir aire entre la laringe y los bronquios, intercambio de calor y humedad y expulsión de partículas.

El transporte de aire a través de la tráquea depende de su diámetro interno y la resistencia al paso del mismo es inversamente proporcional al radio de la tráquea elevado a la cuatro, tal y como lo representa la ley de Poiseuille, siempre y cuando el flujo de aire sea laminar. A velocidades de flujo más altas, el flujo puede volverse turbulento, lo que al final aumenta la resistencia. La inflamación de la mucosa, contracción del músculo liso o patologías que reduzcan el calibre de la vía aérea, o incluso tubos endotraqueales, aumentan considerablemente la resistencia al flujo de aire. Una reducción del 50% del calibre interno aumenta la resistencia hasta 16 veces y si además el paso de aire es turbulento, aumenta hasta 32 veces (Brand-Saberi et al., 2014).

Las vías respiratorias superiores calientan y humidifican el aire inspirado, de manera muy eficiente a temperatura ambiente sobrepasando la bifurcación traqueal (se calienta a 37°C y se humidifica a una saturación del 100%); a esto se le llama el punto de saturación isotérmica. Cuanto más seco y frío es el aire inspirado, más se mueve este punto hacia la periferia pulmonar, induciendo deshidratación y enfriamiento del tejido pulmonar (Brand-Saberi et al., 2014).

Por último, las glándulas traqueo-bronquiales producen una secreción rica en mucina que forma una barrera protectora sobre el epitelio. Esta secreción está controlada en gran medida por el sistema nervioso autónomo, modulado por numerosos

mediadores inflamatorios. Estos mediadores forman dos, posiblemente tres, capas: una “capa de sol” al lado del epitelio y cubierta por el moco (lo que hace posible la pulsación ciliar), la “capa de gel” y posiblemente separada por una capa de surfactante. El moco recoge desechos y microorganismos, y se transporta oralmente a través de las fuerzas mecánicas de la coordinada pulsación ciliar y el flujo de aire durante la espiración. La producción de moco y la capacidad de transporte mucociliar son mayores en las vías aéreas pequeñas que en las vías aéreas centrales, donde el transporte por flujo de aire espiratorio es mayor, la velocidad de este último está determinada por el diámetro de la vía aérea y la diferencia entre la presión intrapulmonar y la presión ambiental (Brand-Saberi et al., 2014).

En conclusión, las funciones de la tráquea superan con creces la conducción simple de aire entre la laringe y los pulmones, pues juega un papel trascendental en la protección del tejido pulmonar. Las restricciones patológicas o iatrogénicas de la luz traqueal aumentan severamente la resistencia de las vías respiratorias y, por lo tanto, el trabajo respiratorio del paciente (Brand-Saberi et al., 2014).

## **1.2 Estenosis traqueal**

### **1.2.1 Causas y patogénesis**

La estenosis postintubación y los tumores son las indicaciones más frecuentes para la resección y reconstrucción de la tráquea, sin embargo, la incidencia de estenosis postintubación ha disminuido desde la introducción de los tubos traqueales con manguitos de baja presión.

Los síntomas pueden aparecer de forma gradual o abrupta según la patología subyacente, no son específicos, a menudo retrasan el diagnóstico durante muchos años. La intolerancia progresiva al ejercicio es un síntoma prominente en más de la mitad de los pacientes, otros síntomas incluyen hemoptisis, tos persistente que puede o no ser productiva, sibilancias que progresan a estridor durante el ejercicio y

finalmente estridor en reposo, cuando el diámetro de la tráquea alcanza los 5mm o menos, también puede aparecer la disfagia y ronquera debido a la afectación del nervio laríngeo recurrente. La cianosis es un signo muy tardío y siniestro, que indica una oclusión casi completa de la vía aérea. Muy a menudo, se realiza erróneamente el diagnóstico de asma de aparición en adultos y se trata en consecuencia con broncodilatadores y esteroides sin responder al tratamiento, lo que retrasa el diagnóstico (Pinsonneault et al., 1999). En la tabla 1 se resumen las diferentes causas de obstrucción traqueal.

<b>TUMORES PRIMARIOS MALIGNOS</b>
Carcinoma adenoide quístico (cilindroma), Carcinoma de células escamosas, otros
<b>TUMORES PRIMARIOS BENIGNOS</b>
Neurofibroma, Condroma, Condroblastoma, Hemangioma, Adenoma pleomórfico
<b>TUMORES SECUNDARIO</b>
Extensión directa: tiroides, laringe, pulmón, esófago Metástasis: pulmón, mama, linfoma
<b>LESIONES INFLAMATORIAS</b>
Lesión post-intubación: estenosis, granuloma, malacia, fístula traqueoesofágica Estenosis postraumática: traumatismo cerrado, lesión penetrante, traqueotomía de emergencia Post infecciosas: tuberculosis, difteria, histoplasmosis, rinosderoma Quemaduras Enfermedad del tejido conectivo: lupus eritematoso sistémico, granulomatosis de Wegener, amiloidosis
<b>LESIONES COMPRESIVAS</b>
Bocio Compresión vascular: Aneurisma torácico, anillos vasculares congénitos, aneurisma o anomalía de la arteria innominada, doble arco aórtico, anillos traqueales completos y origen aberrante de la pulmonar izquierda
<b>MISCELANEAS</b>
Sarcoidosis, policondritis recidivante, traqueopatía osteoplástica, idiopática
Tabla 1: Etiología de la patología traqueal (Pinsonneault et al., 1999).

### 1.2.1.1 Estenosis traqueal benigna

Existen diversas etiologías de las lesiones benignas de la vía aérea superior, todas ellas causando estenosis con o sin otra lesión asociada. Las causas más comunes de la estenosis traqueal benigna son la idiopática, traumática, postintubación o postraqueotomía, aunque no son las únicas.

Es una entidad patológica de gran importancia, que afecta usualmente a pacientes que han precisado una intubación orotraqueal prolongada con o sin traqueotomía añadida. La incidencia en dichos casos corresponde a un 21% o 4.9 casos por millón de habitantes/año, según la mayoría de las series reportadas (Fernández Fau et al., 2010). Es una lesión frecuente y grave que compromete seriamente la función respiratoria poniendo en peligro la vida del paciente, pudiendo llegar a la asfixia si no se realiza un tratamiento correcto y oportuno.

La estenosis se produce por los fenómenos de isquemia, necrosis y destrucción de los tejidos laringotraqueales, que se ven afectados por la presión ejercida por el tubo endotraqueal y compresión del balón neumático. La isquemia ocurre cuando la presión ejercida sobre la pared posterolateral y anterolateral de la tráquea, secundaria al tubo y el balón respectivamente, excede la presión de perfusión capilar a estos niveles. El proceso empieza con una dilatación y ablandamiento de las estructuras de soporte traqueales por la destrucción de los tejidos blandos y del cartílago, y una vez la lesión se ha instaurado puede evolucionar de dos maneras: se restaura la fisiología normal o se desarrolla tejido de granulación y fibrosis que conlleva a estenosis (Fernández Fau et al., 2010).

En cambio, la estenosis laringotraqueal idiopática es infrecuente, afecta predominantemente a mujeres en edad media (90% de los casos) sin instrumentación traqueal previa. Se han propuesto varias hipótesis fisiopatológicas, entre las que se incluyen el reflujo gastroesofágico, la tos crónica y la respuesta anormal al estrógeno. A diferencia de la estenosis traqueal iatrogénica, la historia natural y la extensión de estas lesiones no se conocen, y su curso futuro no se puede

predecir, sin embargo, se sabe que la mucosa laringotraqueal o traqueal generalmente se encuentra engrosada e inflamada, y la vía aérea se ve afectada circunferencialmente. En pacientes no tratados previamente por otro especialista, el tipo de lesión característica revela cartílago sano y estrechamiento progresivo de un segmento corto de la vía aérea, generalmente en el área subglótica. El diagnóstico requiere la exclusión de otras causas más frecuentes de estenosis traqueal, como intubación, infecciones, agentes físicos, enfermedades vasculares del colágeno y factores congénitos (Morcillo et al., 2013).

Algunos autores han aplicado terapias endoluminales conservadoras (láser, dilatación, prótesis o una combinación) con buenos resultados a corto plazo, en el mejor de los casos, pero las recurrencias tardías son frecuentes. Estas terapias pueden lesionar cartílagos laringotraqueales previamente sanos y por consiguiente ocasionar una extensión del área afectada (Morcillo et al., 2013).

#### 1.2.1.2. Estenosis traqueal maligna

En los adultos, aproximadamente el 90% de todos los tumores primarios de la tráquea son malignos, en contraste con el 10% al 30% en niños. La incidencia de neoplasias malignas traqueales es aproximadamente 0,1 por 100,000 personas por año. El carcinoma de células escamosas y el carcinoma adenoide quístico constituyen aproximadamente dos tercios de los tumores traqueales primarios en adultos y un grupo heterogéneo de tumores benignos y malignos representa el tercio restante (Junker, 2014).

Las metástasis a la pared traqueal es un evento muy inusual. La mayoría de estos tumores metastásicos están asociados con estadios muy avanzados de enfermedades malignas. Los tumores primarios suelen estar localizados en mama, colon o piel. La diseminación continua a la tráquea es mucho más frecuente, como consecuencia de carcinoma de tiroides, carcinoma de esófago, cáncer de pulmón, tumores malignos tímicos o ganglios linfáticos mediastínicos metastásicos (Junker, 2014).

En general, los pacientes con neoplasias traqueales tienen un pronóstico desfavorable, con tasas de supervivencia informadas a los 5 y 10 años del 5% al 15% y del 6% al 7%, respectivamente, para todos los tipos de carcinoma traqueal.

Los factores pronósticos más importantes en las enfermedades malignas primarias de la tráquea son el diagnóstico precoz, el estadio del tumor, la histología y las opciones de tratamiento. Debido a su patrón de crecimiento predominantemente local, los tumores malignos de tipo glándula salival muestran un mejor resultado en comparación con otros tipos histológicos. Sin embargo, la cura mediante resección quirúrgica del carcinoma adenoide quístico suele ser imposible debido a su característico crecimiento a lo largo de la vaina perineural. Sin embargo, la supervivencia en pacientes con tumores resecables es mejor que en pacientes no resecados, especialmente después de una resección completa. Por lo tanto, la selección de pacientes para la cirugía definitiva es el factor más importante para mejorar el pronóstico de los pacientes con tumores malignos traqueales primarios (Junker, 2014).

#### 1.2.1.3 Estenosis traqueal congénita

La estenosis traqueal congénita es rara, pero potencialmente mortal, a menudo conduce a una insuficiencia respiratoria grave, en particular en los recién nacidos y primeros meses de vida, la gravedad de los síntomas corresponderá al grado de estenosis presente. La verdadera incidencia de esta anomalía es desconocida dado que muchos bebés mueren antes de realizar el diagnóstico. La estenosis traqueal congénita representa un espectro de lesiones de las vías respiratorias que generalmente están compuestas por anillos traqueales cartilaginosos completos y ausencia de *pars membranosa*; que además varían en la ubicación, la longitud y la gravedad del estrechamiento luminal. La variabilidad en los síntomas clínicos, la diversidad de anomalías cardiovasculares asociadas y la infrecuencia del trastorno presentan desafíos significativos para su manejo oportuno y eficaz (Hofferberth et

al., 2015).

Aunque un subconjunto de pacientes puede superar la estenosis traqueal con el tiempo, la intervención quirúrgica a menudo es inevitable para los pacientes sintomáticos. Se han descrito varias técnicas quirúrgicas para tratarla, incluida la resección con anastomosis termino-terminal, la traqueoplastia con injerto de cartílago costal, la traqueoplastia con parche pericárdico y la traqueoplastia por deslizamiento (descrita por Tsang, modificada por Grillo). Además, del uso de *stents* endoscópicos (Hofferberth et al., 2015).

La traqueoplastia por deslizamiento ahora se reconoce como el procedimiento de elección, independientemente de la anatomía de la vía aérea y la duración de la estenosis traqueal, mientras que la resección segmentaria y la anastomosis son una opción de tratamiento viable en el subgrupo de pacientes con estenosis discreta de un segmento corto. La colocación de *stent* traqueal también puede usarse como terapia adyuvante, sin embargo, esta estrategia conlleva su propia morbilidad adicional y actualmente solo se usa como procedimiento de rescate o terapia puente, sin embargo, promete convertirse en una terapia complementaria más factible gracias a las nuevas tecnologías, como los materiales bioabsorbibles y los dispositivos derivados de impresoras de tres dimensiones (Hofferberth et al., 2015).

#### 1.2.1.4. Estenosis traqueal autoinmune

Cuando se diagnostica una estenosis laringotraqueal, en un paciente sin antecedentes de traumatismo o intubación previa, en ausencia de causa identificable, se habla de estenosis idiopática, aunque siempre en estos casos se sospecha algún mecanismo autoinmune desconocido.

La etiología autoinmune ocupa el quinto lugar en frecuencia en la estenosis laringotraqueal. La enfermedad de Wegener es la más comúnmente asociada, es una vasculitis sistémica primaria que comúnmente afecta al área otorrinolaringológica, así como al tracto respiratorio bajo y al riñón. Su diagnóstico se realiza por la

presencia de inflamación granulomatosa necrosante en el tracto respiratorio alto y vasculitis de pequeño o mediano vaso. En un 87-92% de los casos aparecen manifestaciones en el área otorrinolaringológica, sin embargo, solo un 8-13% se asocian a una estenosis laringotraqueal (Dablanca et al., 2017).

Uno de los problemas más importantes que presenta este tipo de enfermedad es el número de intervenciones que requiere para poder obtener buenos resultados, puesto que la recurrencia de la enfermedad es frecuente. Uno de los temas más controvertidos que trata la literatura sobre esta cuestión es si la evolución de la estenosis depende o no del curso de la enfermedad de base, ya que algunos autores opinan que la evolución de la estenosis es independiente de ésta (Dablanca et al., 2017).

### **1.2.2 Diagnóstico**

Existen signos y síntomas que orientan al diagnóstico de la estenosis traqueal como son: la disnea progresiva, el ronquido, el estridor, la disfonía, la disfagia y la apnea obstructiva del sueño entre otros. Pero se requiere de pruebas diagnósticas específicas para el diagnóstico de esta patología. Se utilizan los siguientes estudios para identificar o caracterizar una lesión traqueal (Pinsonneault et al., 1999):

- Tomografía lineal de la tráquea: es probablemente la herramienta más precisa para caracterizar la lesión en cuanto a su grado, nivel y longitud.
- Fluoroscopia: proporciona información valiosa sobre la función de la glotis y la laringe, así como la identificación de segmentos malácicos.
- Tomografía computarizada: es un complemento útil para evaluar la afectación extratraqueal o extrabronquial por tumor, así como la invasión esofágica y mediastínica. Es de utilidad en la estenosis benigna, para definir la ubicación exacta y la extensión bruta de la obstrucción.
- Estudio del esófago con bario: identifica la afectación esofágica por invasión

del proceso tumoral o compresión extrínseca.

- Angiogramas de arco aórtico: en casos seleccionados de cáncer en los que se planea extirpación de laringe, porción de tráquea y esófago y frecuente traqueotomía.
- Pruebas de función pulmonar: el interés en las pruebas de función pulmonar para lesiones traqueales altas reside en la curva de flujo-volumen que identifica una obstrucción y define si es intra o extratorácica, variable o fija. El grado de estenosis se puede estimar con una boquilla de diámetro variable y decreciente. La curva de flujo-volumen cambiará cuando la abertura de la boquilla sea más pequeña que la luz de las vías respiratorias. El volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) en sí mismo no aporta muchos datos: la relación de flujo espiratorio máximo a FEV1 es más útil. Si esta relación es  $\geq 10:1$ , debe sospecharse la obstrucción de la vía aérea.
- Broncoscopia: valoración por el cirujano bajo anestesia local con broncoscopia flexible preferiblemente para caracterizar la movilidad y situación de las cuerdas vocales, presencia de lesiones de las comisuras, posición de los cartílagos aritenoides y su movilidad, valoración de la articulación cricoaritenoides, valoración del estoma, consistencia de la laringe y tráquea, presencia de granulomas, estudio de la estenosis y toma de biopsias. La broncoscopia rígida es el estándar de oro para caracterizar la lesión y la pared traqueal que la rodea, además no sólo sirve como herramienta diagnóstica sino terapéutica y proporciona una vía de ventilación (Pinsonneault et al., 1999).

### **1.2.3 Tratamiento**

Los pacientes que presentan obstrucción de la vía aérea pueden tratarse de diferentes maneras, teniendo como objetivos terapéuticos la cura o la paliación de los signos y síntomas.

Existen procedimientos endoscópicos para tratar la estenosis traqueal y que a veces son necesarios en caso de urgencias, sin embargo, si no se realizan por manos expertas pueden llegar a empeorar la estenosis, además, dichos procedimientos pueden tener utilidad como terapia puente, pero la cirugía siempre será el único tratamiento que pueda ofrecer una cura definitiva (D'Andrilli et al., 2016).

Con respecto a los principales tratamientos para la estenosis traqueal distinguimos los siguientes:

- Irradiación: el carcinoma de células escamosas y el carcinoma adenoide quístico responden a la irradiación, sin embargo, la radioterapia sola no es un tratamiento definitivo, ya que la recurrencia del tumor se produce después de algunos años. Es un buen complemento como adyuvante postoperatorio, sin embargo, la neoadyuvancia es cuestionable ya que aumenta la incidencia de dehiscencia traqueal (Pinsonneault et al., 1999).
- Dilatación: es el método de elección para el manejo de emergencia de la obstrucción traqueal causada por la estenosis. Tiene muy poco valor como tratamiento definitivo ya que la recurrencia casi siempre ocurrirá. También se usa como medida temporal hasta que se pueda realizar la cirugía y se puede hacer repetidamente durante un tiempo hasta que se complete el tratamiento definitivo (Pinsonneault et al., 1999).
- Laser: la terapia con láser (CO<sup>2</sup> o YAG) se utiliza principalmente como paliación para lesiones malignas que no son susceptibles de cirugía de resección. La recurrencia es inevitable. No debe intentarse como una terapia definitiva para la estenosis, ya que el láser tiende a destruir la tráquea adyacente sana.
- *Stents*: pueden usarse como paliación para pacientes con afectación extensa que no son susceptibles de cirugía. Pueden ser un tratamiento definitivo para pacientes con estenosis benignas que son demasiado extensas para la cirugía, para pacientes cuyas tráqueas han sido destruidas por múltiples intentos de

reconstrucción con fallas asociadas, o para pacientes que no son candidatos para cirugía debido a afecciones médicas asociadas. Pueden insertarse en la vía aérea como una medida temporal hasta que el paciente esté listo para la cirugía. Finalmente, pueden usarse como complemento de la cirugía, lo que proporciona estabilidad a la tráquea recién anastomosada (Pinsonneault et al., 1999).

- Traqueotomía: si la traqueotomía se considera necesaria para asegurar la vía aérea, debe colocarse en el área más dañada de la tráquea para mantener intactos los anillos sanos, en caso de que la reconstrucción traqueal se realice en una fecha posterior.
- Resección traqueal con anastomosis termino-terminal: es la mejor técnica quirúrgica para el tratamiento de la estenosis traqueal circunferencial cervical.

El abordaje quirúrgico de los espacios glótico y subglótico es uno de los desafíos de la reconstrucción laringotraqueal. El tratamiento quirúrgico está condicionado por la proximidad o implicación de las cuerdas vocales y el estado de los cartílagos laríngeos. Las técnicas quirúrgicas descritas por Couraud, Pearson y Grillo hoy en día siguen siendo el *gold standard* de la cirugía laringotraqueal y consisten en la resección de la mucosa afectada y recubrimiento del defecto con colgajos de la pared membranosa de la tráquea restante (D'Andrilli et al., 2016).

En cuanto al manejo anestésico, la elección de intubación orotraqueal o a través de traqueotomía dependerá del estado de la vía aérea de cada paciente.

El abordaje consiste en una incisión cervical, horizontal o en collar, se levanta el *flap* de músculo platisma hasta alcanzar la cara anterior del músculo esternocleidomastoideo. El músculo esternohioideo y esternotiroideo son seccionados en la línea media, al igual que el istmo tiroideo. Así se expone la cara anterior de la tráquea, desde el cartílago tiroideo hasta la escotadura esternal (D'Andrilli et al., 2016).

El procedimiento quirúrgico apropiado se debe seleccionar después de analizar las características de la estenosis, incluida la afectación de los cartílagos laríngeos y de las cuerdas vocales, así como su movilidad y la distancia de la estenosis.

Por ejemplo, cuando la estenosis no involucra a la laringe, se puede realizar una anastomosis termino-terminal. Sin embargo, se debe indicar una intervención de tipo Pearson cuando la estenosis involucra a la mucosa traqueal a nivel del cartílago cricoides, con los ventrículos laríngeos sanos y cuerdas vocales móviles a una distancia de la estenosis mayor a 2cm: se reseca el arco anterior del cricoides, preservando el sello cricoideo para evitar lesión de los nervios laríngeos recurrentes. La anastomosis se puede realizar sin necesidad de laringofisura, realizando un telescopaje de la tráquea al cartílago tiroides para la anastomosis (D'Andrilli et al., 2016; Morcillo et al., 2013).

Una resección de Grillo es de elección cuando la estenosis afecta circunferencialmente la mucosa subglótica y necesita ser reemplazada: Tras resecar el anillo cricoideo, debe interponerse un *flap* de la membranosa remanente de la tráquea sana sobre el sello cricoideo y a continuación se puede realizar la anastomosis de igual manera a la descrita anteriormente (D'Andrilli et al., 2016; Morcillo et al., 2013).

La cirugía tipo Maddaus se realiza en pacientes con la estenosis localizada más cerca de cuerdas vocales, pero siendo móviles y funcionales. En esta intervención no solo se reseca el anillo cricoideo sino que se realiza una laringofisura, esto es, una incisión vertical en la línea media del cartílago tiroides. Posteriormente se reseca la mucosa afecta y se procede a realizar la anastomosis de la cara posterior de la tráquea dejando un tutor o cánula (D'Andrilli et al., 2016; Morcillo et al., 2013).

Y, por último, se debe indicar una intervención tipo Couraud cuando la estenosis afecte ambas cuerdas vocales o los cartílagos laríngeos estén

desestructurados por procedimientos previos (láser, traqueotomía, cirugías, entre otros).

En esta intervención, tras realizar la laringofisura, se debe realizar una cricotomía media posterior, es decir incidir el sello cricoideo en la línea media (con o sin interposición de injertos libres) para aumentar la luz de la laringe (D'Andrilli et al., 2016; Morcillo et al., 2013).

#### **1.2.4 Resecciones traqueales extensas**

Parte de la longitud de la tráquea puede diseccionarse circunferencialmente sin necrosis, si la tráquea permanece intacta y con ella los vasos longitudinales verticales. Sin embargo, durante una cirugía de resección, la disección circunferencial de un segmento de tráquea excesivamente largo por encima o por debajo del punto de incisión traqueal, puede llevar a la devascularización seguida de necrosis. Por lo que, la experiencia clínica dicta que se debe minimizar la disección circunferencial de la tráquea que no se va a resecar, con el objetivo de no diseccionar más de 1 o 2cm de tráquea por encima o por debajo de una línea anastomótica (Grillo, 2004).

La tráquea no permite una resección mayor del 50% de su longitud y la necesidad de resecciones extensas se suele presentar en pacientes que ya han sido tratados previamente con cirugía o métodos endoscópicos, con mucho tiempo de evolución, o que presentan desde el principio de su patología estenosis extensas y/o complejas.

La primera anastomosis bronquial exitosa fue descrita por Jackson y sus colaboradores en 1949 (Grillo, 1973); en el mismo año, basándose en los resultados de ensayos en 6 cadáveres humanos frescos, Rob y Bateman estimaron que la resecabilidad factible de la tráquea era de aproximadamente 2cm de longitud y esta estimación fue fuertemente defendida por Barclay y sus colegas en 1950 y se consideró válida durante varios años (Grillo, 1973).

