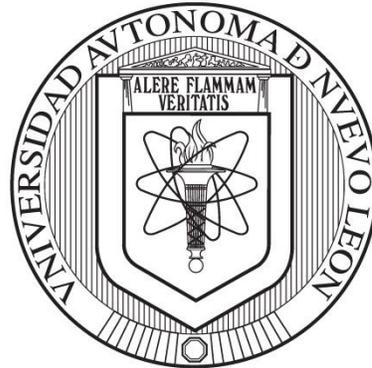


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DESCELULARIZACIÓN DE NERVIO CIÁTICO DE RATA Y SU  
POSTERIOR RECELULARIZACIÓN *in vitro* CON CÉLULAS DE  
SCHWANN**

**POR:**

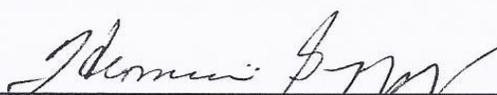
**IBT GYSELA GUADALUPE LÓPEZ GUERRA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**DICIEMBRE 2014**

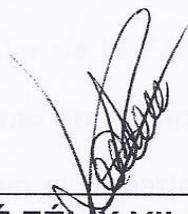
**DESCELULARIZACIÓN DE NERVIO CIÁTICO DE RATA Y SU POSTERIOR  
RECELULARIZACIÓN *in vitro* CON CÉLULAS DE SCHWANN**

**Aprobación de la Tesis:**



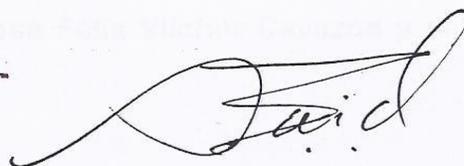
---

**DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Directora de Tesis



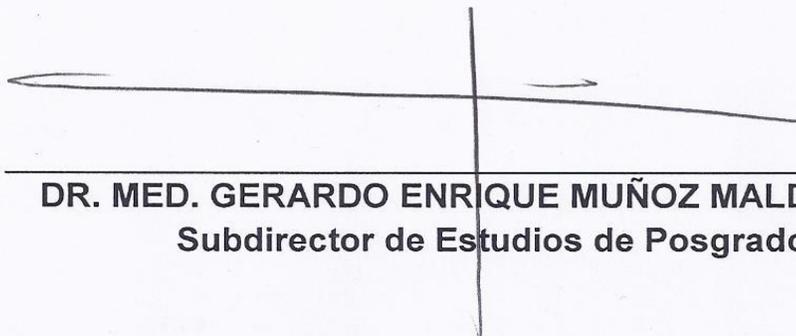
---

**DR. MED. JOSÉ FÉLIX VILCHEZ CAVAZOS**  
Co- Director de Tesis



---

**DR. C. SALVADOR LUIS SAID Y FERNÁNDEZ**  
Miembro de la Comisión



---

**DR. MED. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el departamento de Histología de la misma Facultad y Universidad, también en el Departamento de Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, bajo la dirección de la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. Med. José Félix Vilchez Cavazos y el Dr. C. Salvador Luis Said y Fernández.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por mostrarme siempre el camino y haberme guiado hasta aquí. Por darme salud y fortaleza para concluir esta etapa de mi vida.

A mi Má, Guadalupe Guerra Rivera, por su enorme esfuerzo de darnos siempre lo que necesitamos a mis hermanos y a mí, por apoyarme siempre en mis decisiones, por darme todos mis estudios, por enseñarme mis valores, por motivarme, por todo, gracias.

A la Dra. Herminia por su tiempo, pues a pesar de tener su agenda muy ocupada (en serio, muy ocupada), siempre estuvo pendiente de ver cómo iba avanzando. Por tenerme paciencia, por preocuparse por el bienestar de sus alumnos, por sus acertadas correcciones y por su asesoría en este proyecto.

Al Dr. Said por sus buenos consejos, por su paciencia, por apoyarme con la obtención de los nervios tantas veces y por mostrarse siempre optimista con la realización de este proyecto.

Al Dr. Vilchez por su tiempo, por sus valiosos comentarios y por su asesoría en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rubén por toda la ayuda brindada para llevar a cabo este proyecto, por todos sus tips y por estar siempre con una excelente disposición.

Al Dr. Mauricio por su ayuda en la realización de las cirugías y su buena disposición, porque el día que lo ascendieron a jefe de departamento se quedó a operar ratas hasta media noche y por celebración tuvo un pedazo de pizza y un refresco.

A Amador por apoyarme siempre, por escuchar mis quejas y zozobras y darme palabras de aliento cuando me quería rendir.

A mis compañeros y amigos de generación Selene, Abraham, Jesús, Mauricio, Nidia, Yazmin, Vanessa, Ulrich, Brenda, Rolando, Guillermo, Carlos, César, Byron, Álvaro, Rita, Daniela y Eduardo que hicieron que este capítulo de mi vida llamado Maestría, estuviera lleno de buenos momentos.

A mis compañeros de laboratorio Nancy, Selene, Jesús, Mario y Yeseniapor su amistad, por su ayuda y por hacer del laboratorio un lugar tan agradable.

A los estudiantes de medicina Samuel, Marina y Lucero que a pesar de tener sus clases y guardias en el HU se dieron el tiempo para ayudarme en la realización de este proyecto.

A todas las ratitas de laboratorio que dieron su vida en pos de esta causa, su sacrificio no será en vano, algún día esto salvará vidas.

A CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

**GRACIAS**

## DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Madre.

Mis logros,  
son sus logros también.

*“Tanto si piensas que puedes,  
como si piensas que no puedes,  
estás en lo cierto”.*

*- Henry Ford*

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
INDICE DE TABLAS .....	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
ABREVIATURAS .....	iii
RESUMEN .....	iv
I. INTRODUCCION.....	1
1.1 Matrices a partir de materiales sintéticos.....	2
1.2 Matrices a partir de materiales naturales .....	3
1.3 Técnicas de descelularización .....	5
1.4 Uso de matrices en la regeneración de lesiones en nervios periféricos .....	6
1.5 Reparación de lesiones de nervios periféricos por autoinjertos .....	7
1.6 Reparación de lesiones de nervios periféricos por aloinjertos .....	8
1.7 Importancia del microambiente en la regeneración .....	9
II. JUSTIFICACION .....	10
III. OBJETIVOS.....	11
3.2 Objetivos Específicos.....	11
3.1 Objetivo General .....	11
IV. MATERIALES Y METODOS.....	12
4.1 Estrategia General.....	12
4.2 Descelularización del nervio ciático de rata.....	12
4.3 Pruebas histológicas.....	13
a) Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E).....	13
b) Tinción Tricrómico de Masson (TCM).....	13
c) Tinción de Klüver-Barrera (K-B).....	14
d) Tinción de Marsland, Glees y Erickson (M-G-E).....	14

e) Inmunohistoquímica .....	15
4.4 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM-TA).....	16
4.5 Diferenciación de las CMM-TA a células de tipo Schwann con factores de diferenciación .....	17
4.6 Recelularización del nervio .....	17
4.7 Procedimiento quirúrgico .....	18
4.8 Evaluación funcional: Medición del índice de función ciática (SFI).....	18
4.9 Análisis estadístico .....	19
V. RESULTADOS .....	20
5.1 Descelularización del nervio ciático y conservación de la MEC .....	20
5.2 Recelularización del nervio <i>in vitro</i> con células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata diferenciadas a células de Schwann.....	24
5.3 Evaluación de la recelularización del nervio trasplantado en ratas después de un período de recuperación de 9 semanas.....	26
5.4 Evaluación funcional durante las 9 semanas de recuperación.....	30
VI. DISCUSIÓN .....	32
VII. CONCLUSIONES.....	35
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	36
ANEXOS.....	41

**INDICE DE TABLAS**

	<i><b>Página</b></i>
<b>Tabla 1.</b> Materiales naturales y sintéticos empleados en la generación de matrices, así como sus ventajas y desventajas.....	4
<b>Tabla 2.</b> Valores de SFI para los diferentes grupos durante 9 semanas de evaluación.....	31

**INDICE DE FIGURAS**

	<i><b>Página</b></i>
Figura 1. Lesión de nervio periférico .....	6
Figura 2. Descelularización del nervio ciático con detergentes .....	21
Figura 3. Detección de mielina en el nervio descelularizado .....	22
Figura 4. Detección de colágeno tipo I en el nervio descelularizado .....	23
Figura 5. Tinción de M-G-E e inmunohistoquímica para NF en el nervio descelularizado .....	24
Figura 6. Caracterización de CMM-TA y drSC y recelularización de un nervio descelularizado con drSC .....	25
Figura 7. Tinciones de los nervios recuperados nueve semanas después de su implantación en ratas .....	28
Figura 8. Cuantificación de la señal de mielina en el cabo proximal .....	29
Figura 9. Cuantificación de la señal de mielina en el cabo distal .....	29
Figura 10. Comparación de la señal de mielina en el cabo distal con el estándar de oro .....	30
Figura 11. Evaluación funcional de los distintos grupos a lo largo de 9 semanas .....	31

**ABREVIATURAS**

°C	grados centígrados
2D	dos dimensiones
3D	tres dimensiones
Ac	Anticuerpo
AgNO <sub>3</sub>	nitrato de plata
CMM-TA	células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo
DAB	3-3' diaminobenzidina
drSC	CMM-TA de rata, diferenciadas <i>in vitro</i> a células de Schwann
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
h	Horas
HyE	tinción de hematoxilina y eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno
IT	ingeniería de tejidos
ITS	longitud interna
K-B	tinción de Klüver-Barrera
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de litio
LNP	lesión en nervio periférico
MBP	proteína básica de la mielina
MEC	matriz extracelular
M-G-E	Tinción de Marsland, Glees y Erickson
min	minutos
NF	Neurofilamentos
p/v	peso/volumen
PBS	buffer fosfato salino
PGA	ácido poliglicólico
PL	longitud de la huella
PLA	ácido poliláctico
SB	Sulfobetaína
SBF	Suero bovino fetal
SC	células de Schwann
seg	Segundos
SFI	índice de función ciática
SNC	sistema nervioso central
SNP	sistema nervioso periférico
TA	temperatura ambiente
TBST	tris-buffered-saline-tween 20
TCM	tricrómico de Masson
TRS	solución recuperadora de antígenos
TS	longitud externa

**RESUMEN**

**Gysela Guadalupe López Guerra**

**Fecha de Graduación: Diciembre 2014**

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina.**

**Título del estudio: DESCELULARIZACIÓN DE NERVIO CIÁTICO DE RATA Y SU POSTERIOR RECELULARIZACIÓN *in vitro* CON CÉLULAS DE SCHWANN**

**Número de páginas: 44**

**Área de estudio: Terapia Celular**

**Introducción:** La ingeniería de tejidos intenta resolver la necesidad de trasplantes, debido a la falta de donadores disponibles, usando superficies porosas denominadas andamios, éstos pueden obtenerse mediante descelularización, proceso que consiste en eliminar las células dejando solo los componentes de la matriz extracelular. Los andamios descelularizados presentan un campo de oportunidad para tratar lesiones de nervios periféricos, ya que el autoinjerto (estándar de oro), presenta muchas desventajas como: morbilidad del área de donación, un segundo sitio donante y potencial formación de neuroma. El empleo de un aloinjerto nervioso descelularizado obtenido de cadáver tiene como ventajas: una fácil disponibilidad, no hay reacción inmune en el paciente y proporcionan una microestructura que ofrece el mismo nivel de apoyo regenerativo que un autoinjerto. **Objetivo:** Descelularizar nervios ciáticos de rata y posteriormente trasplantarlos en ratas para evaluar su regeneración. **Metodología:** Se extrajeron nervios ciáticos de ratas y se descelularizaron mediante detergentes. Se les hicieron pruebas histológicas para comprobar su descelularización, posteriormente se trasplantaron a otras ratas. Se operaron cuatro grupos de ratas: 1) sham, 2) autoinjerto, 3) nervio descelularizado y 4) nervio reelularizado con células de Schwann (SC); después de 9 semanas de recuperación se extrajo el nervio trasplantado y se analizó mediante pruebas histológicas. **Resultados:** La tinción de H y E mostró ausencia de núcleos celulares y la inmunotinción para detectar MBP fue negativa, por lo cual se puede comprobar que en los nervios tratados con detergentes no quedan restos celulares. Después de las 9 semanas, el nervio descelularizado presenta una reelularización y remielinización, sin embargo, éstas son menores que en el nervio reelularizado, pero aun así, ambos casos presentan mejores resultados que el autoinjerto. En cuanto a la evaluación funcional, el grupo de nervio descelularizado presenta una mejoría a lo largo de las 9 semanas. **Conclusión:** Se logró obtener un aloinjertodescelularizado mediante lavados con detergentes y éste puede ser comparable con un autoinjerto en cuanto a reelularización, remielinización y funcionalidad.

