



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

DESCELULARIZACIÓN DE ÓRGANOS: DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE
UN DISPOSITIVO PARA LA OBTENCIÓN DE ANDAMIOS 3D

EL INICIO DE LOS ÓRGANOS BIOARTIFICIALES EN MÉXICO

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:
HÉCTOR MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MIEMBROS DEL COMITE
DR. JOSÉ OCOTLÁN FLORES FLORES
CENTRO DE CIENCIAS APLICADAS Y DESARROLLO TECNOLÓGICO UNAM
M. C. BENJAMÍN HERMINIO LEÓN MANCILLA
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

MÉXICO D.F. NOVIEMBRE DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. ARTURO BARBA PINGARRÓN.

SECRETARIO: DR. LEOPOLDO RUÍZ HUERTA.

VOCAL: DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA.

1 ER. SUPLENTE: DR. FILIBERTO RIVERA TORRES.

2 DO. SUPLENTE: DR. ABEL MORENO CÁRCAMO.

LUGAR O LUGARES DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:
LABORATORIO DE BIOMATERIALES LB-102,
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES (IIM),
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM).

TUTOR DE TESIS:

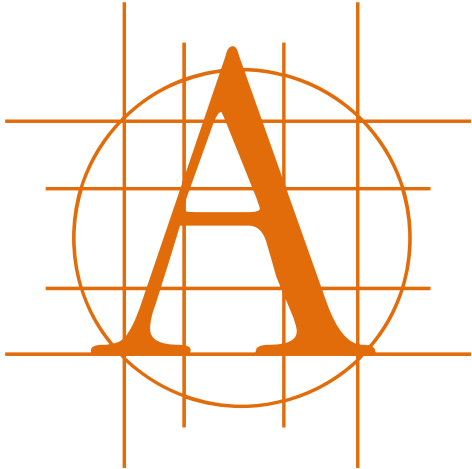
DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA

FIRMA

Descelularización de órganos: Diseño y construcción de un dispositivo para la obtención de andamios 3D

El inicio de los órganos Bioartificiales en México





mis padres:

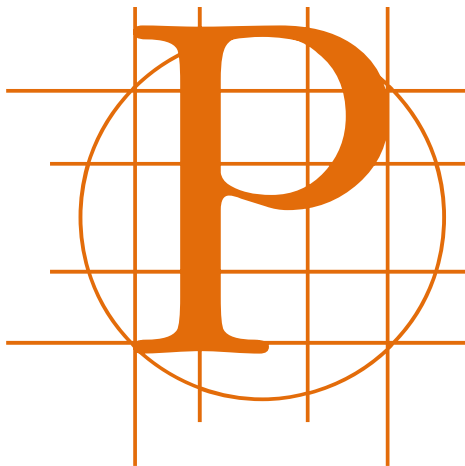
Quienes con amor, cariño y un
brillante ejemplo de superación,
me acompañan por mi sendero
lleno de aprendizaje tras cada caída,
duda o temor.

“Si quieres ser un peón, esfuérzate por ser el mejor del mundo”
Héctor Martínez Guijosa

“Siendo yo de la que menos esperaban, soy la única que luchó por lo que quería”
Juana Hernández Álvarez

Porque si tú quieres, tú puedes...





or su orientación, el conocimiento, su paciencia, la motivación que brinda a cada uno de nosotros y la persistencia al forjar excelentes personas.

Por inculcar el sentido de responsabilidad, seriedad, y por qué no, por la libertad de investigar lo que me gusta y de la manera que creí es la adecuada.

Por que sus logros han sido capaces de ganarse mi admiración como persona y sus derrotas mi lealtad como investigador, estas líneas no son lo suficiente

para expresar lo que recibí durante el tiempo que ha durado esta aventura llena de sorpresas, alegrías y sobre todo de éxito.

Quiero agradecer con todo cariño a mi asesora y amiga.

Dra. María Cristina Piña Barba.

Agradezco al PAPIIT por su apoyo económico a través del proyecto IG100114,
al CONACyT por su apoyo económico a través del proyecto 214128,
a la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto de Investigaciones en Materiales.

Quiero dejar plasmado el agradecimiento que tengo por los profesores del Instituto Tecnológico de Morelia de la carrera de Ingeniería en Materiales.

En particular a quienes me ayudaron a “transformar una piedra en roca”: M.C. Leticia Ortiz García, M.A. Liliana Molina Vázquez, M.C. Teresita Santoyo Arreguín, Ing. Jesús Guzmán Hernández y el Ing. José Jaime López Soria. Y “otros”.

A TODOS mis compañeros de la carrera de Ingeniería en Materiales.

Porque junto a ustedes aprendí la tolerancia, la disciplina, encontrar soluciones rápidas para no generar más interrogantes y a trabajar en equipo sin importar nuestras diferencias: Estefany (fanilu), Estefanía (fanee), Casandra (casilda), Jael, Rubí, Ariadna, Yadira, Itzel, Rocío, Fernando, José Manuel (colima), Francisco (paco), Juan Antonio (juanete), Alfredo (alfredishco), Ulises, Héctor (hectorón), Elio, Juan Pablo, Omar (zalapa), Pedro Adán, Juan (raso), Juan (simio), Mario (dañado). Gracias por ser parte de mi aventura.

Alejandra, Juan Martin, José Martin, Adriana, Selene, Motita, Karina, Carlos, Martin, Oscar, Salvador, Yarín, Héctor, Raúl, Daniel; (CEITM). Con ustedes aprendí a dar más de lo que creemos que es suficiente.

Las personas que me adentraron a la investigación y creyeron en mí: M.C. Janet Beltrán Gonzales, M.C. Ana Iris Peña Maldonado, M.C. Ivonne Jacobson Pinzón y el Dr. Miguel Avalos Borja.

Profesores y compañeros del IIM-UNAM.

En especial a Keziah Reynoso, Nancy Flores, Iván Valdez.

Un agradecimiento especial por la colaboración de mis compañeros en el Laboratorio de Biomateriales:

Karla Karina Gómez Lizárraga.

Nayeli Rodríguez Fuentes.

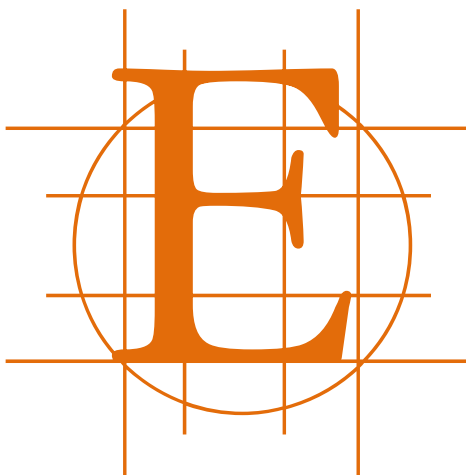
María Luisa Del Prado Audelo.

Lidia Escutia Guadarrama.

David Giraldo Gómez.

A Sergio Serrano Guzmán, Verónica Rodríguez Mata, Damaris Cabrero Palomino, Miguel Ángel Canseco Martínez, Raúl Reyes Ortiz, Eduardo Llera, por el apoyo técnico brindado.

RESUMEN



Este trabajo comprende la obtención de andamios 3D por la técnica llamada “Descelularización” que utiliza como principio la perfusión de disoluciones a través del lecho vascular de un órgano.

La descelularización se llevó a cabo en un dispositivo, diseñado y construido específicamente para este propósito, llamado Bio-MEC, el cual garantiza la obtención de la matriz extracelular (MEC), conservando su integridad estructural y su composición (1) (2). Las variables que se consideraron para su diseño son: tamaño de los órganos, concentración del agente químico, flujo y volumen requerido de la disolución, además, se evaluaron los materiales utilizados en la construcción de dicho dispositivo con un ensayo de degradación. Los contenedores fueron seleccionados y diseñados de acuerdo con el tamaño de cada órgano y de un material inerte a los agentes químicos utilizados.

La descelularización consiste en extraer todas las células, las cuales pueden ser reconocidas como agentes extraños por el sistema inmune del receptor, con la ayuda de diferentes disoluciones que permiten la disrupción celular (3), dejando tan solo la MEC (4), esta estructura de soporte se compone principalmente por colágena, elastina y otras proteínas de señalización química, conservando la intrincada arquitectura interna del órgano y su forma básica (5).

Los andamios obtenidos se evaluaron mediante técnicas histológicas, en secciones bidimensionales de tejido (6). Para un análisis general, se utilizó la tinción de Hematoxilina-Eosina, con la cual se observó una descelularización eficiente por la ausencia de núcleos y citoplasma celular, además de esto, la presencia de la MEC fue confirmada mediante la tinción Tricrómica de Masson, la cual permitió apreciar la ausencia de células y la permanencia de colágena.

La arquitectura del órgano fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) la cual proporciona información de la estructura en tres dimensiones del andamio antes y después de ser descelularizado: la preservación de estructuras propias de cada órgano, vasculatura, porosidad y daños en el andamio.

Con la espectroscopía infrarroja (IR) se corroboró la presencia de colágena en el andamio obtenido, identificando las bandas características y la contribución de algunos aminoácidos. De manera conjunta, se evaluó la presencia del ácido desoxirribonucleico (DNA) en la disolución descelularizante mediante cuantificación por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-vis), con lo cual se corroboró la extracción de material genético.

Los análisis térmicos (TGA y DSC) proporcionaron información del comportamiento de la MEC del andamio, en comparación con un material de referencia de colágena tipo I (COL), al ser sometido a cambios de temperatura y así estudiar: la estabilidad en ciertos intervalos de temperatura, la desnaturalización de las proteínas presentes en el andamio, la degradación del mismo así como la pérdida de masa.

El dispositivo Bio-MEC permitió obtener andamios 3D con las características requeridas para cada órgano, ya que la arquitectura presente en estos andamios es igual al órgano que se descelularizó. Además el andamio obtenido por descelularización presentó un mejor comportamiento, comparado con el andamio de colágena (COL) que se utilizó como referencia, ya que las temperaturas de desnaturalización y degradación son mayores.

Posteriormente (no abarcado en esta tesis), esta estructura servirá de soporte para las células del paciente receptor (7), con lo que se pretende obtener un órgano Bioartificial completo y funcional (8).

Tabla de Abreviaturas

Bio-MEC	Biomateriales – Matriz Extracelular
CD	Columna de descelularización
CMC	Concentración micelar crítica
CLG	Colágena
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en ingles)
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en ingles)
GAG	Glicosaminoglicano (por sus siglas en ingles)
IIM	Instituto de Investigaciones en Materiales
IR	Espectroscopía infrarroja
IT	Ingeniería de Tejidos
MEC	Matriz extracelular
PBS	Buffer fosfato salino (por sus siglas en ingles)
RNA	Ácido ribonucleico (por sus siglas en ingles)
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido (por sus siglas en ingles)
TBF	Tributil fosfato
TGA	Análisis Termogravimétrico (por sus siglas en ingles)
TX1	Tritón X100
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV-vis	Ultravioleta-visible

CONTENIDO

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS DEL PROYECTO	6
IMPORTANCIA Y LIMITACIONES.....	7
JUSTIFICACIÓN	9

Capítulo 2: MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES	13
INGENIERÍA DE TEJIDOS	15
CÉLULAS	16
PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN	20
ANDAMIOS.....	21

DESCELULARIZACIÓN 22
 MÉTODOS DESCELULARIZANTES 23
 AGENTES DESCELULARIZANTES 24
 DETERGENTES 25
BIORREACTORES 27

Capítulo 3: METODOLOGÍA

RECURSOS BIOLÓGICOS 33
MATERIAL 34
 OBTENCIÓN DE ÓRGANOS 34
 CANULACIÓN DE ÓRGANOS 35
 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES 35
 REACTIVOS: SOLUTOS Y DISOLVENTES 35
 CONSTRUCCIÓN DEL DISPOSITIVO 36
DIAGRAMA DE FLUJO 37
DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL DISPOSITIVO Bio-MEC 38
 REQUERIMIENTOS DEL DISPOSITIVO CON BASE EN LAS NECESIDADES DEL PROYECTO 39
 CONTENEDOR 40
 PROCURACIÓN DE RIÑÓN 40
 VOLUMEN DEL CONTENEDOR 41
 MATERIAL DEL CONTENEDOR 42
 FORMA DEL CONTENEDOR 42
MANGUERAS Y CONECTORES 44
 ENSAYO DE DEGRADACIÓN 46
DISOLUCIONES UTILIZADAS EN LA DESCELULARIZACIÓN 49
 DESCELULARIZACIÓN POR PERFUSIÓN 52
 TRAMPA DE AIRE 53

COLUMNA DE DESCELULARIZACIÓN	54
CIRCULACIÓN DE LA SANGRE	55
FLUJO DE DISOLUCIONES	56
CIRCULACIÓN DE LAS DISOLUCIONES EN EL DISPOSITIVO	57
CONEXIONES DEL PROTOTIPO “Bio-MEC 01”	58
CONEXIONES DEL PROTOTIPO Bio-MEC 02.....	60
PREPARACIÓN DEL ÓRGANO PARA LA DESCELULARIZACIÓN	62
MONTAJE EN DISPOSITIVO BIO-MEC	63
PERFUSIÓN DE DISOLUCIONES DESCELULARIZANTES.....	63
CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS OBTENIDOS	64
HISTOLOGÍA.....	64
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	64
ANÁLISIS TÉRMICOS.....	65
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	65
ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	65

Capítulo 4: RESULTADOS

ENSAYO DE DEGRADACIÓN.....	69
DEGRADACIÓN DE MANGUERAS CON TBF	71
DEGRADACIÓN DE MANGUERAS CON TX1	72
DEGRADACIÓN DE MANGUERAS CON SDS.....	73
DESCELULARIZACIÓN: INMERSIÓN Y AGITACIÓN	74
DESCELULARIZACIÓN: CON DISPOSITIVO Bio-MEC.....	76
HISTOLOGÍA	82
RIÑÓN	83
HÍGADO.....	85
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	87
RIÑÓN	88

HÍGADO	90
ANÁLISIS TÉRMICOS	91
CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO.....	92
ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO.....	93
ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	94
ESPECTROSCOPIÍA INFRARROJA	95
ESPECTROSCOPIÍA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	96

Capítulo 5: DISCUSIÓN

CONCLUSIONES	107
PROPUESTAS	109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
APÉNDICE A	121
APÉNDICE B	135
APÉNDICE C	136

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ilustración general de una célula animal.</i>	18
<i>Figura 2. Ilustración de una vista tridimensional de la membrana celular.</i>	18
<i>Figura 3. Molécula lipídica de membrana.</i>	19
<i>Figura 4. Influencia de la concentración micelar crítica en presencia de proteínas y fosfolípidos de la membrana celular.</i>	26
<i>Figura 5. Ejemplificación de forma la cónica de las moléculas de detergente y cilíndrica de los fosfolípidos.</i>	26
<i>Figura 6. Biorreactores representativos con aplicaciones en ingeniería de tejidos.</i>	29
<i>Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología de trabajo.</i>	31
<i>Figura 8. Cortes para la procuración de riñón.</i>	40
<i>Figura 9. Semicorte en perspectiva con un punto de fuga y proyecciones del contenedor de hígado.</i>	43
<i>Figura 10. Mangueras Masterflex.</i>	47
<i>Figura 11. Comparación de la vida útil del material de las mangueras.</i>	48
<i>Figura 12. Ilustración de los conectores utilizados en la fabricación del dispositivo</i>	48
<i>Figura 13. Ilustración del flujo por perfusión</i>	52
<i>Figura 14. Ilustración de las trampas de aire.</i>	53
<i>Figura 15. Vista frontal y lateral de la columna para descelularizar del Dispositivo Bio-MEC.</i>	54
<i>Figura 16. Flujo sanguíneo en el cuerpo humano.</i>	55
<i>Figura 17. Cambios en el flujo sanguíneo durante el ciclo cardiaco</i>	56
<i>Figura 18. Ilustración del flujo de disoluciones en el dispositivo.</i>	57
<i>Figura 19. Conexiones utilizadas en la columna de descelularización.</i>	58
<i>Figura 20. Conexiones utilizadas en el tapón del contenedor.</i>	58
<i>Figura 21. Ensamble de dispositivo Bio-MEC prototipo 01.</i>	59
<i>Figura 22. Conexiones utilizadas en la trampa de aire.</i>	60
<i>Figura 23. Conexiones utilizadas en la tapa del contenedor.</i>	60
<i>Figura 24. Ensamble de dispositivo Bio-MEC prototipo 02.</i>	61
<i>Figura 25. Diagrama de flujo del proceso de diseño.</i>	39
<i>Figura 26. Ilustración de la forma en la que se insertan los conectores en los órganos</i>	62