Como resultado, desde entonces, ha habido un esfuerzo considerable en el desarrollo de nuevos materiales de reemplazo para prótesis traqueales, incluyendo tubos sólidos de diferentes materiales y rigidez, diversos materiales de tipo de malla en combinación con diferentes técnicas de soporte, así como injertos y fascia reforzados con alambre. En la actualidad y desde hace algunos años se han obtenido avances en las maniobras quirúrgicas de liberación de tejidos para lograr una mayor movilización de las estructuras hasta alcanzar incluso resecciones de hasta 6cm de longitud (Montgomery, 1974), sin embargo, sigue siendo un reto el alcanzar resecciones de mayor tamaño. Una posible alternativa al tratamiento actual en estos casos complejos podría estar en la construcción de sustitutos traqueales mediante técnicas de Ingeniería Tisular (Aoki, 2019), como se ampliara posteriormente.

### **1.2.5 Trasplante de vía aérea**

Una alternativa a las prótesis podría ser el trasplante de tejido heterólogo. Sin embargo, la necesidad de inmunosupresión a largo plazo es una desventaja importante. También se han realizado conductos tubulares contruidos a partir de intestino delgado, esófago, piel, o aorta, pero por lo general se obstruyen fácilmente porque no pueden soportar las variaciones de presión de la vía aérea.

Además, los sustitutos traqueales autólogos previamente probados y los *stents* se asociaban generalmente con la acumulación de secreciones bronquiales e infecciones graves. Hasta la fecha, el concepto de los reemplazos traqueales realizados por bioingeniería no ha significado una solución confiable.

La experiencia con el alotrasplante traqueal ha sido anecdótica debido a las dificultades relacionadas con la restauración de la vascularización.

En 1963 y 1971 el equipo de Fonkalsrud realizó reemplazo traqueal en dos pacientes, utilizando sus esófagos con una recuperación inmediata adecuada, pero falleciendo en ambos casos a las 6 semanas ya que las neotraqueas precisaban de *stents* permanentes y su funcionalidad era inadecuada (Fonkalsrud et al., 1971). Desde

entonces, se han intentado varios abordajes que utilizan alotrasplante.

En 1979 Rose y colaboradores describen el primer reemplazo traqueal alogénico utilizando injerto de donante cadavérico en un paciente de 21 años con estenosis traqueal extensa. Inicialmente el injerto fue implantado en la región del esternocleidomastoideo para aportar vascularización indirecta y tres semanas después trasplantarlo a la región ortotópica. El paciente fue dado de alta a las 9 semanas sin tratamiento inmunosupresor (hasta ese entonces se asumía que los fallos del injerto se debían a isquemia o infección únicamente y no se tenía en cuenta la inmunogenicidad de la tráquea), no se publicó información sobre el resultado a largo plazo (Nakanishi, 2009). El artículo original afirmaba, "el aloinjerto traqueal se ha integrado y ha funcionado de manera perfecta durante 9 semanas sin evidencia de rechazo, isquemia o infección" (Rose, 1979).

Así mismo, Levashov y colaboradores realizaron un trasplante traqueal con omentopexia para aportar vascularización a la tráquea cadavérica y reportaron signos de rechazo de injerto a los 10 días postoperatorios. Tras lo anterior, los autores hicieron énfasis en la importancia de la selección donante-receptor, más la inmunosupresión (Levashov et al., 1993).

A pesar de la evidente importancia de la inmunogenicidad de la tráquea, la mayoría de investigadores han centrado sus estudios en la revascularización de injertos. Klepetko y colaboradores demostraron que se pueden mantener las funciones y arquitectura de un injerto alogénico mediante trasplante heterotópico hacia el epiplón (Klepetko, 2004). El beneficio del epiplón para aportar vascularización al sustituto ha sido demostrado solo en modelo animal, no sólo por Hamaji (Hamaji et al., 2014), sino que el grupo de Elliott utilizó esta técnica en un caso clínico con seguimiento de dos años (Elliott et al., 2012). Ya previamente, los autores de este proyecto vieron que en un modelo animal el implante en el abdomen de segmentos traqueales recubiertos por epiplón, podía ser útil en la revascularización de

segmentos traqueales con excelente preservación de cartílago y mucosa (Borro et al., 1992).

En 1993 se notificó un caso de alotrasplante traqueal que fue revascularizado ortotópicamente bajo la protección de medicamentos inmunosupresores. El injerto parecía vital al final del segundo mes, pero los signos de estenosis del injerto aparecieron al final del cuarto mes (Levashov et al., 1993). El conocimiento actual sugiere que la revascularización ortotópica de un injerto traqueal es completamente imposible.

En 2013 el grupo de Darteville describió la utilización de substitutos traqueales autólogos formando una neotraquea a partir de un flap vascularizado de tejido fasciocutáneo del antebrazo reforzado con cartílagos costales. Con esto se consiguieron resecciones traqueales de 7 a 12cm de longitud (Fabre et al., 2013).

En el pasado también se recurrió a la utilización de prótesis para reconstruir resecciones traqueales que excedían los 6cm, uno de los primeros prototipos es del grupo de Neville (Neville, 1982); sin embargo, dado que no existe prótesis seguras, se han utilizado más *stents* con su consecuente riesgo de erosión hacia el mediastino o vasos cervicales.

De estos estudios, aprendimos que la tráquea está sujeta a las mismas leyes inmunológicas que todos los demás tejidos alogénicos. El componente más importante en el rechazo traqueal fue mediado por linfocitos, y la principal población de células diana fue el endotelio del aloinjerto (Delaere et al., 2018).

Así pues, una posible estrategia para la obtención de un sustituto traqueal estanco, biomecánicamente adecuado y susceptible de ser epitelizado y de permitir la anidación de condrocitos podría residir en el uso de constructos mixtos elaborados mediante biomateriales y segmentos de tráquea descelularizadas. Esta idea ya ha sido planteada y utilizada con éxito en diferentes trabajos. Así por ejemplo destacamos el uso de constructos mixtos empleados para regeneración nerviosa,

diferenciación de células madre o regeneración ósea (Gibson et al., 2014; Hung et al., 2014). No obstante, la posible aplicación de este tipo de constructos para la regeneración de vías aéreas no ha sido evaluada hasta la fecha.

### **1.3 Ingeniería tisular de la tráquea**

#### **1.3.1 Introducción**

Como ya hemos comentado, la cirugía de resección traqueal con anastomosis directa es actualmente la terapia *gold standard* para pacientes con enfermedad traqueal. Sin embargo, debido a sus varias limitaciones, en los últimos veinticinco años se han realizado numerosos esfuerzos para generar equivalentes traqueales mediante ingeniería tisular para su posible sustitución.

En la actualidad, los pacientes que no cumplen con los criterios para indicar una cirugía de resección-anastomosis, son tratados con terapias láser, en ocasiones subóptimas, y colocación de *stents*. Pero, también se han intentado, otro tipo de tratamientos experimentales que incluyen la conformación de un conducto traqueal a partir de una variedad de tejidos y materiales, como los autoinjertos, aloinjertos y materiales protésicos.

Un sustituto traqueal ideal debe exhibir una excelente biocompatibilidad y no ser inmunogénico, poseer una rigidez lateral y una flexibilidad longitudinal, debe ser totalmente hermético y evitar una penetración bacteriana en su interior a la vez que permita ser recubierto por epitelio respiratorio, y debe ser fácilmente vascularizable evitando así la erosión, infección y necrosis de la zona implantada.

Además, para desarrollar con éxito una tráquea mediante técnicas de Ingeniería Tisular, también se deben cumplir los siguientes requisitos: desarrollar un procedimiento de obtención celular mínimamente invasivo y simple pero que sea eficaz (suficientes células en un corto período de tiempo); el uso de un andamiaje biodegradable que no cause respuestas inflamatorias e inmunes; flexibilidad

adecuada, rigidez y complianza del tejido diseñado; una estructura hermética; angiogénesis apropiada y vascularización del tejido; epitelización del tejido; y el crecimiento del implante en el paciente, particularmente importante en la población pediátrica.

En términos generales, las líneas de investigación en Ingeniería Tisular incluyen: ensayos de una gran cantidad de materiales foráneos con muchas modificaciones técnicas para evitar complicaciones de la implantación; implantación de tejidos no viables, incluida la tráquea fija; adaptación y transferencia de tejidos autógenos con o sin andamiaje como parches o tubos; ingeniería tisular de componentes necesarios como cartílago; y trasplante de aloinjertos con y sin terapia inmunosupresora, preservación y procedimientos de vascularización. El éxito se ha reportado de forma puntual durante décadas en cada una de estas categorías, pero hasta ahora ningún método de reemplazo se ha mantenido a largo plazo de manera segura y práctica (Grillo, 2002; Kojima et al., 2014).

Revisando las diferentes líneas de investigación enumeradas anteriormente nos encontramos con una serie de inconvenientes. Por ejemplo, en cuanto a las prótesis rígidas, han demostrado ser exitosas como conductos vasculares, válvulas cardiacas y dispositivos ortopédicos, sin embargo, no han tenido el mismo resultado en el sistema respiratorio, gastrointestinal o genitourinario. Aquí, persiste inevitablemente una interface por incompatibilidad biológica entre el material extraño y la reparación crónica del tejido conjuntivo y epitelial, lo que proporciona una fuente de contaminación bacteriana (Neville et al., 1982; Grillo, 2002).

Para contrarrestar este problema, se han utilizado experimentalmente varias mallas con diferentes materiales. Se encontró que, para que exista crecimiento vascular interno, la malla debe contar con una porosidad mínima de 40 a 60  $\mu\text{m}$  (Grillo, 2002). El principio se basa en que la estructura porosa debería permitir el crecimiento de tejido conectivo del receptor hacia la prótesis, incorporándola en la tráquea. Sin embargo, en la práctica, la proliferación continua conlleva a la proliferación de tejido

cicatricial que produce obstrucción y estenosis; y en segmentos muy largos quedan zonas sin recubrimiento epitelial favoreciendo el crecimiento bacteriano.

Otra de las opciones estudiadas es la implantación de tejidos no viables, las tráqueas cadavéricas y también otros tejidos fijados químicamente, congelados o liofilizados, se han utilizado tanto experimental como clínicamente como reemplazos traqueales. Erróneamente se ha llamado a estos intentos "trasplante" o se han descrito como "injerto traqueal" a pesar de su principio de ser no viable y desnaturalizado. En opinión de algunos autores, no se puede esperar que el tejido necrótico funcione como una plantilla para la regeneración de la estructura compleja de la tráquea de acuerdo con los procesos biológicos básicos que se conocen (Nakanishi, 2009).

Se han publicado hallazgos más recientes sobre esta materia han sido publicados. Clínicamente, el injerto traqueal de cadáveres fijado en formalina y almacenado en mertiolate, implantado y observado durante más de 13 meses, mostró desintegración histológica y alogenicidad reducida. Jacobs y colaboradores describieron además la "reconstrucción de aloinjerto traqueal" en adultos y niños, utilizando tráquea de cadáver tratada con formalina al 4%, seguida de timerosal y almacenada en acetona (Jacobs, 1996). La porción cartilaginosa en estenosis largas de diversas etiologías fue extirpada y reemplazada con el tejido fijo, soportado con los *stents* intraluminales de silicona Dumon o Hood. Se requirió la realización frecuente de bronoscopias por la presencia de granulomas después de la extracción del *stent*, pero se describió una epitelización completa después de intervalos no especificados. Basados en la visualización bronoscópica y muestras histológicas de seis pacientes, uno falleció de fístula a la arteria innominada, dos tenían traqueomalacia que requería *stents*, otro requirió reemplazo del *stent* y fue retirado al poco tiempo requiriendo bronoscopias frecuentes por granulomas y otros dos que precisaron de traqueotomía (el último decanulado) en un tiempo no especificado (Grillo, 2002).

En resumen, un paciente de cada seis estaba libre de *stent* y con una vía aérea competente a corto plazo. Otros resultados un poco más favorecedores se citaron en Europa en donde 58% de los niños fueron tratados con éxito, sin embargo, no se proporcionaron datos de seguimiento detallados que permitiera la plena apreciación de su estado final (Jacobs, 1999).

Si la epitelización completa se produce por la migración del epitelio traqueal, esto debe ocurrir sobre el tejido de granulación del huésped que ha reemplazado al injerto de cadáver. Así mismo, esto explicaría la aparición de granulomas y también el desarrollo de malacia grave a medida que el cartílago muerto se reabsorbe y se reemplaza por la cicatriz. Es biológicamente inconcebible que el cartílago completamente necrótico pueda reconstituirse como cartílago vivo (Grillo, 2002; Fabre et al., 2013).

Scherer y colaboradores procesaron químicamente las tráqueas de ratas, cobayas y cerdos. Varios segmentos traqueales y parches de ventana se implantaron como autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos. El rechazo parecía ser evitado, y la supervivencia morfológica variable del cartílago y la epitelización a largo plazo se produjo en ratas, pero no en cerdos (Scherer, 1986). Pressman y Simon utilizaron homoinjertos aórticos liofilizados y esterilizados sobre tubos de polietileno en perros, se previno la estenosis por el *stent*, pero éste por contracción lineal se estiró y deformó los extremos proximal y distal de la tráquea, y los anillos calcificados y el epitelio traqueal emergieron del injerto aórtico (Pressman, 1959).

Marrangoni en 1951 y Greenberg y Williams en 1960 observaron que los aloinjertos traqueales caninos liofilizados perdieron su cartílago y fueron reemplazados por tejido cicatricial (Marrangoni, 1951; Greenberg, 1960).

Otra rama explorada ha sido la de los tejidos autólogos. Se han utilizado materiales externos para darle soporte a estos injertos de tejido autólogo, sea en forma de parches o ya con forma tubular. Los injertos utilizados han sido bastante variados, se

han utilizado: fascia, pared traqueal, trozos de cartílago sobre una malla de alambre y cilindros de vidrio, injertos cutáneos unidos por alambre, fascia con soporte de alambre de Tantalum, pericardio, pericardio con Marlex, periostio libre envuelto en omento, tiras de hueso con fibrocolágeno, tiras de cartílago y pericondrio sobre *stents* de silicona, cartílago costal, periostio y costilla sobre *stent* de polietileno, parche perióstico puesto sobre incisiones intercartilaginosas escalonadas (se aplicó clínicamente), parches compuestos de mucosa bucal y cartílago auricular, dura madre con alambre, mucosa vesical con elastómero de silicona o con *stent* de poliuretano con la cara epitelial de la mucosa hacia afuera del lumen para que formara hueso, o parches yeyunales con reconstrucción microvascular. Los injertos cutáneos soportados con Tantalum, pericondrio de costilla y oreja, formaron cartílago y epitelizaron pero estenosaron. El cartílago nasal con mucosa adherida sirvió de parche en perros, el parche sobrevivió, pero el cartílago casi que se reabsorbió por completo (lo mismo ocurrió al utilizar pared traqueal). Marshak y colaboradores más adelante interpusieron cilindros de mucosa vesical recubriendo elastómeros de silicona en perros y consiguieron estructuras tubulares estables cubiertas de epitelio. Sin embargo, tras remover el *stent* se produjo edema y muerte por obstrucción (Marshak, 1973).

Se ha descrito una combinación de formación, contracción y epitelización de tejido cicatricial en la integración de parches pericárdicos, a veces malinterpretados como regeneración de cartílago a partir de tejido cicatricial.

Belsey realizó en 1943 y 1944, dos resecciones traqueales radicales por cilindroma, dejando intacta una estrecha franja de pared traqueal y reconstruyendo el defecto con fascia lata sostenida por una bobina de alambre de acero (Belsey, 1950).

El uso de injertos dérmicos con soporte de alambre para ensanchar los bronquios y la tráquea se investigó ampliamente en la década de 1950. Los injertos dérmicos grandes para la reparación traqueal fracasaron frecuentemente y los injertos dérmicos envueltos alrededor de los tubos de Tantalio fallaron cuando se utilizaron por vía intratorácica (Grillo, 2002).

Crafoord y Lindgren usaron piel y cartílago para reparar la tráquea cervical en 1945. El cartílago costal y posteriormente, el pericardio, se utilizaron con éxito como injertos de parche para el tratamiento de la estenosis congénita larga, sin revascularización específica. Sólo ocasionalmente ocurrió la necrosis y se observó reepitelización pero el pericardio fue reemplazado con tejido cicatricial maduro e incluso con la adición de un colgajo pediculado omental, el parche de cartílago se reabsorbió con el tiempo (Crafoord, 1945).

Otra vía de reconstrucción fue utilizar los tejidos propios del paciente, preservando o anastomosando el suministro de sangre.

Debido a que es necesaria la rigidez relativa, se agregaron injertos libres de cartílago, anillos de plástico o mallas para el apoyo, pero es menos probable que se produzca una necrosis en un parche vascularizado que en un parche libre. En raras ocasiones, esta técnica aún se utiliza cuando se debe extirpar un segmento largo de la pared traqueal lateral para obtener una resección completa de una neoplasia secundaria invasiva. Cuando la resección circunferencial no es posible debido a la longitud de la afectación neoplásica, la escisión lateral de la pared y la reconstrucción con un colgajo pericárdico pediculado soportado por materiales como Marlex pueden ser efectivos. Para este tipo de reparación se ha experimentado con injerto de parche de músculo intercostal pediculado, periostio pediculado, bronquios pediculados y transferencia de costillas y pleura con anastomosis microvascular para defectos traqueales anteriores largos en perros (la mitad de estos animales sobrevivieron). Lofgren, Lindholm y Jansson realizaron en tres etapas un injerto compuesto pediculado de mucosa bucal y Proplast (PTFE y grafito pirolítico), con una capa externa de tejido conectivo, para la reparación de defectos traqueales laterales en perros (Grillo, 2002; Kojima et al., 2014).

Nowakowski usó colgajos de piel locales en 1909 para cerrar los defectos de la tráquea cervical. Otros colgajos utilizados han incluido el músculo intercostal pediculado y la pleura, sin los soportes de alambre para colgajos que se habían

utilizado previamente en perros; periostio en un pedículo muscular para reparación lateral; bronquios rotados; diafragma pediculado a la pared traqueal posterior; y parche pediculado de pericardio con el apoyo de Marlex para la reparación de un defecto lateral largo. Se usó un colgajo perióstico intercostal pediculado para reparar la fístula traqueoesofágica (Nowakowski, 1909; Fabre et al., 2013).

En cuanto a la construcción autógena de tubos, la tráquea cervical se ha reconstruido experimentalmente mediante la formación de un canal cutáneo, soportado por cartílago o anillos de plástico, con un cierre por etapas del canal. Edgerton y Zovickian revisaron los primeros intentos de creación de colgajos de piel, incluidos los pedículos encapsulados, apoyados con cartílago costal o costilla y, a veces, recubiertos con injertos divididos. En 1964, Grillo y sus asociados diseñaron una reparación por etapas de la tráquea cervical para reemplazar un segmento traqueal cervical devuelto con su suministro de sangre al mediastino para la anastomosis primaria intratorácica. Se formó un tubo cutáneo en etapas, soportado por anillos de polipropileno insertados entre la dermis y el platismo unido. Serrano y sus colegas insertaron una serie de hemianillos bilaterales de cartílago tallados en el arco costal para brindar apoyo cuando finalmente se cerraba anteriormente una cavidad de piel (Serrano, 1959).

Los doctores JooHyun Kim y Grillo construyeron reemplazos traqueales escalonados en perros al permitir que el pericondrio de dos cartílagos costales formara un tubo cartilaginoso alrededor de un molde de silicona *in situ*, que posteriormente cubriera este tubo con la mucosa bucal y, finalmente, lo transfiriera a un sitio torácico con suministro de sangre desde el pedículo de músculos intercostales todavía unidos pero movilizados. Como podría esperarse en una reparación tan compleja, solo un porcentaje tuvo éxito. Krespi y colaboradores colocaron un colgajo perióstico pleural alrededor de un *stent* de elastómero de silicona y, después de seis semanas en una ubicación subcutánea, trasladaron el tubo a una ubicación ortotópica, pero con resultados inciertos (Krespi, 1983; Edgerton, 1954).

Botta y Meyer utilizaron un modelo de rata y prepararon en múltiples etapas un tubo de tejido conjuntivo con aloinjertos de cartílago traqueal, previamente preparado para reducir la antigenicidad, alrededor de un tubo de elastómero de silicona, posteriormente revestido con mucosa bucal, con suministro regional desde el implante. Su tubo fue finalmente anastomosado por técnica microquirúrgica a los vasos cervicales. La complejidad fue clínicamente desalentadora (Botta, 1978).

Grillo describió la aplicación clínica de su técnica de dos etapas, aunque exitosa en algunos pacientes, la técnica no se recomienda debido a una baja tasa de éxito en general. Se debe tener en cuenta que las reparaciones en etapas del tipo que se enumera no tienen aplicación intratorácica donde se debe alcanzar una vía aérea hermética de inmediato (Grillo, 2002; Fonkalsrud et al., 1971).

Otra línea de reconstrucción experimental con tejido huésped ha sido el uso de esófago adyacente para reemplazar un segmento largo de tráquea. Se requiere una férula mural para mantener la permeabilidad, aunque, sorprendentemente, en algunos experimentos la férula parece haber sido innecesaria (Grillo, 2002; Fonkalsrud et al., 1971).

### **1.3.2 Matrices descelularizadas**

Las tráqueas descelularizadas son potencialmente una buena opción debido a que su matriz extracelular, que no debería ser inmunogénica, es capaz de proporcionar señales mecánicas y químicas que promueven la diferenciación y regeneración celular sin la necesidad de aditivos biológicos. Además, al preservar el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y transformar el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (que afecta la angiogénesis y aumenta la condrogénesis) nos proporciona una tráquea viva y funcional (Kojima et al., 2014).

Algunos grupos han reportado estudios con tráqueas descelularizadas como andamio, aunque los resultados no son muy claros. El proceso de descelularización es crucial, especialmente si las células o residuos de ADN permanecen en el tejido, lo que puede causar respuestas inmunitarias e inflamatorias como granulomas e incluso la reestenosis (Kojima et al., 2014).

Para garantizar una efectiva descelularización se debe lograr remover la mayor cantidad posible de componentes celulares con el mínimo daño de la matriz extracelular. Sin embargo, la densidad de la matriz extracelular dificulta la descelularización completa ya que limita la difusión del detergente y cuando se pretende aumentar la eficacia del detergente nos encontramos con una disrupción de los tejidos, deteriorando las propiedades de la matriz (Kojima et al., 2014).

Los métodos de descelularización se pueden categorizar entre técnicas físicas, químicas y enzimáticas, así como sus combinaciones, y la técnica elegida dependerá de las propiedades del tejido con el que se esté trabajando. Los métodos físicos (choque térmico, ultrasónico, y ruptura mecánica) causan ruptura de la membrana celular removiendo así los componentes celulares del tejido mediante agitación y perfusión. Los métodos químicos (detergentes, disolventes, soluciones ácidas, alcalinas o iónicas) suelen utilizarse en periodos cortos de tiempo para optimizar los resultados disminuyendo los efectos no deseados. Las soluciones iónicas actúan rompiendo las células como con los métodos físicos.

Los detergentes son el material químico más utilizado en las descelularizaciones químicas y actúan disolviendo la membrana celular, éstos se dividen en iónicos, no-iónicos y zwitteriónicos. Los detergentes no-iónicos tales como el Triton X-100 tienen efectos muy leves sobre la estructura proteínica, mientras que los iónicos, como el dodecil sulfato sódico (SDS) y desoxicolato de sodio (SDC), la afectan severamente, pero también ocasionan pérdida de la matriz extracelular. Los detergentes zwitteriónicos, como el 3-[(3cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato

(CHAPS) tienen un efecto intermedio entre los iónicos y los no-iónicos (Kojima et al., 2014).