---

Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez  
Directora de Tesis

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

Las técnicas para el trasplante de órganos y la cirugía reconstructiva han avanzado mucho en los últimos años, contribuyendo a mejorar la calidad de vida de los pacientes, sin embargo, hay muchas cosas que pueden mejorarse, por ejemplo, en los trasplantes autólogos, en el caso de injertos de venas, arterias o nervios, se requiere de un segundo sitio quirúrgico, que puede quedar con afectación sensible, motora o ambas[1], además hay dificultades para obtener donadores compatibles. Como resultado de estas complicaciones, el interés de la comunidad médica y científica por el avance de la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos (IT) y el uso de terapias celulares ha ido en aumento.

La IT es un campo joven de investigación, el cual se define como "... un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido"[2]. La IT puede ser utilizada en la restauración de algunos órganos como corazón y riñón, así como de cartílago, hueso y nervios periféricos[3-5].

Uno de los principales métodos de la IT implica el crecimiento *in vitro* de las células de manera tridimensional (3D), como lo harían en el órgano o tejido[6]. No obstante, las células normalmente carecen de la capacidad de crecer en una orientación 3D y así definir la forma anatómica del tejido. En su lugar, migran al azar para formar una capa celular de dos dimensiones (2D). Sin embargo, los tejidos 3D son necesarios y esto se

logra mediante la siembra de las células sobre matrices porosas, conocidas como andamios, al que las células se adhieren y colonizan [7-8]. El andamio por lo tanto, es un componente muy importante para la IT. Según su tipo, estos andamios pueden ser naturales o sintéticos [9], en la cuadro 1 se muestran las ventajas y desventajas de cada uno, así como el material del que pueden estar hechos.

Es importante señalar que el andamio debe proveer las condiciones y el ambiente necesario para que pueda ocurrir una adecuada regulación celular (adhesión, migración, proliferación y diferenciación), así como permitir el adecuado suministro de factores bioactivos (de crecimiento y adhesión) [10].

Algunas investigaciones recientes indican que una matriz obtenida a partir de un proceso denominado descelularización, puede proporcionar numerosas ventajas para la IT en la restauración de ciertos órganos o tejidos [11].

### **1.1 Matrices a partir de materiales sintéticos**

Los materiales sintéticos utilizados para la creación de matrices pueden ser a base de polímeros (ej. ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico (PLA), de péptidos o de cerámica, a partir de los cuales se pueden hacer andamios que permiten la regeneración de hueso, cartílago, nervios y algunos órganos como corazón y riñón [12].

Los materiales sintéticos ofrecen algunas ventajas, incluyendo la reproducibilidad, debido a su composición química definida y la capacidad de controlar las propiedades mecánicas y dar la forma requerida. Las propiedades mecánicas de un andamio pueden influir en la diferenciación de las células madre, mientras que la capacidad de dar forma a un material

permite la producción de andamios que se ajustan a las especificaciones de la lesión o sitio de trasplante[13].

Sin embargo, es importante mencionar que los materiales sintéticos también sufren de varias limitaciones, tales como la vascularización ineficaz, una pobre distribución y organización celular, una baja densidad celular final[14], además de otras consideraciones que incluyen la biocompatibilidad del material y su idoneidad para el trasplante *in vivo*, así como la posibilidad de que el material y sus derivados puedan desencadenar una respuesta inmune[15]. Es por estas razones, que en ocasiones se opta por matrices a partir de materiales naturales, que tienen ciertas ventajas sobre las sintéticas, como se menciona en el siguiente apartado.

## **1.2 Matrices a partir de materiales naturales**

Los diferentes componentes que constituyen la matriz extracelular (MEC), proporcionan un punto de partida para el desarrollo de los andamios que se basan en materiales naturales. Estas matrices se pueden dividir en dos tipos: biomateriales basados en proteínas y biomateriales basados en polisacáridos. Dentro de la primera clasificación, puede ser colágeno, fibrina y seda, los cuales se pueden utilizar en la regeneración de cartílago, hueso, nervios, etc. Para la segunda clasificación, los materiales empleados son polisacáridos como la agarosa, alginato, ácido hialurónico y quitosano que se emplean en la regeneración de cartílago, nervios y algunos órganos como la piel y el riñón[16-17].

Estas proteínas y polisacáridos desempeñan muchas funciones *in vivo*, por lo que son materiales atractivos para aplicaciones de IT. Además, su origen natural a menudo significa que estos materiales contienen sitios para la adhesión celular y tienden a ser

**“Descelularización de Nervio Ciático de Rata y su Posterior  
Recelularización *in vitro* con Células de Schwann”**

biocompatibles. Algunas de las desventajas de estos materiales incluyen un alto potencial de variabilidad, dependiendo de la fuente, así como la necesidad de garantizar la pureza de la proteína o polisacárido antes de la implantación, para evitar la activación de una respuesta inmune que pueda generar rechazo[18].

Este tipo de andamios naturales pueden ser obtenidos por un proceso denominado descelularización, y posteriormente se pueden recelularizar con células autólogas maduras o con células madre. Éstas presentan grandes ventajas para la IT, tales como una composición química ideal, la preservación de la estructura de la vascularización y una estructura tridimensional perfecta[19].

**Tabla 1.** Materiales naturales y sintéticos empleados en la generación de matrices, así como sus ventajas y desventajas [12-19].

	<b>Andamios Naturales</b>	<b>Andamios Sintéticos</b>
<b>Materiales utilizados</b>	Proteínas (colágeno, fibrina y sílice) y polisacáridos (agarosa, alginato, ácidohialurónico y quitosano).	Polímeros (PGA y PLA), péptidos y cerámica.
<b>Aplicación</b>	Regeneración de cartílago, nervios y algunos órganos como la piel y el riñón.	Regeneración de hueso, cartílago, nervios y algunos órganos como corazón y riñón.
<b>Ventajas</b>	Contienen sitios para la adhesión celular y tienden a ser biocompatibles.	Reproducibilidad, composición química definida, capacidad de controlar las propiedades mecánicas y dar forma independiente.
<b>Desventajas</b>	Potencial de variabilidad, riesgo de respuesta inmune sino se garantiza la pureza de la proteína o del polisacárido antes de la implantación.	Vascularización ineficaz, pobre distribución y organización celular, baja densidad celular final, posibilidad de respuesta inmune.

### **1.3 Técnicas de descelularización**

El proceso de descelularización lleva diferentes etapas, pero la matriz finalmente obtenida mantiene la conformación espacial del tejido previamente tratado[20]. Hay dos técnicas principalmente empleadas para descelularizar un órgano o tejido de interés: la conservación en frío y un proceso a base de detergentes. A pesar de las diferencias inherentes, ambas técnicas tienen por objetivo: (1) reducir la inmunogenicidad del injerto mediante la eliminación de los componentes celulares, y (2) mejorar la capacidad de regeneración a través de la preservación de la MEC[21].

La técnica de conservación en frío desarrollada en la Universidad de Wisconsin (UW) consiste básicamente en colocar el órgano o tejido a descelularizar directamente en placas de cultivo, en una solución de preservación mezclada con tacrolimus y almacenarlo en condiciones estériles a 4°C durante un período de 7 semanas antes de la implantación, tiempo durante el cual, la solución de preservación se tiene que estar cambiando[22]. Esta técnica ha demostrado eliminar efectivamente la antigenicidad de las matrices, además de que permite la conservación efectiva de las láminas basales nativas, permitiendo una buena regeneración. Sin embargo, la aplicación clínica de esta técnica ha sido limitada debido a los tiempos de procesamiento largos; como resultado, las matrices obtenidas por conservación en frío se han empleado principalmente como una herramienta en el campo de la investigación[23].

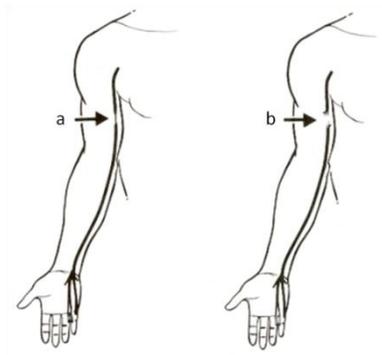
Por otra parte, la técnica basada en el uso de detergentes, fue desarrollada inicialmente en un esfuerzo para eliminar de manera más eficaz los restos celulares, evitando al mismo tiempo los efectos destructivos de la congelación-descongelación de la técnica anterior. Aunque los primeros protocolos para descelularizar dependían en gran medida del uso de desoxicolato de sodio, Tritón X-100, y agua desionizada[24], estudios más

recientes han optimizado el proceso utilizando tratamientos químicos menos agresivos. Específicamente, Moore y colaboradores mencionan que los órganos expuestos repetidamente a soluciones de agua desionizada, sulfobetaína-10 (SB-10), y Tritón X-200/sulfobetaína16 (SB-16) durante un período de 4 días, mostraron una conservación superior de la MEC nativa, al igual que un mayor nivel de descelularización en comparación con las técnicas anteriores de procesamiento químico[25].

No obstante, a pesar de que la técnica de descelularización basada en el uso de detergentes presenta ventajas adicionales respecto a la técnica de conservación en frío, aún es necesario que estudios *in vivo* demuestren si existe un aumento en la capacidad regenerativa y la recuperación funcional después del trasplante.

#### **1.4 Uso de matrices en la regeneración de lesiones en nervios periféricos**

Las lesiones en nervio periférico (LNP) son un problema de salud grave para la sociedad, afectando a 2.8% de los pacientes traumatizados, muchos de los cuales adquieren una discapacidad a largo plazo y los costos socioeconómicos relacionados son altos. Las LNP resultan en la interrupción parcial o completa de la fisiología normal del nervio[26](figura 1).



**Figura 1.** En el esquema (a) se representa un nervio normal, mientras que en el (b), se observa una interrupción del nervio periférico.

Los nervios periféricos que se interrumpen por un traumatismo o resección quirúrgica requieren de la reaproximación de sus extremos, dado que el sistema nervioso periférico es capaz de llevar a cabo un proceso de regeneración cuando los dos extremos de los nervios cortados pueden volverse a unir por una anastomosis directa en el caso de una lesión pequeña. Sin embargo, en el caso de lagunas nerviosas más largas, se requiere de un injerto del nervio[27].

El estándar de oro para la reconstrucción de lagunas nerviosas, es el uso de un autoinjerto de nervio[28]; no obstante, actualmente se está buscando una nueva alternativa, ya que este método tiene algunas desventajas. Es por eso que la IT en el sistema nervioso periférico une los esfuerzos de los médicos, ingenieros y biólogos hacia una meta común de crear canales de guía, de nervios tubulares naturales o sintéticos como alternativas a los autoinjertos nerviosos. Estas estructuras tienen como función: ayudar a la organización de los axones que brotan directos desde el extremo del nervio de regeneración, proporcionando además un conducto para la difusión de los factores neurotróficos secretados por las terminaciones nerviosas dañadas y reducir al mínimo la infiltración de tejido fibroso[29].