Figura 27. Cambios en el diámetro y color de las mangueras sumergidas en TBF..... 71

Figura 28. Cambio en la masa de las mangueras sumergidas en una disolución de TBF..... 71

Figura 29. Cambios en el diámetro y color de las mangueras sumergidas en TX1..... 72

Figura 30. Cambio en la masa de las mangueras sumergidas en una disolución de TX1..... 72

Figura 31. Cambios en el diámetro y color de las mangueras sumergidas en SDS. 73

Figura 32. Cambio en el peso de las mangueras sumergidas en una disolución de SDS..... 73

Figura 33. Sección de órgano sin ser sometido a algún tratamiento 75

Figura 34. Sección de órgano tratada con una solución de SDS al 1%, descelularización por inmersión..... 75

Figura 35. Sección de órgano tratada con una solución de SDS al 1%: descelularización por inmersión y agitación. 75

Figura 36. Riñón sometido a una perfusión en el Bio-MEC con flujo similar al reportado en la literatura 77

Figura 37. Corte longitudinal de riñón: Arquitectura interna del riñón..... 77

Figura 38. Cambios en el color durante el proceso de descelularización. 78

Figura 39. Corazón descelularizado en el dispositivo Bio-MEC 01 79

Figura 40. Contenedor del Bio-MEC 02 en el cual se muestra el cambio de color en la solución descelularizante..... 79

Figura 41. Dispositivo “Bio-MEC prototipo 01” (simplificado)..... 80

Figura 42. Dispositivo “Bio-MEC prototipo 02” (simplificado)..... 81

Figura 43. Histología de riñón 84

Figura 44. Corpúsculo renal..... 84

Figura 45. Cápsula fibrosa desprendida del riñón. 84

Figura 46. La estructura fundamental del hígado..... 86

Figura 47. Matriz extracelular del hígado en tabique conectivo, lobulillo hepático y arteria. 86

Figura 48. Matriz extracelular de arterias y tabique conectivo..... 86

Figura 49. Glomérulos y túbulos conectores 89

Figura 50. Topografía del glomérulo 89

Figura 51. Corte transversal del glomérulo y morfología interna. 89

Figura 52. Globulillos hepáticos. 90

Figura 53. Estructura de una arteria descelularizada y cápsula fibrosa. 90

Figura 54. DSC del andamio obtenido por descelularización de riñón. 92

Figura 55. Termograma del andamio obtenido por descelularización de riñón..... 93

Figura 56. Espectro IR del andamio obtenido por descelularización. 95

Figura 57. Espectro UV-VIS de la disolución descelularizante durante el proceso de descelularización. 96

Figura 58. Gráficas de las mangueras con el mejor comportamiento en: TBF, TX1, SDS..... 99

Figura 59. Gráfica de desnaturalización, degradación y pre-desnaturalización de los andamios. 102

Figura 60. Comparación de la pérdida de peso del andamio matriz extracelular (MEC) y el colágena tipo I (COL). 103

Figura 61. Comparación de los espectro de colágena tipo I (COL) y el andamio de matriz extracelular (MEC) 105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Masas registradas en las mangueras sumergidas en TBF. 70

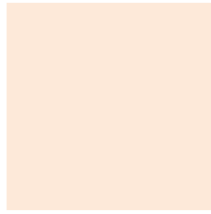
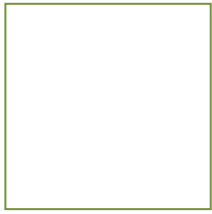
Tabla 2. Masas registradas en las mangueras sumergidas en TX1. 70

Tabla 3. Masas registradas en las mangueras sumergidas en SDS. 70

Tabla 4. Flujo sanguíneo, en reposo, de varios órganos en un varón adulto. 76

Tabla 5. Contribución de las unidades de aminoácidos presentes en las cadenas de colágena.. 104

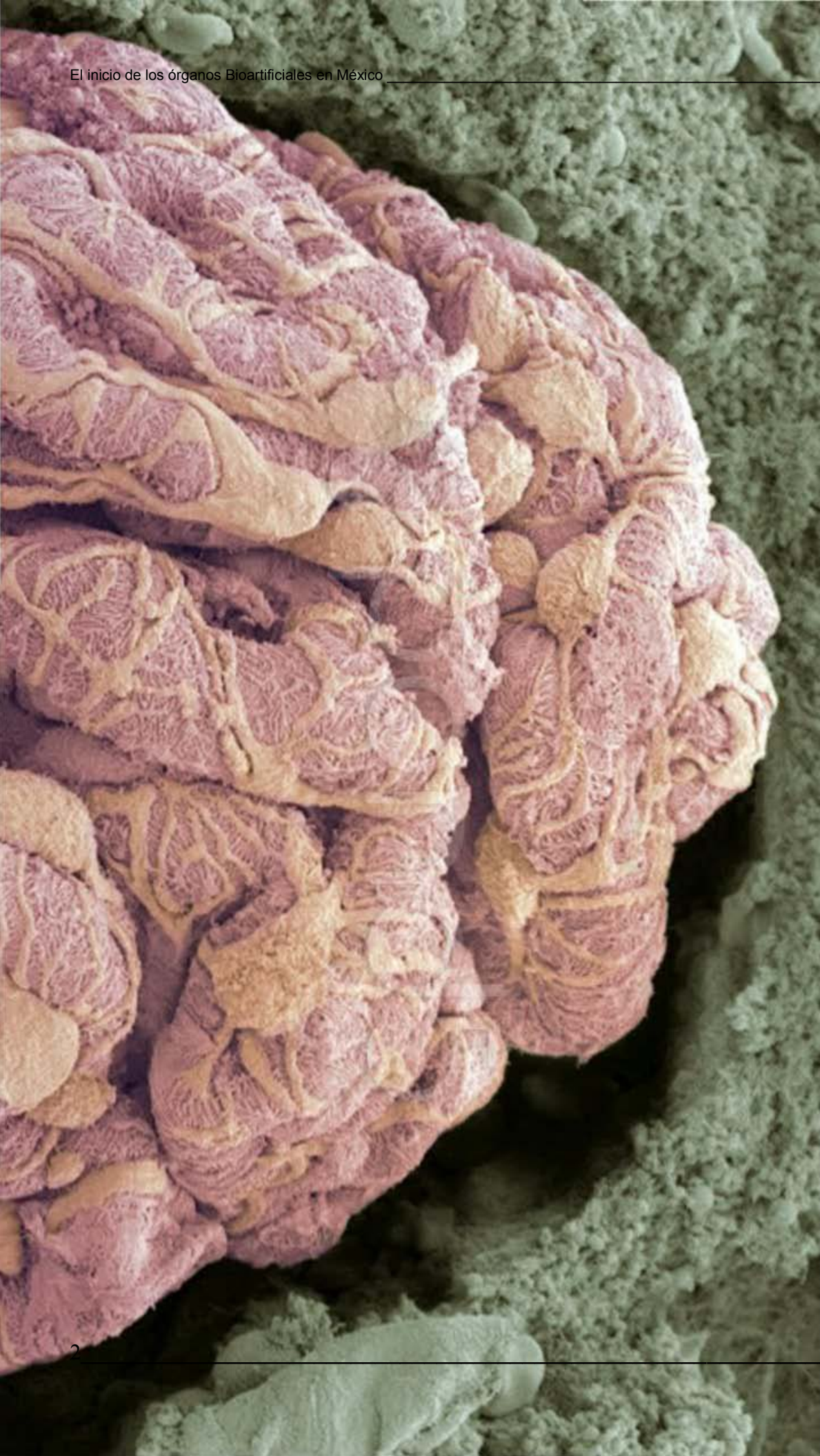




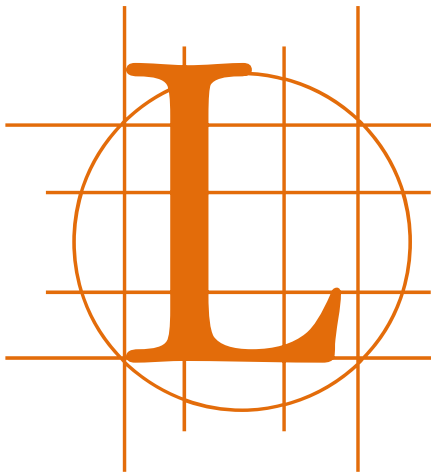
1

Capítulo

Introducción



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



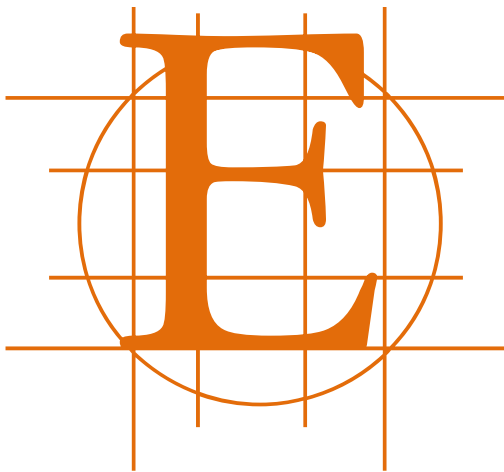
a fabricación de andamios 3D para la regeneración o sustitución de órganos internos en México se encuentra en desarrollo y los andamios elaborados por técnicas como: bioespumas, electrohilado, liofilización, entre otras, presentan ciertas limitaciones como la vascularidad, porosidad, composición y tener proteínas de señalización que en conjunto mimeticen la matriz extracelular.

Debido a su complejidad estructural la matriz extracelular (MEC) aún no es posible sintetizarla a nivel laboratorio (4), ya que la MEC para cada órgano es diferente (9).

Por otro lado, factores como el tamaño de los órganos (equivalente al tamaño del andamio), la materia prima para fabricar los andamios y el costo de fabricación, propician que los dispositivos que se encuentran en el mercado sean escasos y de costo elevado, siendo poco adecuados para obtener andamios con los requerimientos necesarios para regenerar o sustituir órganos completos o grandes secciones de ellos.

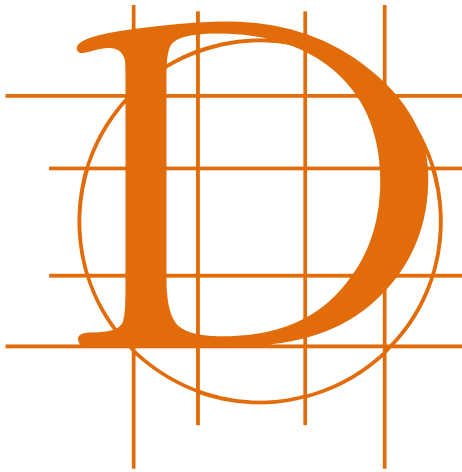
Para la fabricación de órganos artificiales (elaborados con materiales sintéticos), que abarca desde la síntesis de las materias primas, la caracterización, diseño y fabricación del dispositivo hasta las pruebas preclínicas y clínicas, se requieren años de investigación para imitar el funcionamiento del órgano o tejido en cuestión, sin olvidar que actualmente solo son temporales.

HIPÓTESIS



s posible construir un dispositivo que permita obtener andamios 3D de matriz extracelular controlando variables como: volumen, concentración, flujo volumétrico y agente químico de la disolución descelularizante.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

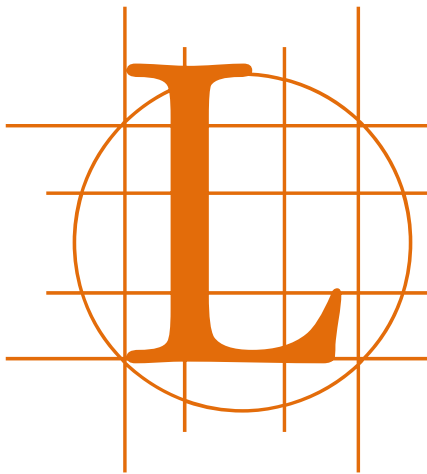


Diseñar y construir un **dispositivo** para la obtención de andamios 3D, a partir de órganos de cerdo que puedan emplearse en ingeniería de tejidos.

- Evaluar el funcionamiento del dispositivo para obtener andamios de matriz extracelular a partir de la descelularización de órganos de origen animal empleando la perfusión de disoluciones.

- Confirmar la descelularización del andamio obtenido.

IMPORTANCIA Y LIMITACIONES



Los andamios fabricados en el laboratorio de Biomateriales (IIM - UNAM) por las técnicas mencionadas anteriormente, aún presentan ciertos inconvenientes que, sin embargo, son resueltos por los andamios que se pueden obtener al descelularizar un órgano, ya que éstos últimos mantienen la composición de la MEC y la arquitectura de cada órgano.

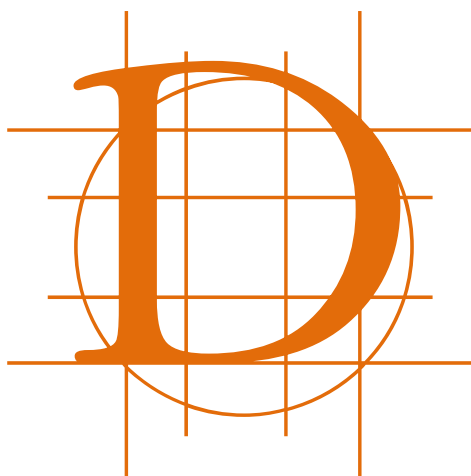
Este trabajo propone la obtención de andamios de MEC para riñón, corazón e hígado, siendo una propuesta viable como solución a la falta de órganos para trasplante que constituye un problema de salud pública.

Como aporte tecnológico se construyó el dispositivo Bio-MEC, que facilita la obtención de MEC de diferentes órganos, además este dispositivo permite colocar uno o varios órganos a la vez, dependiendo de su tamaño.

Actualmente, el estudio de órganos en el Instituto de Investigaciones en Materiales, se limita al uso de órganos de animales destinados a la experimentación, dado que la manipulación con órganos humanos tiene limitantes legales y éticas. Por esta razón, se decidió trabajar con órganos de cerdo que anatómicamente son parecidos a los órganos humanos.

Los protocolos descritos en el presente trabajo, han sido aplicados de manera satisfactoria en órganos de animales jóvenes y sanos sin considerar el efecto de aspectos como la edad, deformaciones o patologías, así como la conservación prolongada de los órganos antes de ser descelularizados.

JUSTIFICACIÓN



e acuerdo al Centro Nacional de Trasplantes, hasta noviembre de 2015 se han inscrito 20,094 personas en la lista de espera para trasplante de algún órgano (10).

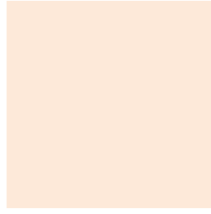
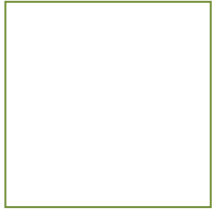
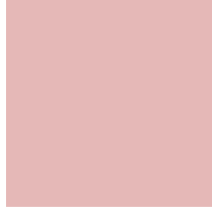
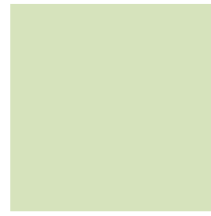
La lista de espera se conforma de la siguiente manera por órgano:

12,150	<i>para <u>riñón</u>.</i>
7,467	<i>para <u>córnea</u>.</i>
403	<i>para <u>hígado</u>.</i>
51	<i>para <u>corazón</u>.</i>
11	<i>para <u>páncreas</u>.</i>
9	<i>para <u>riñón y páncreas</u>.</i>
2	<i>para <u>hígado y riñón</u>.</i>
1	<i>para <u>corazón y pulmón</u>.</i>

Con referencia a los datos anteriores, se determina que el riñón es el órgano con mayor demanda para trasplante, seguido de córnea, hígado y corazón, esto justifica el uso del riñón como órgano principal de estudio y permite avanzar la investigación en corazón e hígado que son órganos con la vascularidad necesaria para ser colocados en el dispositivo Bio-MEC.