Un segmento traqueal descelularizado mediante el uso de detergentes, en principio preservaría un estroma nativo adecuado para la anidación de dichas estirpes celulares, pero su uso de manera independiente resulta peligroso debido a que la distorsión ocasionada en el componente fibromuscular de los mismos podría comprometer tanto las necesidades biomecánicas mínimas de los constructos, como la estanqueidad del mismo con el consecuente riesgo de fugas de aire.

Además, dado que en la mayoría de estudios se han realizado diferentes tipos y mezclas de métodos de descelularización, es difícil llegar a un consenso. Remlinger y colaboradores (Remlinger et al., 2010) utilizaron la descelularización xenogénica de la tráquea en su estudio en 2010, en donde reportaron que cinco ciclos de descelularización eran suficientes, mientras que Bagueira y colaboradores (Bagueira et al., 2010) reportaron que se trata de 25 ciclos.

Si bien la tecnología de descelularización está progresando rápidamente en el campo de la medicina regenerativa, su implementación óptima podría depender del uso de tejidos descelularizados xenogénicos, una vez que podamos eliminar de manera fiable la contaminación de ADN y células. En este punto, ninguno de los estudios de tráquea con ingeniería tisular ha tenido éxito clínico (Kojima et al., 2014).

### **1.3.3 Epitelización**

En la actualidad, en la línea de poder ampliar la resección y anastomosis de la tráquea a más del 50% de su longitud, se están desarrollando prótesis traqueales generadas por ingeniería tisular como las desarrolladas por Nomoto y colaboradores (Nomoto et al., 2013). Estos investigadores implantaron constructos de polipropileno y esponja de colágeno con condrocitos autólogos, cultivados en un modelo

experimental de conejo, y observaron que en tan solo dos semanas después de la implantación se había producido la regeneración de la mucosa respiratoria en aquellos constructos.

Ahora bien, el auténtico reto de la ingeniería tisular en el ámbito de la regeneración traqueal lo presentan los constructos circulares completos. Con esta idea se han utilizado diferentes andamiajes basados en titanio asociado a fibrina-fibroblastos (Mohd et al., 2010), tapices de polipropileno con colágeno asociados a células mesenquimales de médula ósea o fibroblastos traqueales (Nakamura et al., 2009), y tapices de polipropileno tapizados con gelatina y queratinocitos orales cultivados en modelos animales de conejo, rata y perro e incluso en seres humanos (Kim et al., 2004; Elliott et al., 2012). A pesar de los resultados obtenidos por estos grupos, no existe hasta la fecha evidencias de un constructo circular completo implantado con éxito durante un periodo prolongado de tiempo.

Uno de los factores relacionados con el escaso éxito obtenido hasta la fecha consiste en la complejidad estructural y funcional de la tráquea, que dificulta encontrar una terapia regenerativa efectiva, debido a la diversidad celular en dicha zona, a la estructura cilíndrica y rígida abierta al exterior, y a su poca capacidad de vascularización. Por ello, representa una meta complicada para la ingeniería tisular, encontrándose en desarrollo una gran variedad de materiales tanto naturales como sintéticos para generar un sustituto traqueal aplicable clínicamente (Lange et al., 2017; Kucera et al., 1992; Kojima et al., 2014; Doss et al., 1992).

En los últimos años, gracias a la ingeniería de tejidos, se han desarrollado injertos traqueales (*stents*) empleando diversos materiales no degradables, incluyendo injertos de silicona, teflón, cloruro de polivinilo, nitinol, hasta mallas de alambre con o sin un recubrimiento de polímero: malla de polipropileno, de silicona cubierta, de poliéster o de politetrafluoroetileno expandido (Siegel et al., 2013; Gonfiotti et al., 2014). Recientemente, también se han probado experimentalmente *stents*

degradables fabricados con materiales tales como ácido poliláctico, caprolactona, colágeno, etc. (Tsukada et al., 2009; Tsukada et al., 2010; Nomoto et al., 2013; Korpela et al., 1999). Los inconvenientes de los *stents* traqueobronquiales han sido claramente identificados, encontrándose complicaciones que incluyen el desplazamiento del *stent*, retención del esputo y la infección broncopulmonar (Gaissert et al., 2003; Lemaire et al., 2005).

Los intentos de obtener órganos artificiales funcionales mediante el uso de polímeros biodegradables, como por ejemplo poli (ácido lacto-co-glicólico) (PLGA) o policaprolactona (PCL) asociados a células madre mesenquimales (MSCs) podría suponer un avance en este sentido, si bien continuamos enfrentándonos al problema de la epitelización, vascularización y a la complejidad biomecánica que exhibe la tráquea (Liu et al., 2010; Chang et al., 2014).

Entre las estrategias empleadas por la ingeniería tisular para favorecer la vascularización está la del uso de partículas que liberen de manera controlada factores angiogénicos como son el VEGF o el bFGF (Tan et al., 2007). Estos factores de crecimiento ejecutan una liberación controlada y localizada, pudiendo ir libres en un andamiaje o incluidos en micropartículas que permitan controlar en qué momento se van a liberar o ejercerán su función.

La epitelización de los constructos con mucosa respiratoria diferenciada es de vital importancia a la hora de generar un sustituto traqueal óptimo con la finalidad de evitar la interrupción del aclaramiento mucociliar con la consecuente aparición de morbilidades asociadas al acúmulo de moco en el territorio pulmonar, lo que plantea un serio problema clínico (en especial en aquellos pacientes con patologías asociadas y largos tiempos de permanencia en el hospital). Es por tanto necesario el desarrollo de prótesis que contengan una mucosa respiratoria funcional regenerada de manera autóloga a fin de evitar el uso de inmunosupresores. En este sentido, un punto importante consiste en el aislamiento y diferenciación *in vitro* de mucosa respiratoria

de vías aéreas, que puede obtenerse mediante un sencillo raspado del meato medio del propio paciente. La regeneración de dicha mucosa genera un epitelio pseudoestratificado con células ciliadas y caliciformes fisiológicamente funcionales (Mata et al., 2012).

#### **1.3.4 Regeneración de cartílago**

Por todo lo anteriormente expuesto, el uso de los recursos de la Ingeniería Tisular, que utiliza células madre autólogas para crear nuevos tejidos, parece ser lo más idóneo para las nuevas técnicas en medicina regenerativa.

El cultivo de células para la generación de estructuras funcionales de cartílago es un desafío importante en la reconstrucción traqueal. En última instancia, el objetivo es generar un gran número de células con un fenotipo universal que no sea inmunogénico y pueda usarse con cualquier paciente. Actualmente, desconocemos cual es la fuente de cartílago más efectiva de donde podamos obtener el mayor número de células con procedimientos poco invasivos.

La comprensión actual de la biología de las células madre, incluidas las células madre mesenquimales, las células madre embrionarias y la célula pluripotencial inducida. es muy alentadora para el campo de la medicina regenerativa. Además, deben considerarse los problemas éticos potenciales que surgen del uso de estos tipos de células. Actualmente, no hay consenso con respecto al tipo de célula ideal para la ingeniería del tejido traqueal. El enfoque actual está basado en el uso de condrocitos autólogos o células madre mesenquimales.

Finalmente, tras la implantación, las células sembradas deben sobrevivir y expresar los marcadores genéticos apropiados para cartílago, incluso en huéspedes inmunocompetentes. Solo en estas condiciones se puede probar el tejido traqueal recién generado para determinar la resistencia, la forma y otras propiedades mecánicas necesarias para el uso clínico en pacientes humanos (Kojima et al., 2014).

Por ejemplo, en nuestro grupo de investigación hemos utilizado con éxito para la regeneración condral no sólo condrocitos sino también células madre de pulpa dental humana, por su habilidad condrogénica de regenerar cartílago *in vivo* e *in vitro*. Estas células madre de pulpa dental y condrocitos primarios fueron aisladas de conejos donantes, y tras ser cultivadas en medio condrogénico, se evidenció la expresión de colágeno tipo II y agregano. Ambos tipos celulares (células madre de pulpa dental y condrocitos primarios aislados de conejo) se cultivaron en hidrogeles de alginato al 3% e implantado en un modelo animal de conejo tras introducirle un defecto en el cartílago articular. Tres meses después del implante celular en el andamiaje de alginato, se observó regeneración del cartílago, principalmente en los animales en los que se utilizaron células madre de pulpa dental. Aunque preliminares, estos resultados están a favor de que dichas células podrían ser útiles en la regeneración del cartílago articular (Mata et al., 2017).



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La estenosis traqueal es una enfermedad grave que, si no es tratada adecuadamente, puede comportar la muerte del paciente. En la actualidad disponemos de un arsenal terapéutico eficaz para el tratamiento de la mayor parte de las mismas. No obstante, por desgracia, existe un subconjunto de pacientes para los que dichos tratamientos no suponen una resolución de su problema a largo plazo. La resolución de la estenosis traqueal es más compleja y supone un desafío quirúrgico cuando el defecto a corregir es de más del 50% del órgano. Por éste tipo de casos complejos conocidos desde la experiencia de nuestro servicio de Cirugía torácica, surge la necesidad de desarrollar alternativas de procedimientos y estrategias terapéuticas eficaces para el tratamiento de estos pacientes que nos permita disminuir el riesgo de complicaciones y obtener resultados satisfactorios. Debemos plantearnos la posibilidad del trasplante alogénico como una posible solución para pacientes que no puedan acceder a otro tipo de tratamiento por la tipología de su lesión o complejidad de la misma.

Con esta idea se han propuesto diferentes estrategias desde la Ingeniería Tisular empleando multitud de biomateriales en la construcción de sustitutos traqueales. Esos elementos no han demostrado suficiente eficacia debido, tanto a las peculiares características biomecánicas de la tráquea, como a su compleja vascularización y muy especialmente al imperativo de constituir sustratos adecuados para la reepitelización.

Las matrices traqueales descelularizadas deberían suponer la mejor opción para la generación de un sustituto traqueal ideal. No obstante, no existe a día de hoy ninguna optimización con respecto al material descelularizante, ni suficientes estudios que determinen el efecto de los mismos sobre la integridad tisular, tanto desde el punto de vista histológico como biomecánico. Así mismo no se ha

desarrollado un procedimiento estándar para el almacenamiento de las mismas, aspecto determinante para su posible aplicación clínica.

El objetivo general de esta tesis consiste en la puesta a punto de un protocolo de descelerización de tráqueas porcinas efectivo para su posterior aplicación en tráqueas humanas. Para ello nos proponemos alcanzar los siguientes objetivos concretos:

1. Ensayar diferentes detergentes incluyendo SDS, SDC y Tritón X-100 a diferentes concentraciones y combinaciones en un modelo de descelerización de tráquea porcina. Evaluaremos la eficacia de los mismos mediante el estudio histológico utilizando DAPI, hematoxilina eosina (H-E), tricrómico de Masson y orceína.
2. Optimizar las condiciones del detergente o combinación de detergentes que resulte más eficaz para la descelerización de la tráquea porcina, desde el punto de vista histomorfométrico, biomecánico y de biocompatibilidad de las matrices descelerizadas.
3. Determinar la biocompatibilidad in vitro de las tráqueas descelerizadas.
4. Poner a punto un protocolo de criogenización válido para generar un banco de tejidos descelerizados para su uso posterior.
5. Extrapolar los parámetros optimizados en el modelo porcino al modelo de tráquea humana.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención y procesamiento de las tráqueas
Preparación de los detergentes
Descelularización: <ul style="list-style-type: none"><li>• Choque osmótico</li><li>• Lavado</li><li>• Detergente</li><li>• Incubación</li><li>• Choque osmótico</li></ul>
Tinción DAPI
Extracción ADN
Tinciones Histológicas
Análisis morfométrico
Aislamiento y cultivo de células epiteliales <ul style="list-style-type: none"><li>• Curetaje nasal</li><li>• Medio de cultivo</li><li>• Centrifugación</li></ul>
Aislamiento y cultivo de condrocitos <ul style="list-style-type: none"><li>• Extracción articular de conejo</li><li>• Lavado</li><li>• Digestión enzimática</li><li>• Incubación</li><li>• Filtrado</li></ul>
Criogenización
Estudio de biocompatibilidad
Determinación parámetros morfométricos

#### 3.1 Obtención y procesamiento de las tráqueas

En este estudio hemos utilizado 100 tráqueas de cerdo y 11 anillos traqueales humanos. Las tráqueas de cerdo fueron generosamente donadas por el matadero de Mercavalencia, a los que mostramos nuestro más sincero agradecimiento. Los anillos humanos procedían de 6 hombres y 5 mujeres, pacientes del Hospital Clínico de Valencia con diagnóstico de estenosis traqueal subglótica y sometidos a cirugía de

resección traqueal en la Unidad de Cirugía Torácica de dicho Hospital entre mayo del 2016 y abril de 2018. Las muestras utilizadas se corresponden con los excedentes de las biopsias enviadas al Servicio de Anatomía Patológica de dicho Hospital. Todos los procedimientos, que enunciaremos más adelante, que involucraron muestras humanas fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia y con el preceptivo consentimiento informado de los pacientes.

Las muestras se transportaron al laboratorio en tampón fosfato salino (PBS) (Live technologies, Gaithersburg, Estados Unidos) suplementado con un 5% de antibióticos (penicilina y estreptomina) y antifúngicos (fungizona) para ser procesadas, bajo condiciones de esterilidad, en el laboratorio de ingeniería tisular del departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València. Una vez allí se eliminó el tejido conjuntivo circundante, exponiendo así el tejido cartilaginoso y eliminando la mayor cantidad de artefactos posibles. Las tráqueas se procesaron y fragmentaron en anillos de 3cm. Se obtuvieron entre 4-6 anillos de cada tráquea, dependiendo de la longitud de la misma.

### **3.2 Preparación de los detergentes**

Para la preparación de las soluciones de detergente, utilizamos SDS y Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU.) y SDC (Merck, Darmstadt, Alemania) en polvo. Los detergentes se disolvieron en PBS estéril con agitación a 37°C. Una vez disueltos en el PBS, se añadieron los antifúngicos y los antibióticos al 5% y se filtraron las soluciones por un filtro de 0,22µm. Finalmente se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

### **3.3 Protocolo de descelularización**

Una vez procesadas tal y como se describe en el apartado 3.1, las tráqueas fueron sometidas a un choque osmótico mediante su inmersión en agua destilada estéril durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 3

veces en PBS y se sumergieron en solución con detergente preparada acorde a las especificaciones del apartado 3.2 en botes de orina estériles de 70ml. Las muestras de tráquea se incubaron a temperatura ambiente con agitación orbital y fueron sometidas a un nuevo choque osmótico e inclusión en una nueva solución con detergente cada 72 horas. El tiempo de descelularización osciló entre las 4 y 6 semanas de tratamiento y se optimizó mediante tinción fluorescente DAPI a fin de evaluar la completa descelularización de los anillos traqueales para posteriormente ser analizados en el laboratorio.

Para ello tras un primer choque osmótico de dos horas, se incubaron las tráqueas de cerdo con diferentes combinaciones de los siguientes detergentes: Triton X-100, SDS, y SDC. Cada grupo se compone de 3 a 12 tráqueas porcinas, siendo el grupo control el A que no fue sometido a ningún detergente. La tabla 2 resume los grupos experimentales incluidos en estos primeros experimentos (experimento (i)) y la concentración y tipo de detergente utilizado en cada grupo. Cada 7 días se cambió la solución descelularizante, se realizó un choque osmótico de 2 horas en agua destilada y se procesó un pequeño fragmento para su estudio mediante tinción DAPI, a fin de verificar el grado de descelularización. La descelularización fue máxima a las 4 semanas de incubación con los diferentes detergentes, coincidiendo con el máximo grado de transparencia a la inspección macroscópica de los anillos evaluados.

	<b>Triton X-100</b>	<b>SDS</b>	<b>SDC</b>
<b>Experimento (i)</b>			
grupo A	-	-	-
grupo B	0.2%	0.25%	-
grupo C	2%	0.25%	-
grupo D	-	-	4%
grupo E	-	2%	-

<b>Experimento (ii)</b>			
grupo A	-	-	-
grupo F	-	0.5%	-
grupo G	-	1%	-
grupo E	-	2%	-
grupo H	-	4%	-
Tabla 2: Concentración (%) de los diferentes detergentes utilizados en cada grupo experimental.			

En la tabla 2, el experimento ii hace referencia a la optimización de la concentración de SDS, aspecto que se detalla en la sección 4.2 del apartado de resultados.

### **3.4 Evaluación de la descelularización mediante tinción fluorescente con DAPI**

Una vez a la semana se evaluó la descelularización mediante tinción fluorescente con DAPI. Para ello se realizaron cortes transversales de 5mm de grosor de los anillos traqueales y se incluyeron en OCT cortándose en un criostato (Tissue-Tek, Pennsylvania, EE.UU). El excedente de muestras se almacenó a -80°C para posteriormente realizar extracciones de ADN. EL OCT se eliminó de los cortes mediante inmersión en agua destilada y se montaron con medio de cultivo suplementado con DAPI para su análisis mediante microscopía de fluorescencia (Vector laboratorios, Burlingame, EE.UU). Se consideró que la descelularización había sido completa cuando no se observaron núcleos intactos en los anillos cartilagosos de los órganos evaluados.

### **3.5 Extracción y valoración de ADN**

De las muestras almacenadas se extrajo, de la porción más central del anillo traqueal para que las extracciones fueran homogéneas, la muestra de ADN. Antes de empezar se pesaron los tejidos en la balanza de precisión para conocer su peso y poder extrapolarlo con el resultado de la extracción. La extracción de ADN se realizó con el

kit para ADN QIAamp Mini (Quiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el siguiente protocolo:

- Fragmentación del tejido con bisturí para maximizar el efecto de la lisis del mismo que se logra gracias a la adición de 180µl de tampón de lisis celular (ATL) junto con 20µl de proteinasa K e incubando la suspensión en un baño (Thermomixer comfort, Hamburgo, Alemania) a 56°C durante toda la noche.
- La suspensión resultante se depuró, junto con distintos tampones proporcionados por el kit, a través del filtro gracias a la fuerza proporcionada por una centrífuga microfuga (Beckman Coulter, California, EEUU). De esta forma se aísla el ADN en el filtro que se diluyó en 100µl de agua Milli-Q.
- La cantidad de ADN extraído de la muestra se cuantificó con el microespectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Rockland, EE.UU).

### **3.6 Procesamiento histológico de los especímenes**

Una vez concluido el proceso experimental, las muestras se fijaron en formaldehído al 4% durante un mínimo de 2 horas e incluidas en parafina para su análisis histológico. Se realizaron cortes seriados de 5µm de espesor que se desparafinaron mediante tres pases de 3 minutos cada uno en xilol e hidrataron mediante pases sucesivos en alcohol del 100, 70 y 50% para finalmente pasarlas por agua. Las muestras se tiñeron mediante hematoxilina-eosina (H-E), tricrómico de Mason, orceína y ácido periódico de Schiff (PAS) acorde a los protocolos que se detallan a continuación.

Hematoxilina-Eosina

- Desparafinar e hidratar
- Teñir en hematoxilina 45 segundos

- Eliminar el exceso de colorante sumergiendo en agua
- Teñir en eosina durante 1 minuto
- Realizar un baño rápido en agua
- Deshidratar las muestras con sucesivos baños con alcohol de concentración creciente y xiloles

#### Tricómico de Mason

- Desparafinar e hidratar
- Teñir en hematoxilina durante 45 segundos
- Eliminar el exceso de colorante sumergiendo en agua
- Sumergir en Fucsina ponceau durante 60 segundos
- Ácido acético 1% durante 5 segundos
- Teñir en orange G + ácido fosfomolhidrico durante 2 minutos
- Ácido acético 1% durante 5 segundos
- Azul de anhilina durante 2 minutos
- Sumergir la muestra en agua
- Baño en ácido acético 1% durante 20 segundos
- Deshidratar las muestras con sucesivos baños con alcohol de concentración creciente y xiloles

#### PAS

- Desparafinar e hidratar
- Oxidar con ácido peryódico al 1% durante 15 minutos
- Aclarar con agua durante 10 minutos
- Secar bien los portaobjetos con papel
- Sumergir en reactivo de Schiff durante 30 minutos en cubeta tapada con papel de aluminio (evitando su exposición a la luz)
- Aclarar con agua

- Deshidratar las muestras con sucesivos baños con alcohol de concentración creciente y xiloles

#### Orceína

- Desparafinar e hidratar
- Sumergir en orceína durante 1 hora y 30 minutos
- Lavar brevemente con un baño de agua
- Sumergir en picrocarmín de indigo rápidamente
- Lavar en EtOH 100% para eliminar el exceso de orceína
- Deshidratar las muestras con sucesivos baños con alcohol de concentración creciente y xiloles.

Finalmente, todas las muestras se protegieron mediante un cubreobjetos utilizando como medio de montaje Entellan® (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### **3.7 Análisis morfométrico de las muestras**

Una vez realizadas todas las tinciones se tomaron las fotos con el microscopio Leica DMD108. Se obtuvo una foto panorámica de la muestra traqueal, así como varias fotos a 10x, 20x o 40x en las que se vieran todas las capas, desde el epitelio hasta el pericondrio, y un par de fotos en 20x en el centro del cartílago traqueal para valorar las células condrales. Las mediciones sobre las imágenes se realizaron con el programa ImageJ. La calibración se realizó utilizando la barra de escala generada al tomar las imágenes con el microscopio (Figura 2).

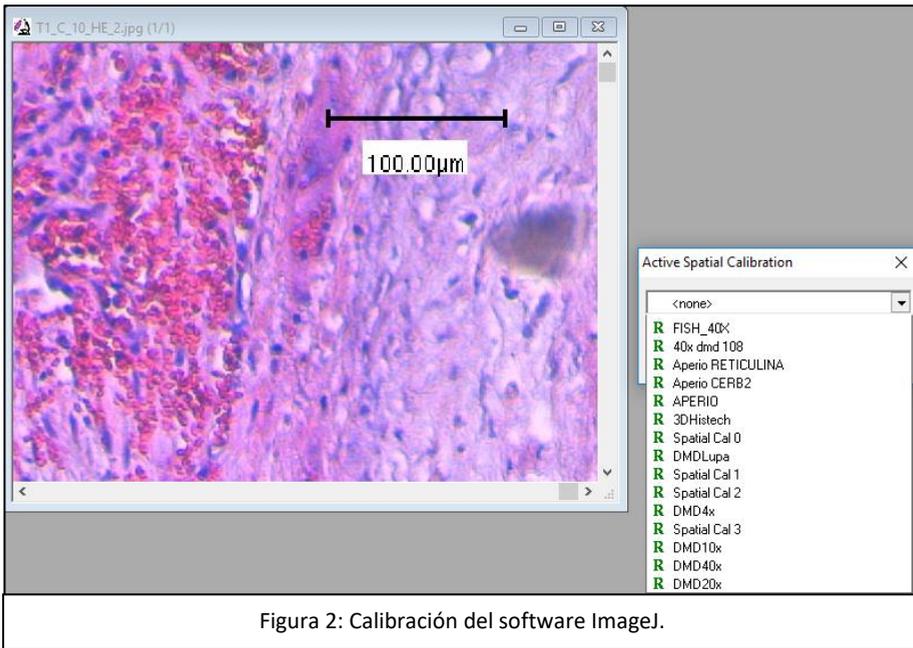


Figura 2: Calibración del software ImageJ.

Para medir una distancia de una zona en la imagen se establecieron las medidas longitud (*length*) y distancia promedio (*average distance*). Se dibujó una línea entre dos puntos para así medir la distancia entre ellos y así mismo al trazar una segunda línea nos indica, no sólo la distancia entre puntos, sino la distancia promedio entre las dos líneas (Figura 3).