### **1.5 Reparación de lesiones de nervios periféricos por autoinjertos**

La neurotmesis de un nervio periférico, es la rotura anatómica del axón y de los tejidos conectores debido a una lesión traumática, tiene un pronóstico particularmente malo y requiere la rápida realineación quirúrgica por neurorrafia primaria o la implantación de un injerto autólogo. La neurorrafia primaria, consiste en la realineación quirúrgica de fascículos individuales en los seres humanos y es la opción de tratamiento principal para pequeños defectos que pueden ser puenteados sin tensión, pero si la diferencia es mayor

a varios milímetros, un nervio donante se cosecha y se implanta quirúrgicamente, para formar una vía continua para la regeneración[30].

Como ya se había mencionado, el autoinjerto de un nervio es el estándar de oro para la reconstrucción de lagunas nerviosas. A pesar de las ventajas que esta técnica ofrece, como una respuesta inmune limitada y una fuente de tejido fácilmente disponible, también tiene varias limitaciones inherentes, algunas de ellas son que la cosecha de un autoinjerto requiere un segundo sitio de cirugía, resultando en la pérdida sensorial del sitio donante y teniendo el potencial para la formación de un neuroma que resulta en dolor. Una alternativa a los autoinjertos nerviosos es trasplantar un aloinjerto acelular para cerrar la brecha entre los dos extremos de los nervios seccionados [31].

### **1.6 Reparación de lesiones de nervios periféricos por aloinjertos**

La morbilidad asociada con la cosecha autógena de injerto de nervio ha motivado a los investigadores a participar en la búsqueda de alternativas para mejorar el proceso de regeneración del nervio periférico en los pacientes. Una alternativa a los autoinjertos son los aloinjertos nerviosos. Los aloinjertos nerviosos pueden ser obtenidos de cadáveres, por lo que ofrecen ciertas ventajas como una disponibilidad abundante, un mayor potencial en cuanto al tamaño, la longitud y la especificidad sensorial del nervio; además, contienen una microestructura que proporcionan el mismo nivel de apoyo regenerativo que los autoinjertos[25].

Empero, los aloinjertos requieren de una inmunosupresión sistémica en el paciente durante aproximadamente 18 meses. Esta inmunosupresión permite que los axones y las células de Schwann (SC) se regeneren a través del armazón del aloinjerto, pero deja al paciente vulnerable a las infecciones y a la formación de tumores. Por estas razones, los

aloinjertos de nervios descelularizados se han convertido en una alternativa atractiva al aloinjerto nervioso, ya que son capaces de actuar como un andamio para la regeneración de los axones, y a la vez eludir la necesidad de inmunosupresión. Cabe mencionar que se han desarrollado modelos experimentales para la descelularización de aloinjertos nerviosos, pero aún no se han presentado datos clínicos[32].

### **1.7 Importancia del microambiente en la regeneración**

Aunque los injertos de nervios que se vuelven acelulares mediante procesos químicos provocan poca o ninguna respuesta inmune, los métodos de procesamiento actuales resultan en una regeneración deficiente. Se cree que el principal obstáculo en el desarrollo de un aloinjerto nervioso es la falta de un entorno adecuado que facilite la regeneración[30].

La regeneración nerviosa periférica después de la lesión, depende de las señales ambientales y de apoyo trófico. Las SC secretan factores tróficos que promueven la supervivencia neuronal y ayudan a guiar a los axones durante la regeneración. La adición de SC en aloinjertos acelulares de nervios, es una estrategia prometedora para la mejora de la regeneración de nervios periféricos[33]. Las SC son las principales células gliales en el sistema nervioso periférico y desempeñan un papel indispensable en la regeneración del nervio periférico. Se convierten en el primer y más utilizado tipo de células de apoyo, para la introducción en el andamio de aloinjertos de nervios en la IT, lo que mejora la regeneración nerviosa en estudios experimentales. Por otro lado, el uso de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y otras moléculas bioactivas para aloinjertos nerviosos, también han demostrado que ejercen efectos positivos sobre la regeneración del nervio periférico[34].

## **CAPITULO II**

### **JUSTIFICACION**

Debido a la morbilidad asociada con la obtención autógena de una porción de nervio para utilizarlo como injerto y de que se requiere de un segundo sitio quirúrgico, así como el hecho de que ni en México, ni en América Latina, se cuenta con un protocolo definido para la generación de aloinjertos nerviosos descelularizados y debido a que estos aloinjertos tienen algunas ventajas con respecto a los autoinjertos, como: 1) su fácil disponibilidad, 2) no crean una reacción inmune en el paciente y 3) pueden proporcionar una microestructura que ofrezca el mismo nivel de apoyo regenerativo que los autoinjertos; es necesario continuar con la búsqueda de nuevas alternativas experimentales que contribuyan a mejorar el proceso de regeneración de nervios periféricos en los pacientes que lo requieran.

Es por eso, que en el presente trabajo se desarrolló un protocolo para el proceso de descelularización y reelularización *in vitro* de nervio ciático de rata con células mesenquimales de tejido adiposo, obtenidas también de rata y diferenciadas *in vitro* a células de Schwann.

## **CAPITULO III**

### **OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Descelularizar nervios ciáticos de rata y posteriormente recelularizarlos *in vitro* con células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata, diferenciadas a células de Schwann para trasplantarlos en ratas y evaluar su regeneración.

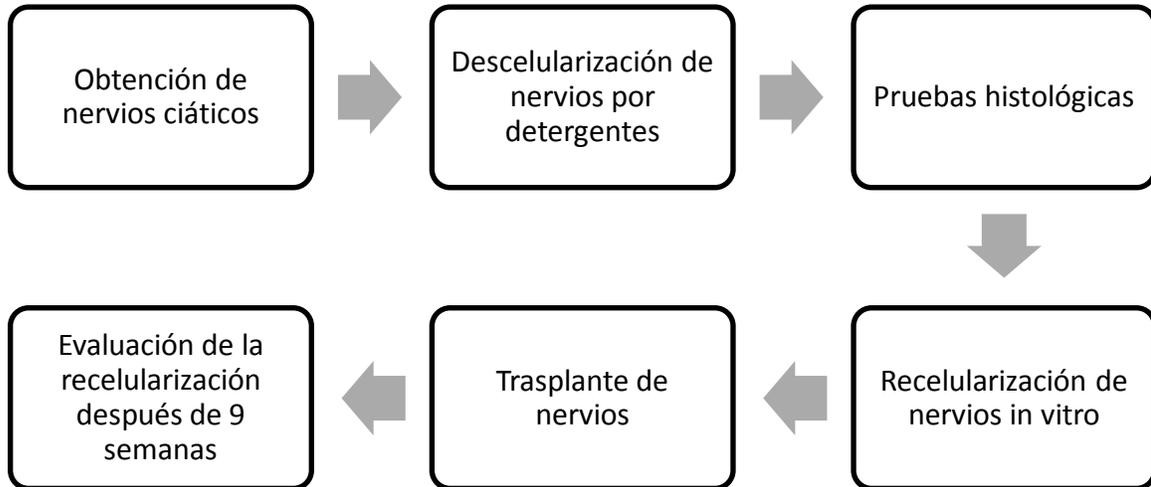
#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Optimizar el método de descelularización.
2. Comprobar mediante pruebas histológicas que el nervio fue descelularizado completamente y que se conserva en buen estado la matriz extracelular.
3. Recelularizar el nervio *in vitro* con células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata, diferenciadas a células de Schwann.
4. Comprobar mediante pruebas histológicas la recelularización del nervio trasplantado en ratas.

## CAPITULO IV

### MATERIALES Y METODOS

#### 4.1 Estrategia General



#### 4.2 Descelularización de nervio ciático de rata.

Se extrajeron nervios ciáticos de ratas Wistar adultas, los segmentos de nervios eran de aproximadamente 15mm de longitud. Los nervios ciáticos extraídos se dividieron en tres grupos. Primero, todos los grupos se sumergieron en agua destilada, la cual fue sustituida cada 2h durante un período de 10h. Enseguida, los nervios se expusieron a Tritón X-100(SIGMA-ALDRICH®, San Luis, MO, Estados Unidos) durante toda la noche, el primer grupo a una concentración del 1%, el segundo del 2% y el tercero del 3%. Se continuó con un período de 24h de agitación (500rpm) en una solución de desoxicolato de sodio(SIGMA-ALDRICH®), igualmente se usaron distintas concentraciones para cada grupo, siendo para el primer grupo una concentración del 1%, para el segundo del 2.5% y para el tercero del 4%. Este proceso se repitió por 5, 9, 12 y 15 días para cada grupo. El

proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad y a temperatura ambiente (TA). Por último, se realizó un lavado final en agua destilada y los nervios se almacenaron en buffer PBS 1X, pH 7,2 a 4 ° C hasta su uso para incluirse en parafina y realizar los cortes correspondientes.

### **4.3 Pruebas histológicas**

Los nervios se fijaron con glutaraldehído al 2.5% durante 24h, enseguida se procesaron mediante la técnica histológica descrita en el anexo 1.1, luego se incluyeron en parafina y se realizaron los cortes correspondientes para las siguientes tinciones:

**a) Tinción de Hematoxilina-Eosina (H y E).** Se realizaron cortes de 5 µm, se montaron en laminillas y luego se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Se sumergieron en hematoxilina (ANALYTYKA INC., D.F., México) por 2 min, se lavaron dos veces con agua corriente, se realizó una inmersión rápida en alcohol ácido, se lavaron de nuevo con agua corriente, se hicieron dos inmersiones rápidas en agua amoniacal 1%, se enjuagó con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Enseguida, se realizaron 9 inmersiones de los cortes en eosina (ANALYTYKA INC.). Por último, se deshidrató, aclaró y montó en resina (ver anexo 2.2).

**b) Tinción Tricrómico de Masson (TCM).** Se hicieron cortes igualmente de 5µm, se montaron en laminillas y luego se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Después se usó como mordiente el fijador de Bouin durante toda la noche a TA. A continuación, se enjuagaron los cortes en agua corriente hasta que el color amarillo desapareció y luego se enjuagaron en agua destilada. Se pasaron los cortes a hematoxilina férrica de Weigert (Fisher Scientific®, Waltham, MA, Estados Unidos) por 10 min, se lavó con agua corriente y enseguida con agua destilada. Se tiñó con la solución de fúosina ácida (Fisher

Scientific®)-escarlata de Biebrich (CTR SCIENTIFIC, NL, México) por 5 seg, se lavó con agua destilada varias veces hasta que dejó de teñirla. Se pasaron los cortes a la solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (CTR SCIENTIFIC) por 10 min y se enjuagó brevemente con agua destilada. Se tiñó con la solución de azul de anilina (EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, NY) por 15 seg y se lavó con agua destilada, hasta que se eliminó el exceso de colorante. Luego, los cortes se pasaron por ácido acético durante 2 min. Por último se deshidrató, aclaró y montó (ver anexo 2.2).

**c) Tinción de Klüver-Barrera (K-B).** Se hicieron cortes de 7  $\mu\text{m}$ , se montaron en laminillas y luego se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Los cortes se dejaron toda la noche en azul de luxol (SIGMA-ALDRICH®) a 50°C. Posteriormente, se enjuagó con etanol 96° para eliminar el exceso del colorante y luego con agua destilada. Enseguida, se hizo una inmersión en carbonato de litio ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) 0.05% (p/v) (Merck® KGaA, Darmstadt, Alemania) para producir la diferenciación. Para continuar con la diferenciación, se colocó el corte en etanol al 70% hasta obtener un matiz gris y blanco y se enjuagó con agua destilada. Para terminar con la diferenciación, se enjuagó en  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  y enseguida se pasó por varios cambios de etanol al 70% hasta que tomó un color azul verdoso la parte más teñida y gris, la menos teñida y se enjuagó con agua destilada. Después se colocó en violeta de cresilo (Merck®) por 10 min y luego se colocó en varios cambios de etanol 96°. Por último se deshidrató, aclaró y montó (ver anexo 2.2).