Los andamios obtenidos para la ingeniería tisular, deben imitar las características esenciales de la matriz extracelular tales como composición, porosidad adecuada, vasculatura que permita el flujo de nutrientes a las células y la residencia de proteínas de señalización (11).

La obtención de andamios de MEC, a través de un proceso de descelularización, puede ser una solución viable a la demanda de andamios para la regeneración de tejidos y órganos, ya que cumplen con todas las características antes mencionadas.



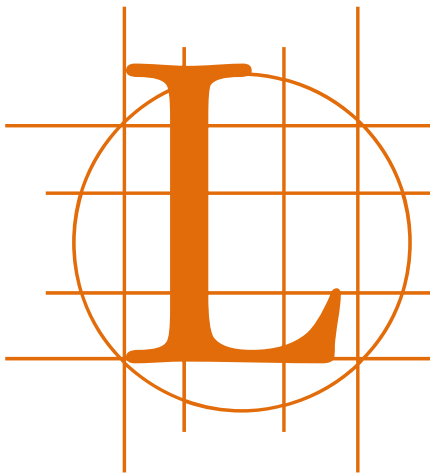
2

Capítulo

Marco teórico



ANTECEDENTES



a ciencia e ingeniería de los biomateriales ha tenido grandes avances en la obtención de andamios 3D para piel (12), cartílago (13), vejiga-uréter (14), tráquea (15), vasos sanguíneos (16), entre otros, (17); por diferentes técnicas como bioespumas (12), electrohilado (18), solvent cast (19), liofilización (20), 3D printing (21), sinterización selectiva por láser (22), entre otras (23), que imitan la estructura de un tejido u órgano y son fabricados con materiales, biocompatibles, bioactivos y/o bioreabsorbibles (24).

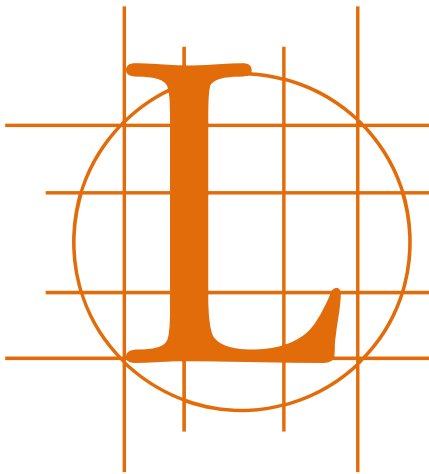
Estos andamios sustituyen la MEC, que es secretada por las células y deben permitir la migración, proliferación y diferenciación celular (25) (26).

Lo ideal es fabricar un andamio de MEC, sin embargo, actualmente la posibilidad de sintetizar MEC en el laboratorio es un proceso asequible debido a la complejidad en su composición, estructura espacial y falta de caracterización (4) (9), ya que la MEC de cada órgano y tejido es diferente (27). Existen los andamios biológicos derivados de MEC que son usados en cirugía reconstructiva y medicina regenerativa para reparar (28) (29) (30), reconstruir (31) (32) o reemplazar (33), tejidos u órganos; estos andamios son obtenidos por la técnica llamada descelularización (34). En el proceso de descelularizar se eliminan las células y se preserva casi en su totalidad la estructura y composición de la MEC (35). La obtención de tejidos descelularizados se puede lograr con diferentes métodos: a través de un gradiente de presión con disoluciones enzimáticas (36), o la inmersión-agitación en disoluciones (37), por otra parte, la perfusión de varios agentes químicos a través del lecho vascular permite obtener andamios biológicos 3D de MEC para órganos ya que derivan de órganos completos (38).

El primer reporte de descelularización de un órgano fue en el 2008 al tratar un corazón de rata, el cual presentó una apariencia traslúcida de color blanco y estructuralmente similar al corazón (39); en el periodo de 2009-2010 se reportó la descelularización de hígado (40), riñón (41), páncreas, pulmón (42) e intestino delgado en ratas. Mientras que en 2010, se iniciaron las publicaciones en relación a descelularización de órganos más grandes provenientes de cerdo como corazón (2010), hígado y riñón (2012).

La complejidad y duración del protocolo de descelularización están relacionadas con el grado de conservación estructural y biológica. Es importante tener en cuenta el tamaño y peso del órgano, así como los agentes químicos y su concentración para lograr la lisis celular (34), ya que el tiempo requerido para descelularizar depende de estos factores y puede variar desde un par de horas hasta semanas. Lo anterior representa un punto crítico en el proceso, ya que el uso indiscriminado de cualquier agente químico causará daños en la composición y estructura de la MEC (43). Por otra parte, para descelularizar órganos utilizando la perfusión, se debe ajustar a las características fisiológicas de cada órgano, determinadas por el tamaño y edad del cerdo, incluyendo el flujo, la presión y la velocidad de las disoluciones descelularizantes (44).

INGENIERÍA DE TEJIDOS



a ingeniería de tejidos (IT), es una ciencia que ha llegado a tener una gran aplicación en los últimos años, abarca disciplinas como Biología, Medicina, Física, Química, Ingeniería, Ciencia de Materiales, Biomateriales, etc., así como el desarrollo de tecnología que son parte del proceso para generar o regenerar, reparar o reemplazar tejidos e incluso órganos enteros con la combinación de células, biomateriales y proteínas de señalización. (45)

La estrategia clásica de la IT consiste en aislar células específicas de un órgano o tejido para ser cultivadas en un andamio, al que se le pueden añadir proteínas de señalización, bajo condiciones de cultivo controladas, para obtener un constructo y colocarlo en el sitio deseado del cuerpo del paciente y así conducir la formación de nuevo tejido en el andamio que puede degradarse con el tiempo. (46)

La biomimética es el área de la ciencia que tiene por objeto el estudio de las estructuras biológicas y sus funciones, para aprender acerca de la naturaleza, sus estrategias y soluciones, y utilizar este conocimiento en diferentes campos de la ciencia. Dentro de la IT, especialmente en el diseño de andamios, la biomimética representa un camino potencial para el éxito de la respuesta celular *in-vitro* e *in-vivo*, que es un factor vital para promover la producción de MEC nativa. (47)

CÉLULAS

Las células son las unidades funcionales básicas de los organismos complejos. Las que se relacionan o son similares entre sí, así como las células que funcionan de una manera particular o tienen un propósito común, se agrupan para formar tejidos. Los cuatro tejidos básicos (epitelio, tejido conectivo, músculo y tejido nervioso) que constituyen el cuerpo, se unen para formar órganos, que a su vez se integran en sistemas. La labor de cada sistema es específica, es decir, implica un conjunto de funciones relacionadas, como digestión, reproducción o respiración. (48)

Aunque el cuerpo humano está conformado por más de 200 tipos diferentes de células, cada una con una función diferente, todas las células poseen ciertas características unificadoras y por tanto pueden describirse en términos generales (Figura 1). Cada célula está rodeada por una membrana plasmática bilipídica, posee organelos que le permiten realizar sus funciones, sintetiza macromoléculas para su uso o secreción, genera energía, es capaz de comunicarse con otras células y con su entorno.

El agua representa el mayor volumen del citoplasma y en ella se disuelven o suspenden diversas sustancias inorgánicas y orgánicas. Esta suspensión líquida se denomina citosol y contiene los organelos, estructuras metabólicamente activas que llevan a cabo funciones precisas.

Además, la forma de las células, su capacidad para moverse y las vías intracelulares dentro de ellas se conservan por un sistema de túbulos y filamentos que se conoce como citoesqueleto. (49)

La descelularización interactúa directamente con la membrana plasmática y esta es la parte más importante de la célula para nuestro estudio, por tal motivo, se abordará de manera particular para entender sus componentes principales y sus características para así comprender la interacción con las sustancias descelularizantes.

LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Las células tienen una membrana que separa y protege sus componentes del medio externo. Todas las membranas celulares están compuestas por lípidos y proteínas y comparten una estructura fundamental común, independientemente de su localización.

El componente lipídico está formado por millones de moléculas de lípidos organizados en dos láminas íntimamente adosadas que conforman una bicapa lipídica. Esta bicapa es la responsable de la estructura fundamental de la membrana y actúa como una barrera de permeabilidad. (50)

Las moléculas proteicas median la mayoría de las otras funciones de la membrana y confieren a las distintas membranas sus características individuales.

Los lípidos presentes en las membranas celulares combinan dos propiedades muy diferentes en una misma molécula: cada lípido posee una cabeza hidrofílica (que atrae al agua) y una o dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas (que repelen el agua). (51)

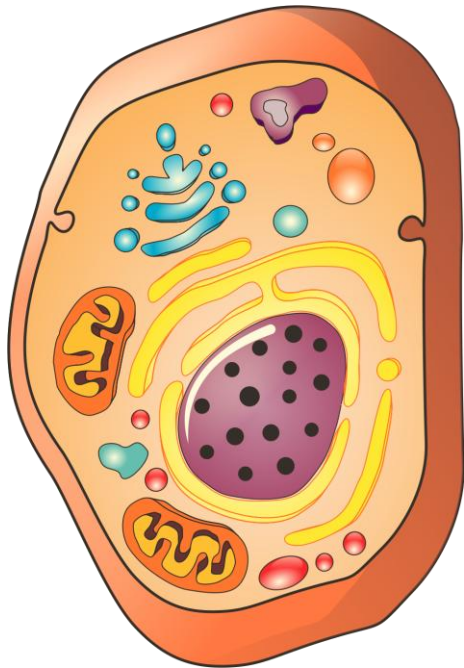


Figura 1. Ilustración general de una célula animal. Se ilustra el núcleo, varios orgánulos, el citoplasma y la membrana celular. Imagen modificada de (50).

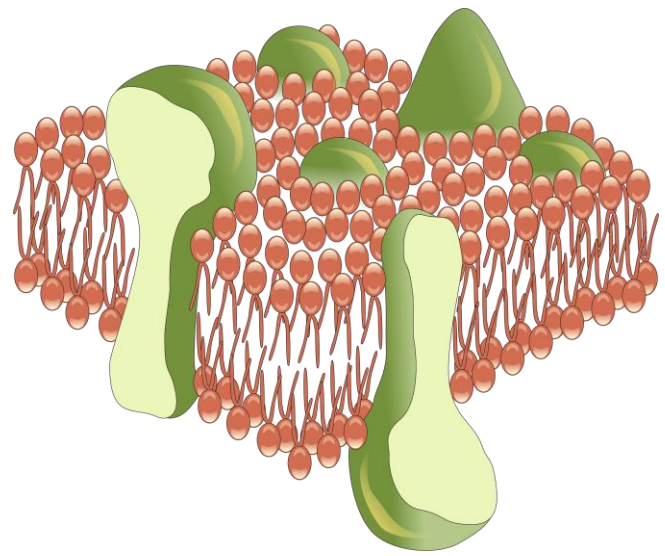


Figura 2. Ilustración de una vista tridimensional de la membrana celular. Imagen modificada de (50).

Las moléculas con propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas se denominan anfipáticas. Esta característica química es compartida por otros tipos de lípidos de membrana y desempeña un papel importante en el ensamblaje de los lípidos en forma de bicapa.

La cabeza hidrofílica es atraída por el agua mientras que la cola hidrofóbica rechaza el agua y tiende a agregarse con otras moléculas hidrofóbicas. Pero como el interior de la célula contiene agua y su exterior está rodeado por agua, este conflicto se resuelve inteligentemente por medio de la formación de una bicapa lipídica.

Las cabezas hidrofílicas quedan expuestas al agua en ambas superficies de la membrana mientras que las colas hidrofóbicas quedan protegidas del agua y se ubican unas junto a las otras en el interior del “sándwich” (Figura 2).

Si existiera un desgarro pequeño en la membrana, las moléculas de la bicapa se reorganizarán en forma espontánea para abolir el borde libre y excluirán las moléculas de agua y conducirá a la reparación de la bicapa. Si es grande el desgarro, la lámina puede comenzar a plegarse sobre sí misma y a fragmentarse para formar vesículas aisladas (52).

Los lípidos más abundantes en las membranas celulares son los fosfolípidos (Figura 3), que son moléculas que se caracterizan por tener una cabeza hidrofílica unida al resto del lípido mediante un grupo fosfato.

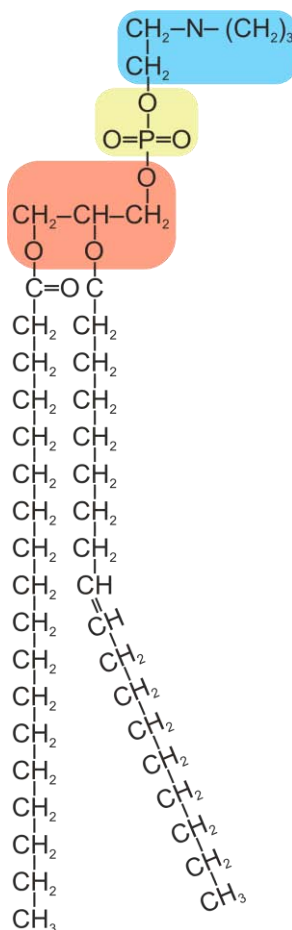


Figura 3. Molécula lipídica de membrana: Posee una cabeza hidrofílica y colas hidrofóbicas.

PROTEÍNAS DE SEÑALIZACIÓN

Las células se comunican entre sí y con la MEC, por medio de señales químicas entre las que se encuentran: factores de crecimiento, encargados de regular el ciclo celular, mantener la supervivencia celular, estimular la migración celular, la diferenciación celular e incluso la apoptosis; citocinas, responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, compuestos quimiotácticos, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas; ligandos, moléculas capaces de ser reconocidas por otras provocando una respuesta biológica. (50) (53)

A su vez están los componentes de la MEC como: (54) (55)

Glicoproteínas: laminina, fibronectina, enactina y tenascina.

- Participan como receptores celulares, así como guía para la migración celular siendo las principales uniones entre células y la MEC. Proporcionan sitios de unión para CLG.

Proteoglicanos: agregano, betaglicano, decorina, sindecano, perlecano y serglicina.

- Proporcionan soporte mecánico, uniones con factores de crecimiento, unión con la CLG, adhesión celular, soporte y almacenamiento, así como difundir con mayor facilidad los nutrientes a las células.

Glicosaminoglicanos (GAG's): Ácido hialurónico, condrotín sulfato, dematán sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato.

- Brindan viscosidad a la disolución, compresibilidad baja, brinda integridad estructural a las células y provee vías entre las células, permitiendo la migración celular.

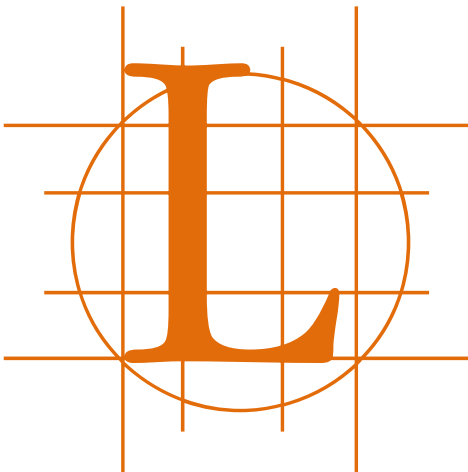
ANDAMIOS

Los andamios representan el soporte físico para el crecimiento celular y el espacio disponible en el cual el tejido u órgano se desarrolla. La rigidez del andamio le permite mantener su forma durante la regeneración pero la rapidez de degradación del mismo tiene que garantizar el apoyo necesario durante la formación de tejido. La porosidad en los andamios es una característica fundamental para la migración celular y para el transporte de fluidos y nutrientes. En particular, la microporosidad es importante para el crecimiento interno capilar y las interacciones entre células y MEC, mientras que la macroporosidad es relevante para el suministro de nutrientes y eliminación de desechos del metabolismo celular. La porosidad óptima está estrictamente relacionada con el tipo de órgano o tejido.