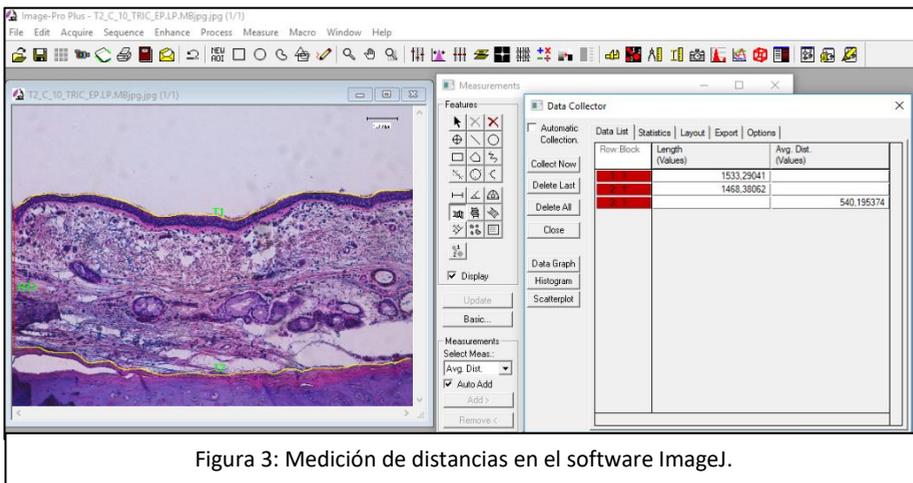


Figura 3: Medición de distancias en el software ImageJ.

De esta manera se obtuvieron los valores para el grosor del epitelio, lámina propia, submucosa, membrana basal y cartílago (Figuras 4,5 y 6).

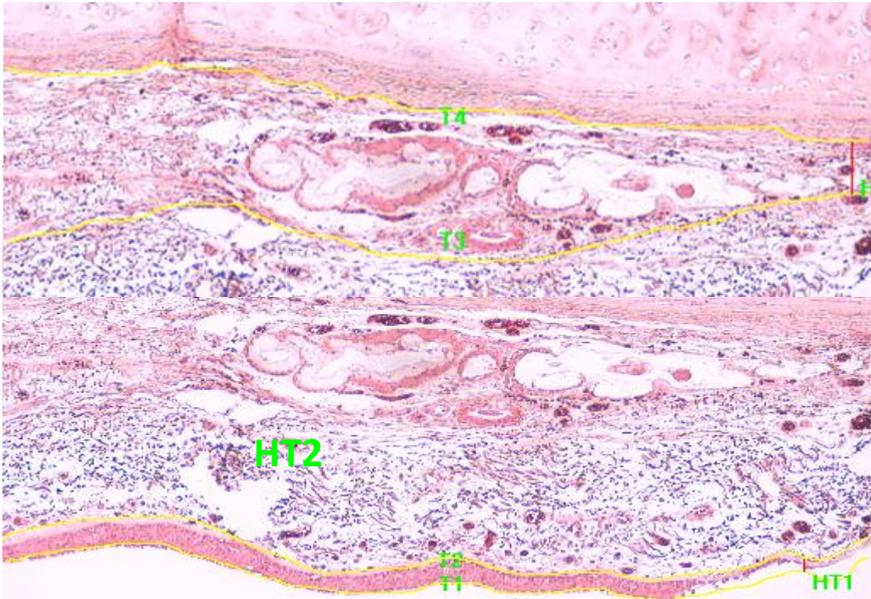


Figura 4: Medición de longitud y distancia promedio entre las capas de la pared.

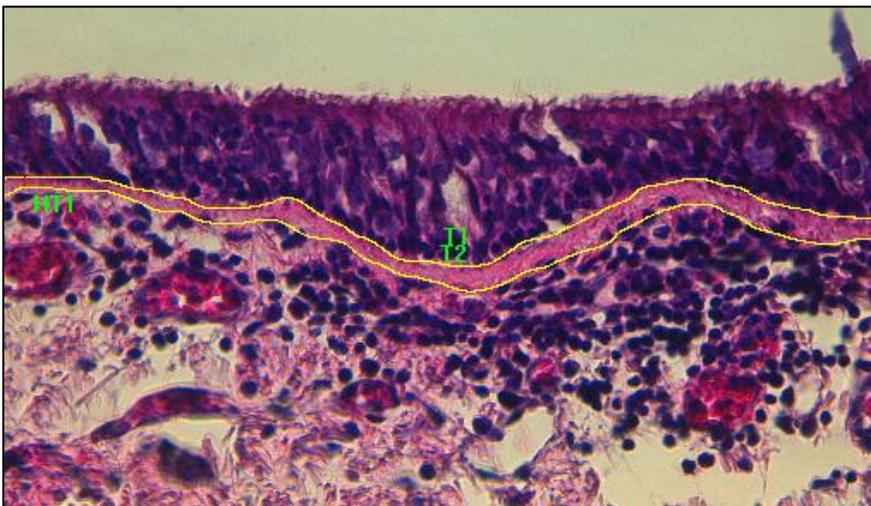


Figura 5: Medición de las magnitudes promedio de la membrana basal.



Figura 6: Medición de longitud y distancia promedio del cartílago.

El recuento de condrocitos en el interior de la matriz cartilaginosa se realizó manualmente, seleccionando uno a uno todos los condrocitos en los que se veía claramente la presencia de un núcleo en las fotos obtenidas a 20x (Figura 7).

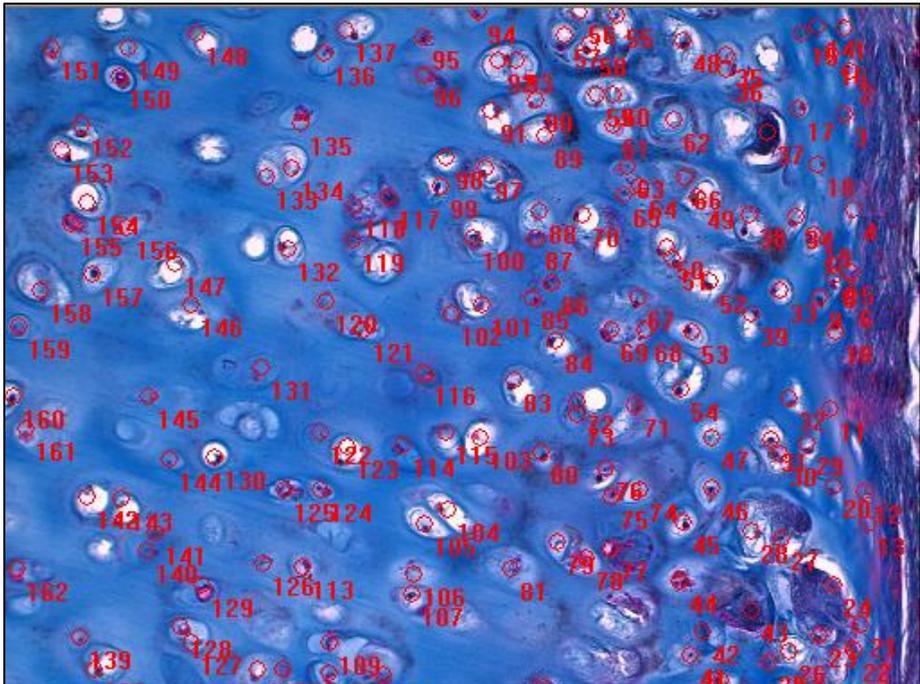


Figura 7: Recuento manual de condrocitos.

La medición del contenido en fibras colágenas y elásticas se estimó con base al porcentaje del área ocupada por dichas fibras en cada una de las tinciones específicas utilizadas respecto del área total. Para ello se delimitó y midió la zona en donde se realizaría la medición de fibras ya que este valor es necesario para poder hablar de la proporción de cada elemento por área (Figura 8).

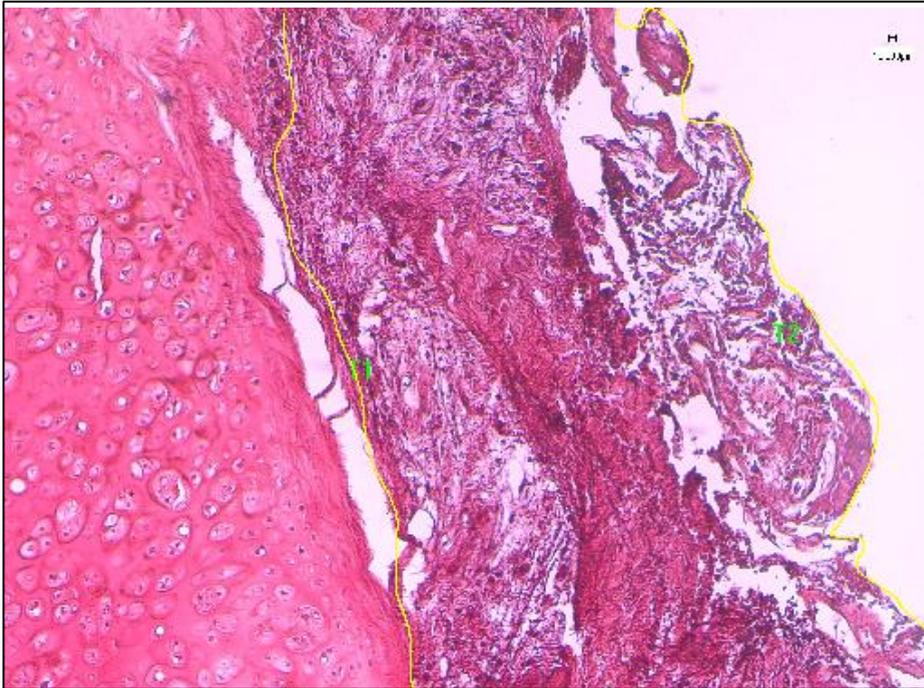


Figura 8: Área delimitada para el recuento de fibras colágenas y elásticas.

Seguidamente se asignó un color a cada elemento a medir y manualmente se seleccionan las estructuras de interés y finalmente se calculó el porcentaje de ocupación de cada tipo de fibra (Figura 9).

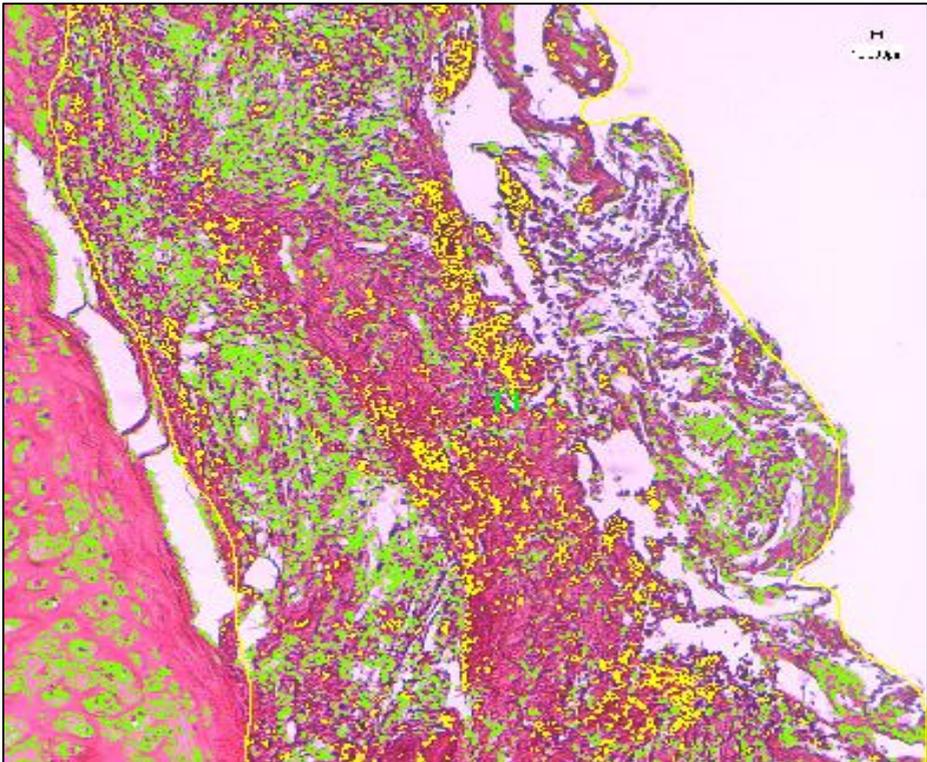


Figura 9: Recuento de fibras colágenas y elásticas.

### **3.8 Aislamiento y cultivo de células epiteliales**

Todas las manipulaciones con cultivos celulares se realizaron en una sala de cultivos usando una campana estéril de flujo laminar (Mars Safety Class 2, ScanLaf, Lyngø, Dinamarca).

Las células epiteliales se aislaron a partir de curetaje nasal de voluntarios sanos revisados por otras patologías en el Hospital General de Valencia, a los que se les solicitó consentimiento informado según figuraba en los procedimientos que fueron aprobados por el comité ético de Consorcio del Hospital General de Valencia. Las muestras se obtuvieron introduciendo una cureta y rascando superficialmente el cornete nasal medio. Inmediatamente, la biopsia se resuspendió en un microtubo

Eppendorf con 1ml de medio de cultivo de crecimiento de epitelio bronquial (BEGM, Life Technologies, Madrid, España) y se centrifugó 5 minutos a 1500rpm para separar las células de la capa mucosa. El *pellet* se resuspendió en 2ml de medio BEGM, intentando disgregar las aglomeraciones, y se sembró en 2 pocillos de una placa de 12 pocillos previamente colagenados. Se les cambió el medio cada dos o tres días hasta que llegaron a una confluencia del 90% aproximadamente.

### **3.9 Aislamiento y cultivo de condrocitos**

Los condrocitos se extrajeron del cartílago articular de la rodilla de conejo acorde a procedimientos aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universitat de València. Para obtener estos condrocitos se sacrificó a los conejos donantes con una inyección letal en la vena auricular que contenía una sobredosis de anestesia (500mg/iv de tiopental sódico tiobarbital). Se separó el cartílago, se seccionó del hueso subcondral, se cortó en cubos finos y se lavó con medio de lavado. A continuación, los cubos de cartílago se sometieron a sucesivas digestiones con varias enzimas. En primer lugar, el cartílago se incubó con 0.5 mg/ml de hialuronidasa durante 30 minutos a 37°C en el baño termostatzado con agitador. Después se retiró la hialuronidasa, se añadió 1 mg/ml de pronasa y se incubó 1 hora a 37°C en el baño termostatzado con agitador. Posteriormente, los trozos de cartílago se lavaron con el medio de lavado, se retiró el medio y se continuó con la digestión añadiendo 0.5mg/ml de colagenasa-IA. Se incubó *overnight* en el baño termostatzado con agitador a 37°C y la suspensión resultante se filtró a través de un filtro de nylon con poros de 70µm de diámetro para eliminar los restos de tejidos. Las células se centrifugaron con el medio básico de condrocitos y el *pellet* resultante se resuspendió en medio de cultivo compuesto por medio Eagle modificado por Dulbecco 1X (DMEM, Life technologies, Madrid, España) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de piruvato sódico 100mM, 1% de anfotericina B y 1% de L-glutamina (EuroClone, Milán, Italia), obteniendo finalmente las células aisladas y preparadas para el cultivo.

### **3.10 Criogenización de las tráqueas**

Los anillos traqueales descelularizados se sumergieron en una solución al 20% de DMSO en SBF y se congelaron mediante enfriamiento a 1°C/minuto utilizando un contenedor Nalgene® Mr. Frosty (Sigma-Aldrich, Madrid, España) conteniendo isopropanol a -80°C durante 24 horas. Posteriormente las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su posterior análisis.

### **3.11 Estudio de biocompatibilidad *in vitro* de las tráqueas descelularizadas**

Evaluamos la biocompatibilidad de las tráqueas mediante inoculación de condrocitos en los anillos cartilaginosos descelularizados, así como mediante cultivo de células epiteliales de vía aérea sobre su superficie luminal.

Los condrocitos se inocularon en la pared traqueal utilizando una jeringuilla de insulina de dos formas: por un lado, se realizaron incisiones de poca profundidad desde la cara externa hacia la luz traqueal y, por otra, se realizaron incisiones profundas desde los extremos de la tráquea hacia en centro en sentido longitudinal (Figura 10). Posteriormente las tráqueas fueron introducidas en placas de Petri de seis pocillos, en las que se cultivaron en medio de cultivo específico. Por otra parte, algunos segmentos de las tráqueas se sembraron 2,5 millones de células epiteliales en 200µl de medio de cultivo y se dejaron en incubación durante 24 horas a 37°C. Pasado este tiempo se sumergieron los segmentos traqueales en medio de cultivo específico.

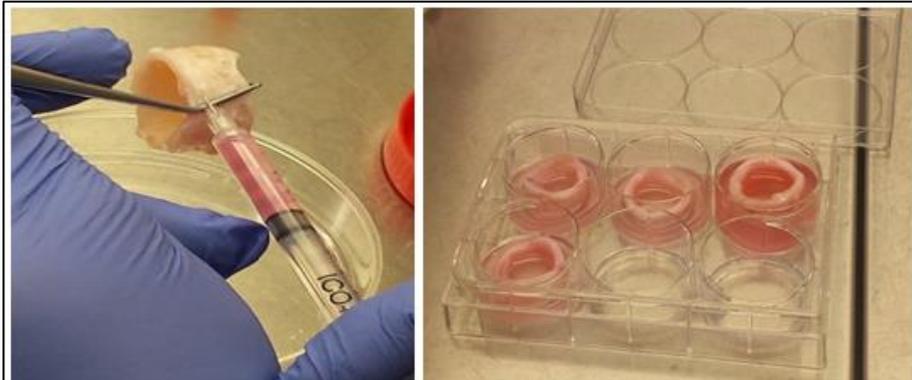


Figura 10: Inoculación de las tráqueas para la recelularización.

### **3.12 Determinación de parámetros biomecánicos de tráqueas descelularizadas**

Los ensayos de compresión radial fueron realizados en un sistema UTS de sobremesa con control por desplazamiento Microtest (Microtest, Madrid, Spain), equipado con una célula de carga de 15N. El software utilizado para el control del test y la recolección de datos fue Microtest SCM3000 95 (Microtest, Madrid, Spain), siendo la resolución de la fuerza medida de 0,001N, la de la posición de 0,001mm, y la del tiempo 0,1s. De cada test se obtuvieron datos de fuerza en Newtons, de posición (mm) y de tiempo (s). Los datos fueron grabados cada 0,5s y posteriormente exportados a una hoja de cálculo (Microsoft Excel para Mac, Versión 16.23, Redmond, WA, EE.UU) para su análisis.

Para la medida, se colocó la tráquea con la *pars membranosa* orientada hacia el plato de compresión inferior y apoyando en él (Johnson et al., 2016; Butler et al., 2017). La velocidad de desplazamiento fue constante, de 5mm/min, sin que la muestra estuviese inicialmente en contacto con el plato superior. El test se inició cuando la muestra contactó con el plato superior, y se detuvo de forma automática cuando se alcanzó la fuerza de compresión máxima (14N), estado en el que el 100% de la luz quedaba colapsada (Jones et al., 2014; Safshekan et al., 2017).

Previamente se midió, en 3 puntos al azar, la longitud y el espesor de las muestras con un calibrador de Vernier, tomándose como dato de cada una de las medidas la media aritmética de los valores obtenidos. El diámetro anteroposterior ( $D_o$ ) lo calculó la UTS, determinando su posición en el punto de contacto con la tráquea, si bien el que nos interesa es el interno ( $D_i$ ), que es el que va a traducir el calibre de tráquea disponible para el intercambio gaseoso. Este lo calculamos restando a ese diámetro externo dos veces el espesor de la tráquea.

El diámetro en cada instante se obtuvo calculando el diámetro interno inicial menos el desplazamiento producido. Al referir este diámetro en cada punto al diámetro interno inicial porcentualmente obtenemos el porcentaje de oclusión de la tráquea en cada momento:

$$Oclusión = \frac{D_n}{D_i} 100$$

Donde  $D_n$  es el diámetro interno en cada uno de los puntos y nos devuelve un resultado que es el porcentaje de tráquea que queda permeable en cada momento. Se tomaron los valores en el 50% de oclusión (Johnson et al., 2016; Butler et al., 2017; De Wolf et al., 2017).

La fuerza tolerada a la longitud de la pieza se calculó en N/mm la fuerza por unidad de longitud para cada fuerza ejercida.

$$f = \frac{F}{L}$$

Donde F se mide en Newtons, L (longitud de la muestra) en milímetros, y  $f$  en Newton/milímetro ( $N/mm$ ).





## **4. RESULTADOS**

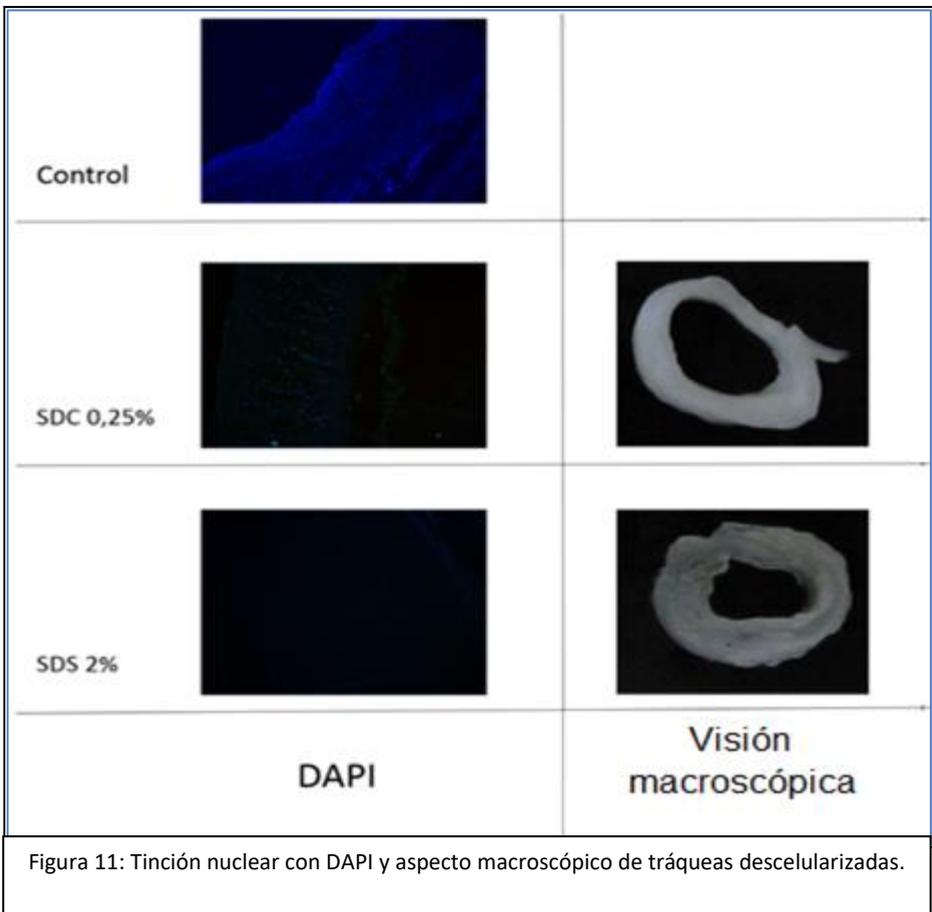




#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 Efecto de diferentes combinaciones de detergentes para la descelularización de tráqueas porcinas

Las tráqueas porcinas se cortaron en anillos y se incubaron en ausencia o presencia de diferentes detergentes durante 4 semanas a temperatura ambiente. Los resultados ilustrados a continuación son representativos de 3 animales diferentes. Las fotografías muestran, a la derecha el aspecto macroscópico del tejido traqueal descelularizado y a la izquierda con tinción de DAPI (Figura 11).



El ritmo de descelularización de las diferentes capas componentes de las tráqueas incluida en este estudio resultó bastante divergente. En la primera semana de descelularización todas las capas de las tráqueas estudiadas excepto la cartilaginosa habían perdido los núcleos celulares.

La eliminación de los mismos en la capa cartilaginosa resultó más compleja que en el resto de capas, no se consiguió la descelularización total en ninguno de los grupos experimentales.

Una vez determinado el tiempo óptimo de descelularización, las muestras se fijaron, procesaron histológicamente y se tiñeron con hematoxilina eosina (Figura 12), tricrómico de Masson (Figura 13), PAS (Figura 14) y orceína (Figura 15).