**d) Tinción de Marsland, Glees y Erickson (M-G-E).** Se realizaron cortes de 10  $\mu\text{m}$ , se montaron en laminillas y se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Luego los cortes se lavaron en agua desionizada. Enseguida, se colocaron las laminillas en nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Merck®) por 45 min a 37°C. Luego, se lavaron los cortes en formalina 10% (ANALYTYKA INC.) aproximadamente 15 seg, se colocaron en  $\text{AgNO}_3$  amoniacal por 90

seg, se lavaron de nuevo en formalina 10% por 1 min y después con agua desionizada. Posteriormente, se fijó la reacción con tiosulfato de sodio al 5% (Merck®) durante 5 min y se lavó con agua desionizada. Por último, se deshidrató, aclaró y montó en resina (ver anexo 2.2).

**e) Inmunohistoquímica.**

Se realizaron cortes de 4µm, se montaron en laminillas silanizadas (Fisher Scientific®) y se desparafinizaron (ver anexo 2.1). Primero, se realizó la exposición de antígenos en solución recuperadora de antígenos (por sus siglas en inglés TRS, Target Retrieval Solution)(Abcam®, Cambridge, Inglaterra, Reino Unido) por 20 min, enseguida tanto los controles de técnica como las muestras fueron colocadas en TBST (Abcam®) durante 5 min, después se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% (Abcam®) durante 10 min a 37°C, se hizo un lavado con TBST durante 5 min y después se colocó el Anticuerpo primario, los cortes se incubaron a 4°C durante toda la noche. Se emplearon anticuerpos primarios para detectar Proteína Básica de la Mielina (por sus siglas en inglés MBP, Myelin Basic Protein) (Dako®, Carpintería, CA, USA) y Neurofilamentos (NF) (Dako®). Luego se lavaron con TBST, se agregó el Ac secundario del Kit de detección Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC de Abcam®, se incubaron a 37 °C por 30 min y se volvieron a lavar con TBST, después se agregó la solución de estreptavidina-HRP (Abcam®), de la misma manera se incubaron a 37 °C por 30 min y se volvieron a lavar con TBST. Enseguida se les añadió el 3-3' diaminobenzidina (DAB) (Abcam®) durante 10 min. Por último, se retiró el DAB y se lavaron las muestras y los controles con agua destilada para después contrateñir con Hematoxilina de Gill, y después deshidratar gradualmente con soluciones crecientes de etanol (70-100%) hasta llegar a xilol, para enseguida montar las laminillas con Entellan.

#### **4.4 Aislamiento de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (CMM-TA).**

Las células madre mesenquimales se obtuvieron a partir de tejido adiposo de rata Wistar. El tejido se colocó en PBS estéril con el antibiótico gentamicina, 50 µg/mL (LABORATORIOS QUIMICA SON'S, S.A. DE C.V., Puebla, México), y anfotericina B, 0.25 µg/mL (GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA), como antimicótico. Después dentro de la campana de cultivo, la muestra se colocó en una caja de petri y se fragmentó el tejido con un bisturí hasta obtener fragmentos pequeños. Luego, se realizaron lavados con PBS estéril adicionado con antibiótico y antimicótico, mezclando por inversión y dejando reposar para que se llevara a cabo la separación de las fases, se eliminó la fase superior y se repitió el proceso hasta que la fase inferior se observara clara.

Después se llevó a cabo la digestión agregando una solución de PBS estéril, con Colagenasa tipo I, 200U/mL (GIBCO®/INVITROGEN™), con la misma mezcla de antibiótico/antimicótico mencionada anteriormente. La muestra se incubó a 37 °C con agitación suave durante 1h, hasta observar una mezcla más homogénea y espesa. Al terminar el proceso de digestión se añadió PBS adicionado con antibiótico/antimicótico, se mezcló suavemente y después se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. En el precipitado se mantuvo una pequeña cantidad de adipocitos y células mesenquimales. Luego se descartó el sobrenadante, y la pastilla de células se resuspendió con PBS adicionado con antibiótico/antimicótico y se volvió a centrifugar, este proceso se repitió 2 veces más. Por último, las células se resuspendieron en medio MEM – Alpha+ Glutamax™-I (GIBCO®/INVITROGEN™) adicionado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (GIBCO®/INVITROGEN™) y antibiótico/antimicótico. Las células se sembraron en

botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> incubándolas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. A los 3 días se les realizó el cambio de medio y se dejó expandir el cultivo. Cuando el cultivo llegó al 80-90% de confluencia, las células se cosecharon utilizando tripsina al 0.25% (GIBCO®/INVITROGEN™) y se dividieron en partes iguales en dos botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> para seguir expandiéndolas.

#### **4.5 Diferenciación de las CMM-TA a células de tipo Schwann con factores de diferenciación.**

Se realizó la diferenciación a partir de las células del tercer pase. Las células fueron lavadas con PBS y se les cambió el medio MEM-Alpha + Glutamax™-I, al cual se le adicionó con β-Mercaptoetanol 1mM (SIGMA-ALDRICH®). A las 24 h, se cambió el medio y se agregó medio MEM-Alpha+ Glutamax™-I con SBF al 10% adicionado con ácido transretinoico (ATRA) 0.1mM (Calbiochem®, ©MerkKGaA, Darmstadt, Alemania), este medio se dejó por 72 h. Finalmente, a las células se les agregó medio MEM-Alpha + Glutamax™-I adicionado con SBF al 10%, forskolina 5mM (Calbiochem®), factor de crecimiento de fibroblastos humano recombinante-b (bFGF) 10ng/mL (PEPROTECH, INC., Rocky Hill. NJ, USA), factor de crecimiento derivado de plaquetas humanas recombinante-AA (PDGF-AA) 10 ng/mL (PEPROTECH, INC.) y 1β-herregulina humana recombinante 200 ng/mL (PEPROTECH, INC.). Este último medio se conservó de 2 a 8 días, renovándose de acuerdo al crecimiento de las células.

#### **4.6 Recelularización del nervio.**

El nervio descelularizado se puso en contacto con una suspensión de células de Schwann de rata diferenciadas (drSC), enseguida se centrifugó a 3000 rpm por 5min, se incubó por 48h a 37°C y posteriormente se trasplantó a las ratas receptoras [35].

#### **4.7 Procedimiento quirúrgico.**

Ratas Wistar de entre 230 – 250g se anestesiaron por vía intraperitoneal con ketamina (90mg/Kg) y xilacina (10mg/Kg), enseguida el sitio quirúrgico fue rasurado y se esterilizó con etanol al 70%. A continuación, se hizo una incisión en la piel a lo largo del eje femoral, se separaron los músculos del muslo y se localizó el nervio ciático. Usando un castroviejo, se seccionó el nervio en un segmento aproximadamente de 15mm, dicho segmento se invirtió y se suturó microquirúrgicamente al cabo proximal y distal usando una sutura de 10.0 (Grupo I: Autoinjerto, n=3). Del mismo modo, a otro grupo de ratas les fue removido el segmento del nervio y se trasplantó un aloinjerto nervioso descelularizado (Grupo II: Descelularizado, n=3) o un aloinjerto nervioso recelularizado (Grupo III: Recelularizado, n=3). Por último, se usó un grupo Sham (Grupo IV: Sham, n=3), al cual solo se le hizo la incisión y manipulación del nervio, pero éste no se segmentó.

#### **4.8 Evaluación funcional: Medición del índice de función ciática (por sus siglas en inglés, SFI, sciatic functional index).**

Las ratas fueron evaluadas funcionalmente durante un período de 9 semanas con intervalos de una semana, para ello se les pintaron las patas traseras con tinta y se hicieron pasar por un túnel de un extremo a otro sobre una hoja blanca. Una vez obtenidas las huellas se les hicieron las siguientes mediciones:

- Longitud de la huella (PL): distancia del talón al dedo del medio.
- Longitud externa (TS): distancia del primer al quinto dedo.
- Longitud interna (ITS): distancia del segundo al cuarto dedo.

Las tres medidas fueron tomadas tanto de la pata experimental como de la pata control, para después mediante la siguiente fórmula calcular el SFI:

$$SFI = -38.3 \left( \frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left( \frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left( \frac{BIT - NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

Donde E= pata experimental y N=pata control

#### **4.9 Análisis estadístico**

Para llevar a cabo el análisis que permitiera cuantificar la cantidad de mielina en los nervios después de las 9 semanas de recuperación tanto para el cabo proximal y distal, de cada muestra se tomaron 8 campos consecutivos y se analizaron con el programa ImageJ para obtener un valor de densidad. Para el análisis estadístico se aplicó un ANOVA, considerando como significativos los resultados que presentaron un valor de  $p < 0.05$ .

Para analizarla diferencia entre grupos con respecto al valor del SFI, también se utilizó una prueba de ANOVA.

Por último, para comprobar si había una mejoría significativa en base a la evaluación funcional entre la semana 1 y la semana 9 en cada uno de los grupos, se aplicó una prueba t de Student para muestras relacionadas, igualmente considerando como significativos los resultados que presentaron un valor de  $p < 0.05$ .

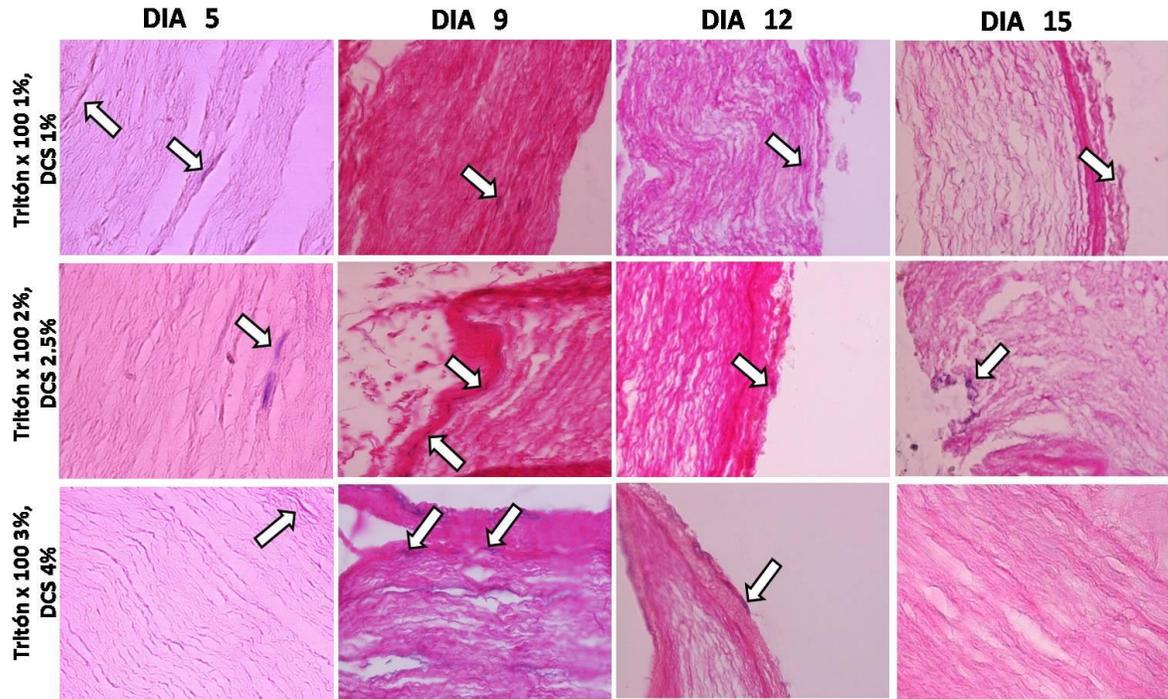
## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS**