Los andamios deben diseñarse para tener una porosidad con tamaño de poros de 63-150 μm , área superficial que permita la adhesión y unión celular (a mayor superficie mayor será la adhesión celular en el andamio) geometría interconectada, resistencia estructural, y la forma tridimensional específica para cada órgano o tejido. Los andamios son fabricados con biomateriales sintéticos (metales, cerámicos, polímeros) o naturales (colágena, hidroxiapatita, ácido hialurónico) y con el fin de permitir la sustitución de tejido recién formado deben ser biocompatibles, biodegradables y/o reabsorbibles. (23) Los biomateriales se pueden definir como cualquier sustancia, material o combinación de ambos que pueden ser utilizados como un todo o como una parte de un sistema que es considerado parte de un tratamiento, aumento o reemplazo de algún tejido, órgano o función del organismo. Desde el punto de vista fisiológico, se dividen según la respuesta general del tejido receptor al implante: (56)

- Los materiales tóxicos provocan necrosis del tejido circundante.
- Los materiales inertes no reaccionan químicamente con las macromoléculas del huésped, el cual forma un tejido fibroso alrededor del implante.
- Los materiales biotolerables provocan una respuesta a distancia.
- Los materiales bioactivos son aquellos capaces de establecer interacciones químicas y físicas con el tejido y promover su regeneración.

DESCELULARIZACIÓN



a descelularización consiste en extraer las células de un órgano o tejido, las cuales pueden ser reconocidas como agentes extraños por el sistema inmune del receptor, con la ayuda de diferentes métodos y disoluciones (3) que permiten la lisis celular, dejando tan sólo la estructura de soporte denominada MEC (4), compuesta mayoritariamente por colágena, elastina y otras proteínas de señalización química, conservando la intrincada arquitectura interna del órgano y su forma básica (5).

La selección del método y disoluciones que se utilizan para una descelularización efectiva depende de varios factores entre los que se encuentran; la cantidad de células del tejido, densidad, contenido graso, tamaño y espesor (57).

Debe considerarse que cada agente y método descelularizante altera la composición y causa daño en la arquitectura de la MEC. Sin embargo, lo que se requiere es minimizar estos daños. Existen diferentes métodos para la obtención de la MEC, dependiendo del órgano o tejido a procesar se utilizaron tres métodos.

MÉTODOS DESCELULARIZANTES

- Temperatura: Consiste en colocar los órganos o tejidos a temperaturas por debajo de 0 °C, de forma que la totalidad del agua se convierta en hielo. (36) (58) (59) (60)

Ventaja: los cristales de hielo intracelulares fragmentan la membrana celular.

Desventaja: La formación de cristales de hielo puede alterar o dañar la MEC.

- Agitación: Se necesita forzar un líquido, con medios mecánicos, para que adquiera un movimiento constante alrededor del tejido u órgano. (37) (58) (59) (61) (62)

Ventaja: Lisa las células, facilita la exposición química y eliminación de material celular.

Desventaja: Agitación o sonicación agresiva puede alterar MEC.

- Perfusión: Consiste en introducir de manera lenta pero continúa un líquido en un tejido u órgano a través del lecho vascular. (38) (39) (40) (42) (63)

Ventaja: Facilita la exposición química y la eliminación de material celular.

Desventaja: La presión asociada con la perfusión puede alterar la MEC.

Para llevar a cabo la descelularización es necesario utilizar disoluciones con agentes químicos que interactúen con las células y eliminen los residuos celulares fuera del órgano.

Estas disoluciones son utilizadas en diferente orden, pero de manera individual, dependiendo del órgano ya que los órganos y tejidos tiene diferentes tipos de células y un comportamiento diferente con cada disolución.

AGENTES DESCELULARIZANTES

➤ Enzimas.

- Nucleasas: (38) (59) (64) (65) (66)

Ventaja: Catalizan la hidrólisis de ribonucleótidos y cadenas de desoxirribonucleótidos.

Desventaja: Los restos son difíciles de eliminar de los tejidos, puede provocar una respuesta inmune.

➤ Solventes: (36) (37) (62) (67) (68)

Ventaja: Provocan lisis celular por deshidratación, solubilizan y eliminan los lípidos, eliminan eficazmente las células de los tejidos densos e inactivan pirógenos.

Desventaja: Entrecruza y precipita las proteínas, incluyendo CLG.

➤ Detergentes no iónicos: (37) (39) (40) (58) (61) (62) (64) (65) (68) (69) (70)

Ventajas: Interrumpen las interacciones proteína-ADN, las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína y en menor grado las interacciones proteína-proteína. Resultados mixtos con eficacia dependiendo del tejido, la eliminación de células es eficaz en los tejidos finos.

Desventaja: Pueden dañar de la ultraestructura de la MEC y la eliminación de GAG's.

➤ Detergentes iónicos: (33) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (59) (61) (62) (67) (68) (70) (71) (72) (73)

Ventaja: Solubiliza la membrana celular y nuclear. Elimina los restos nucleares y proteínas citoplasmáticas.

Desventaja: Alteran la ultraestructura de MEC, puede eliminar factores de crecimiento, GAG's y dañar la CLG.

DETERGENTES

Los detergentes son moléculas anfipáticas que rompen las interacciones hidrofóbicas de la membrana celular al intercalarse dentro de las bicapas fosfolípídicas y así solubilizar lípidos y proteínas presentes. La parte hidrofóbica de una molécula de detergente es atraída hacia cadenas hidrocarburadas y luego se mezcla con facilidad con ellas; la parte hidrofílica es atraída fuertemente hacia el agua. Algunos detergentes son productos naturales, pero la mayoría son moléculas sintéticas desarrolladas para limpiar y dispersar aceites y agua. (74)

Los detergentes iónicos como el dodecilsulfato de sodio (SDS), contienen un grupo cargado; los detergentes no iónicos como el Tritón X-100 (TX1), carecen de grupos cargados. A muy bajas concentraciones los detergentes se disuelven en agua pura como moléculas aisladas. En cuanto la concentración aumenta, las moléculas empiezan a formar micelas, pequeños conglomerados esféricos en los cuales las partes hidrofílicas de las moléculas se orientan hacia el exterior y las partes hidrofóbicas se agrupan en el centro. (52)

La concentración micelar crítica (CMC) a la cual se forman las micelas es una característica de cada detergente y es una función de las estructuras de sus partes hidrofóbicas e hidrofílicas.

Los detergentes iónicos se unen a las regiones hidrofóbicas expuestas de las proteínas de membrana, así como al centro hidrofóbico de las proteínas solubles en agua. Los detergentes actúan de diferente manera y a diferentes concentraciones.

A altas concentraciones (por encima de la CMC) solubilizan membranas biológicas y forman micelas mixtas de detergente, fosfolípidos y proteínas integrales de membrana. A bajas concentraciones (debajo de la CMC), se unen a las regiones hidrofóbicas de la mayoría de las proteínas integrales de membrana y las hacen solubles en disoluciones acuosas (Figura 4). Debido a su carga, estos detergentes también rompen enlaces iónicos y de hidrógeno. A altas concentraciones, mayor al 10 % (p/v), el SDS desnatura por completo las proteínas ligándose a cada cadena lateral. Los detergentes no iónicos no desnaturan las proteínas y por ello son útiles en la extracción de proteínas de membrana. (50)

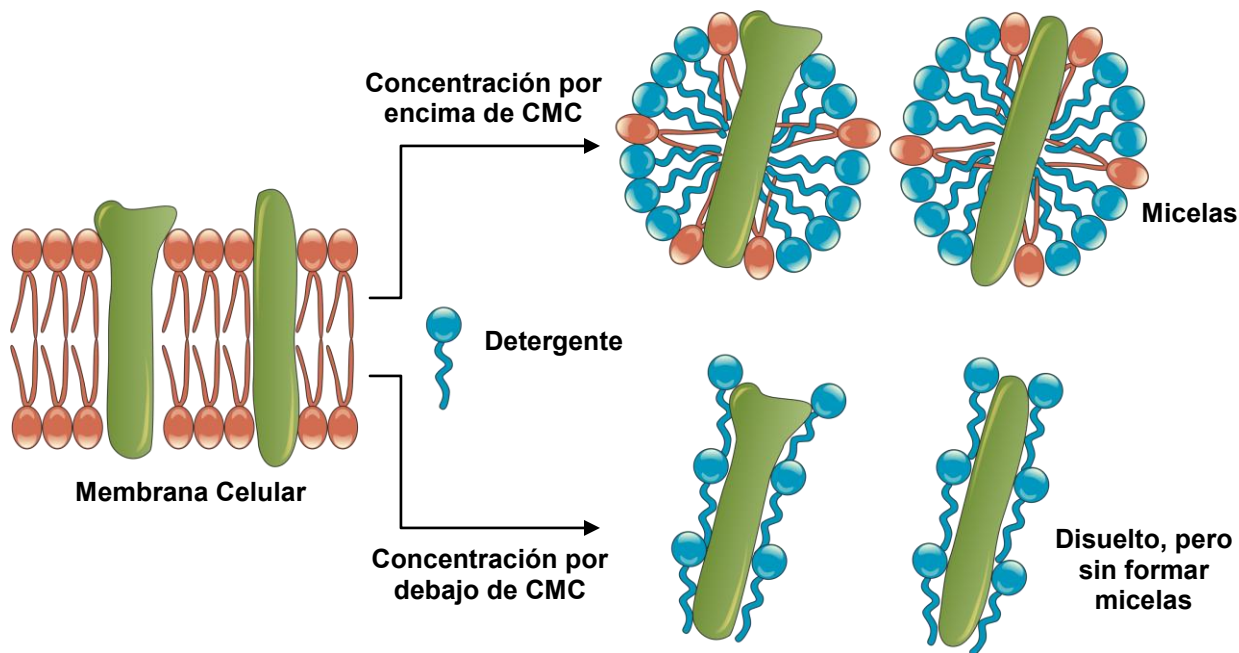


Figura 4. Influencia de la concentración micelar crítica en presencia de proteínas y fosfolípidos de la membrana celular. Imagen modificada de (52).

Los detergentes se diferencian de los fosfolípidos de membrana por la presencia de una sola cola hidrofóbica y en consecuencia tienen un comportamiento distinto. La presencia de una sola cola hidrofóbica determina que las moléculas de detergente adopten una forma más parecida a la de un cono (Figura 5A); en un medio acuoso estas moléculas tienden a agregarse en pequeños racimos denominados micelas en lugar de formar una bicapa como los fosfolípidos, que poseen una conformación más cilíndrica como lo muestra la Figura 5B. (53)

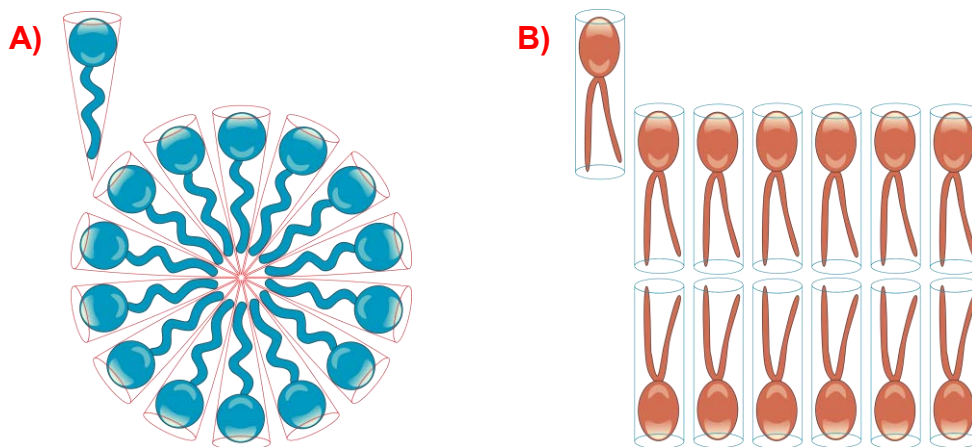
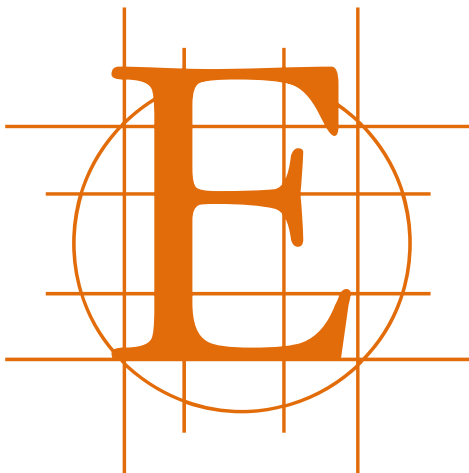


Figura 5. Ejemplificación de forma A) cónica de las moléculas de detergente y B) cilíndrica de los fosfolípidos.

BIORREACTORES



El objetivo de este trabajo no es la construcción de un biorreactor, es la construcción de un dispositivo basado en los diseños de biorreactores existentes. Por tal motivo es indispensable introducir al lector en este tema.

Un Biorreactor puede ser descrito como cualquier dispositivo que intenta imitar condiciones fisiológicas según el propósito deseado como: simular el flujo sanguíneo, mantener la temperatura corporal, proporcionar una concentración de oxígeno, mantener y estimular el crecimiento celular, todo encaminado a la regeneración de tejidos y órganos. (75)

Existe una gran variedad de diseños de biorreactores como resultado del esfuerzo multidisciplinario realizado, por ingenieros e investigadores, para construir dispositivos útiles en la IT. (76)

El propósito de un biorreactor es proporcionar una frontera que proteja el proceso que se lleva a cabo del ambiente externo: contaminado y no controlado. (77)

Los elementos básicos que conforman un biorreactor son: (78)

1. Contenedor o cámara.
2. Sistema de agitación o flujo.
3. Sistemas de control.
4. Sistemas de medición.

Un biorreactor puede ser tan simple como una caja de Petri en una incubadora o tan complejo que puede controlar el ambiente al interior de su cámara (en función del tamaño del andamio), mantener o cambiar el flujo requerido, todo de manera automatizada. (79)

Existen diferentes niveles de complejidad en un biorreactor; típicamente, los sistemas incorporan al menos uno de los diferentes tipos de flujo: continuo/discontinuo, desplazamiento uniaxial o biaxial de corrientes, por presión hidrostática y por acción de la gravedad (Figura 6). Los biorreactores comúnmente están diseñados para realizar una o más de las siguientes funciones: (76) (78)

- Cultivar uniformemente una concentración de células sobre biomateriales clínicamente relevantes.
- Mantener el flujo de disoluciones dentro del andamio y el cultivo celular.
- Controlar las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, niveles de CO₂, nutrientes, medicamentos, entre otros.
- Controlar el flujo de las disoluciones: intermitente o continuo.