El examen histológico de las tráqueas del grupo control mostró una organización estructural similar a la estructura traqueal humana. La capa de mucosa consistía en un epitelio respiratorio típico con predominio de células ciliadas y caliciformes y una lámina propia subyacente sobre la capa de submucosa compuesta de tejido conectivo (Figura 12, panel A). No se encontró estructura física que delimitara la capa submucosa en la que se encontraban abundantes glándulas mucoserosas (Figura 12, panel B). La tinción tricrómico de Masson reveló la presencia de un tejido conectivo laxo con abundantes células estromales y característicos haces delgados de fibras de colágeno, que eran más abundantes en la submucosa que en la lámina propia (Figura 13, panel A-B).

La capa cartilaginosa estaba compuesta por un cartílago hialino típico rodeado por un pericondrio bien organizado (Figura 12, panel B-C). También se observó la presencia de glicosaminoglicanos (GAG) en toda la matriz conectiva de la pared traqueal, definiendo áreas cromáticas características en la capa cartilaginosa, como lo evidencia la tinción PAS, además de resaltar la ubicación de las células caliciformes y otras células secretoras de moco (Figura 14, panel A-C).

Todas las combinaciones de los detergentes ensayados eliminaron completamente las células de las capas mucosa y submucosa (Figura 12, paneles D, E, G, H, J, K, M, N). En cuanto a la capa cartilaginosa, los detergentes que lograron una mayor remoción de condrocitos fueron los grupos C (2% Triton X100 + 0,25% SDS) (Figura 12, panel I) y E (18% SDS) (Figura 12, panel O), mientras que en tráqueas de los grupos B (0,2% Triton X 100 + 0,25% SDS) y D (4% SDC), el grado de descelularización de la capa condral se redujo (Figura 12, panel F y L).

En general, todas las tráqueas descelularizadas experimentaron una pérdida significativa de colágeno, como lo demuestra la tinción tricrómico de Masson (Figura 13, paneles D-O). Esta pérdida de contenido de colágeno fue particularmente relevante en las tráqueas descelularizadas de los grupos experimentales C (2% Triton X-100 + 0.25% SDS) (Figura 13, paneles GI) y D (4% SDC) (Figura 18, paneles KL), mientras que fue mínimo en el grupo B (0,2% Triton X-100 + 0,25 SDS) (Figura 13, paneles DF) e intermedio en el grupo E (2% SDS) (Figura 13, paneles M-O). Se observó una tendencia similar para el contenido de GAG, como se resume en la figura 14.

A continuación, se midió el contenido de ADN en todos los grupos incluidos en el experimento (i). El contenido de ADN en el grupo de control A fue de  $5,21 \pm 0,252 \mu\text{g} / \text{mg}$  de tejido, que es un valor estadísticamente significativo superior al contenido de ADN en los grupos experimentales C ( $0,18 \pm 0,021 \mu\text{g} / \text{mg}$ ), D ( $0,22 \pm 0,003 \mu\text{g} / \text{mg}$ ) y E ( $0,85 \pm 0,065 \mu\text{g} / \text{mg}$ ). El contenido de ADN en las tráqueas descelularizadas del grupo B fue de  $3,1 \pm 0,51 \mu\text{g} / \text{mg}$  de tejido, lo que supone una diferencia estadísticamente significativa con respecto al resto de los grupos experimentales, excepto al control.

Finalmente, se utilizó tinción con orceína para estudiar los efectos de la descelularización sobre la composición de las fibras elásticas de las tráqueas. En este estudio solo se incluyeron las tráqueas del grupo A (control) y las tráqueas descelularizadas de los grupos D (4% SDC) y E (2% SDS). En las tráqueas de control

(grupo A), las fibras elásticas fueron abundantes en todas las capas traqueales, excepto en la matriz cartilaginosa (Figura 15, panel A). En las capas, mucosa y submucosa, las fibras elásticas mostraron un tamaño regular y una disposición precisa. Justo debajo del epitelio de la capa de mucosa las fibras elásticas eran delgadas y con una disposición predominantemente concéntrica con respecto a la luz, mientras que en la profundidad de la mucosa y en la capa de submucosa se observó una alternancia de disposiciones circulares y longitudinales de haces de fibras elásticas con respecto a la luz (Figura 4, panel B). En la capa adventicia también fue relevante el contenido de fibras elásticas, con fibras más delgadas que en la capa de mucosa y submucosa, y sin una organización estricta (Figura 15, panel C). El contenido y la organización de las fibras elásticas se conservaron en ambos grupos experimentales D y E, sin diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 15, paneles D-I).

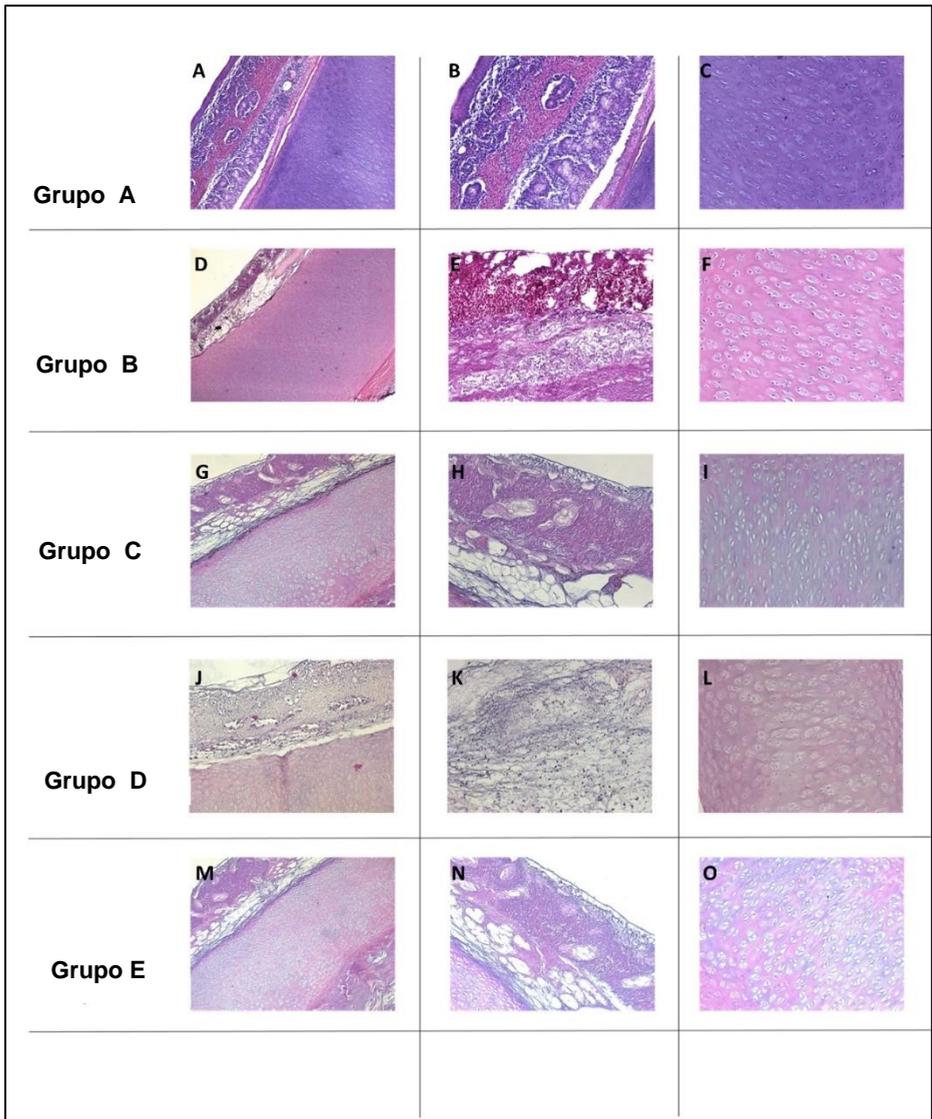


Figura 12: Tinción con hematoxilina eosina de las tráqueas porcinas descelularizadas; en la primera columna del panel aspectos panorámicos, en la segunda los detalles de la submucosa y en la tercera se muestra el aspecto del cartílago.

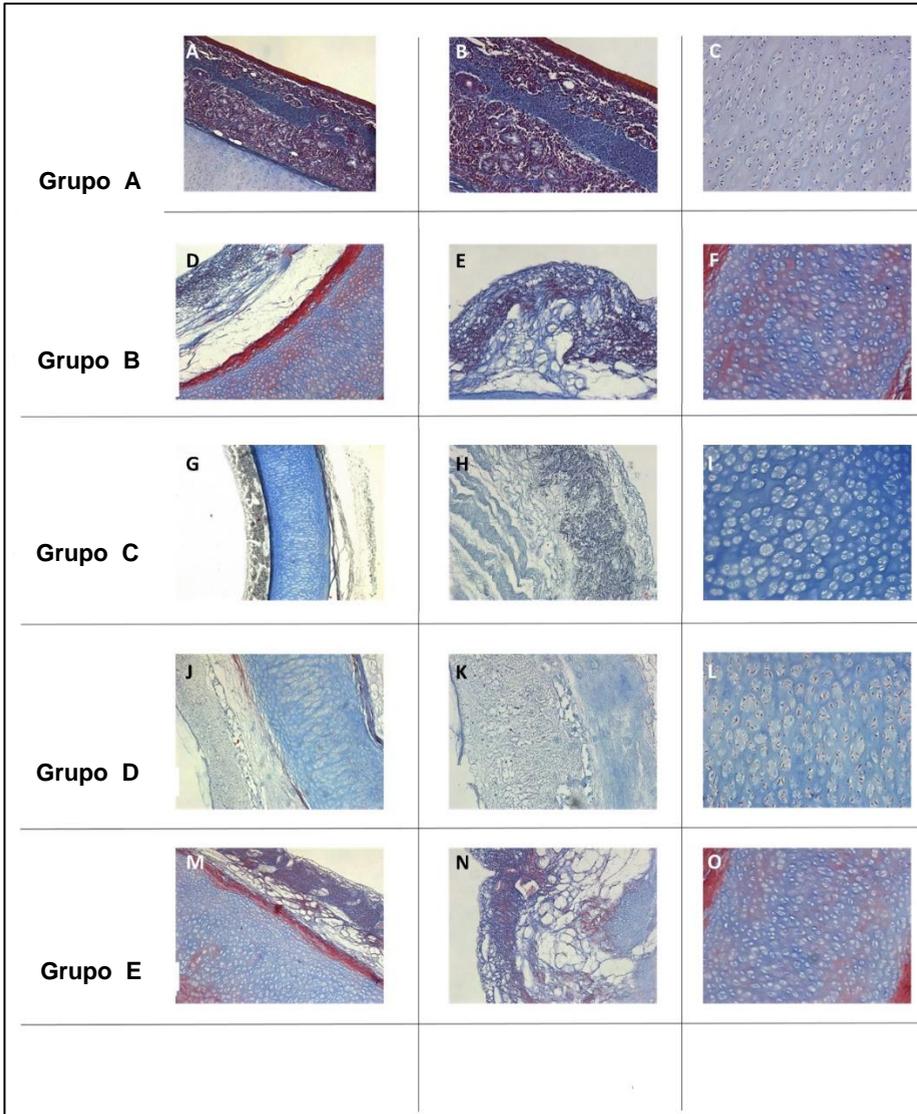


Figura 13: Tinción tricrómico de Masson de tráqueas porcinas descélularizadas; en la primera columna del panel aspectos panorámicos, en la segunda los detalles de la submucosa y en la tercera se muestra el aspecto del cartilago.

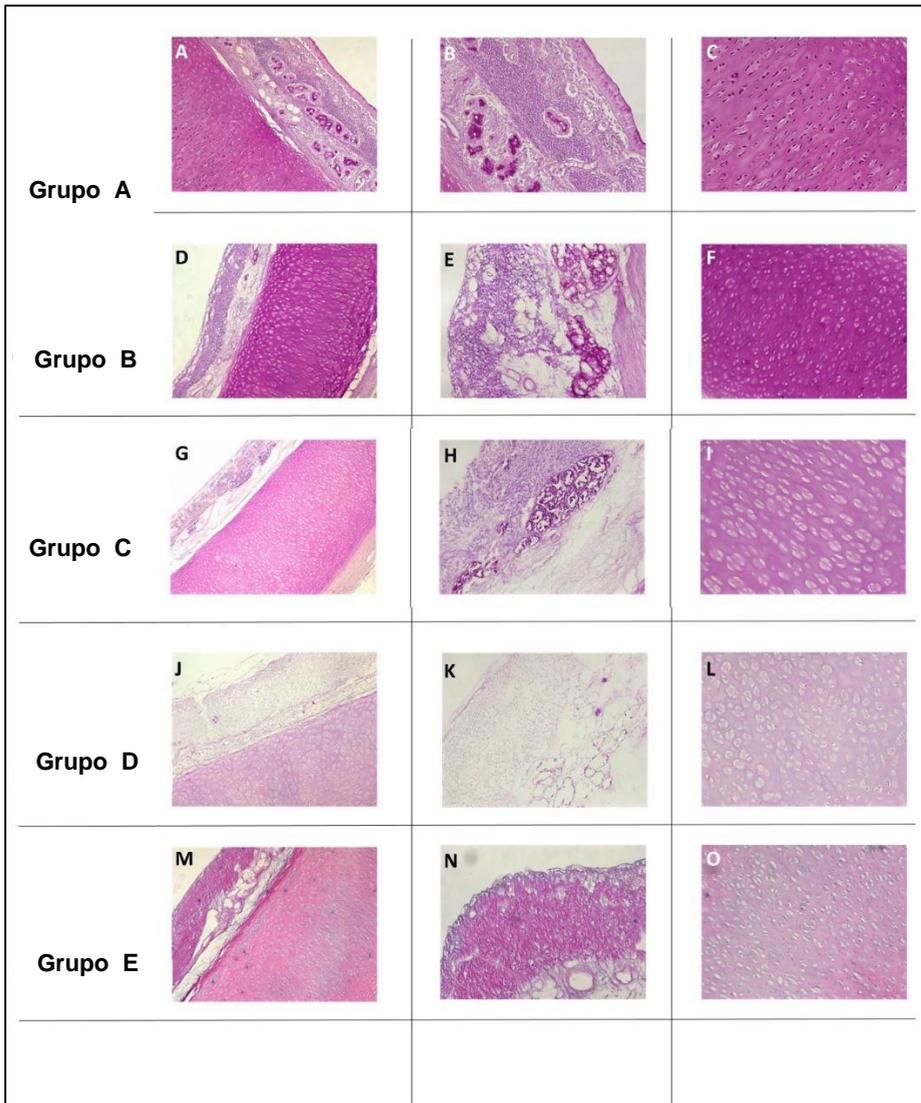
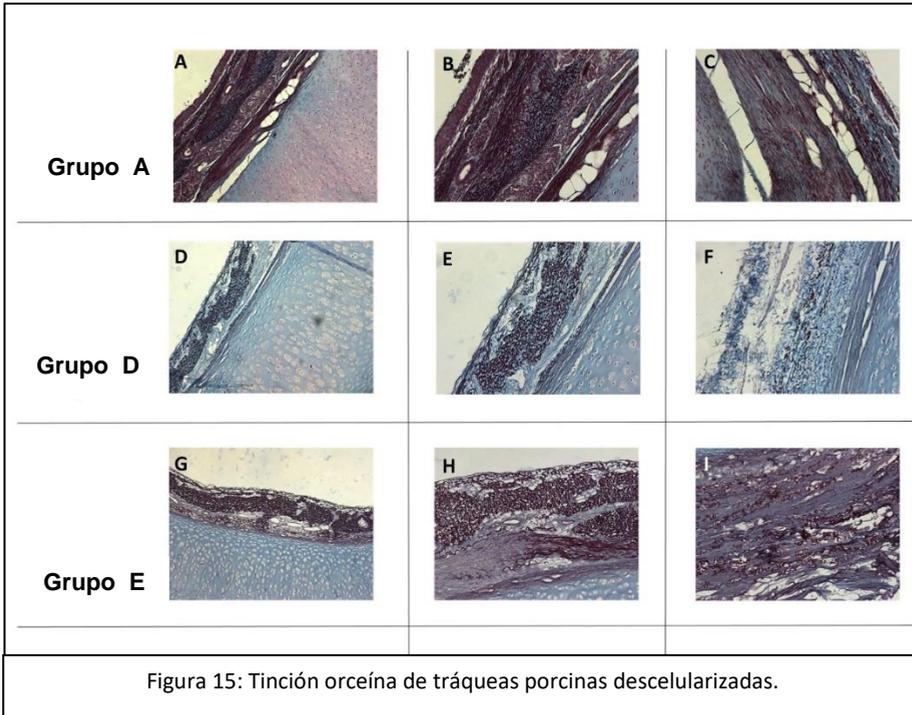


Figura 14: Tinción de PAS de tráqueas porcinas descelularizadas; en la primera columna del panel aspectos panorámicos, en la segunda los detalles de la submucosa y en la tercera se muestra el aspecto del cartílago.



#### 4.2 Optimización de la concentración de SDS

Entre todos los detergentes estudiados en el experimento (i), el SDS al 2% (grupo E) mostró la mayor capacidad de eliminación de condrocitos con el menor impacto en la matriz extracelular. Por esta razón, se utilizó una curva de concentración de SDS para determinar el porcentaje óptimo de dicho agente iónico, y en el experimento (ii) (Tabla 2) se ensayó una concentración de SDS entre 0,5 y 4%. Durante el proceso de descelularización, se tomaron muestras de tejido en las semanas 2 y 4, y se midió el ADN por espectrofotometría. Los resultados se representan en la figura 16, panel A. Sólo el grupo E (SDS al 2%) fue eficaz en el aclaramiento del ADN tisular en la semana 2, cuando la eliminación del ADN fue máxima. La tasa de eliminación de ADN fue más

lenta en todos los demás grupos experimentales y ninguno de ellos logró niveles satisfactorios de eliminación.

A continuación, se llevó a cabo un estudio morfométrico para evaluar la eficacia de SDS para eliminar condrocitos de los anillos de cartílago. Como se describe en la sección de métodos, las tráqueas descelularizadas se tiñeron con hematoxilina eosina y se realizó el recuento del número de lagunas completamente descelularizadas, parcialmente descelularizadas y las no descelularizadas en las áreas de interés. Los resultados obtenidos se representan en la figura 16, panel B. Como se muestra, SDS al 2% (grupo E) fue la concentración de detergente que eliminó de manera más eficiente las células de las lagunas, lo cual se evidenció debido al número limitado de condrocitos intactos detectados.

Se realizó un análisis morfométrico de las tráqueas descelularizadas para estudiar los efectos de las diferentes concentraciones de SDS sobre la composición de la matriz extracelular. Las muestras se tiñeron con tricrómico de Masson y con orceína, y se calculó el porcentaje respectivo de las áreas azul (fibras de colágeno) y roja (fibras elásticas). La imagen representativa de la selección de la máscara de color se muestra en la figura 17, panel A. Como se muestra en la Figura 17, panel B, ninguna de las concentraciones probadas afectó el contenido de fibras elásticas. En cuanto a las fibras de colágeno, el impacto de todas las concentraciones de SDS fue mínimo, excepto para el grupo E (SDS al 2%), que provocó una pérdida de casi el 22% del área teñida de azul.

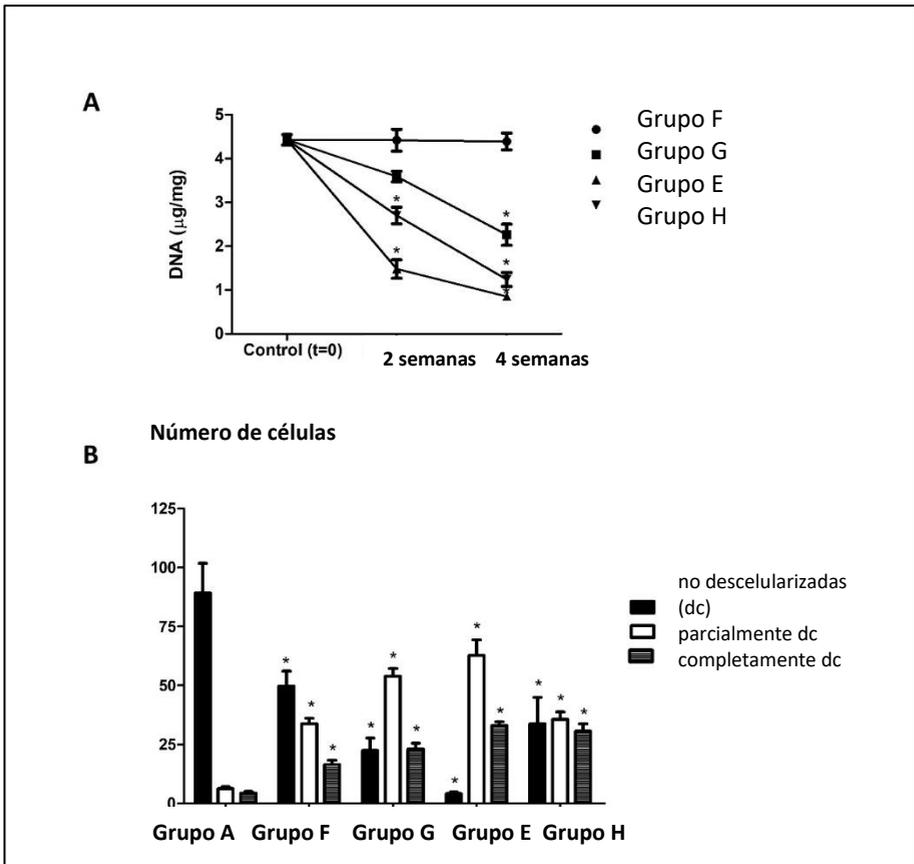
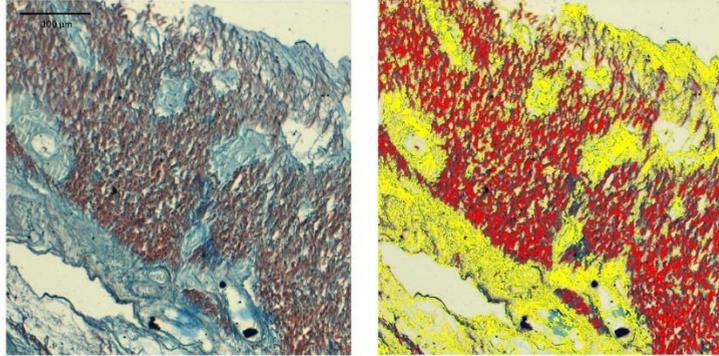


Figura 16. Estimación de cuantificación de ADN y eliminación de condrocitos de tráqueas porcinas descelularizadas con SDS: (Panel A) Grupo A control, F (0,5% SDS), G (1% SDS), E (2% SDS) y H (4% SDS), se estimó el contenido de ADN a las 0 (control), 2 y 4 semanas. (Panel B) El tejido se tiñó con tricrómico de Masson y se estimó el número de condrocitos intactos, degradados y lagunas vacías. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE de  $n = 3$  animales diferentes. \*  $p < 0,05$  en comparación con el grupo de control.