#### **5.1 Descelularización del nervio ciático y conservación de la MEC.**

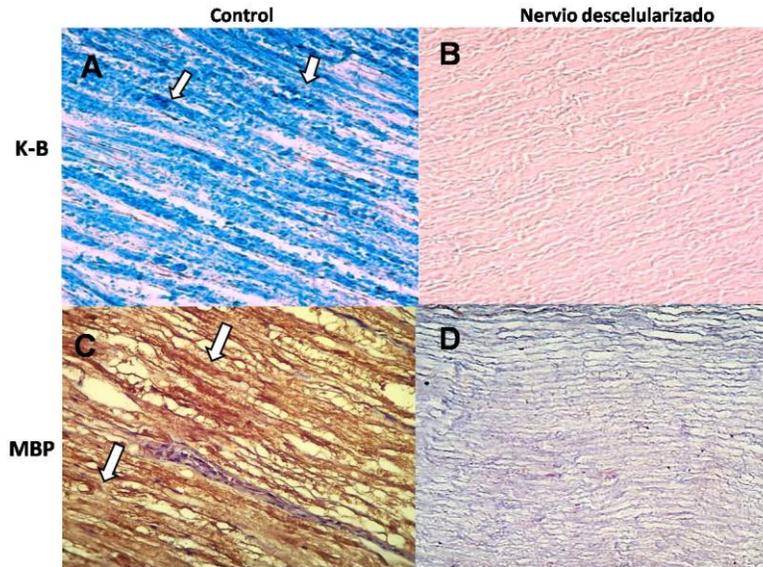
Para descelularizar el nervio se probaron diferentes concentraciones de los detergentes tritón X-100 y desoxicolato de sodio, así como diferentes periodos de tratamiento. La primera prueba histológica que se hizo una vez terminado el proceso de descelularización fue la de H y E, la cual se basa en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xanténico ácido (eosina). La hematoxilina oxidada y transformada en hemateína, nos permite observar los núcleos teñidos de color azul/negro; mientras que la eosina, aporta una gradación entre el rosa y el rojo al citoplasma y material extracelular[36].

En la figura 2 se puede observar que conforme va aumentando la concentración de los detergentes, así como el tiempo de exposición al tratamiento, los núcleos van perdiendo su integridad y se sitúan en la periferia del nervio hasta que en el día 15, a una concentración de tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio al 4% el nervio quedó completamente descelularizado.



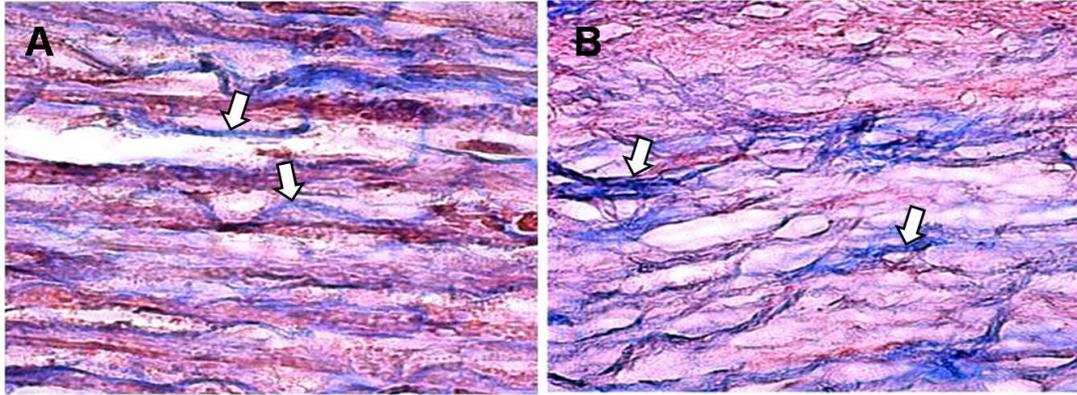
**Figura 2. Descelularización del nervio ciático con detergentes.** Segmentos de nervio ciático obtenidos de ratas, fueron tratados con diferentes concentraciones de tritón X-100 y desoxicolato de sodio e incubados por 5, 9, 12 y 15 días, posteriormente fueron teñidos con hematoxilina y eosina para determinar si las células se habían destruido y ya no se observaban núcleos. Las flechas blancas muestran los núcleos o remanentes de ellos.

Enseguida se realizó la tinción de K-By se usó un anticuerpo para detectar MBP y así comprobar que no había restos de mielina en el nervio tratado. En la tinción K-B, el azul de luxol tiene afinidad por los lípidos de la vaina de mielina, tiñéndola de color azul[37], como se señala con flechas en el recuadro A de la figura 3, por otro lado, en el recuadro B se muestra que en el nervio tratado, no hay presencia de mielina. En el recuadro C podemos ver el control positivo para la inmunotinción contra MBP donde la presencia de mielina se observa de un color marrón, mientras que en el recuadro D, que es el nervio tratado, no hay ninguna señal.



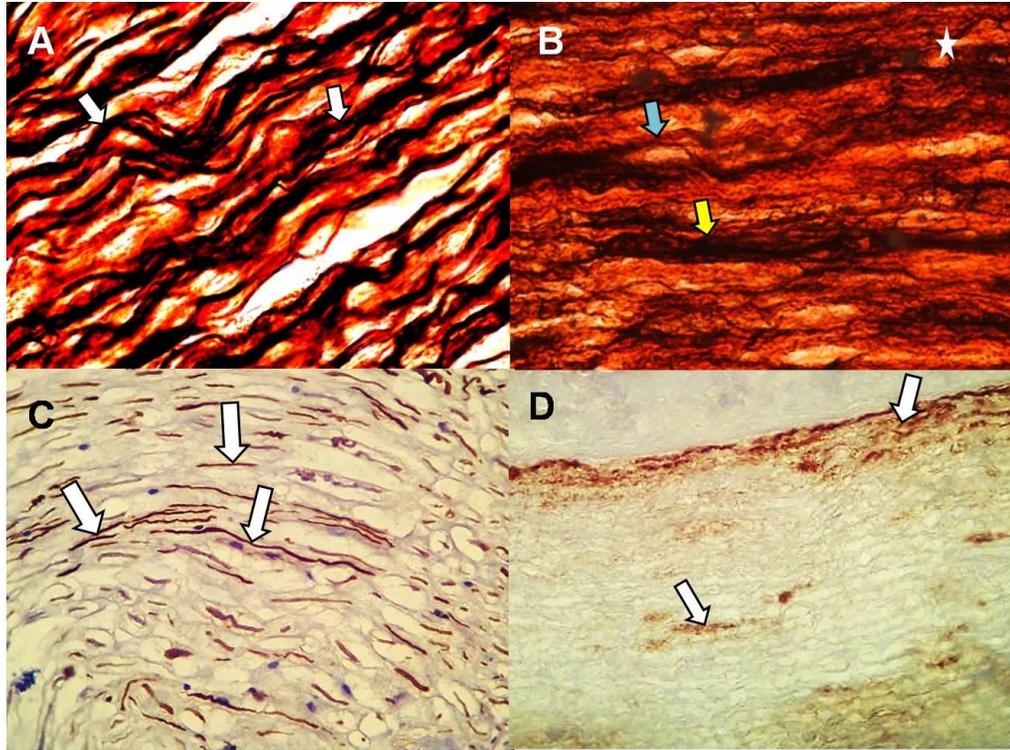
**Figura 3. Detección de mielina en el nervio descelularizado.** Se utilizó la tinción de K-B y MBP en el nervio descelularizado con tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio al 4% por un período de 15 días. Ay C son el nervio control, como testigo positivo; B y D son el nervio tratado donde ya no hay mielina.

Para comprobar que la MEC se conservaba en buen estado, se realizó la tinción de TCM, que es una técnica de coloración que permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular (de color café), el citoplasma (de color rojizo) y las fibras de colágeno (de color azul)[36]. En el recuadro B de la figura 4, donde se muestra el nervio tratado, podemos ver que las fibras de colágeno no presentan una diferencia notable en comparación con el control (figura 4, recuadro A), por lo que se puede decir que el tratamiento no afecta la MEC.



**Figura 4. Detección de colágeno tipo I en el nervio descelularizado.** Los nervios descelularizados fueron teñidos con TCM para comprobar si se conservaba la estructura de las fibras de colágeno después de los 15 días de tratamiento con detergentes. A) nervio sin tratar, como control positivo y B) nervio tratado.

De igual manera, se realizó la tinción de M-G-E con la cual se puede lograr una impregnación específica de la plata por los axones[38]. En el control (figura 5, recuadro A) se observa la presencia de axones bien conservados y uniformes; mientras, que en el nervio tratado (figura 5, recuadro B) se pueden observar alteraciones. Se notan algunos axones engrosados y otros más delgados, así como también la presencia de vacuolas que hacen que se pierda la trayectoria de éstos. En el recuadro C de la figura 5, se observa el nervio control para la detección de NF donde la positividad de color marrón muestra igualmente axones bien definidos, pero en el nervio tratado (figura 5, recuadro D) se pierde la positividad de éstos.

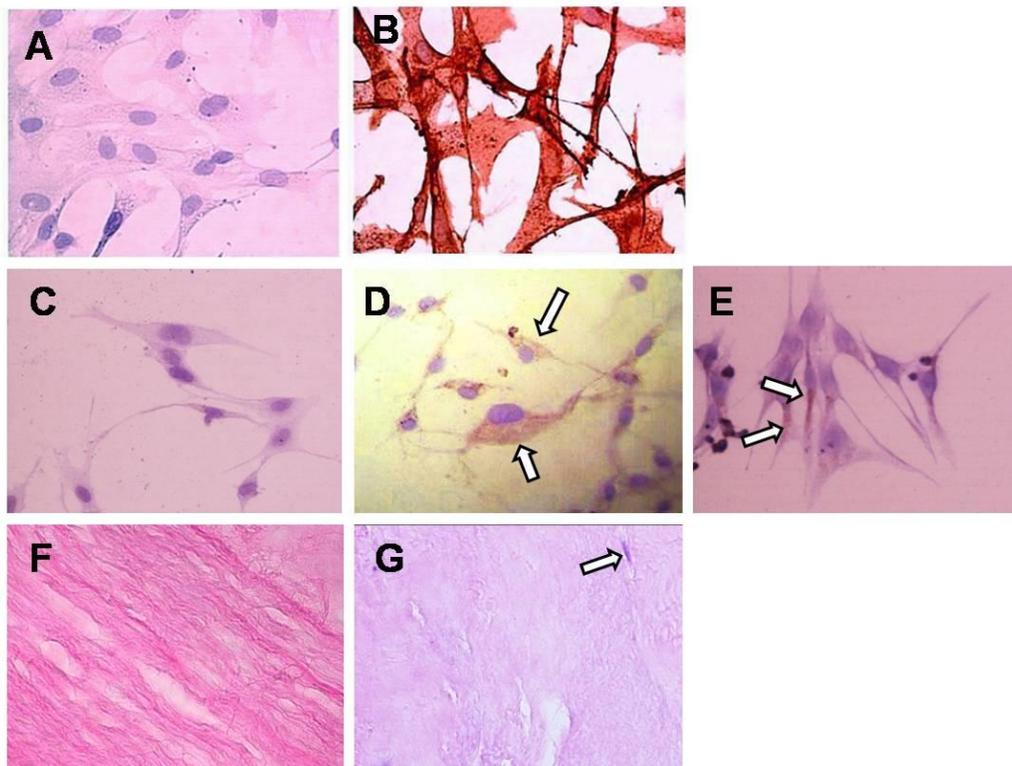


**Figura 5. Tinción de M-G-E e inmunohistoquímica para NF en el nervio descelularizado.** Los cortes de nervios tratados con tritón X-100 al 3% y desoxicolato de sodio al 4% por un período de 15 días, fueron teñidos con la técnica M-G-E. Las acotaciones en el recuadro B señalan alteraciones en la estructura del axón como: vacuolas (estrella), adelgazamiento (flecha azul), y engrosamiento (flecha amarilla); en el recuadro A las flechas blancas señalan la estructura normal de los axones. En el recuadro D está señalado, por flechas blancas, como disminuye la señal para NF en el nervio después del tratamiento en comparación con el control positivo (recuadro C), donde las flechas señalan la positividad para este marcador.