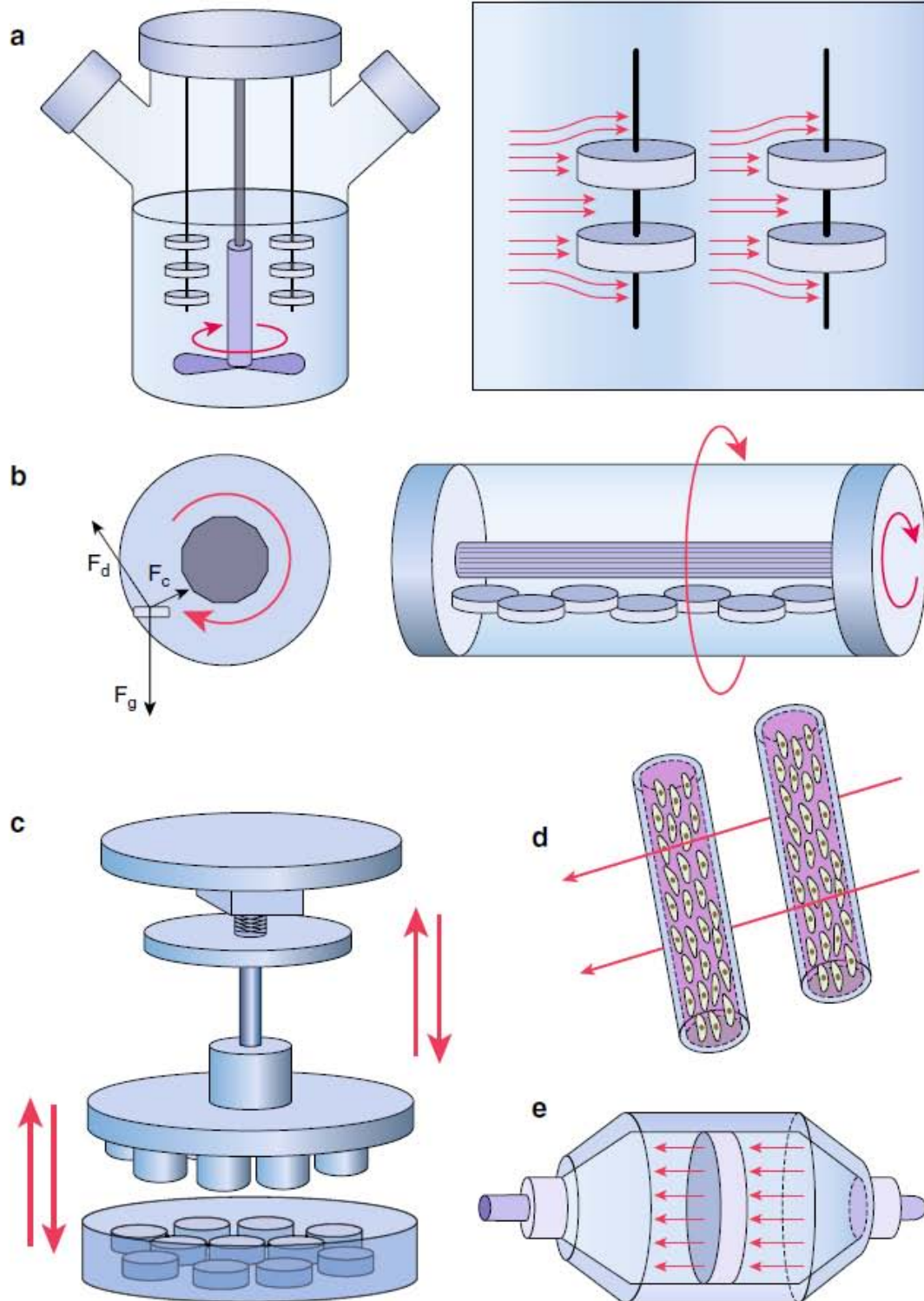
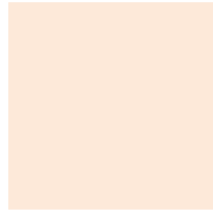
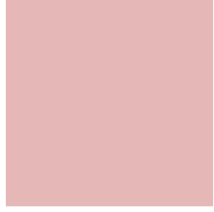
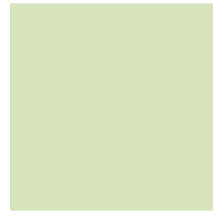


Figura 6. Biorreactores representivos con aplicaciones en ingeniería de tejidos: (a) biorreactores de matraz con propela de agitación, (b) contenedores con pared giratoria, (c) biorreactores de esponjas-membranas porosas, (d) biorreactores de perfusión y (e) biorreactores que aplican fuerzas mecánicas controladas.

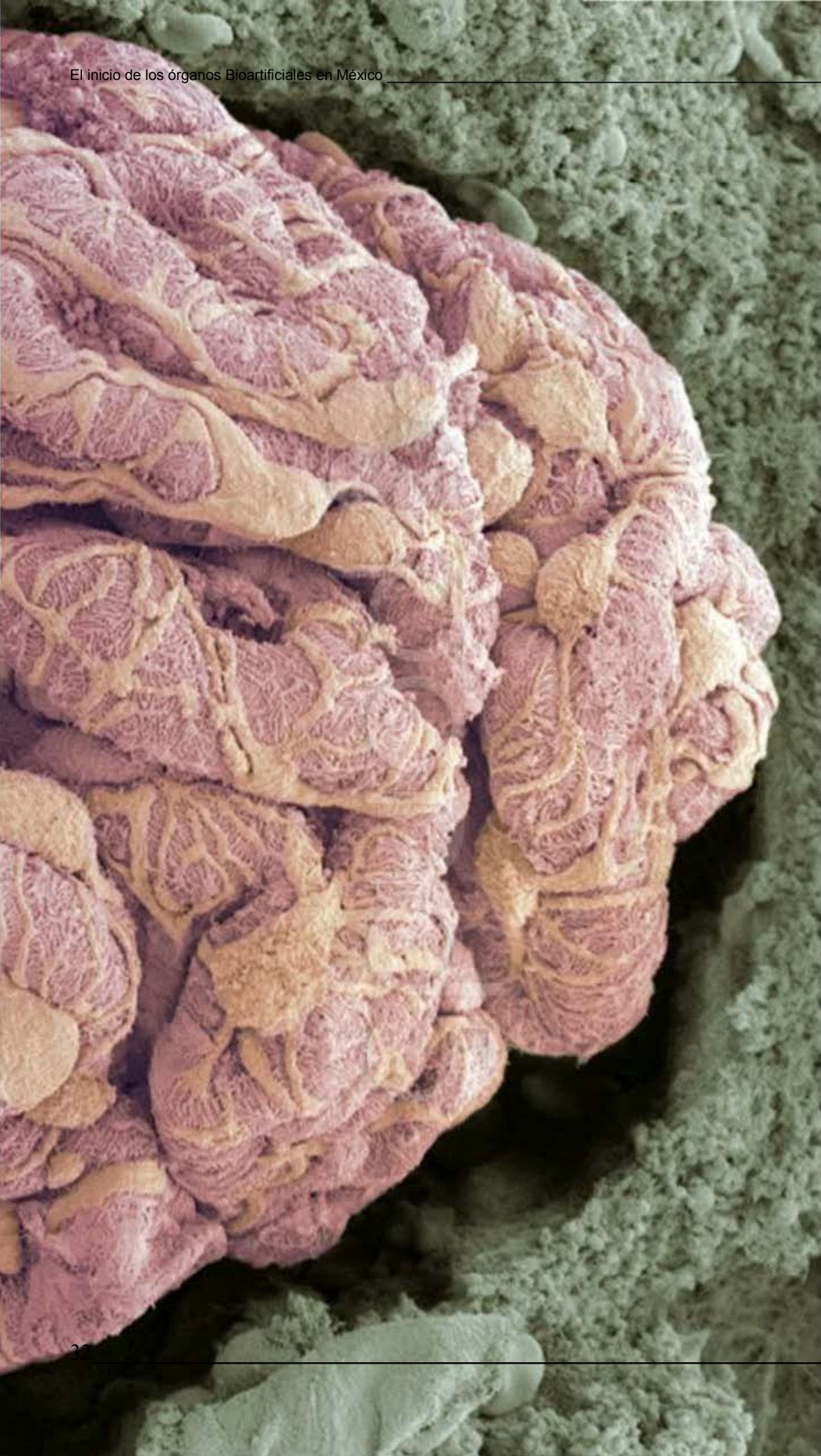




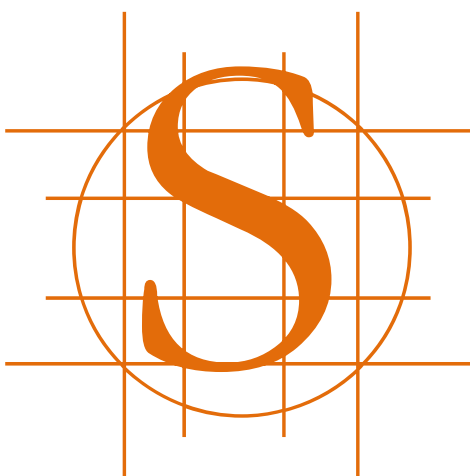
3

Capítulo

Metodología



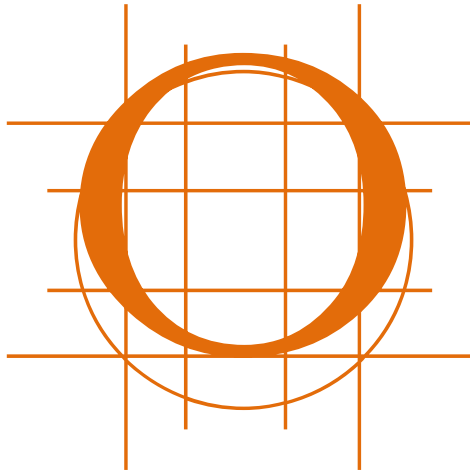
RECURSOS BIOLÓGICOS



e utilizaron para este trabajo cerdos jóvenes de 15 a 20 Kg, sexo indistinto. El cerdo se obtuvo de una granja certificada que cumple con los requisitos mínimos de buenas prácticas de producción porcina, dentro de la cual se realiza medicina preventiva.

Los cerdos empleados para la toma de órganos permanecieron en observación mínimo siete días antes del procedimiento quirúrgico, en la Facultad de Medicina (departamento de cirugía) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con la finalidad de vigilar su estado de salud; los animales que presentaron signos de enfermedad fueron omitidos en este estudio.

MATERIAL



ATENCIÓN DE ÓRGANOS

- Contenedor acero inoxidable (riñón).
- Gasas.
- Hilo quirúrgico.
- Hojas de bisturí.
- Jeringas.
- Lámpara.
- Ligaduras.
- Mango de bisturí.
- Mesa auxiliar.
- Paño quirúrgico.
- Pinza de disección.
- Pinza de disección con dientes.
- Pizas mosquito (curvas).
- Pizas mosquito (rectas).
- Porta agujas.
- Tijeras cirugía (curvas).
- Tijeras cirugía (rectas).

CANULACIÓN DE ÓRGANOS

- Conector de acrílico (catéter).
- Contenedor de acrílico o metálico.
- Jeringas.
- Ligaduras.
- Manguera de látex.
- Tijeras cirugía (curvas y rectas).

PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Agitador magnético.
- Parrilla de agitación.
- Balanza analítica.
- Cuchara.
- Jeringas.
- Vasos de precipitado.

REACTIVOS: SOLUTOS Y DISOLVENTES

- Agua desionizada y destilada. CAS 7732-18-5. H₂O
- Amfotericina B. CAS: 1397-89-3. C₄₇H₇₃NO₁₇
- Buffer fosfato salino (PBS):
 - Cloruro de sodio. CAS: 7647-14-5. NaCl
 - Cloruro de potasio. CAS: 7447-40-7. KCl
 - Fosfato de sodio. CAS: 7558-79-4. Na₂HPO₄
 - Fosfato de potasio monobásico. CAS: 7778-77-0. KH₂PO₄
- Desoxirribonucleasa I.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS). CAS: 151-21-3. C₁₂H₂₅NaO₄S
- Estreptomina.
- Heparina.
- Penicilina.
- Solución fisiológica.
 - Cloruro de sodio. CAS: 7647-14-5. NaCl
 - Cloruro de potasio. CAS: 7447-40-7. KCl
 - Cloruro de calcio. CAS: 7647-14-5. CaCl₂.
 - Lactato de sodio. CAS: 867-56-1. C₃H₅NaO₃
- Tributil fosfato (TBF). CAS: 126-73-8. (CH₃(CH₂)₃O)₃PO
- Tritón X100 (TX1). CAS: 9002-93-1. *t*-Oct-C₆H₄-(OCH₂CH₂)_xOH, x= 9-10

CONSTRUCCIÓN DEL DISPOSITIVO

- Manguera de PVC. 1/8".
- Manguera de silicón 1/8".
- Vaso de precipitados de 2 L y 4 L.
- Tapón de caucho de silicón con orificios.
- Contenedor de 20 L.
- Tapa de madera y de acrílico para 20 L.
- Conexiones de vidrio o policarbonato.
- Válvulas de tres vías de acrílico con teflón.
- Refrigerante de serpentín.
- Trampa de aire de diseño específico.
- Columna para descelularización de diseño específico.
- Válvula de drenado.
- Pinzas para bureta de tres dedos y sencillas.
- Soporte universal.
- Soporte para el contenedor de 20 L.
- Bomba peristáltica.
- Termómetro de dos lecturas.
- Válvula de un solo flujo.
- Jeringas.

DIAGRAMA DE FLUJO

(Hoja doble)

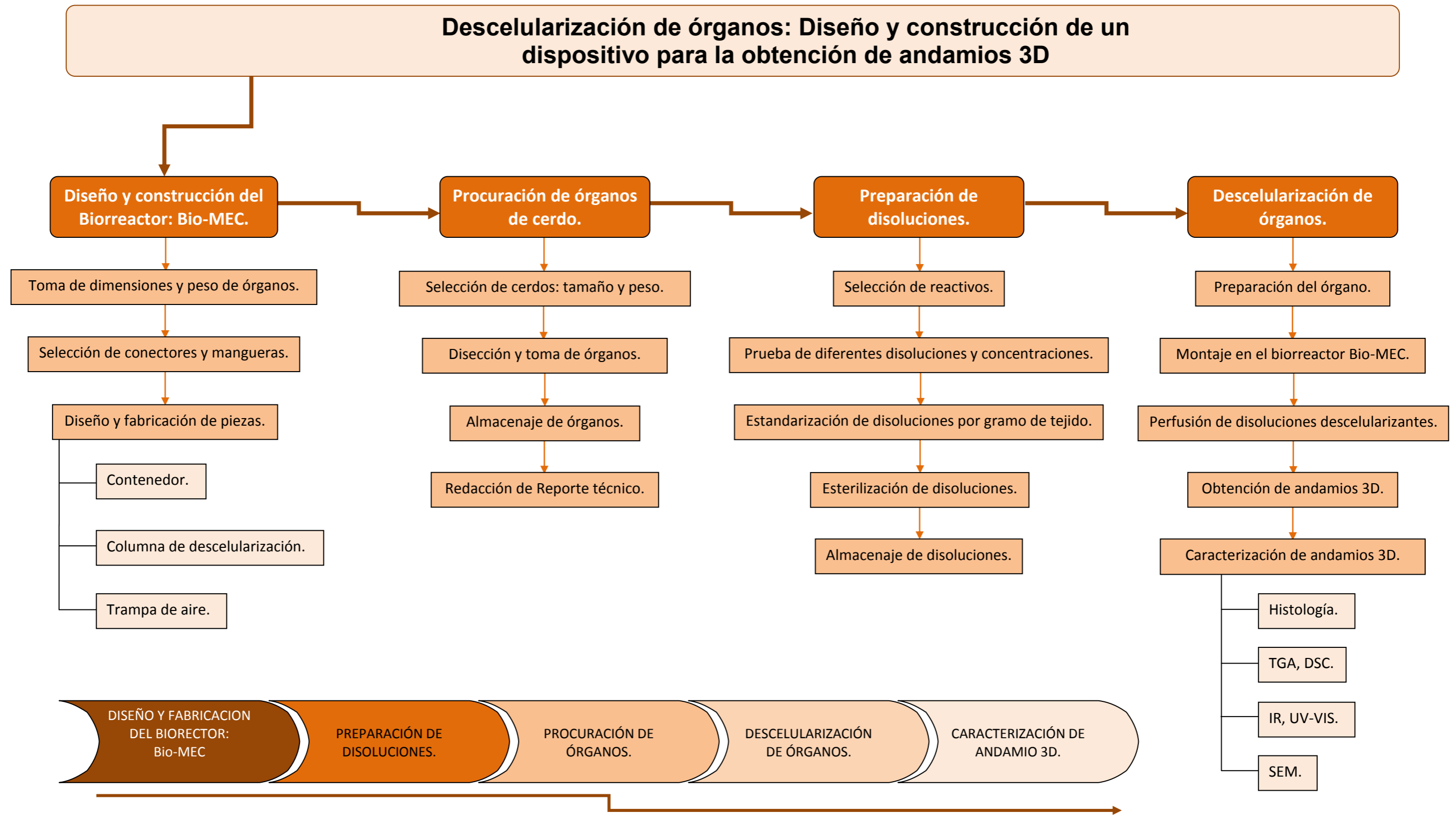
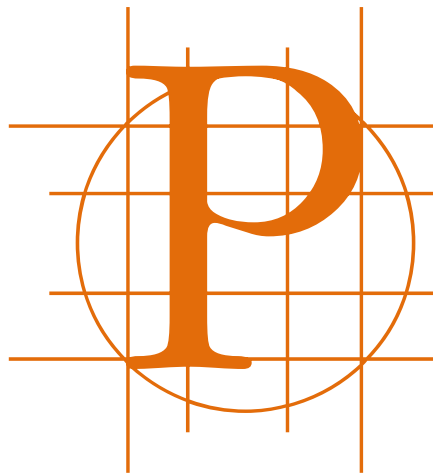


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología de trabajo.