A



B

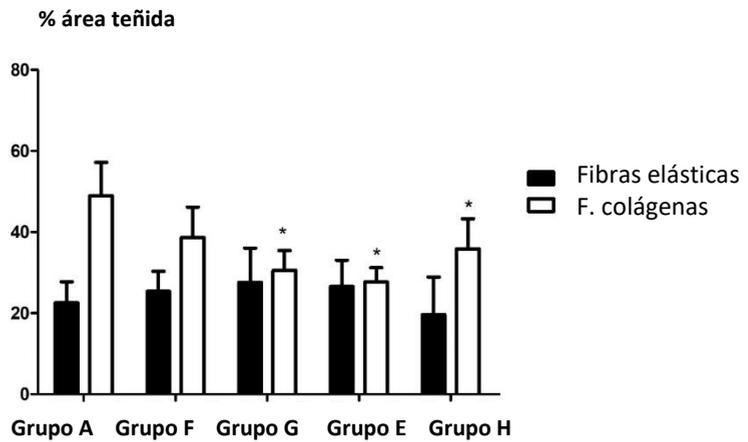


Figura 17. Evaluación morfométrica de colágeno y fibras elásticas en tráqueas porcinas descelularizadas con SDS durante hasta 4 semanas: A (control), F (0,5% SDS), G (1% SDS), E (2% SDS) y H (4% SDS). (Panel A) El porcentaje del área ocupada por fibras de colágeno (marcadas en amarillo) y fibras elásticas, marcadas en rojo), se estimó utilizando el software ImageJ. (Panel B) Los resultados obtenidos se representan como media  $\pm$  DE. Se utilizaron n=3 animales diferentes. \* p < 0,05 en comparación con el grupo de control (grupo A).

### **4.3 Evaluación de la biocompatibilidad de las tráqueas descelularizadas**

A continuación, decidimos estudiar si las tráqueas descelularizadas eran capaces de promover el anidamiento celular *in vitro*, tanto para condrocitos como para células epiteliales.

Los anillos de las tráqueas porcinas se descelularizaron usando SDS al 2% durante 4 semanas. Los anillos se cultivaron y después de 24 h de incubación a 37°C, se retiró el medio y se inyectaron  $6 \times 10^6$  condrocitos en 1ml de medio de cultivo en la capa de cartílago (se muestra una imagen representativa en el panel A de la figura 18). En un segundo grupo de anillos, se sembraron  $3 \times 10^6$  células en 1ml de medio de cultivo celular Nbhe en la superficie luminal. Tanto las muestras inyectadas con condrocitos como las sembradas con NBHE se mantuvieron durante una semana en la incubadora. La tinción DAPI indicó la presencia de núcleos celulares tanto en la capa cartilaginosa (Figura 18, panel B) como en la superficie de la mucosa (Figura 18, panel C), en los que se pudieron apreciar mitosis celulares (Figura 18, panel D). Las imágenes mostradas son representativas de  $n = 3$  animales diferentes.

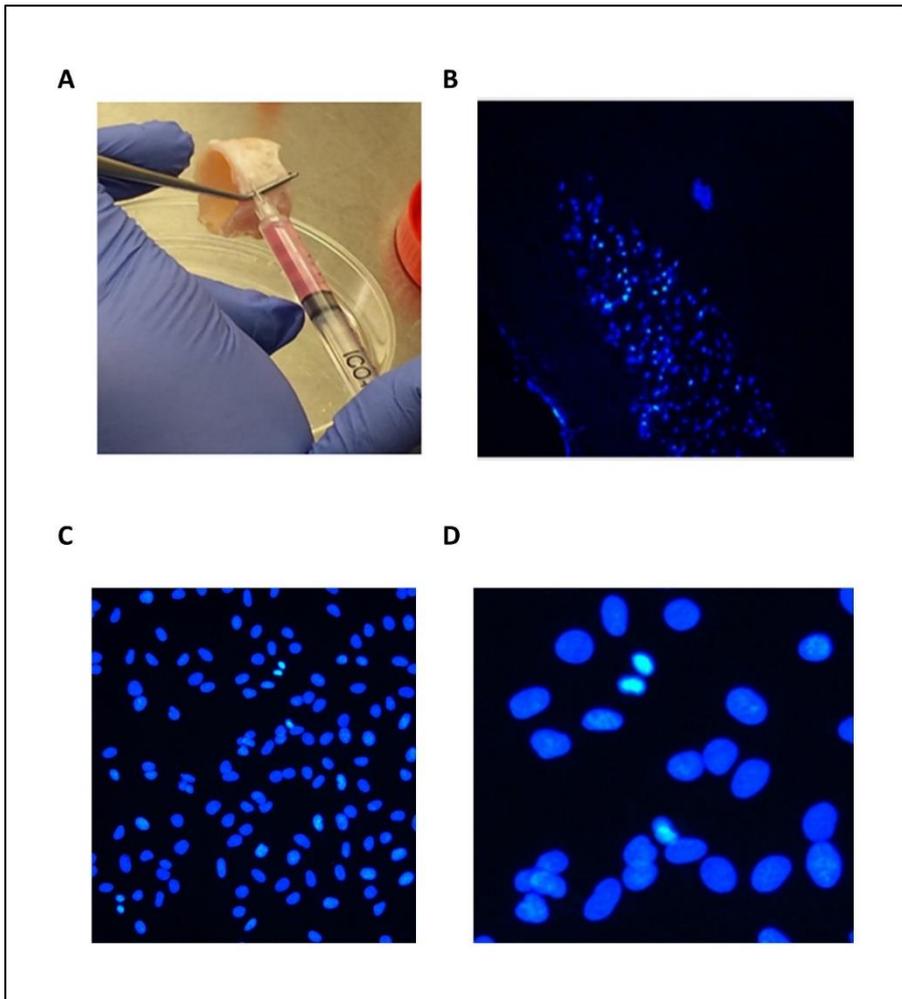


Figura 18: Biocompatibilidad de tráqueas porcinas descelularizadas: (A) inyección celular; imágenes de fluorescencia con DAPI (B) capa cartilaginosa con núcleos celulares, (C) superficie mucosa con núcleos celulares y (D) mitosis celular en la superficie traqueal.

#### **4.4 Criogenización de tráqueas descelularizadas**

Para comprobar el efecto de la criogenización los anillos traqueales se descelularizaron con SDS al 2% (grupo E), se expusieron a choque osmótico y luego se criopreservaron. El análisis MEB de las mismas frente al grupo control, no criopreservado, demostró una distribución normal de fibras conectivas en la mucosa, submucosa y capa cartilaginosa, donde se observaron fibras con aspecto y distribución similar al control, así como restos de células condrales en algunas de las lagunas (Figura 19, panel A). El estudio morfométrico de las tráqueas procesadas histológicamente no mostró diferencias en cuanto al contenido de colágeno y fibras elásticas en las tráqueas congeladas en comparación con las no congeladas (Figura 19, panel B).

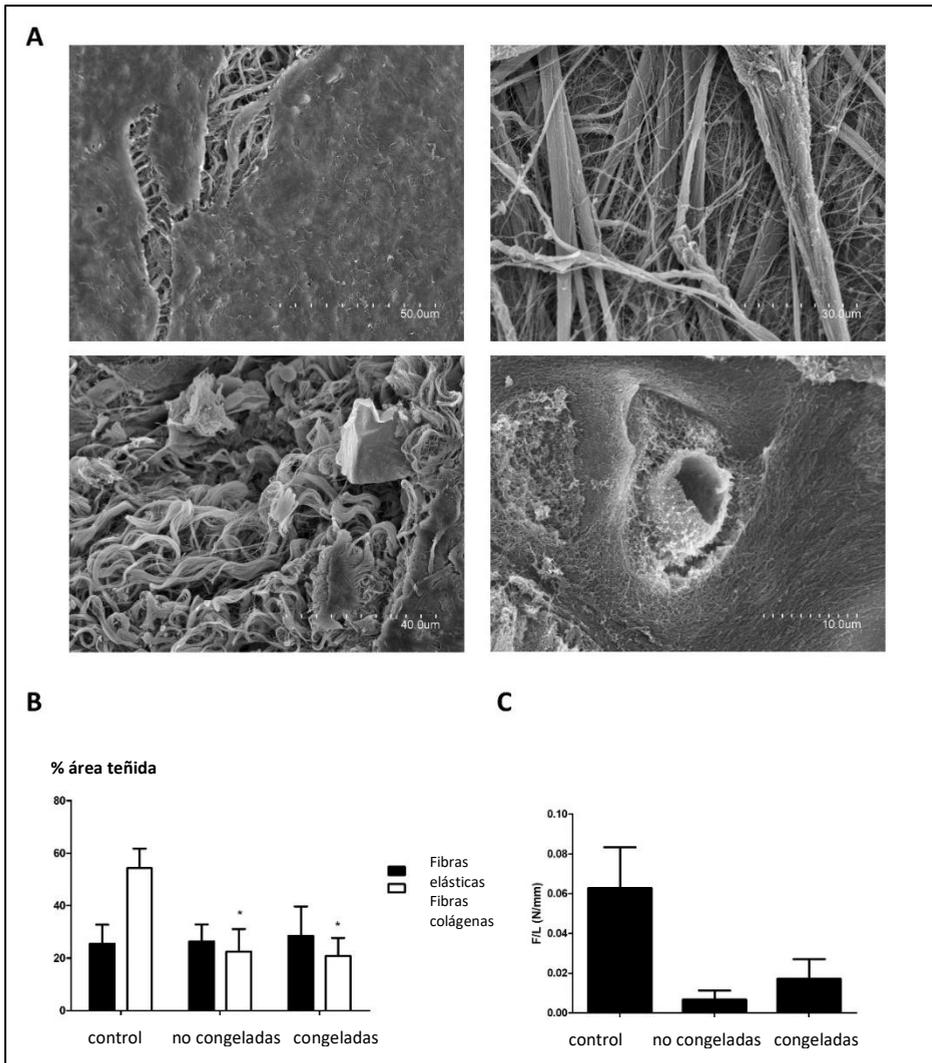


Figura 19: Propiedades histológicas y mecánicas de tráqueas criopreservadas a largo plazo: Control (tráqueas no descelularizadas), tráqueas descelularizadas no congeladas con SDS al 2% y tráqueas congeladas descelularizadas con SDS al 2% durante 4 semanas. (Panel A) Imágenes representativas de SEM de la superficie de la lámina basal (arriba a la izquierda), lámina propia (arriba a la derecha), submucosa (abajo a la izquierda) y capa de cartílago (abajo a la derecha). (Panel B) Análisis morfométrico de las fibras teñidas con orceína. (Panel C) Prueba de compresión de tráqueas descelularizadas. La fuerza tolerada, F (N) con respecto a la longitud de la muestra, L (mm) se representa (F/L). Los datos presentados son representativos de 3 animales diferentes. \* p <0,05 en comparación con grupo control

El análisis biomecánico de tráqueas descelularizadas con SDS al 2% (grupo E) de muestras frescas (no congeladas) y congeladas se llevó a cabo como se describe en la sección de métodos. Todas las tráqueas descelularizadas mostraron una disminución significativa en F/I (Fig. 19, panel C). Curiosamente, se observó un valor mayor, aunque no significativo de F/I en el grupo de tráqueas criopreservadas en comparación con el grupo experimental descelularizado no criopreservado.

#### **4.5 Evaluación del protocolo de descelularización en tráquea humana**

Una vez puesto a punto el protocolo de descelularización en tráquea porcina, nos planteamos evaluar su eficacia en vía aérea humana. Para ello se incluyeron anillos traqueales a partir de los especímenes enviados al Servicio de Anatomía Patológica de Hospital Clínico Universitario de Valencia para su análisis, procedentes de pacientes diagnosticados de estenosis traqueal subglótica entre el 2016 y 2018. Se incluyeron un total de 11 pacientes. Antes de proceder a la descelularización de los mismos, se caracterizaron microscópicamente los ejemplares. Los resultados obtenidos se representan en las figuras 20-28.

La tráquea 1 (Figura 20) no pudo ser incluida en el análisis estadístico ya que tenía el cartílago muy calcificado debido al proceso crónico del paciente y además perdió completamente su estructura al procesarla con detergente. En la tráquea 4 (Figura 23) se observaba una histología anormal por el tipo de corte realizado en quirófano, por lo que al someterla al detergente sufrió mayor desestructuración, sin embargo, pudieron hacerse mediciones en cartílago, fibras colágenas y elásticas. Las tráqueas 5 y 8 fueron excluidas del estudio dado que el material estaba muy desestructurado para su procesamiento como se puede apreciar en la Figura 28. La tráquea 7 fue igualmente excluida del estudio por carencias en la cadena de custodia que podían modificar significativamente los resultados.

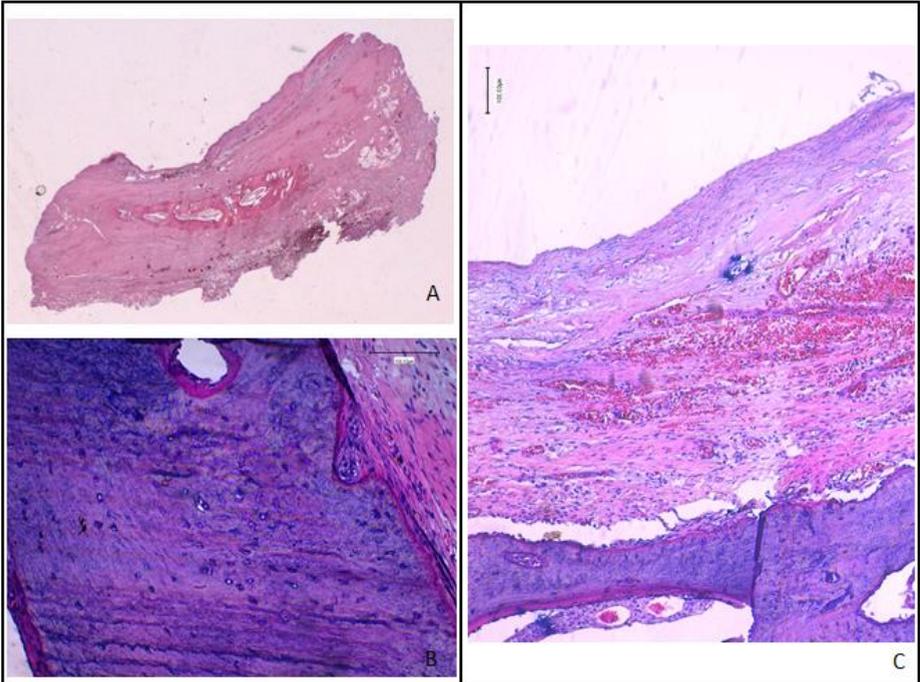


Figura 20: Tinción con H-E de la Tráquea 1. A) Panorámica. B) Foto a 20x del cartílago traqueal. C) Foto a 10x del epitelio, lámina propia, submucosa y cartílago traqueal.

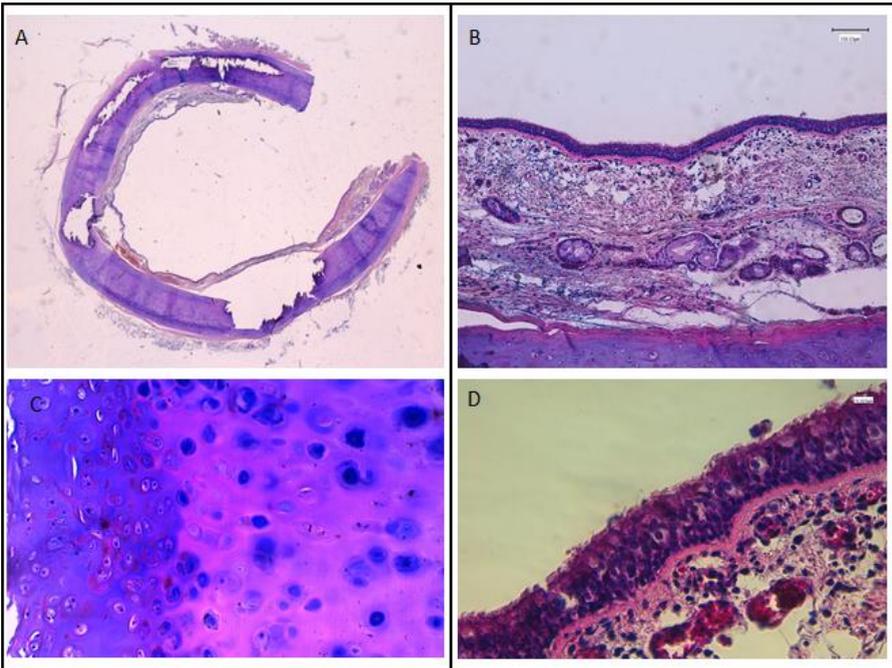


Figura 21: Tinción con H-E de la Tráquea 2. A) Panorámica. B) Foto a 10x del epitelio, lámina propia y submucosa. C) Foto a 20x del cartílago traqueal. D- Foto a 40x del epitelio respiratorio.

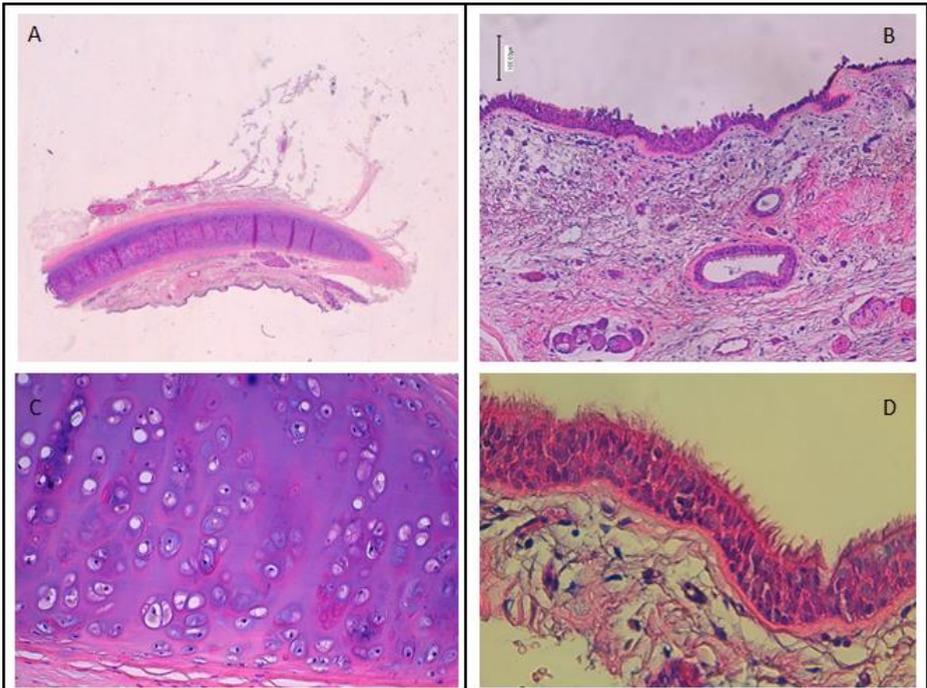


Figura 22: Tinción con H-E de la Tráquea 3. A) Panorámica. B) Foto a 10x del epitelio, lámina propia y submucosa. C) Foto a 20x del cartilago traqueal. D) Foto a 40x del epitelio respiratorio.

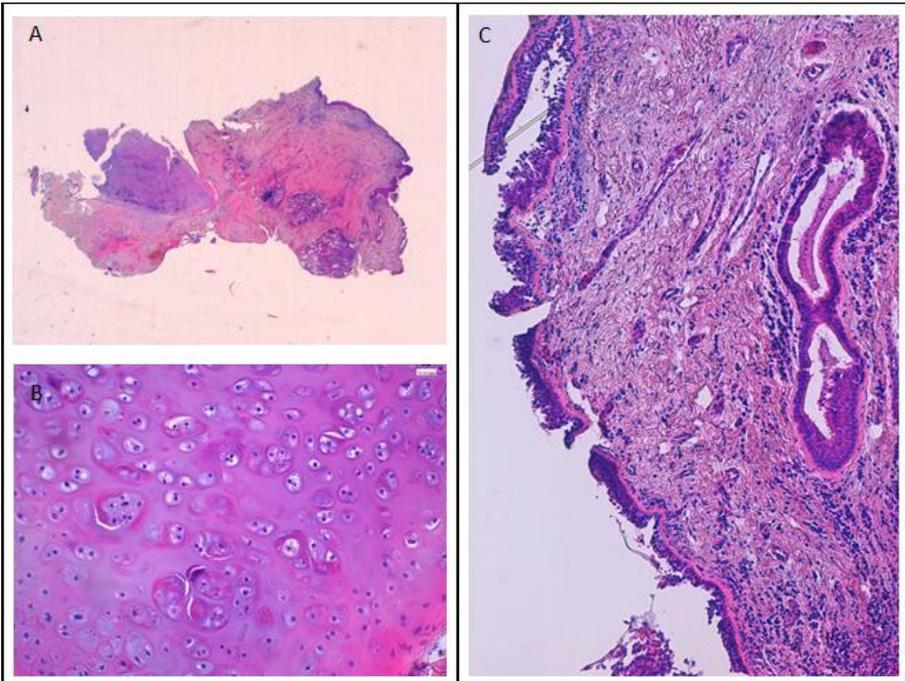


Figura 23: Tinción con H-E de la Tráquea 4. A) Panorámica. B) Foto a 20x del cartílago traqueal. C) Foto a 10x del epitelio, lámina propia y submucosa.



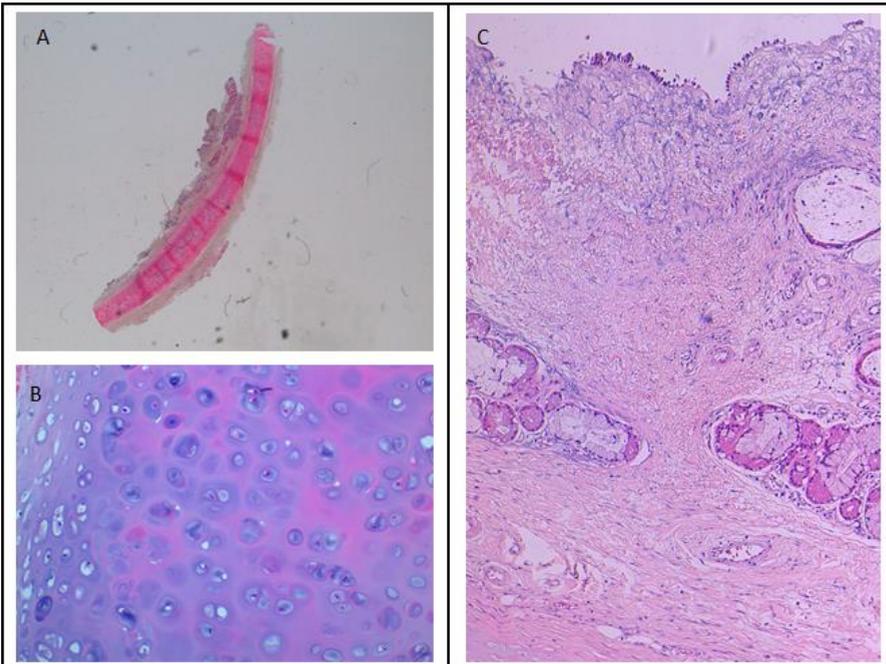


Figura 25: Tinción con H-E de la Tráquea 9. A) Panorámica. B) Foto a 20x del cartilago traqueal. C) Foto a 10x del epitelio, lámina propia y submucosa.

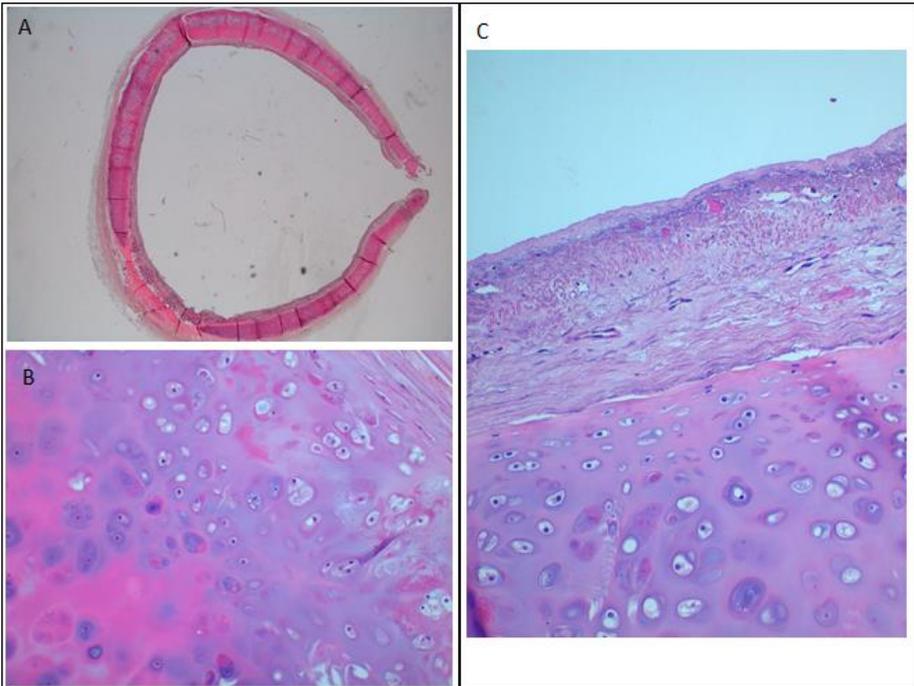


Figura 26: Tinción con H-E de la Tráquea 10. A) Panorámica. B) Foto a 20x del cartilago traqueal. C) Foto a 10x del epitelio, lámina propia y submucosa.