## 5.2 Recelularización del nervio *in vitro* con células madre mesenquimales de tejido adiposo de rata diferenciadas a células de Schwann.

Lo primero que se realizó fue la extracción de las CMM-TA de rata, una vez extraídas, éstas se caracterizaron mediante el marcador CD-105 que es específico para CMM [39], en la figura 6 (recuadro B) se puede ver la positividad para este marcador de color marrón. Enseguida, estas células se diferenciaron utilizando factores de diferenciación,

en los recuadro D y E (figura 6) se puede observar la positividad de color marrón en nuestras células diferenciadas para los marcadores GFAP (proteína ácida fibrilar glial) y S100 respectivamente, que son específicos para SC[40]. Una vez obtenidas las drSC se procedió a recelularizar el nervio, en el recuadro F) se puede observar un nervio descelularizado, mientras que en recuadro G), mediante una H y E, podemos observar la presencia de núcleos teñidos de un color morado, comprobándose así la recelularización.



**Figura 6. Caracterización de CMM-TA y drSC y recelularización de un nervio descelularizado con drSC.** A) Control negativo para CD-105, B) rCMM-TA muestran positividad para el marcador CD-105, C) Control negativo donde se omitió el anticuerpo primario, D) drSC muestran positividad para el marcador GFAP, E) drSC muestran positividad para el marcador S-100, F) Nervio descelularizado, donde no se observa ningún núcleo celular, G) Nervio recelularizado, se puede observar la presencia de un núcleo celular de color morado.

### **5.3 Evaluación de la recelularización del nervio trasplantado en ratas después de un período de recuperación de 9 semanas.**

El nervio trasplantado después de las 9 semanas de recuperación se disecó tomando aproximadamente 5mm antes de las suturas tanto en el cabo proximal (más cercano a la médula espinal), como en el cabo distal (más alejado de la médula espinal), para hacerle las tinciones correspondientes. En la figura 7 podemos observar una imagen representativa de cada grupo, en la primera fila tenemos la tinción de H y E con la cual podemos observar que en el nervio descelularizado, hay una recelularización uniforme, muy similar al nervio Sham y al autoinjerto. Sin embargo, en el recelularizado con células de Schwann, se observa una celularidad mayor, así como una alteración en la estructura en comparación con los otros tres grupos.

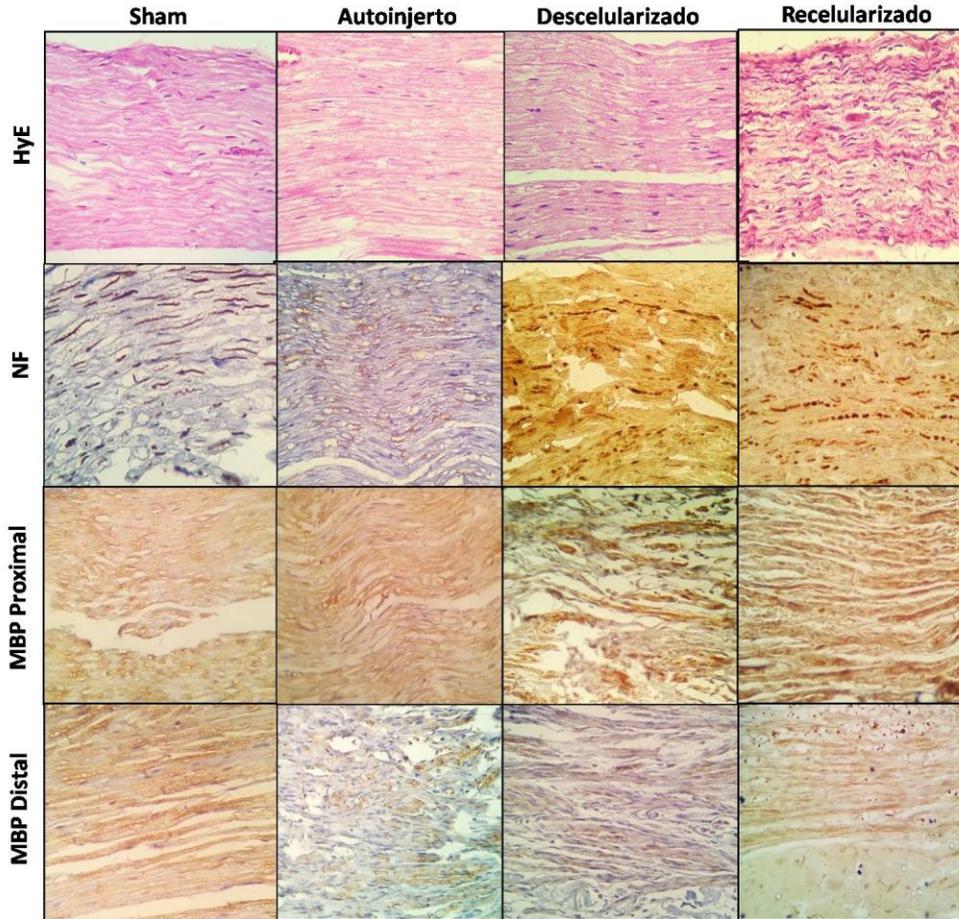
En el nervio descelularizado se pudo observar que después del proceso de descelularización, los axones perdían su integridad y presentaban alteraciones (figura 5B y 5D), sin embargo, en la figura 7 en la segunda fila, donde se muestra una inmunotinción para la detección de NF, se puede ver como en el nervio descelularizado y en el recelularizado después de las 9 semanas de recuperación, la integridad de los axones se ve restaurada en ambos casos.

La regeneración axonal es unidireccional y va del cabo proximal hasta llegar al cabo distal. Por ello para evaluar la remielinización del nervio trasplantado, se tomó una porción del cabo proximal y distal y haciendo uso de una técnica histológica llamada histoarreglo, la cual consiste en incluir en un mismo bloque de parafina un mayor número de muestras, lo que permite optimizar tiempo y reactivos, se les hizo la inmunotinción para la detección de MBP. En la figura 7 en la tercera fila, se observa como la porción del cabo proximal en los nervios descelularizado y recelularizado se ve remielinizada.

Mediante el programa ImageJ se realizó una cuantificación de la señal de MBP y en la figura 8, se puede observar que en los nervios descelularizado y recelularizado hay una mayor cantidad de mielina en comparación con el control.

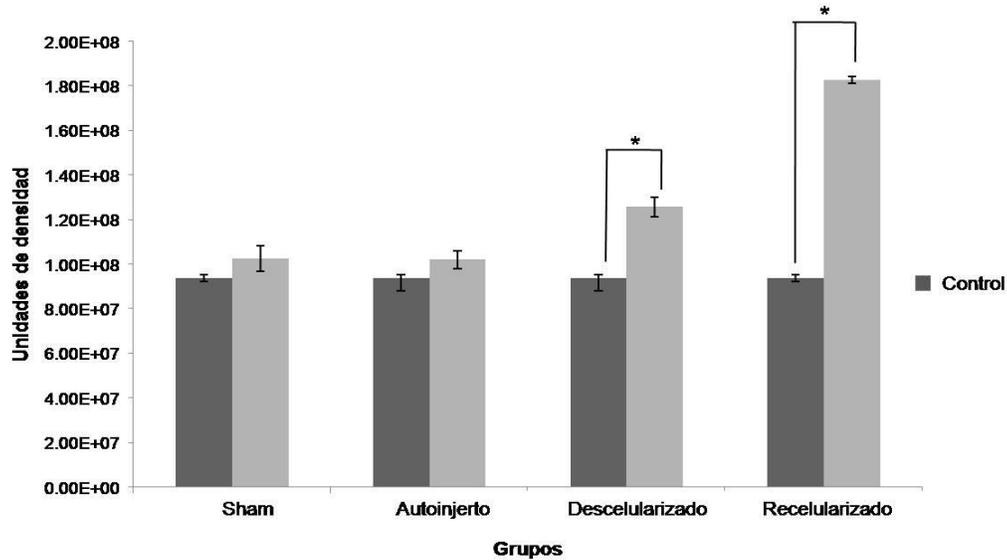
En la última fila de la figura 7 se muestra la porción del cabo distal, se puede ver que para los nervios de autoinjerto y descelularizado, la remielinización aún no ha alcanzado esa zona, sin embargo, en el nervio recelularizado la señal de mielina es notable. En la figura 9, se puede observar de forma cuantitativa que hay una menor cantidad de mielina en los grupos de autoinjerto, descelularizado y recelularizado con respecto al control. Sin embargo, si comparamos los grupos descelularizado y recelularizado con el autoinjerto (figura 10), que es el estándar de oro en la LNP, hay una mayor remielinización en los dos primeros grupos, siendo este incremento, en el caso del grupo de nervio recelularizado significativamente estadístico.

**“Descelularización de Nervio Ciático de Rata y su Posterior  
Recelularización *in vitro* con Células de Schwann”**

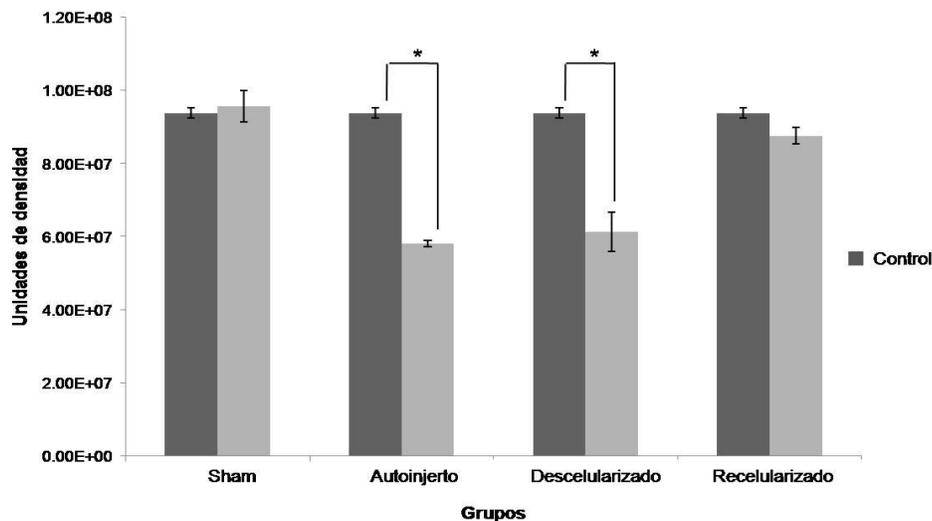


**Figura 7. Tinciones de los nervios recuperados nueve semanas después de su implantación en ratas.** En la primera fila se observa una imagen representativa de cada grupo con la tinción de H y E, el grupo descelularizado presenta una reelularización similar al grupo Sham y al autoinjerto; sin embargo, en el grupo reelularizado se observa una mayor cantidad de núcleo y una estructura menos ordenada. En la segunda fila se muestra la inmunohistoquímica para NF, se nota como la integridad en los axones se ve recuperada después de 9 semanas en los grupos de nervio descelularizado y reelularizado. Por último, la tercera y cuarta fila representan la inmunotinción para MBP en el cabo proximal y distal respectivamente; en el cabo proximal en todos grupos experimentales se ve una remielinización, sin embargo, en el cabo distal, para los grupos de autoinjerto y descelularizado, la remielinización aún no es completa.