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL DISPOSITIVO BIO-MEC



Para diseñar el dispositivo fueron necesarios los requerimientos del grupo de trabajo y la procuración de órganos para conocer sus dimensiones promedio y así proponer el volumen del contenedor, lo que deriva en la forma y selección de materiales para su fabricación.

El diseño debe ser sencillo, simple, de fácil montaje y desmontaje. Como la finalidad es la descelerización de órganos se analiza la circulación sanguínea en el cuerpo humano, ya que se imitó el recorrido en el diseño y construcción del dispositivo Bio-MEC.

REQUERIMIENTOS DEL DISPOSITIVO CON BASE EN LAS NECESIDADES DEL PROYECTO

Requerimientos primera parte:

- Contener un órgano (riñón, corazón, hígado) más la disolución descelularizante. El tamaño del contenedor debe ajustarse al tamaño del órgano a descelularizar.
- Mantener la arquitectura y composición de la matriz extracelular.
- Proporcionar la rapidez adecuada durante el proceso de descelularización.
- Permitir un monitoreo visual durante el proceso.

Requerimientos segunda parte:

- Imitar el flujo sanguíneo. El flujo de las disoluciones a utilizar debe ser similar al flujo fisiológico.
- Mantener la disolución a una temperatura en un rango de temperatura de: 4-6 °C y 10-15 °C.
- Contener un filtro para residuos desprendidos del órgano.

Requerimientos tercera parte:

- Eliminar las burbujas de las disoluciones mediante una trampa de aire.
- Evitar la presencia de aire en el sistema mediante una salida para purgar.

CONTENEDOR

Fue necesario conocer el peso y las dimensiones promedio de los órganos a utilizar, con la finalidad de estandarizar el volumen de la disolución descelularizante por gramo de tejido, y así seleccionar el contenedor adecuado que permita colocar órganos de varios tamaños.

PROCURACIÓN DE RIÑÓN

Para procurar los dos riñones simultáneamente, se liberaron de la fascia retroperitoneal para extraerlos con facilidad, una vez liberados se anudó la aorta descendente (Figura 8, color rojo) con tres nudos; uno a 5 cm arriba de la arteria renal “A” y dos nudos a 5 cm por debajo de la arteria renal “B” y “C” con distancia de un centímetro entre cada uno.

En la vena cava inferior (Figura 8, color azul) se requirió de dos nudos, uno a 5 cm por arriba de la vena renal “D” y otro a 5 cm por debajo de la vena renal “E”. Esto permitió obtener los órganos sin derramar sangre en el interior del cerdo y así procurar otros órganos con la limpieza necesaria. Para mayor detalle ver Anexo A.

Se realizaron los cortes necesarios (líneas punteadas) para separar los dos riñones juntos, extraerlos y depositarlos en un recipiente para perfundir por la parte superior de la vena cava con solución salina heparinizada hasta eliminar la sangre del riñón. Se observó un cambio de color, de marrón oscuro a café claro.

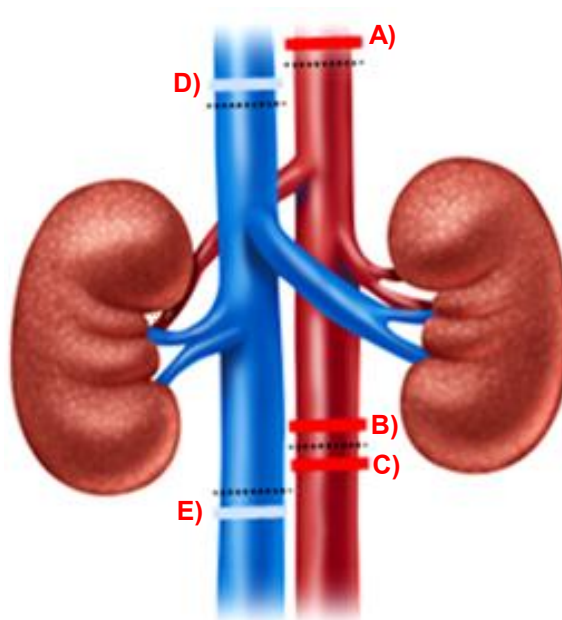


Figura 8. Cortes para la procuración de riñón.

VOLUMEN DEL CONTENEDOR

Una vez que se obtuvo el órgano a procesar, se registró su peso, volumen y sus dimensiones como: largo, ancho y espesor.

	Riñón:	Hígado:	Corazón
Peso promedio:	150 g	900 g	300 g
Volumen promedio:	150 mL	900 mL	300 mL
Largo promedio:	120 mm	150 mm	120 mm
Ancho promedio:	70 mm	80 mm	90 mm
Espesor promedio:	35 mm	50 mm	70 mm

Para proponer el volumen de disolución descelularizante se tomó como referencia el volumen y peso promedio para cada órgano, proponiendo el siguiente volumen: (33) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (59) (61) (62) (67) (68) (70) (71) (72) (73).

Volumen 1: volumen promedio (órgano) * 10 = mL de disolución descelularizante.

Volumen 2: volumen promedio (órgano) * 11.6666 = mL de disolución descelularizante.

Volumen 3: volumen promedio (órgano) * 13.3333 = mL de disolución descelularizante.

Volumen 4: volumen promedio (órgano) * 100 = mL de disolución descelularizante.

Propuestas de volumen:

	Volumen 1	Volumen 2	Volumen 3	Volumen 4
Riñón:	1,500 mL	1,750 mL	2,000 mL	15,000 mL
Corazón:	3,000 mL	3,500 mL	4,000 mL	30,000 mL
Hígado:	9,000 mL	10,500 mL	12,000 mL	90,000 mL

MATERIAL DEL CONTENEDOR

Los materiales propuestos fueron seleccionados en base a los encontrados en los bioreactores comerciales:

Propuesta de materiales:

Metal:	Acero inoxidable 304	Aluminio	-----
Polímero:	Acrílico	Polietileno	Policarbonato
Cerámico:	Borosilicato	Vidrio Topacio	Vidrio Pírex

Los materiales utilizados en el contenedor deben ser biocompatibles o bioinertes, de tal manera que la mayoría de los metales son excluidos. Los polímeros son utilizados en la mayoría de ensayos *in-vitro*, pero los recipientes son utilizados una vez y desechados, algunos otros se esterilizan en autoclave o por inmersión en disoluciones esterilizantes, por lo que deben ser resistentes a degradación química y térmica.

Los cerámicos utilizados en la construcción de contenedores son los vidrios: proporcionan una superficie fácil de limpiar, son resistentes a la mayoría de disoluciones utilizadas en la ingeniería de tejidos, normalmente son transparentes y permiten visualizar el avance del proceso que se realiza, motivo por el cual el material seleccionado es el vidrio de Borosilicato ya que tiene excelente resistencia química y baja expansión térmica.

FORMA DEL CONTENEDOR

Típicamente el contenedor de un dispositivo tipo biorreactor, puede tener forma de cilindro con base plana, prisma con base cuadrada, prisma con base hexagonal y cilindro con fondo cóncavo hacia arriba. Para eliminar o hacer cambio de fluidos, puede tener un desfogue en la base, en el costado o por medio de succión.

La forma del contenedor debe evitar áreas que favorezcan el crecimiento bacteriano por lo que la forma seleccionada es el cilindro de base circular cóncava hacia arriba (Figura 9). Con un orificio inferior de 18 mm para el desfogue. La forma de los contenedores permaneció constante y las variables fueron las dimensiones del contenedor, las cuales fueron:

	Riñón	Hígado	Corazón
• Diámetro externo:	132 mm	245 mm	160 mm
• Diámetro interno:	127 mm	235 mm	155 mm
• Grosor de pared:	2.25 mm	5 mm	2.25 mm
• Altura:	190 mm	380 mm	245 mm

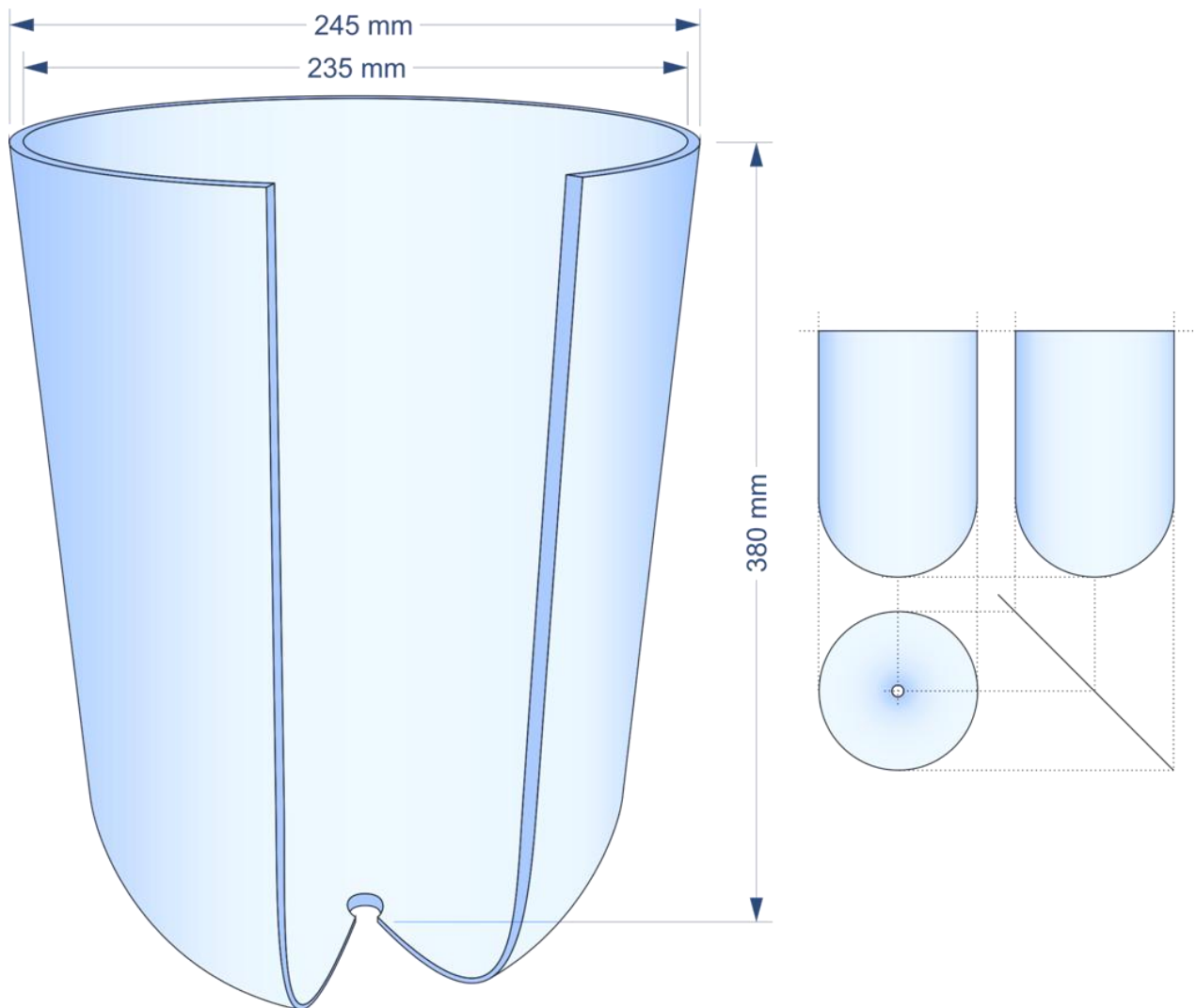


Figura 9. Semicorte en perspectiva con un punto de fuga (inferior) y proyecciones del contenedor de hígado.

MANGUERAS Y CONECTORES

Para garantizar un flujo exacto, se seleccionaron mangueras que se fabricadas para el uso continuo y de larga duración con bombas peristálticas:

LÁTEX

- Flexibles, no toxicas, amplio rango de resistencia química, antiabrasión.
- No recomendables con disolventes, grasas y aceites.
- Intervalo de temperatura dinámico: -30 °C a 80 °C.

POLITETRAFLUOROETILENO (PTFE)

- Químicamente inertes, excelente resistencia química, no toxica, bajo coeficiente de fricción.
- Duración de bombeo limitada.
- Intervalo de temperatura dinámico: -40 °C a 150 °C.

SILICONE Peroxide cured

- Excelente biocompatibilidad, no toxicas, resistentes a los hongos; resistentes a bajas temperaturas, resistentes al ozono; mínima tendencia a deformarse.
- No recomendables con solventes, aceites ni ácidos concentrados.
- Intervalo de temperatura dinámico: -40 °C a 100 °C.

SILICONE Platinum-cured

- Excelente biocompatibilidad, sin látex, no toxicas, resistentes a los hongos; resistentes al clima, al ozono y radiación; mínima tendencia a deformarse.
- No recomendables con ácidos o bases concentradas, solventes orgánicos ni aceites.
- Intervalo de temperatura dinámico: -40 °C a 100 °C.

SILICONE BioPharm

- Tienen la superficie interna lisa lo que minimiza la retención de partículas; tienen una absorción baja; excelente biocompatibilidad y no contienen aditivos lixiviables; no tóxicas, resistentes a los hongos; resistentes a ozono y radiación.
- No recomendables con solventes, aceites ni ácidos concentrados.
- Intervalo de temperatura dinámico: -40 °C a 100 °C.

SILICONE BioPharm Plus

- Son similares a las mangueras BioPharm, además: tienen la máxima vida útil de las mangueras de silicona, mejor capacidad a la presión se usan con gran cantidad de ácidos y álcalis
- No recomendables con solventes, aceites ni ácidos concentrados.
- Intervalo de temperatura dinámico: -40 °C a 100 °C.

PURI-FLEX

- Biocompatibles, termosellables y soldables, niveles bajos en uniones con proteínas, sin halógenos ni ftalatos.
- No usar con solventes, aceites ni ácidos concentrados.
- Intervalo de temperatura dinámico: -30 °C a 100 °C.

TYGON E-LFL

- Tienen la mayor vida útil de todas las mangueras Tygon, transparentes para monitorear el flujo, amplia resistencia química.
- No usar con ácidos ni álcalis fuertes.
- Intervalo de temperatura dinámico: 0 °C a 40 °C.

TYGON E-Food

- Diseñada para manipular productos de alimentos, interior liso, no son tóxicas.
- Duración de bombeo limitada.
- Intervalo de temperatura dinámico: 0 °C a 40 °C.

TYGON E-Lab

- Transparentes para monitorear el flujo, resistente a casi todas las sustancias químicas inorgánicas.
- Duración de bombeo limitada.
- Intervalo de temperatura dinámico: 0 °C a 40 °C.