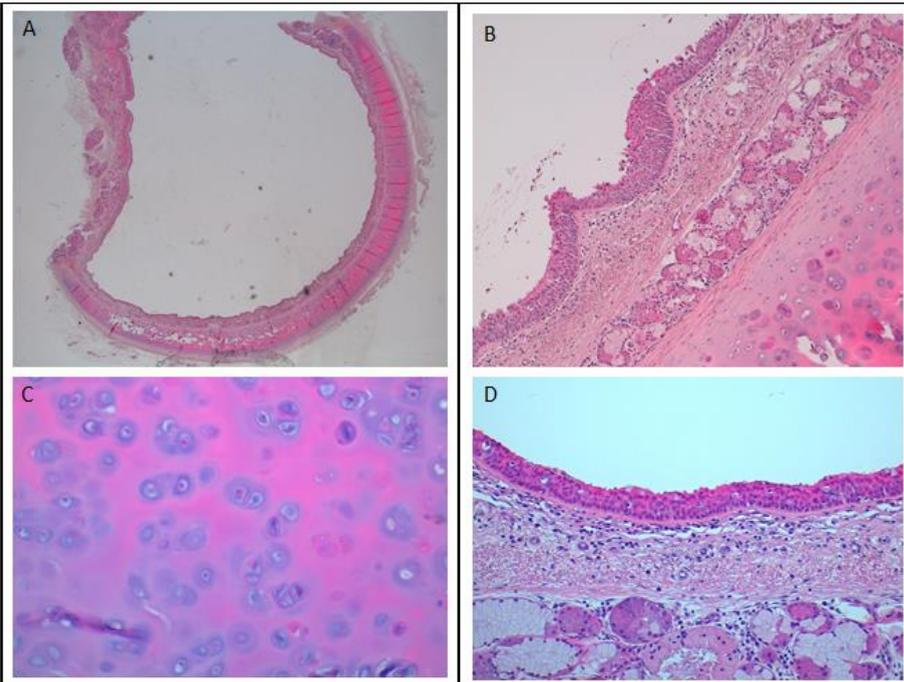


Figura 27: Tinción con H-E de la Tráquea 11. A) Panorámica. B) Foto a 10x del epitelio, lámina propia, submucosa y cartílago. C) Foto a 20x del cartílago traqueal. D) Foto a 40x del epitelio respiratorio.

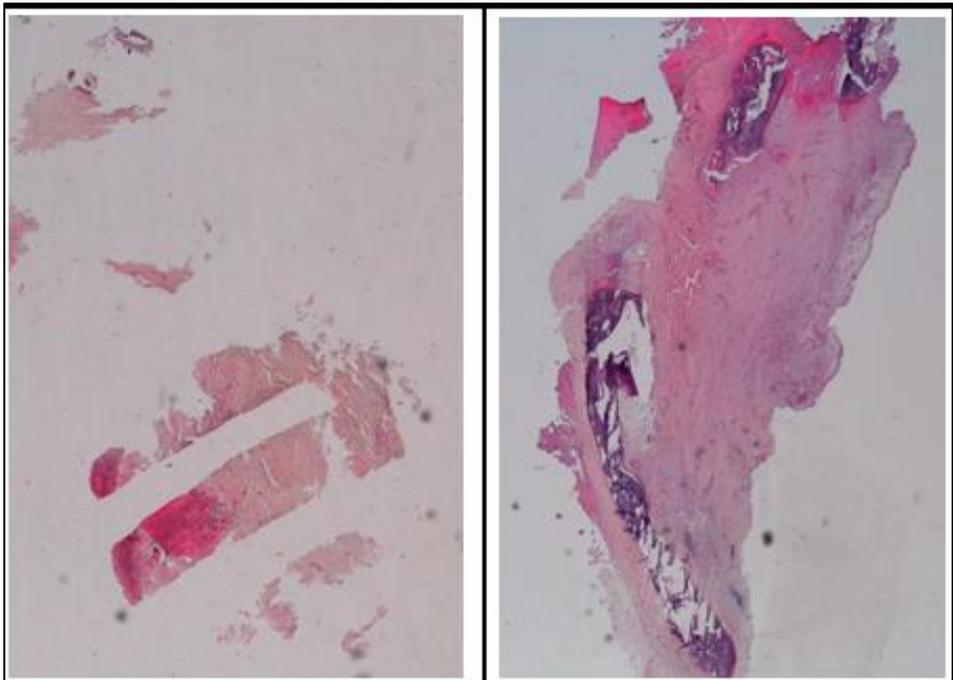


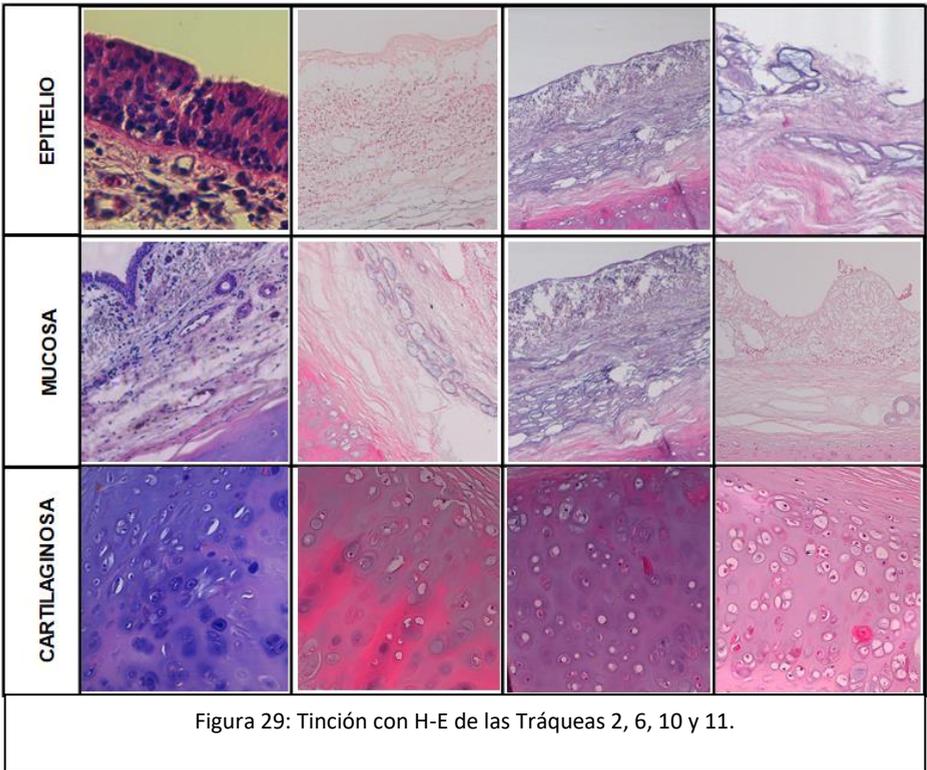
Figura 28: Tinción con H-E de la Tráquea 5 (izquierda) y Tráquea 8 (derecha).

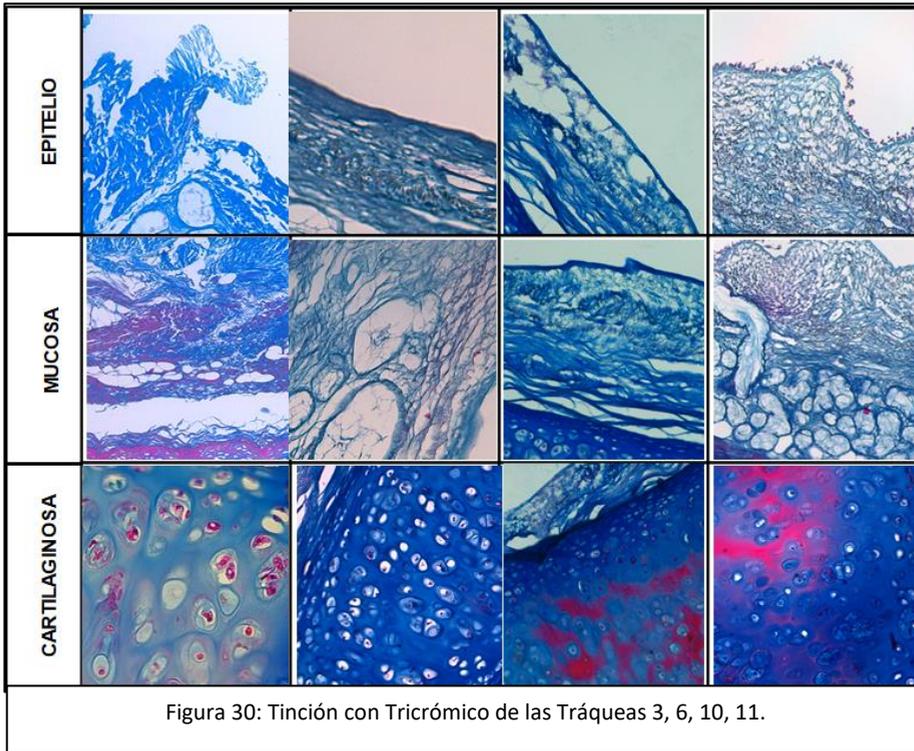
A continuación, procedimos a procesar los especímenes que no fueron descartados siguiendo el protocolo optimizado para tráquea porcina con SDS2%. Una vez concluido el protocolo experimental, las tráqueas se incluyeron y se tiñeron con hematoxilina eosina, tricrómico de Masson y orceína. Los resultados se representan en las figuras 29-31. En líneas generales los resultados obtenidos fueron bastante satisfactorios. Al igual que en las tráqueas porcinas, se consiguió una descelularización completa de las capas mucosa, submucosa y adventicia. En el caso de la capa cartilaginosa, quedaron bastantes lagunas condrales con contenido celular intacto, lo que parece indicar una diferente composición de la matriz condral característica de la tráquea humana en comparación con la tráquea porcina.

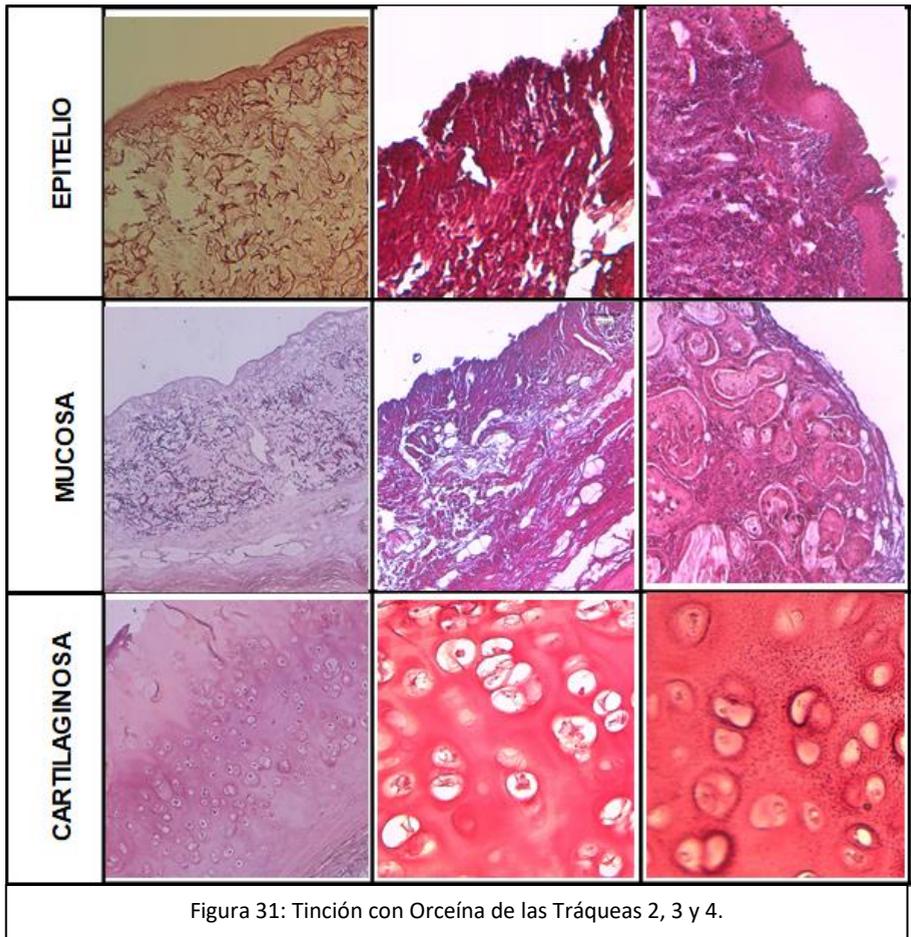
Así mismo obtuvimos los resultados morfométricos reflejados en la Tabla 3, que muestran como en la mayoría de especímenes el proceso de descelularización no ha

afectado el contenido de colágeno ni de fibras elásticas que hemos medido como % de área, el aumento de ese porcentaje tras la descelularización que se observa en algunos casos, se debe a una disminución en la matriz extracelular tras el proceso de descelularización.

	<b>Control</b>	<b>SDS2%</b>
<b>Tráquea 2</b>		
Fibras colágenas	54%	4.9%
Fibras elásticas	38%	2.8%
<b>Tráquea 3</b>		
Fibras colágenas	25%	30%
Fibras elásticas	1%	6%
<b>Tráquea 4</b>		
Fibras colágenas	26%	38%
Fibras elásticas	4.3%	6.9%
<b>Tráquea 6</b>		
Fibras colágenas	11%	51%
Fibras elásticas	5%	14%
<b>Tráquea 9</b>		
Fibras colágenas	34%	53%
Fibras elásticas	28%	53%
<b>Tráquea 10</b>		
Fibras colágenas	33%	52%
Fibras elásticas	51%	150%
<b>Tráquea 11</b>		
Fibras colágenas	48%	40%
Fibras elásticas	67%	90%
Tabla 3: Resultados morfométricos tras el proceso de descelularización.		











## **5. DISCUSIÓN**





## 5. DISCUSIÓN

La estenosis traqueal es una entidad patológica de gran importancia, usualmente de etiología benigna y con una incidencia aproximada de 4.9 casos por millón de habitantes/año. La estenosis traqueal representa un grave problema de salud con consecuencias desastrosas sobre la calidad de vida de los pacientes afectados, llegando en algunos casos a ocasionar el fallecimiento de los mismos, si no se realiza un tratamiento correcto y oportuno.

Las terapias actuales, aunque de extrema utilidad, están limitadas por la longitud de la tráquea afectada. Las maniobras quirúrgicas de liberación de tejidos, utilizadas con el fin de lograr una mayor movilización de las estructuras hasta alcanzar incluso resecciones de hasta 6cm de longitud, han aportado al avance la cirugía, pero sigue siendo un reto, cuando el segmento afecto es de más del 50% de la vía aérea.

En la actualidad, se han aplicado terapias endoluminales conservadoras (láser, dilatación, prótesis, etc.) con el objetivo de conseguir la paliación de los signos y síntomas. Los resultados a corto plazo han sido buenos; pero las recurrencias tardías han sido frecuentes teniendo que recurrir a la traqueotomía como tratamiento definitivo para asegurar la funcionalidad de la vía aérea.

Como hemos mencionado anteriormente, la resección traqueal con anastomosis termino-terminal, es la mejor técnica quirúrgica para el tratamiento de la estenosis traqueal circunferencial cervical. Sin embargo ésta técnica no se puede llevar a cabo cuando la tráquea afectada es extensa y precisa de una resección mayor al 50% de la longitud de la misma. En estos casos, el poder disponer de un sustituto traqueal biocompatible sería de utilidad para el tratamiento de esta subpoblación de pacientes, que en la actualidad carecen de una estrategia terapéutica válida, y es en este sentido en el que numerosos grupos de investigación del área de la ingeniería tisular han centrado sus esfuerzos. Pese al optimismo inicial en el desarrollo de

sustitutos traqueales, los éxitos a día de hoy en lo referente a la regeneración traqueal, son por desgracia, nulos. Entre los factores responsables de esta situación podemos incluir la extremadamente compleja vascularización de la tráquea, la necesidad imperiosa de contar con una mucosa respiratoria funcional capaz de eliminar las secreciones pulmonares mediante el aclaramiento mucociliar, la imposibilidad de utilizar inmunosupresores en muchos casos y la compleja biomecánica de dicho órgano.

Con respecto a la vascularización, ésta no deja de ser compleja, no obstante, y pese a las dificultades en la restauración de la misma, existen grupos de investigación que han reportado resultados prometedores en modelos animales de experimentación mediante implante en epiplón previos a la anastomosis (Borro et al. 1992). En el ser humano, el problema de la revascularización se ha afrontado para trasplantes de vía aérea mediante prevascularización del órgano a trasplantar, con la utilización de sustitutos traqueales autólogos como describió Dartevelle, formaron una estructura tubular a partir de un *flap* vascularizado de tejido fasciocutáneo del antebrazo y lo reforzaron en su cara anterior con cartílagos costales, según describe su grupo en 2013, consiguieron así, resecciones traqueales de 7 a 12cm de longitud (Fabre et al., 2013).

Como hemos dicho, la compleja biomecánica de la tráquea es uno de los factores responsables del fallo de diferentes sustitutos generados por las técnicas de ingeniería de tejidos. Por esta razón, la matriz traqueal descclularizada es una fuente realista de andamios compatibles, que potencialmente podrían ser útiles para la regeneración de las vías respiratorias (Giraldo-Gómez et al., 2019). La descclularización implica la eliminación completa del contenido celular de las tráqueas para evitar respuestas inmunogénicas que conducirían a la falla del andamio, especialmente porque la mayoría de los pacientes candidatos están inmersos en un proceso carcinogénico que impide el uso de inmunosupresores

(Grillo et al., 2003). La eliminación de células y restos celulares de las capas de mucosa, submucosa y adventicia de la tráquea no es un problema, ya que es relativamente simple, pero las cosas son diferentes cuando se trata de la capa cartilaginosa. De hecho, algunos autores sostienen que es imposible descelularizar completamente los anillos cartilagosos que sostienen la tráquea (Aoki et al., 2019). No obstante, la ausencia de vascularización del cartílago hialino representa una ventaja, por lo que puede no ser necesaria una descelularización completa del cartílago traqueal para evitar el rechazo inmunológico del andamio (Aoki et al., 2019). Este es un aspecto importante a considerar porque la mayoría de los agentes descelularizantes tienen un impacto mayor o menor sobre la integridad de la matriz extracelular y debe alcanzarse un equilibrio entre la eliminación de células y la integridad del tejido conectivo de soporte. Este equilibrio debe depender de las características de la matriz traqueal, que son diferentes en las diversas especies animales y depende de aspectos relacionados con el peso, tamaño, largo del cuello o bipedestación (Dyce et al., 2002).

Entre los diferentes agentes de descelularización, parece inevitable el uso de detergentes iónicos, solos o en combinación con métodos físicos. La mayoría de los protocolos de descelularización informados utilizan SDC, generalmente a una concentración del 4%, solo o en combinación con otros agentes, incluidos detergentes no iónicos como SDS, CHAPS o Triton X100, enzimas como la tripsina o agentes físicos que incluyen vacío o temperatura, entre otros (Batioglu-Karaaltin et al., 2019; Dimou et al., 2019; Giraldo-Gomez et al., 2019; Hong et al., 2018; Hung et al., 2016; Lange et al., 2017; Urbano et al., 2017; Weymann et al., 2015).

Sin embargo, en muchas investigaciones, el protocolo de descelularización utilizado no está optimizado para una especie animal en particular, o para otras condiciones experimentales específicas, y los autores utilizan directamente 4% SDC. Por este motivo, nuestro primer objetivo en este trabajo, fue optimizar un protocolo específico para la descelularización de tráqueas humanas. Dada la enorme dificultad

en conseguir tráqueas humanas, nos planteamos en primer lugar optimizar el protocolo de descélularización utilizando una especie animal de arquitectura y características histológicas similares a la humana para posteriormente adaptar el protocolo a la vía aérea humana. De entre las diferentes especies animales a las que teníamos un acceso relativamente sencillo, nos decantamos por la porcina. Es de destacar que para la realización de este trabajo de investigación hemos utilizado 100 tráqueas.

Decidimos, así mismo, no utilizar equipos complejos como bombas de vacío o láseres para optimizar un protocolo fácilmente reproducible en cualquier laboratorio convencional. Nuestra idea era diseñar un protocolo sencillo que pudiese realizarse en cualquier laboratorio con un mínimo de recursos materiales, a fin de hacerlo universal. Todos los procedimientos se realizaron a temperatura ambiente y solo se utilizó un agitador orbital. Incluimos algunos de los detergentes iónicos más utilizados en la literatura, solos o en combinación. Se incluyó como grupo experimental de referencia un grupo de animales tratados con SDC al 4%, el más utilizado en la literatura, aunque como hemos visto en el presente trabajo, no es el más eficiente en términos de descélularización, ni el menos lesivo sobre la matriz extracelular traqueal. Decidimos incluir varios choques osmóticos en el protocolo, incluido un choque al comienzo del protocolo, otro después de cada cambio de solución de detergente y un último choque al final del experimento. Estos choques osmóticos se agregaron para aumentar la eliminación de desechos celulares y residuos de ADN y detergente que podrían afectar la viabilidad de la matriz descélularizada generada. El análisis de las muestras teñidas con DAPI indica una eliminación celular óptima después de 4 semanas de descélularización y, por lo tanto, este fue el punto de tiempo seleccionado para el resto de los experimentos. Tomando en consideración nuestras condiciones experimentales y las especies animales seleccionadas, un fino análisis histológico indicó que las muestras tratadas con SDS al 2% presentaron la mejor remoción de células del tejido con el leve impacto en la composición y organización de la matriz extracelular. Curiosamente, el

tratamiento con el 4% de SDS fue menos eficaz que el 2% de SDS en la eliminación de células de tráqueas procesadas. Atribuimos este efecto a un aumento considerable de la viscosidad de la solución detergente debido a su alta concentración, que impedía el acceso del detergente al tejido. Este efecto podría minimizarse usando una incubadora, pero esto habría implicado el uso de más instrumentos y esto estaba fuera de nuestros objetivos. Es importante resaltar que esta conclusión probablemente solo sea válida para nuestras condiciones experimentales y las especies animales utilizadas, por lo que se debe optimizar un protocolo específico para otras variables experimentales.

En el presente trabajo las tráqueas porcinas se cortaron en anillos y se incubaron en ausencia o presencia de diferentes detergentes durante 4 semanas. Se consideraron los siguientes grupos experimentales:

- A- No expuestos a detergentes, grupo control
- B- 0,2% Triton X100 + 0,25% SDS
- C- 2% Triton X100 + 0,25% SDS
- D- 4% SDC, paneles JKL y E 2% SDS

Aunque el SDS es un agente descelularizante valioso ampliamente utilizado en la ingeniería de tejidos, no carece de desventajas y, de hecho, se ha informado que el SDS puede generar residuos potencialmente citotóxicos que podrían afectar la viabilidad de la matriz descelularizada (Gilpin & Yang, 2017). Para disminuir este efecto indeseable del SDS, decidimos incluir varios choques osmóticos con agua destilada para aumentar la remoción de escombros. Primero, se descelularizaron las tráqueas y luego, se cultivaron condrocitos y células NBHE en la capa de cartílago o en la superficie mucosa de las tráqueas descelularizadas, respectivamente, para probar el efecto de la descelularización sobre la viabilidad celular. Los resultados obtenidos indicaron poco efecto deletéreo sobre la supervivencia celular, como lo evidencia la presencia de núcleos intactos y mitosis tanto en el cartílago como en la capa mucosa de las tráqueas.