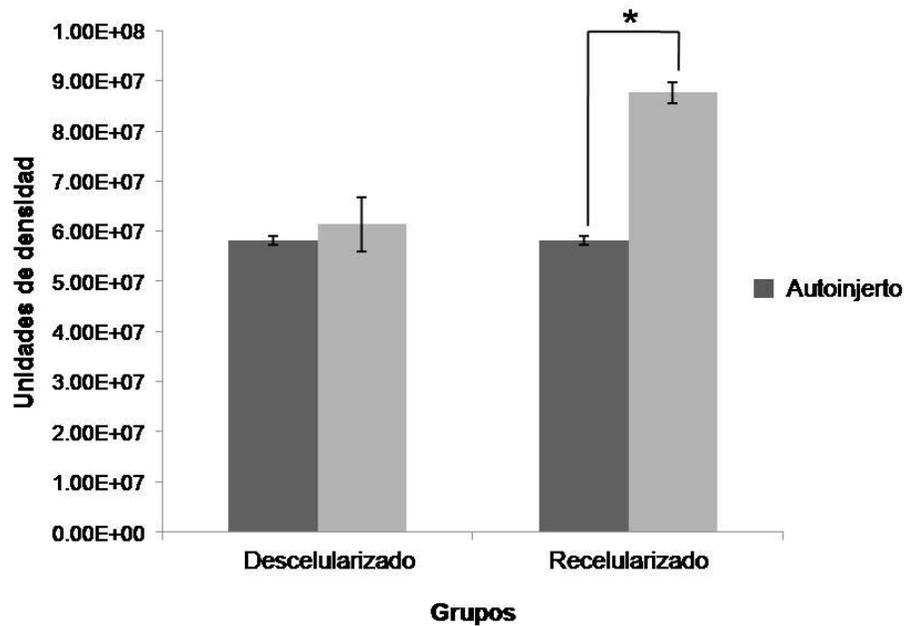
## “Descelularización de Nervio Ciático de Rata y su Posterior Recelularización *in vitro* con Células de Schwann”



**Figura 8.** Cuantificación de la señal de mielina en el cabo proximal. Se utilizó el programa Image J para medir las unidades de densidad correspondientes a la cantidad de mielina expresada en el cabo proximal después de las 9 semanas de recuperación para cada uno de los grupos. Los grupos descelularizado y recelularizado presentan mayor remielinización con respecto al grupo Sham y Autoinjerto.



**Figura 9.** Cuantificación de la señal de mielina en el cabo distal. Mediante el programa Image J se midieron las unidades de densidad correspondientes a la cantidad de mielina expresada en el cabo distal después de las 9 semanas de recuperación para cada uno de los grupos. Los grupos Autoinjerto y Descelularizado presentan una menor remielinización con respecto al Control, mientras que en el grupo Recelularizado esta diferencia no es estadísticamente significativa.



**Figura 10.** Comparación de la señal de mielina en el cabo distal con el estándar de oro. El grupo recelularizado presenta una mayor remielinización en el cabo distal en comparación con el autoinjerto.

#### 5.4 Evaluación funcional durante las 9 semanas de recuperación.

Para evaluar la funcionalidad del nervio ciático, se calculó el índice de función ciática para cada rata a lo largo de las 9 semanas. El índice de función ciática tiene valores de 0 a -100, siendo 0 el resultado más favorable y -100 es el menos favorable.

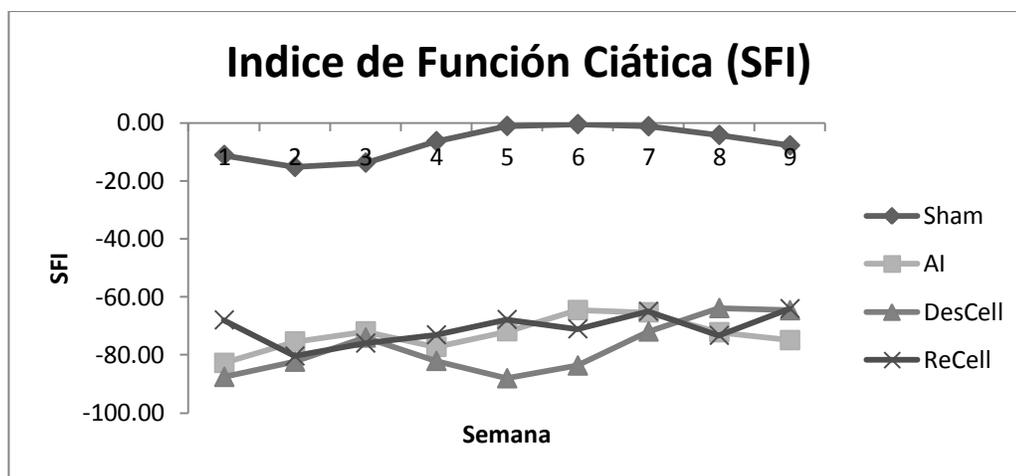
En la figura 11 se puede observar que el comportamiento del grupo Sham tiene SFI cercanos a 0 a lo largo de las 9 semanas, lo cual es un comportamiento normal. Se puede observar también que los grupos de autoinjerto, descelularizado y recelularizado a lo largo de las nueve semanas de observación, presentan un comportamiento similar y no hay diferencia significativa entre estos; sin embargo, si hay una diferencia significativa

**“Descelularización de Nervio Ciático de Rata y su Posterior  
Recelularización *in vitro* con Células de Schwann”**

entre el SFI de la semana 1 y el SFI de la semana 9 en el grupo de nervio descelularizado, representando una mejora a lo largo de las 9 semanas.

**Tabla 2.** Valores de SFI para los diferentes grupos durante 9 semanas de evaluación.

Semana	Sham	Autoinjerto	Descelularizado	Recelularizado
1	-11.12	-82.83	-87.64	-67.99
2	-15.26	-75.44	-82.40	-80.45
3	-13.76	-71.97	-74.06	-75.99
4	-6.36	-77.29	-82.12	-73.13
5	-1.11	-71.90	-88.10	-67.85
6	-0.48	-64.61	-83.71	-71.1
7	-1.22	-65.39	-71.98	-65.04
8	-4.24	-72.25	-63.90	-73.32
9	-7.82	-74.97	-64.66	-64.11



**Figura 11.** Evaluación funcional de los distintos grupos a lo largo de 9 semanas. Los animales de cada grupo de tratamiento se analizaron con el índice de función ciática con intervalos de una semana y los valores obtenidos se graficaron. (n= 3, para cada grupo).

## **CAPITULO VI**

### **DISCUSION**

El estándar de oro usado en una LNP es el autoinjerto, sin embargo, este procedimiento presenta ciertas desventajas como son: escasez de material para el injerto, se requiere de un segundo sitio de cirugía, hay una pérdida sensorial del sitio donante y una potencial formación de neuroma. Debido a estos inconvenientes, los esfuerzos por reemplazar este procedimiento se enfocan al desarrollo de un aloinjerto nervioso acelular que serviría como andamio en la reparación de estas lesiones y presenta algunas ventajas como por ejemplo: fácil disponibilidad, no crea una reacción inmune y conserva la MEC[41].

Se han descrito varios protocolos de descelularización para obtener un aloinjerto acelular, uno de ellos es el uso de detergentes. Sondell y colaboradores mostraron que usando una combinación de tritón X-100 y desoxicolato de sodio es posible lograr una descelularización de un nervio ciático de rata Sprague–Dawley[42]. En el presente trabajo, la combinación empleada de estos detergentes para descelularizar, que dio mejores resultados fue de tritón X-100 3% y desoxicolato de sodio 4% durante un período de 15 días. Mediante la tinción de H y E y la inmunohistoquímica para detectar MBP, fue posible comprobar la eliminación total de material celular. Olausson y colaboradores [43], señalaron que la eliminación del componente celular en cualquier aloinjerto descelularizado es crucial para evitar una reacción inmune. En su caso, Olausson realizó un trasplante de un aloinjerto de vena descelularizado, en el cual el paciente no presentó ninguna reacción inmune.

La regeneración axonal del sistema nervioso central (SNC) es mucho más lenta que en el sistema nervioso periférico (SNP), la principal causa de esto podría ser el retraso en la limpieza de los restos de mielina, ya que contienen varios factores inhibitorios, por lo tanto, su presencia podría obstaculizar la regeneración axonal [44]. Al eliminar la mielina en el nervio descelularizado, estamos eliminando este efecto inhibitorio y propiciando de manera más eficiente la regeneración axonal.

El aloinjerto nervioso descelularizado ofrece un andamio para la regeneración de los axones y es un soporte para las células de Schwann, por lo tanto su MEC debe conservarse en buen estado y no ser afectada por el tratamiento con los detergentes. Con la tinción de TM se pudo observar la estructura de las fibras de colágeno del nervio tratado, las cuales resultaron similares a las del nervio control, señalando que el tratamiento empleado en este trabajo para descelularizar los nervios no afectó la MEC. Wallis J. *et al.* [45] señalan que es indispensable mantener la integridad de la MEC para una adecuada recelularización.

En el nervio descelularizado se puede ver como la estructura de los axones sí se vio afectada por el proceso de descelularización. Sin embargo, su integridad parece recuperarse después de las 9 semanas postrasplante. Salazar M., *et al.* [38] reportaron que cuando hay un daño causado por una neuropatía, los axones sufren una alteración por causa de la desmielinización pero pueden restaurarse en la etapa de recuperación si hay condiciones adecuadas.

En lo que se refiere a la remielinización del nervio, se pudo ver que en el caso de los grupos de autoinjerto y nervio descelularizado, la remielinización aún no alcanza el cabo distal, esto puede deberse a que el tiempo de recuperación no fue el suficiente para

permitir dicho proceso, ya que en la mayoría de los estudios reportados, el tiempo después del trasplante es mayor a 4 meses, pero en nuestro caso fue solo de nueve semanas.

Sin embargo, la remielinización en el nervio reelularizado es mayor significativamente tanto en el cabo proximal como en el cabo distal en comparación con el autoinjerto, que es el estándar de oro en la reparación de LNP. Esto puede deberse a la adición de SC, ya que éstas producen los factores de crecimiento que atraen a nuevos brotes axonales que crecen desde el tronco proximal hacia el distal y también proporcionan orientación estructural guiando la regeneración de los axones en la dirección correcta[46].

En lo que se refiere al SFI, todos los grupos parecen notener una diferencia significativa entre sí. Sin embargo, el grupo de nervio descelularizado sí presenta una diferencia significativa entre el SFI de la semana 1 y el SFI obtenido en la semana 9. Cabe señalar que en el grupo de nervio reelularizado solo se tiene una muestra de 2 ratas por lo que se deberá aumentar la muestra para comprobar si existe una mejoría a lo largo del tiempo, ya que este grupo fue el que mejor resultados tuvo en cuanto a la remielinización.

En base a los resultados obtenidos, se puede decir que los grupos de nervio descelularizado y reelularizado tuvieron mejores resultados que el autoinjerto que es el estándar de oro en la reparación de LNP.

## **CAPITULO VII**

### **CONCLUSIONES**

- ❖ El tratamiento con detergentes tritón X-100 3% y desoxicolato de sodio 4% durante un periodo de 15 días, permitió descelularizar y conservar la MEC del nervio en buen estado, para su posterior uso como un aloinjerto eficiente en una LNP en un modelo murino.
  
- ❖ Se observó una mayor remielinización en el nervio reelularizado con drSC *in vitro* mediante factores de diferenciación.
  
- ❖ En todos los grupos se observó una recuperación en la integridad de los axones después de un período de 9 semanas de recuperación.
  
- ❖ No se detectó una diferencia significativa entre los grupos de autoinjerto o reelularizado, en lo referente al SFI, sin embargo, el grupo de nervio descelularizado si presentó una mejoría significativa a lo largo de las 9 semanas.