TYGON Chemical

- Resistencia química óptima de la formulación Tygon, transparentes para monitorear el flujo, compatible con solventes polares.
- Duración de bombeo limitada, degradación del exterior por cabezal de bomba sin cambiar diámetro interno.
- Intervalo de temperatura dinámico: 0 °C a 40 °C.

C-FLEX ULTRA

- Biocompatibles, termosellables y soldables.
- No recomendables con hidrocarburos.
- Intervalo de temperatura dinámico: -50 °C a 40 °C.

C-FLEX

- Biocompatible, termosellables y soldables.
- No recomendables con hidrocarburos.
- Intervalo de temperatura dinámico: -40 °C a 40 °C.

ENSAYO DE DEGRADACIÓN

Las mangueras propuestas son de la marca Masterflex y el código utilizado en este trabajo es el número de serie de la manguera (Figura 10). Para la selección de mangueras, se tomaron en cuenta los tiempos de vida útil de las mangueras (Figura 11) y se realizó el ensayo de degradación sugerido por el fabricante y descrito a continuación.

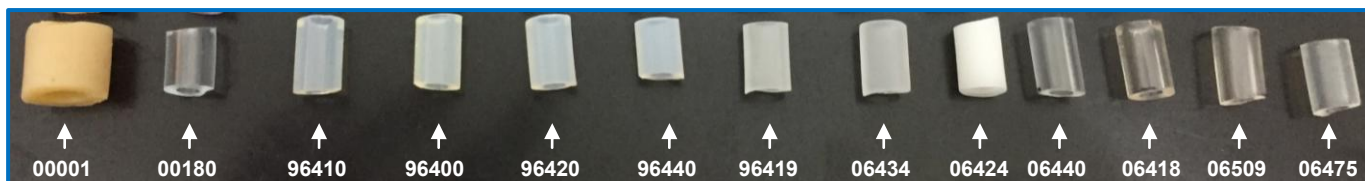


Figura 10. Mangueras Masterflex y su número de serie.

- Se cortó y registró la masa de un segmento de 2 cm de manguera.
- Los segmentos fueron sumergidos en 20 mL de las disoluciones a prueba: SDS TXT TBF
- En los días 5, 10, 15, se registraron los pesos de los segmentos.

Nombre	No. de serie
• LÁTEX	00001
• POLITETRAFLUOROETILENO	00180
• SILICONE:	
- Peroxide-cured:	96410
- Platinum-cured.	96400
- BioPharm.	96420
- BioPharm Plus.	96440
• PURI-FLEX.	96419
• C-FLEX ULTRA.	06434
• C-FLEX	06424
• TYGON.	
- E-LFL.	06440
- E-Food.	06418
- E-Lab.	06509
- Chemical.	06475

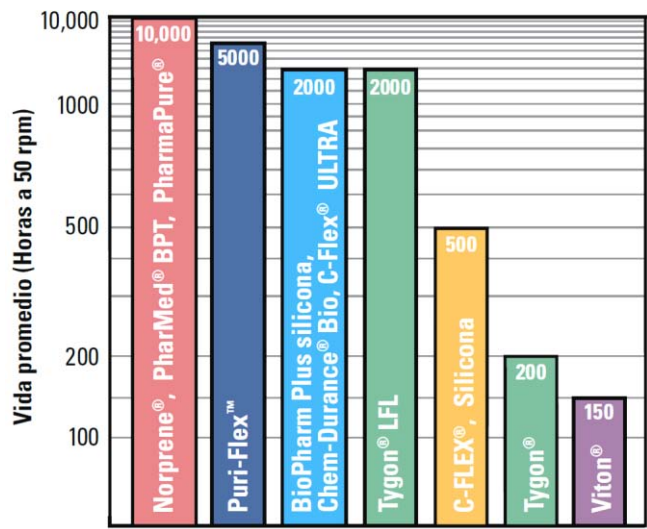


Figura 11. Comparación de la vida útil del material de las mangueras.

Se utilizaron conectores de policarbonato en forma de “Y” con un diámetro interno de 6.25 mm, reductores con diámetros internos de 6.25 mm y 2.75 mm; conectores, llaves de tres vías y válvulas de un solo paso, con diámetro interno de 6.25 mm ilustrados en la Figura 12.

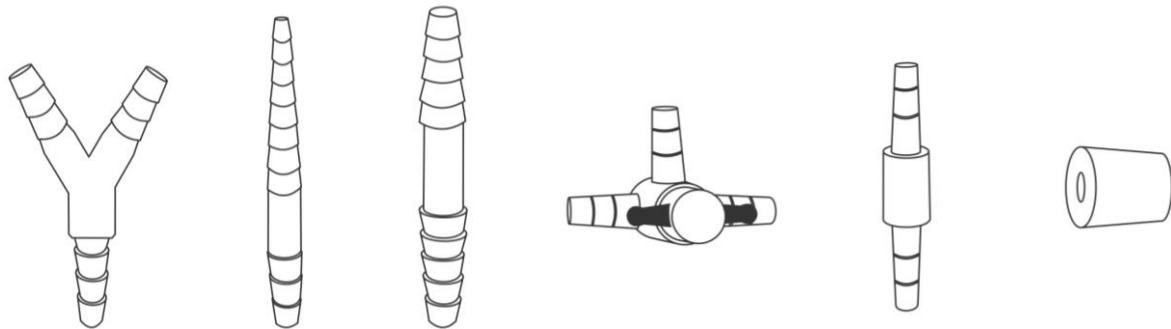


Figura 12. Ilustración de los conectores utilizados en la fabricación del dispositivo.

Se utilizó vidrio Borosilicato en conectores y extensiones que están en el interior del contenedor y en la fabricación de piezas de diseño específico con las siguientes dimensiones:

- Diámetro interno de 6 mm y diámetro externo de 9 mm (conectores).
- Diámetro interno de 35 mm y diámetro externo de 38 mm (refrigerante).
- Diámetro interno de 57 mm y diámetro externo de 60 mm (trampa de aire).

DISOLUCIONES UTILIZADAS EN LA DESCELULARIZACIÓN

Como las disoluciones descelularizantes pueden afectar de manera negativa la composición y estructura de la MEC, durante el proceso de descelularización, la selección de éstas así como el método descelularizante y el desarrollo de los protocolos, fueron etapas críticas para descelularizar.

Se utilizaron diferentes disoluciones para la descelularización de órganos, tomadas de los métodos existentes y que reportaron los mejores resultados, con las siguientes concentraciones del reactivo descelularizante: 0.1 %, 0.3 %, 0.5 %, 1 %. (33) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (58) (59) (61) (62) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73)

- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS).
- Triton X100 (TX1).
- Tributíl Fosfato (TBF).
- SDS-TX1.

La preparación de las disoluciones utilizadas en este trabajo se describe a continuación:

DISOLUCIÓN FISIOLÓGICA-HEPARINA

Esta disolución se utilizó para eliminar los residuos de sangre en arterias, venas y capilares. La función principal de la heparina es evitar la formación de coágulos dentro de los órganos a descelularizar, ya que la presencia de coágulos impide que el flujo de la disolución interactúe con las células y éstas sean removidas.

Por cada gramo de órgano (peso húmedo):

5 mL	Solución salina fisiológica (9 %).
50 U	Heparina.

Mantener a 4 °C hasta su uso.

DISOLUCIÓN FISIOLÓGICA - AMFOTERICINA B - ESTREPTOMICINA - PENICILINA

El uso de la disolución con antifúngico, antibiótico, y antiviral se empleó para mantener la esterilidad del órgano y además evitar la contaminación por hongos, bacterias y virus durante el proceso de descelularización.

Por cada gramo de órgano (peso húmedo):

10 mL	Solución salina fisiológica (9 %).
0.0625 µg	Amfotericina B.
25 µg	Estreptomicina.
25 U	Penicilina.

Mantener a 4°C hasta su uso.

DISOLUCIÓN BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) 0.01 M

La disolución buffer fue empleada con el objetivo de eliminar los residuos celulares remanentes de la descelularización y mantener el órgano en un ambiente salino a valor de pH controlado (pH = 7.4).

- Procedimiento uno:

1000 mL	Agua desionizada.
1 sobre	PBS (SIGMA 0.01 M).

- Procedimiento dos:

800 mL	Agua desionizada.
8 g	NaCl.
0.2 g	KCl.
1.44 g	Na ₂ HPO ₄ .
0.24 g	KH ₂ PO ₄ .

- Ajustar pH a 7.4 con HCl, aforar a 1000 mL con agua desionizada.
- Esterilizar con autoclave y mantener a 4 °C hasta su uso.

DISOLUCIÓN REACTIVO DESCELULARIZANTE AL 1 %

La finalidad de estas disoluciones es la degradación de la membrana celular y la formación de micelas mixtas detergente-fosfolípidos así como extraer el contenido celular.

Por cada gramo de órgano (peso húmedo):

Disolución SDS:	20 mL	Agua desionizada.
	0.2 g	Dodecil sulfato de sodio.
Disolución TX1:	20 mL	Agua desionizada.
	0.2 mL	Tritón X100.
Disolución TBF:	20 mL	Agua desionizada.
	0.2 mL	Tributil fosfato.

Mantener a 4°C hasta su uso en un lapso no mayor a 10 h.

DISOLUCIÓN PRESERVADORA DE ÓRGANOS

Los órganos procurados para descclularización deben transportarse en una disolución específica para evitar la vasoconstricción y mantener la MEC en buenas condiciones.

1000 mL contiene:

0.0022 g	CaCl.
0.6710 g	KCl.
0.8766 g	NaCl.
0.8132 g	MgCl ₂ ·6H ₂ O.
27.9289 g	Histidina.
0.4085 g	Triptófano.
5.4651 g	Manitol.

DESCELULARIZACIÓN POR PERFUSIÓN

Se ha reportado que la descelularización por perfusión (39) es una técnica eficaz que puede ser aplicada a los órganos que cuentan con venas y arterias, para administrar agentes descelularizantes y para el transporte de residuos celulares fuera del órgano. Perfundir la disolución descelularizante directamente a través de las arterias de un órgano, comparado con la inmersión, agitación y sonicación, mejora el transporte del líquido (38) (80).

Los dispositivos de perfusión pueden ser diseñados de dos maneras. Los primeros mantienen el flujo constante de manera paralela y por un costado a la ubicación del andamio (Figura 13A) y en los segundos el flujo de las disoluciones es a través de los andamios provocando un gradiente de presión dentro del andamio (Figura 13B). (80)

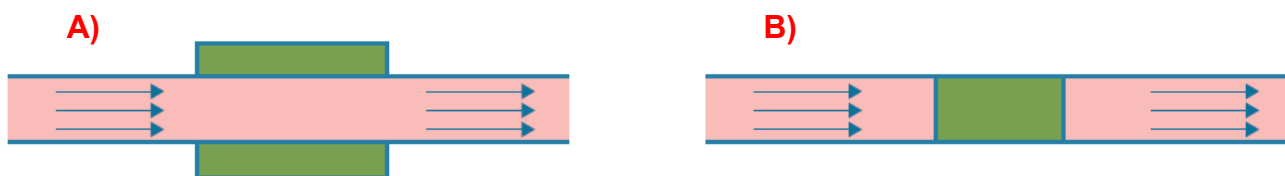


Figura 13. Ilustración del flujo por perfusión: A) paralelo a la superficie y B) a través del andamio.

La principal característica de un sistema de perfusión es el flujo de las disoluciones a través del órgano o tejido, éste puede ser continuo (42) durante la primera etapa del proceso de descelularización, debido a que la lisis celular provoca un aumento en el volumen del órgano y a su vez la vasoconstricción, o intermitente (63) en las etapas finales del proceso, simulando el flujo sanguíneo para estimular el andamio de MEC por medio de expansiones y contracciones.

Los dispositivos por perfusión reducen los riesgos de contaminación asociados con la manipulación y la transferencia de andamios entre dispositivos separados (81), ya que el órgano se mantiene en el contenedor mientras que el flujo de las disoluciones, que se encuentran en contenedores separados, es intercambiado de acuerdo a la necesidad del proceso (40).

TRAMPA DE AIRE

La trampa de aire (Figura 14) se utilizó para eliminar burbujas que se encuentran presentes en el flujo de las disoluciones. La presencia de burbujas impide el paso de la disolución descelularizante por todo el órgano ya que actúan como tapones en las arteriolas y capilares, lo que resulta en una descelularización ineficiente.

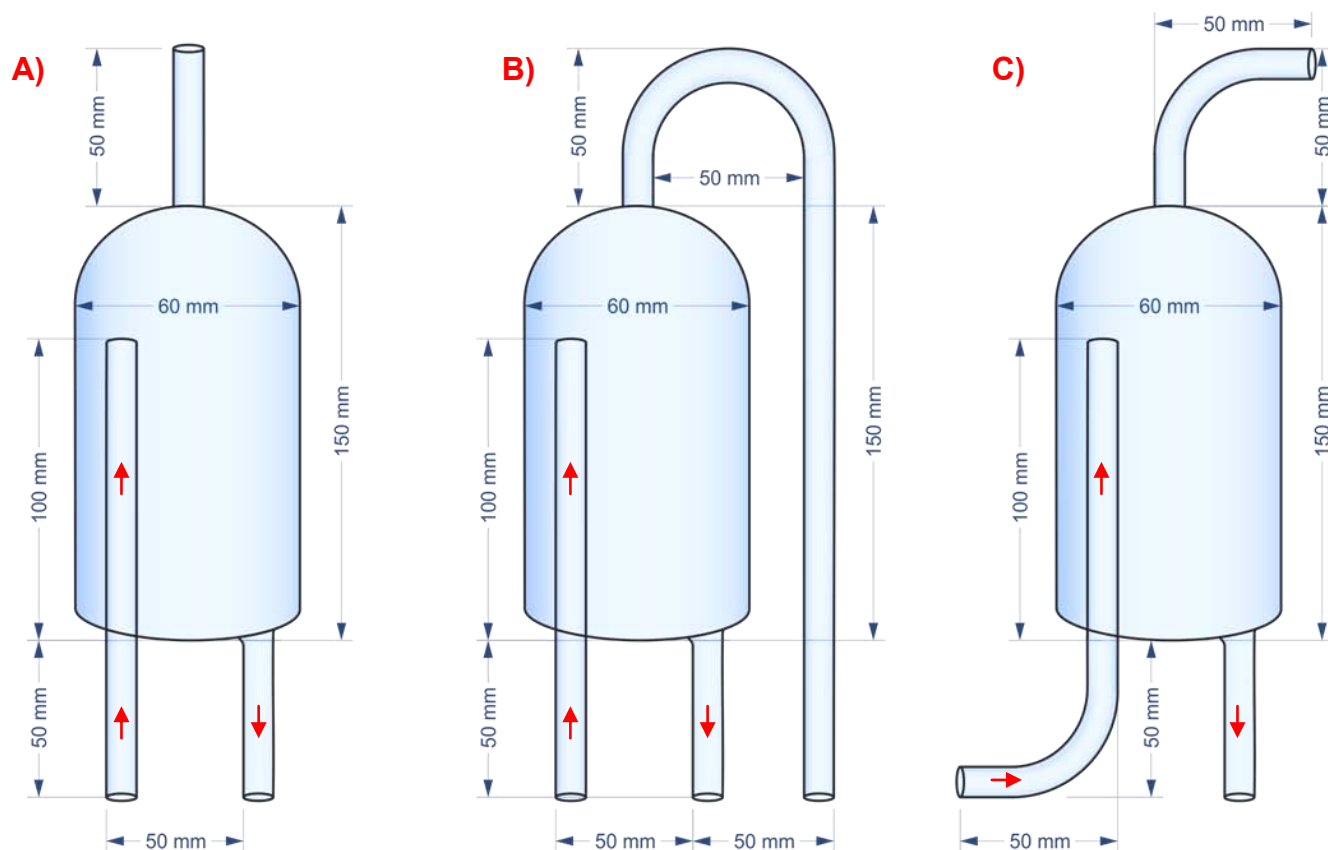


Figura 14. Ilustración de las trampas de aire: A) prototipo 00, B) prototipo 01, C) prototipo 02.