Un aspecto importante en lo que respecta a la ingeniería traqueal es la necesidad de sustitutos listos para usar, ya que los pacientes afectados no pueden esperar meses para recibir tratamiento e incluso, en caso de emergencia, ni horas. Ante este problema existen dos posibles soluciones: acortar los tiempos del procedimiento de descélularización, o preservar las tráqueas descélularizadas para un uso futuro. Varios autores han mejorado los procedimientos experimentales utilizando estrategias que incluyen el uso de presión negativa, ciclos de descélularización con diferentes agentes, el uso de láser o diferentes enzimas, etc. Proponemos que la criopreservación de tráqueas podría ser una solución realista para este problema, porque permitiría un stock de órganos descélularizados listos para implantar de diferentes tamaños.

Con esta idea en mente, presentamos en este artículo un protocolo estandarizado para la criopreservación de tráqueas descélularizadas porcinas con un estudio a largo plazo de la evolución de la organización de la matriz extracelular y de las propiedades biomecánicas de las tráqueas. En cuanto a la histología, no se ha observado ningún efecto adverso para la criopreservación de la tráquea después de una semana, en comparación con los no criopreservados. En cuanto a los estudios biomecánicos, se ha observado un incremento moderado, pero no significativo en algunos de los parámetros analizados. Esta observación concuerda con otras investigaciones y podría ser consecuencia de que la congelación puede inducir cambios en las características de los proteoglicanos de la matriz extracelular (Lam et al., 2011; Theodoridis et al., 2016). Sin embargo, las diferencias observadas son mínimas y no significativas.

Una vez estandarizado el protocolo experimental, nos planteamos evaluar la eficacia del mismo en vía aérea humana. Para ello incluimos especímenes de 11 pacientes intervenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia. Tras proceder a la descélularización de las mismas utilizando el protocolo optimizado en cerdos, analizamos las mismas desde una perspectiva histológica. No observamos grandes

diferencias en lo relativo al efecto del SDS al 2% sobre la integridad de la matriz extracelular. No observamos una pérdida significativa de fibras colágenas ni de fibras elásticas, evidenciadas por las tinciones tricrómico de Masson y orceína respectivamente. Con respecto a la matriz cartilaginosa, el potencial descelularizador del SDS al 2% fue menos eficiente que en el modelo porcino. Atribuimos esta diferencia a dos posibles circunstancias. En primer lugar, las tráqueas humanas incluidas en este estudio son patológicas, con la consecuente calcificación de la matriz condral, mientras que las tráqueas porcinas utilizadas en este trabajo, procedían de animales jóvenes y sanos, obtenidos directamente del matadero. Esta calcificación parcial de la matriz cartilaginosa, podría estar afectando a la permeabilidad de los detergentes y explicaría la menor tasa de descelularización. Otra explicación residiría en diferencias en la composición de la matriz condral entre la tráquea humana y la porcina. Aunque esta segunda hipótesis es menos probable desde nuestro punto de vista, sería necesario realizar un estudio sistemático sobre las diferencias en la composición de la capa cartilaginosa de ambas especies animales, cosa que no existe a día de hoy, al menos hasta donde nuestro conocimiento alcanza.

Otro aspecto relevante que no ha sido posible evaluar ha sido el de los efectos sobre la biomecánica de las tráqueas en el modelo humano. Esto se debe a que de entre todos los ejemplares colectados, solo uno permitía el engarce en la mordaza utilizada para la estimación de los parámetros biológicos. Al no contar con anillos completos lo suficientemente largos, no fue posible montarlos en el reómetro. Es este un aspecto importante que queda pendiente de analizar, aunque para ello sería imperativo contar con segmentos completos de tráqueas humanas de al menos 3cm de longitud.

En resumen, los resultados aquí presentados indican que, por un lado, el mejor agente descelularizante para tráqueas en nuestras condiciones experimentales es SDS al 2% y, por otro lado, el protocolo de criopreservación utilizado no tiene ningún

efecto adverso sobre la composición de la matriz extracelular y no influye negativamente en las propiedades biomecánicas de esta matriz acelular traqueal. En este punto, estamos listos para abordar el problema de la vascularización de los injertos, que es el verdadero caballo de batalla en la ingeniería del tejido traqueal.

## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. El modelo porcino supone una buena alternativa a la tráquea humana a la hora de establecer un modelo de estudio de diferentes factores relevantes en el procedimiento de descelularización de las mismas, no solo por sus características anatómicas, compatibles con la humana, sino por sus características histológicas. Así, el estudio microscópico de los especímenes incluidos demuestra una organización tisular similar a la humana con mínimas diferencias que atienden sobre todo a una mayor organización de las fibras elásticas que forman parte del estroma de dicho órgano.
2. Todos los detergentes utilizados en el proceso de descelularización han demostrado una gran eficacia para la descelularización de las capas mucosa, submucosa y adventicia de las tráqueas estudiadas. Con respecto a la túnica cartilaginosa, únicamente el SDC y el SDS, han demostrado cierta eficacia a la hora de descelularizar dicha capa. El mayor rendimiento en lo referente a la eliminación de células de la capa cartilaginosa unido a un menor efecto lesivo sobre el contenido en colágeno de la matriz extracelular, convierte al SDS en el detergente más adecuado para la descelularización de tráquea porcina.
3. De las diferentes concentraciones de SDS testadas, la del 2% ha demostrado una mejor remoción de células del tejido y de ADN con mínimo impacto en la composición y organización de la matriz extracelular. La utilización de varios choques osmóticos con agua destilada consiguió disminuir la citotoxicidad del detergente y, por tanto, un menor efecto deletéreo sobre la supervivencia celular tanto en el cartílago como en la capa mucosa de las tráqueas.

4. Con respecto a la biocompatibilidad, las tráqueas descelularizadas con SDS al 2% permitieron la adhesión y proliferación de células epiteliales y la anidación de condrocitos en la capa cartilaginosa *in vitro*.
5. El protocolo de criopreservación propuesto en esta tesis no ha tenido efectos sobre la composición de la matriz extracelular en lo referente al contenido en fibras colágenas o elásticas. Todas las tráqueas criopreservadas demostraron una mejor respuesta biomecánica que las no preservadas, lo que podría deberse al aumento de la rigidez de las mismas como efecto de la congelación.
6. En lo referente a la extrapolación a la vía aérea humana, hemos observado una gran variación entre individuos. No obstante, en general, el efecto del protocolo de descelularización estandarizado en modelo porcino, no produjo grandes alteraciones en el contenido en fibras colágenas o elásticas, por lo que podría ser adecuado para descelularizar tráqueas humanas.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**





## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Aoki FG, Varma R, Marin-Araujo AE et al. Deepithelialization of porcine tracheal allografts as an approach for tracheal tissue engineering. *Scientific Reports*. 2019; 9:120-34.
- [2]. Baiguera S, Jungebluth P, Burns A et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials*. 2010;31(34):8931-8.
- [3]. Batioglu-Karaaltin A, Ovali E, Karaaltin MV et al. Decellularization of trachea with combined techniques for tissue-engineered trachea transplantation. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2019; 12(1):86-94.
- [4]. Belsey R. Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea. *Br J Surg*. 1950; 38: 200-5.
- [5]. Borro JM, Chirivella M, Villa C, Galan G, Prieto M, Vila C, París F. Successful revascularization of large isolated tracheal segment. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1992; 6:621-3.
- [6]. Botta Y, Meyer R. Reconstruction expérimentale de la trachée par microchirurgie. *Praxis*. 1978; 67: 1588-92.
- [7]. Brand-Saber BEM, Schäfer T. Trachea: Anatomy and physiology. *Thoracic Surgery Clinics*. 2014; 24(1):1-5.
- [8]. Butler CR, Hynds RE, Crowley C et al. Vacuum-assisted decellularization: an accelerated protocol to generate tissue-engineered human tracheal scaffolds. *Biomaterials*. 2017; 124:95-105.
- [9]. Chang JW et al. Tissue-engineered tracheal reconstruction using three-dimensionally printed artificial tracheal graft: preliminary report. *Artif. Organs*. 2014; 38:95-105.
- [10]. Crafoord C, Lindgren AGH. Mucous and salivary gland tumours in the bronchi and trachea. *Acta Chir Scand*. 1945; 92:481-506.

- [11]. Dablanca M, Maeso A, Méndez DDC, Ortega P. Laryngotracheal stenosis of autoimmune aetiology. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2017; 68(1):38-42.
- [12]. D'Andrilli A, Venuta F, Rendina EA. Subglottic tracheal stenosis. *Journal of Thoracic Disease.* 2016; 8(Suppl 2):S140.
- [13]. De Wolf J, Brieu M, Zawadzki C et al. Successful immunosuppressant-free heterotopic transplantation of tracheal allografts in the pig. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2017; 52(2):248-55.
- [14]. Delaere P, Lerut T, Van Raemdonck D. Tracheal transplantation: State of the art and key role of blood supply in its success. *Thorac Surg Clin.* 2018; 28(3):337-45.
- [15]. Dimou Z, Michalopoulos E, Katsimpoulas M et al. Evaluation of a decellularization protocol for the development of a decellularized tracheal scaffold. *Anticancer Res.* 2019;39(1):145-50.
- [16]. Doss AE, Dunn SS, Kucera KA, Clemson LA, Zwischenberger JB. Tracheal replacements: Part 2. *Asaio Journal.* 1992; 53:631-9.
- [17]. Dyce KM, Sack WO & Wensing CJG. *Textbook of Veterinary Anatomy.* 3rd ed. Philadelphia: Saunders. 2002. ISBN-13: 978-0721689661.
- [18]. Edgerton MT, Zovickian A. Reconstruction of the trachea and infraglottic larynx. *Plast Reconstr Surg.* 1954; 13:167-92.
- [19]. Elliott MJ, De Coppi P, Speggorin S et al. Stem-cell-based, Tissue Engineered Tracheal Replacement in a Child: A 2-year Follow-Up Stud. *Lancet.* 2012;380(9846):994-1000.
- [20]. Fabre D, Kolb F, Fadel E et al. Successful tracheal replacement in humans using autologous tissues: An 8-year experience. *Ann Thorac Surg.* 2013; 96(4):1146-55.
- [21]. Fernández Fau L, Freixinet Gilart J, editores. *Tratado de Cirugía Torácica.* SEPAR. Madrid: Editores Médicos; 2010.
- [22]. Fonkalsrud EW, Sumida S. Tracheal replacement with autologous esophagus for tracheal stricture. *Arch Surg.* 1971; 102(2):139-42.

- [23]. Gaissert HA et al. Complication of benign tracheobronchial strictures by self-expanding metal stents. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 126:744-7.
- [24]. Gibson M, Beachley V, Coburn J, Bandinelli PA, Mao HQ, Elisseeff J. Tissue extracellular matrix nanoparticle presentation in electrospun nanofibers. *BioMed Research International.* 2014; 469120.
- [25]. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int.* 2017; 9831534.
- [26]. Giraldo-Gomez DM, García-López SJ, Tamay-de-Dios L et al. Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019; 105:110-42.
- [27]. Gonfiotti A et al. The First Tissue-Engineered Airway Transplantation: 5-year Follow-Up Results. *Lancet* 2014; 383:238-44.
- [28]. Greenberg S.D, Williams R.K. Tracheal reconstruction an experimental study. *Arch Otolaryngol.* 1960; 72: 565-74.
- [29]. Grillo HC. Reconstruction of the trachea. *Thorax.* 1973; 28(6):667-79.
- [30]. Grillo HC. Development of tracheal surgery: a historical review. Part 2: Treatment of tracheal diseases. *Ann Thorac Surg.* 2003; 75(3):1039-47.
- [31]. Grillo HC. Surgery of the trachea and bronchi. *Pmph USA Ltd Series,* 2004.
- [32]. Grillo HC. Tracheal replacement: A critical review. *Ann Thorac Surg.* 2002; 73(6):1995-2004.
- [33]. Hamaji M, Kolima F, Koyasu S et al. Interactive Cardiovascular Thorac Surg. 2014; 19: 357-62.
- [34]. Hofferberth SC, Watters K, Rahbar R, Fynn-Thompson F. Management of congenital tracheal stenosis. *Pediatrics.* 2015; 136(3):660.
- [35]. Hong P, Bezuhy M, Graham ME & Gratzner PF. Efficient decellularization of rabbit trachea to generate a tissue engineering scaffold biomatrix. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2018; 112:67-74.

- [36]. Hung SH, Chen PY, Tai CC, Chou CH, Cheng WL, Tseng H. Development of tracheal scaffolds using hybridization of PLLA coil skeleton and electrospun structures. *Journal of Medical and Biological Engineering*. 2014; 34:218.
- [37]. Hung SH, Su CH, Lin SE & Tseng H. Preliminary experiences in trachea scaffold tissue engineering with segmental organ decellularization. *Laryngoscope*. 2016; 126(11):2520-27.
- [38]. Jacobs JP, Elliott MJ, Haw MP, Bailey CM, Herberhold C. Pediatric tracheal homograft reconstruction a novel approach to complex tracheal stenosis in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996; 112: 1549-60.
- [39]. Jacobs JP, Quintessenza JA, Andrews T et al. Tracheal allograft reconstruction the total North American and worldwide pediatric experiences. *Ann Thorac Surg*. 1999; 68: 1043-52.
- [40]. Johnson C, Sheshadri P, Ketchum JM, Narayanan LK, Weinberger PM, Shirwaiker RA. In vitro characterization of design and compressive properties of 3D-biofabricated/decellularized hybrid grafts for tracheal tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. junio de 2016; 59:572-85.
- [41]. Jones MC, Rueggeberg FA, Faircloth HA et al. Defining the biomechanical properties of the rabbit trachea. *Laryngoscope*. 2014; 124(10):2352-8.
- [42]. Junker K. Pathology of tracheal tumors. *Thorac Surg Clin*. 2014; 24(1):7-11.
- [43]. Junqueira LC y Carneiro J. *Histología Básica: texto y atlas 12ª edición*. Editorial Médica Panamericana. México, DF. 2015.
- [44]. Kim J, Suh SW, Shin JY et al. Replacement of a Tracheal Defect With a Tissue-Engineered Prosthesis: Early Results From Animal Experiments. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 128(1):124-9.
- [45]. Klepetko W, Marta GM, Wisser W et al. Heterotopic tracheal transplantation with omentum wrapping in the abdominal position preserves functional and structural integrity of a human tracheal allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 127(3):862-7.

- [46]. Kojima K, Vacanti CA. Tissue engineering in the trachea. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014; 297(1):44-50.
- [47]. Korpela A, Aarnio P, Sariola H, Tormala P, Harjula A. Bioabsorbable self-reinforced poly-L-lactide, metallic, and silicone stents in the management of experimental tracheal stenosis. *Chest*. 1999; 115:490-5.
- [48]. Krespi YP, Siller HF, Baek SM. Tracheal reconstruction with a pleuroperiosteal flap. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1983; 91: 610-4.
- [49]. Kucera KA, Doss AE, Dunn SS, Clemson LA, Zwischenberger JB. Tracheal replacements: part 1. *Asaio Journal*. 1992; 53:497-505.
- [50]. Lam SKL, Chan SCW, Leung VY, Lu W, Cheung LM, Luk KDK. The role of cryopreservation in the biomechanical properties of the intervertebral disc *Eur Cell Mater*. 2011; 22:393-402.
- [51]. Lange P, Greco K, Partington L et al. Pilot study of a novel vacuum-assisted method for decellularization of tracheae for clinical tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11(3):800-11.
- [52]. Lemaire A. et al. Outcomes of Tracheobronchial Stents in Patients With Malignant Airway Disease. *Ann Thorac Surg*. 2005; 80:434-7.
- [53]. Levashov YuN, Yablonsky PK, Cherny SM et al. One-stage allotransplantation of thoracic segment of the trachea in a patient with idiopathic fibrosing mediastinitis and marked tracheal stenosis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1993; 7:383–6.
- [54]. Liu L et al. Novel strategy to engineer trachea cartilage graft with marrow mesenchymal stem cell macroaggregate and hydrolyzable scaffold. *Artif. Organs*. 2010; 34:426-33.
- [55]. Marrangoni AG. Homotransplantation of tracheal segments preserved by lyophilization; an experimental study. *J Thorac Surg*. 1951; 21: 398-401.
- [56]. Marshak G, Porter JH, McAdams AJ. Reconstruction of the canine trachea with urinary bladder wall. *Laryngoscope*. 1973; 83: 1090-5.

- [57]. Mata M, Lluch-Estellés J, Armengot M et al. New Adenylate Kinase 7 (AK7) Mutation in Primary Ciliary Dyskinesia. *Am J Rhinol Allergy*. 2012; 26(4):260-4.
- [58]. Mata M, Milian L, Oliver M, et al. In vivo articular cartilage regeneration using human dental pulp stem cells cultured in an alginate scaffold: A preliminary study. *Stem Cells Int*. 2017; 8309256.
- [59]. Mohd Heikal, Aminuddin BS, Jeevanan J et al. Autologous Implantation of Bilayered Tissue-Engineered Respiratory Epithelium for Tracheal Mucosal Regeneration in a Sheep Model. *Cells Tissues Organs*. 2010;192(5):292-302.
- [60]. Montgomery WW. Suprahyoid release for tracheal anastomosis. *Arch Otolaryngol* 1974; 99:255-60.
- [61]. Morcillo A, Wins R, Gómez-Caro A, Paradela M, Molins L, Tarrazona V. Single-staged laryngotracheal reconstruction for idiopathic tracheal stenosis. *Ann Thorac Surg*. 2013; 95(2):439.
- [62]. Nakanishi R. Cryopreservation of the tracheal grafts. *Organogenesis*. 2009; 5(3):113-8.
- [63]. Nakamura T, Sato T, Araki M et al. In Situ Tissue Engineering for Tracheal Reconstruction Using a Luminal Remodeling Type of Artificial Trachea. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 138(4):811-9.
- [64]. Neville WE. Reconstruction of the trachea and stem bronchi with neville prosthesis. *Int Surg*. 1982; 67(3):229-34.
- [65]. Nomoto M, Nomoto Y, Tada Y et al. Bioengineered Trachea Using Autologous Chondrocytes for Regeneration of Tracheal Cartilage in a Rabbit Model. *Laryngoscope*. 2013; 123(9):2195-201.
- [66]. Nowakowski K. Beitrag zur Tracheoplastik. *Arch klin Chir*. 1909; 90: 847-61
- [67]. Pinsonneault C, Fortier J, Donati F. Tracheal resection and reconstruction. *J Anaesth*. 1999; 46(5-1):439-55.

- [68]. Pressman JJ, Simon MB. Tracheal stretching and metaplasia of the tracheal rings from cartilage to bone following the use of aortic homografts. *Am Surg.* 1959; 25: 850-6.
- [69]. Remlinger NT, Czajka CA, Juhas ME et al. Hydrated xenogeneic decellularized tracheal matrix as a scaffold for tracheal reconstruction. *Biomaterials.* 2010; 31(13):3520-6.
- [70]. Rose KG, Sesterhenn K, Wustrow F. Tracheal allotransplantation in man. *Lancet.* 1979; 1(8113):433.
- [71]. Safshekan F, Tafazzoli-Shadpour M, Abdouss M, Shadmehr MB. Viscoelastic Properties of Human Tracheal Tissues. *J Biomech Eng.* 2017; 1:139.
- [72]. Scherer MA, Ascherl R, Geissdorfer K et al. Experimental biosynthetic reconstruction of the trachea. *Arch Otorhinolaryngol.* 1986; 243: 215-23.
- [73]. Serrano A, Ortiz-Monasterio F, Andrade-Pradillo J. Reconstruction of the cervical trachea a technique to obtain a permanently patent airway. *Plast Reconstr Surg.* 1959; 24: 333-40.
- [74]. Tan Q et al. Accelerated angiogenesis by continuous medium flow with vascular endothelial growth factor inside tissue-engineered trachea. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007; 31:806-11.
- [75]. Siegel B, Bent J P ,Ward RF. Endotracheal nitinol stents: lessons from the learning curve. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013, 148: 671-7.
- [76]. Theodoridis K, Müller J, Ramm R et al. Effects of combined cryopreservation and decellularization on the biomechanical, structural and biochemical properties of porcine pulmonary heart valves. *Acta Biomater.* 2016;43:71-7.
- [77]. Tsukada H, Matsuda S, Inoue, H., Ikada Y & Osada H. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 2009; 8: 225-9.
- [78]. Tsukada H et al. Tracheal replacement with a bioabsorbable scaffold in sheep. *Ann Thorac Surg.* 2010; 89:253-8.

- [79]. Urbano JJ, da Palma RK, de Lima FM et al. Effects of two different decellularization routes on the mechanical properties of decellularized lungs. PLoS One. 2017;12(6): e0178696.
- [80]. Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A et al. Perfusion-decellularization of porcine lung and trachea for respiratory bioengineering. Artif Organs. 2015; 39(12):1024-32.



## **8. ANEXOS**





## 8. ANEXOS

 <b>GENERALITAT VALENCIANA</b> <small>COMISSIÓ DE SANITAT PÚBLICA I SALUT PÚBLICA</small>	 <b>DEPARTAMENT CLÍNIC MALVA-ROSA</b>
<b>Hospital Clínic Universitari</b>	

**INFORME DEL COMITE ETICO DE INVESTIGACION CON MEDICAMENTOS DEL HOSPITAL CLINICO  
UNIVERSITARIO DE VALENCIA**

Doña Marina Soro Domingo, Presidenta del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Clínic Universitario de Valencia

**CERTIFICA**

Que este Comité, en su reunión de Comisión Permanente de fecha 29 de agosto de 2019, ha analizado los aspectos éticos y científicos relacionados al proyecto de investigación:

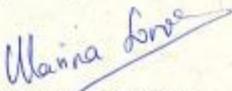
**Nº DE ORDEN:** 2019/035  
**TITULO:** Sustitutos traqueales generados por ingeniería tisular  
**PROTOCOLO:** Versión 1.1 Fecha: 21 de agosto de 2019  
**HIP/CI:** Versión 1.1 Fecha: 21 de agosto de 2019  
**INVESTIGADOR:** GENARO GALÁN GIL  
**GRUPO DE INVESTIGACIÓN/SERVICIO:** Cirugía torácica  
**PETICIÓN DE AYUDA A LA INVESTIGACIÓN:** Tesis Giovanna Foschini

Emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho proyecto este centro.

Este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el DR. GENARO GALÁN GIL en el Servicio de Cirugía torácica, como investigador principal, acordando que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación biomédica.

Lo que certifico a efectos oportunos.

Valencia, 29 de agosto de 2019



Fdo. : Doña Marina Soro Domingo

## **INFORME FAVORABLE DIRECTORES**

**Dr. Dña. Carmen Carda Batalla, Profesor Titular del Dpto. de Patología de la Universitat de València Correo electrónico: carmen.carda@uv.es**

**Dr D. Manuel Mata Roig, Profesor Titular del Dpto. de Patología de la Universitat de València. Correo electrónic: manuel.mata@uv.es**

**Dr. D. Genaro Galán Gil, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universitat de València. Correo electrónico: genaro.galan@uv.es**

**Directores de la tesis doctoral de Dña Giovanna Foschini Martínez, titulada “Sustitutos traqueales generados por ingeniería tisular”, emiten informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis y dan su visto bueno a la propuesta de expertos presentada.**

**Valencia, 18 de enero de 2022**

**Firmado: Carmen Carda B Firmado: Manuel Mata R**

**Firmado: Genaro Galán G**

**Director/a**

**Director/a**

**Director/a**