## **CAPITULO VIII**

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Sunho Oh, e.a., *Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review* American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2006. 2(2): p. 49-56.
2. Kneser U., e.a., *Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view*. Cell. Mol. Med., 2006. 10(1): p. 7-19.
3. Martin i., e.a., *Enhanced Cartilage Tissue Engineering by Sequential Exposure of Chondrocytes to FGF-2 During 2D Expansion and BMP-2 During 3D Cultivation*. Cellular Biochemistry 2001. 82: p. 121-128.
4. Salgado A., e.a., *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends*. Macromol. Biosci. , 2004. 4: p. 743–765
5. Wei A., e.a., *Repairing peripheral nerve defects with tissue engineered artificial nerves in rats*. Chinese Journal of Traumatology, 2008. 11(1): p. 28-33.
6. Han LH., e.a., *Dynamic tissue engineering scaffolds with stimuli-responsive macroporosity formation*. Biomaterials, 2013. xxx: p. 1-8.
7. Sachlos E., e.a., *Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds*. European Cells and Materials, 2003. 5: p. 29-40.
8. Haraguchi Y., e.a., *Concise Review: Cell Therapy and Tissue Engineering for Cardiovascular Disease*. Stem Cells Translational Medicine, 2012. 1: p. 136-141.
9. Sipe J., e.a., *Tissue Engineering and Reparative Medicine*. Annals New York Academy of Sciences, 2002. 961: p. 1-9.

10. C., F., *TÉCNICAS DEL FUTURO: INGENIERÍA DE TEJIDOS Y USO DE CÉLULAS MADRE EN MEDICINA REPRODUCTIVA* MED. CLIN. CONDES, 2010. 21(3): p. 488-493.
11. Pei M., e.a., *A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering*. European Cells and Materials, 2011. 22: p. 333-343.
12. Gunatillake A., y.A.R., *Biodegradable Synthetic Polymers For Tissue Engineering*. European Cells and Materials, 2003. 5: p. 1-16.
13. Engler A., e.a., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. . Rev Cell, 2006. 126: p. 677–689.
14. Bhang S., e.a., *The behavior of neural stem cells on biodegradable synthetic polymers*. *Journal of biomaterials science*. 2007. 18(223–239).
15. Hudson T., e.a., *Engineering Strategies For Peripheral Nerve Repair*. Clinics in Plastic Surgery, 1999. 26(4): p. 485-497.
16. Barbosa MA., e.a., *Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration*. ITBM-RBM, 2005. 26: p. 212-217.
17. Meinel L., e.a., *Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds*. Biotechnology and bioengineering,, 2004. 88: p. 379–391.
18. Kim Y., e.a., *The MMP-9/TIMP-1 Axis Controls the Status of Differentiation and Function of Myelin-Forming Schwann Cells in Nerve Regeneration*. PlosOne, 2012. 7(3): p. 1-15.
19. Carvalho J., e.a., *Characterization of Decellularized Heart Matrices as Biomaterials for Regular and Whole Organ Tissue Engineering and Initial In-vitro Recellularization with Ips Cells*. Tissue Science & Engineering, 2012. S(11): p. 1-5.

20. Falke D., e.a., *Reemplazo traqueal con matriz de colágeno traqueal descelularizada en perros*. Rev. de Cir. Infantil, 2004. 14(1,2,3,4): p. 59-63.
21. Hudson T., e.a., *Optimized Acellular Nerve Graft Is Immunologically Tolerated and Supports Regeneration*. Tissue Engineering, 2004. 10(11/12): p. 1641-1651.
22. Fox I., e.a., *Experience with Nerve Allograft Transplantation*. Seminars in Plastics Surgery, 2007. 21(4): p. 242-249.
23. Evans P., e.a., *Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration*. Muscle Nerve, 1998. 21: p. 1507–1522.
24. Shafiq M., e.a., *Decellularized Human Cornea for Reconstructing the Corneal Epithelium and Anterior Stroma*. Tissue Engineering, 2012. 18(5): p. 340-348.
25. Moore, A.M., et al., *Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study*. Muscle Nerve, 2011. 44(2): p. 221-234.
26. Wang PH., e.a., *Review: Bioengineering Approaches for Guided Peripheral Nerve Regeneration*. Medical and Biological Engineering, 2011. 31(3): p. 151-160.
27. Siemionow M., y.S.E., *Nerve Allograft Transplantation: A Review*. Reconstructive Microsurgery, 2007. 23(8): p. 209-215.
28. Jesuraj, N.J., et al., *A systematic evaluation of Schwann cell injection into acellular cold-preserved nerve grafts*. Neuroscience Methods 2011. 197 (2): p. 209-215.
29. Wang PH., e.a., *Review: Bioengineering Approaches for Guided Peripheral Nerve Regeneration* Medical and Biological Engineering, 2011. 31(3): p. 151-160.
30. Nagao R., e.a., *Functional characterization of optimized acellular peripheral nerve graft in a rat sciatic nerve injury model*. Neurological Research 2011. 33(6): p. 600-608.
31. Nan J., e.a., *Use of nerve conduits for peripheral nerve injury repair* Neural Regeneration Research, 2012. 7(35): p. 2826-2833.

32. Karabekmez F., e.a., *Early Clinical Outcomes with the Use of Decellularized Nerve Allograft for Repair of Sensory Defects Within the Hand*. HAND, 2009. 4: p. 245-249.
33. Madduri S., e.a., *Effect of controlled co-delivery of synergistic neurotrophic factors on early nerve regeneration in rats*. Biomaterials, 2010. 31: p. 8402-8409.
34. Xin Tang., e.a., *Bridging peripheral nerve defects with a tissue engineered nerve graft composed of an in vitro cultured nerve equivalent and a silk fibroin-based scaffold*. Biomaterials 2012. 33: p. 3860-3867.
35. Badylak S., e.a., *Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds*. Annu. Rev. Biomed. Eng. , 2011. 13: p. 27–53.
36. Salud, S.G.d., *Técnico Especialista en Anatomía Patológica*. MAD, 2002. 2: p. 48-50.
37. M., E., *Fundamentos de psicobiología: libro de prácticas I*. Delta, 2006: p. 53-54.
38. M., S., *An experimental model of peripheral neuropathy induce in rats by *Karwinskia humboldtiana**. Peripheral Nervous System., 2006. 11(3).
39. Hernández B M, e.a., *Proliferación de células madres mesenquimales obtenidas de tejido gingival humano sobre una matriz de quitosano: estudio in vitro*. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral, 2011. 4(2): p. 59-63.
40. Tohill M., e.a., *Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration*. Neuroscience Letters 2004. 362: p. 200-203.
41. Ducic I., e.a., *Innovative Treatment of Peripheral Nerve Injuries*. Peripheral Nerve Surgery & Research, 2012. 68(2): p. 180-187.
42. Sondell M., e.a., *Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction*. Brain Research 1998. 795: p. 44-54.

43. Olausson M., e.a., *Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study*. *Lancet*, 2012. 380: p. 230–237.
44. Brown MC., e.a., *Consequences of slow wallerian degeneration for regenerating motor and sensory axons*. *Neurobiology*, 2004. 23(5): p. 521-536.
45. Wallis J., e.a., *Comparative Assessment of Detergent-Based Protocols for Mouse Lung De-Cellularization and Re-Cellularization*. *Tissue Engineering*, 2012. 18(6): p. 420-432.
46. Chang HM., e.a., *Neuregulin Facilitates Nerve Regeneration by Speeding Schwann Cell Migration via ErbB2/3-Dependent FAK Pathway*. *PlosOne*, 2013. 8(1): p. 1-9.

## **ANEXOS**

### **1. DESHIDRATACION DE MUESTRAS FIJADAS**

#### **1.1 Deshidratación de muestras fijadas.**

1. Sumergir las muestras en alcohol etílico al 60% por 1h.
2. Transferir a alcohol etílico al 70%, 80% y 96%, dejar por 1h en cada uno de los alcoholes.
3. Enseguida, transferir a alcohol etílico absoluto por 1h (dos cambios).
4. Trasferir a una solución de etanol absoluto:xilol (1:1) por 1h.
5. Luego, a xilol por 1h (dos cambios)
6. Por último, en parafina líquida por 1h (dos cambio).

### **2. DESPARAFINIZACIÓN Y MONTAJE**

#### **2.1 Desparafinización de cortes incluidos en parafina**

1. Colocar los cortes en la estufa a 60°C por 10 min.
2. Colocar los cortes en xilol por 5 min.
3. Pasar los cortes a una mezcla de xilol-etanol por 5 min.
4. Transferir a etanol absoluto por 2 min.
5. Transferir a etanol 96° por 2 min.
6. Enjuagar en agua destilada.

## **2.2 Deshidratación y montaje de los cortes ya teñidos**

1. Colocar los cortes ya teñidos en etanol 96° de 10 a 20 seg. Y luego por 1min.
2. Transferir los cortes a etanol absoluto por 2min (dos cambios).
3. Colocar los cortes en mezcla de xilol-etanol por 3min.
4. Transferir los cortes a xilol por 2min (dos cambios).
5. Colocar una gota de entellan sobre el portaobjetos y sobre esta se colocar el cubreobjetos, procurando no dejar burbujas entre ellos.

## **3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA**

### **3.1 Hematoxilina de Gil**

Mezclar 730mL de agua destilada + 250 mL de etilenglicol + 2.0 g de Hematoxilina anhídrida en polvo (si son cristales pesar 2,36 g) + 0.2 g de yodato de sodio + 17.6 g de sulfato de aluminio + 2 mL de ácido acético glacial. La solución se prepara en el orden en que están listados los reactivos y se mezclan con ayuda de un agitador magnético a temperatura ambiente durante 1hr. Filtrar la primera vez antes de usar.

### **3.2 Eosina**

Pesar 1 g de eosina amarillenta y disolver en 20 mL de agua destilada + 80 mL de alcohol 96°. De ésta solución concentrada, tomar una parte y agregarla en tres partes del alcohol 80°. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

### **3.3 Solución de Alcohol-Ácido (decolorador o decolorante)**

Mezclar 1 mL de HCl concentrado + 99mL de alcohol 70°.

### **3.4 Solución de Agua Amoniacal (Virador)**

Mezclar 1mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  + 99 mL de agua destilada.

## **4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA TINCIÓN DE MARSLAND GLEE Y ERICKSON**

### **4.1 Solución de Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) 20%**

Pesar 6 g de  $\text{AgNO}_3$  y disolver en 30 mL de agua desionizada para evitar la formación de precipitados de plata. Protegerla solución de la luz.

### **4.2 Solución de $\text{AgNO}_3$ amoniacal**

Preparar 30 mL de  $\text{AgNO}_3$  20% + 20 mL de etanol absoluto. A la solución anterior se le adiciona hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) concentrado gota a gota hasta que se forme un precipitado café, se sigue agregando  $\text{NH}_4\text{OH}$  hasta que se disuelva el precipitado y finalmente se agregan 5 gotas más de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado.

## **5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA TINCIÓN DE TRICRÓMICO DE MASSON**

### **5.1 Solución de Fucsina ácida y escarlata de Biebrich.**

Preparar 90 mL de escarlata de Biebrich acuosa 1% + 10 mL de fucsina ácida acuosa 1% + 1 mL de ácido acético glacial.

### **5.2 Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.**

Pesar 5 g de ácidofosfomolibdico, 5 g de ácido fosfotúngstico y disolverlos en 200 mL de agua destilada.

### **5.3 Solución de azul de anilina**

Pesar 2.5 g de azul de anilina, disolverlos en 100mL de agua destilada y agregar al final 2mL de ácido acético glacial.

### **5.4 Solución acuosa de ácido acético al 1%**

Mezclar 1mL de ácido acético glacial en 99 mL de agua destilada

## **6. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA TINCIÓN KLÜVER-BARRERA**

### **6.1 Azul de luxol 0.1%**

Pesar 0.1 g de azul de luxol, disolverlo en 100mL de etanol 96° y agregar al final 0.5mL de ácido acético glacial.

### **6.2 Violeta de cresilo 0.1%**

Pesar 0.1 g de violeta de cresilo, disolverlo en 100 mL de agua destilada y filtrar (papel filtro). Agregar al final 15 gotas de ácido acético glacial al 10%.

### **6.3 Carbonato de litio 0.05% (p/v)**

Pesar 0.05 g de  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  y disolverlo en 100 mL de agua destilada.