Las trampas de aire del dispositivo Bio-MEC fueron construidas con vidrio borosilicato debido a su buena resistencia química. Tiene una entrada con un diámetro interno de 6 mm y 15 mm de altura con la finalidad de introducir la disolución (con burbujas) en la parte superior de la trampa; la salida del líquido se encuentra en la parte inferior debido a que la densidad de la disolución es mayor a la del aire en las burbujas permitiendo eliminar el aire de la disolución.

COLUMNA DE DESCELULARIZACIÓN

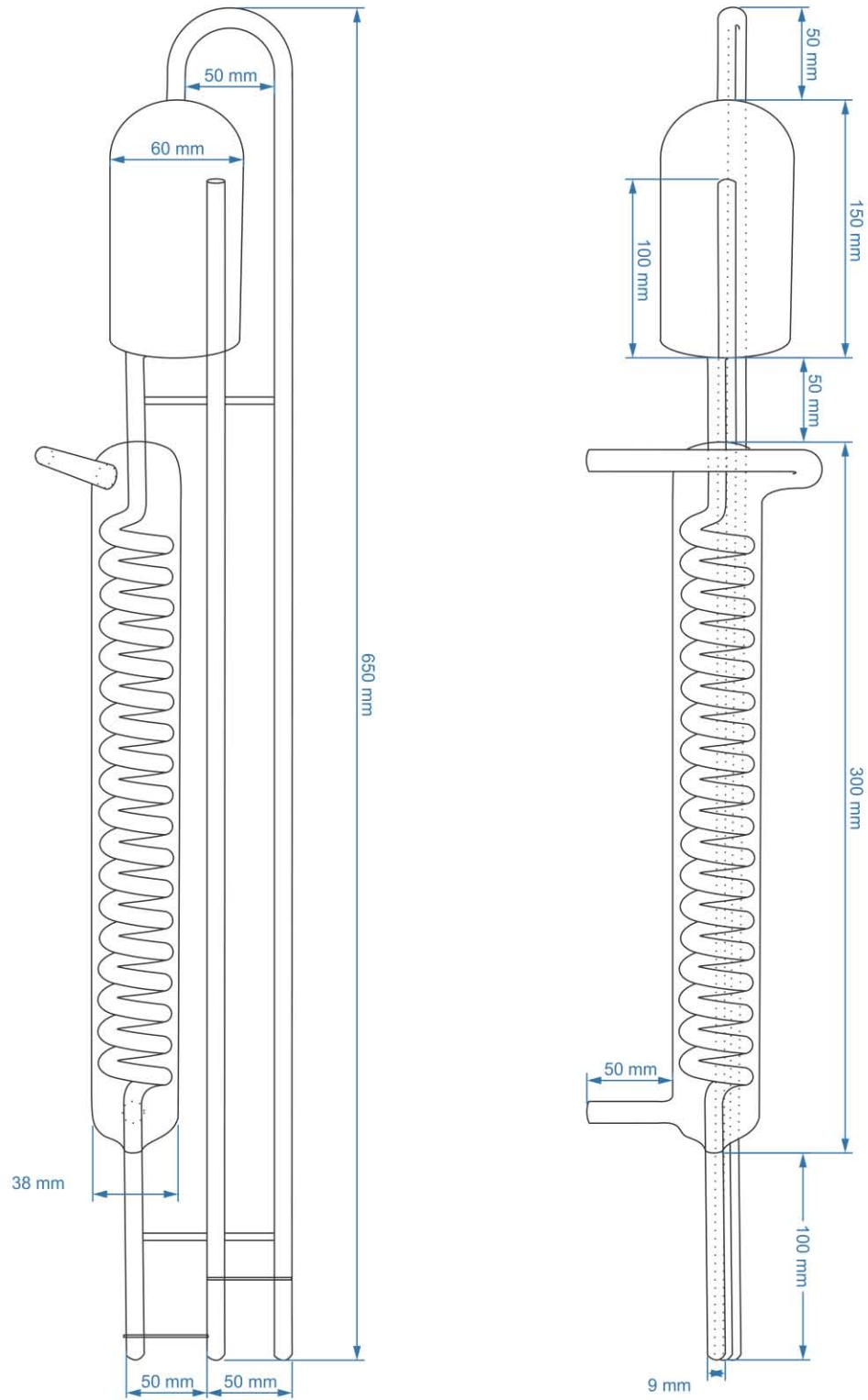


Figura 15. Vista frontal y lateral de la columna para descellularizar del Dispositivo Bio-MEC prototipo 01.

CIRCULACIÓN DE LA SANGRE

Para perfundir las disoluciones utilizadas, se requirió de conocer la circulación sanguínea (Figura 16), ya que se pretendía imitar sus elementos como: corazón, venas, arterias, pulmones y su recorrido al momento de diseñar y construir el dispositivo Bio-MEC. Con ayuda de la descripción de la circulación sanguínea, se hará una analogía de los elementos que fueron utilizados (Figura 18).

1. La sangre es expulsada del corazón por el ventrículo izquierdo y conducida por la aorta y sus ramas arteriales de distribución a los capilares de los tejidos de todo el organismo.
2. En los capilares, la sangre cede oxígeno y nutrientes a las células, y recoge anhídrido carbónico y productos metabólicos.
3. De este modo, la sangre arterial se transforma en venosa, la cual es conducida por las venas de vuelta al corazón por la aurícula derecha.
4. De la aurícula derecha la sangre pasa al ventrículo derecho, que la expulsa por la arteria pulmonar a los capilares pulmonares.
5. En los pulmones tiene lugar la hematosis, proceso mediante el cual la sangre cede el anhídrido carbónico al aire de los pulmones y capta oxígeno, transformándose de este modo otra vez en sangre arterial.
6. La sangre oxigenada de los pulmones sale por las venas pulmonares y llega a la aurícula izquierda; finalmente pasa al ventrículo izquierdo y se cierra el círculo.

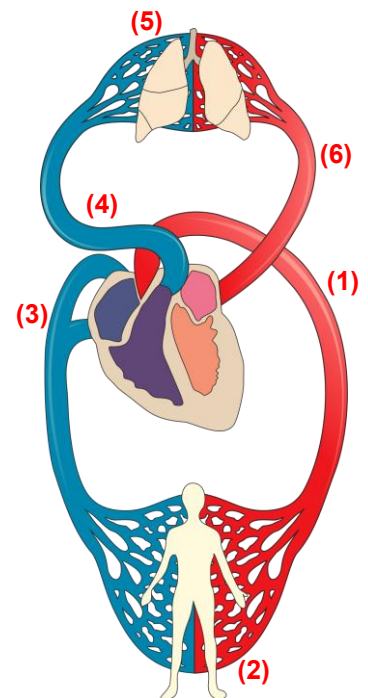


Figura 16. Flujo sanguíneo en el cuerpo humano.

FLUJO DE DISOLUCIONES

Para establecer el flujo que se utilizó, en la bomba peristáltica del dispositivo, fue necesario analizar el flujo sanguíneo para cada órgano (60) (82) (83) (84) (85). Sin embargo, debido al aumento de volumen en los órganos, consecuencia de la lisis celular durante la descelularización, disminuye el área transversal de arteriolas, capilares y vénulas, esto provoca que los valores se reduzcan hasta un 84 % del valor fisiológico reportado (Figura 17).

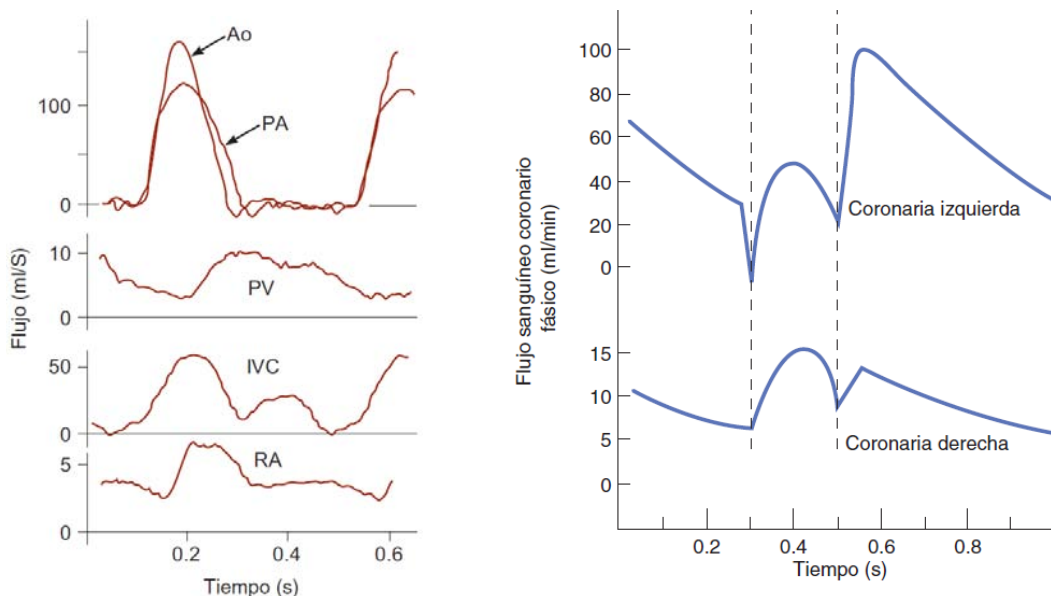


Figura 17. Cambios en el flujo sanguíneo durante el ciclo cardíaco. Ao, aorta; PA, arteria pulmonar; PV, vena pulmonar; IVC, vena cava inferior; RA, arteria renal. Imagen modificada de (82).

$$\text{Flujo empleado} = \text{Flujo sanguíneo} * 0.16666$$

Flujo de descelularización

	Flujo sanguíneo	Reportado	Empleado
Riñón:	360 mL/min (82)	6-12 mL/min (83)	60 mL/min
Corazón:	115 mL/min (82)	1000-1700 L/min (60)	20 mL/min
Hígado:	600 mL/min (82) (84)	10-20 mL/min (85)	100 mL/min

CIRCULACIÓN DE LAS DISOLUCIONES EN EL DISPOSITIVO

1. La disolución se tomó del contenedor y expulsada por uno de los cabezales de la bomba peristáltica “**B₂**” y conducida por la manguera a la trampa de aire “**T**”.
2. En la trampa de aire “**T**” se eliminaron las burbujas de la disolución.
3. La disolución pasó por el condensador “**R**” para bajar la temperatura y/o mantenerla constante.
4. La disolución se perfundió en el órgano “**O**” para distribuirse en los capilares, con la finalidad de promover las interacciones con las membranas celulares y una vez degradada la membrana celular sacar los residuos celulares del órgano al contenedor “**C**”.
5. Por el segundo cabezal de la bomba peristáltica “**B₁**” la disolución es dirigida al filtro.
6. El filtro eliminó los residuos de tejido para evitar bloqueos dentro de los capilares, y la disolución filtrada es regresada al contenedor “**C**” y se cierra el círculo.

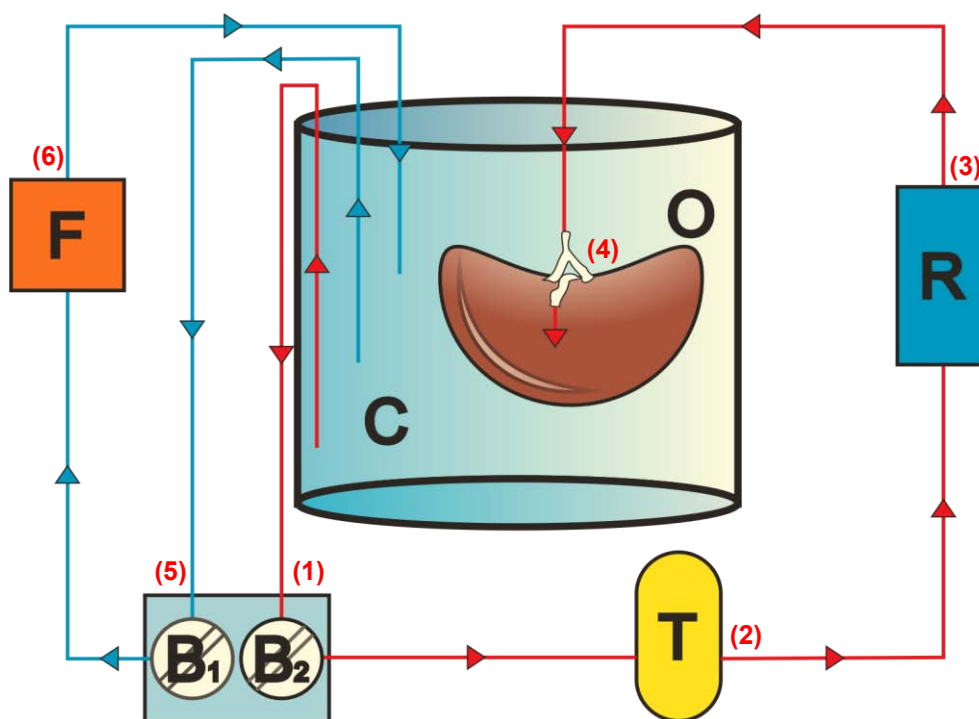


Figura 18. Ilustración del flujo de disoluciones en el dispositivo.

CONEXIONES DEL PROTOTIPO “BIO-MEC 01”

Se colocaron tres conectores (“a”, “b” y “c”), en la columna de descelularización “D” (Figura 19), en “a” se conectó un tramo de manguera 96440 (entrada del flujo), en “b” se conectó un tramo de manguera 96410 y en el extremo una llave de dos vías “v2”, en “c” se colocó una llave de tres vías “v3” con dos conectores “d” y “e” ambos con manguera 96440.

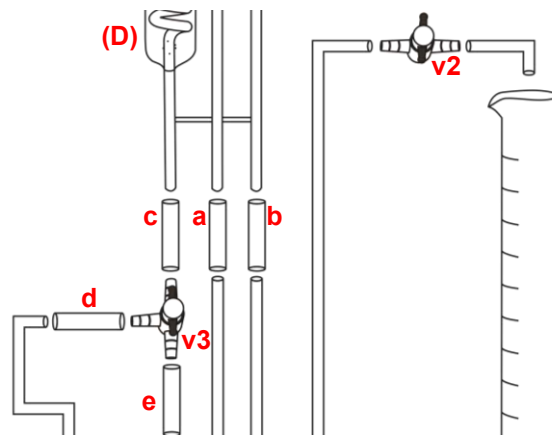


Figura 19. Conexiones utilizadas en la columna de descelularización.

En el tapón de silicón se colocan 5 conectores de policarbonato: uno central y 4 a un radio de 25 mm. En el conector central se insertó la manguera “d” (96440, conectada al órgano), en los exteriores las mangueras “a’”, “f’” (manguera 96440, conectan a la bomba), “f” (salida del filtro) y “e” (purga de burbujas) ambas con manguera 96440. Véase Figura 20.

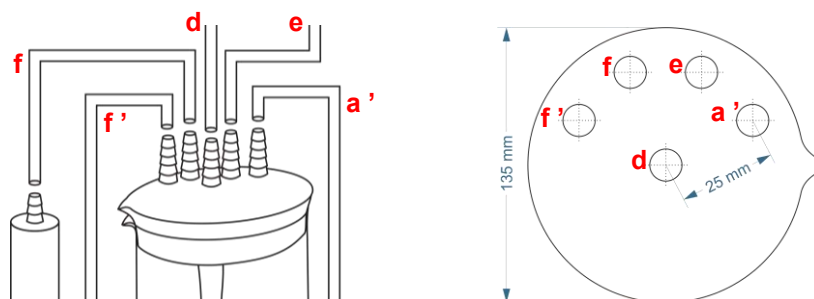


Figura 20. Conexiones utilizadas en el tapón del contenedor.

La manguera que se introduce en el cabezal de la bomba fue 96420.

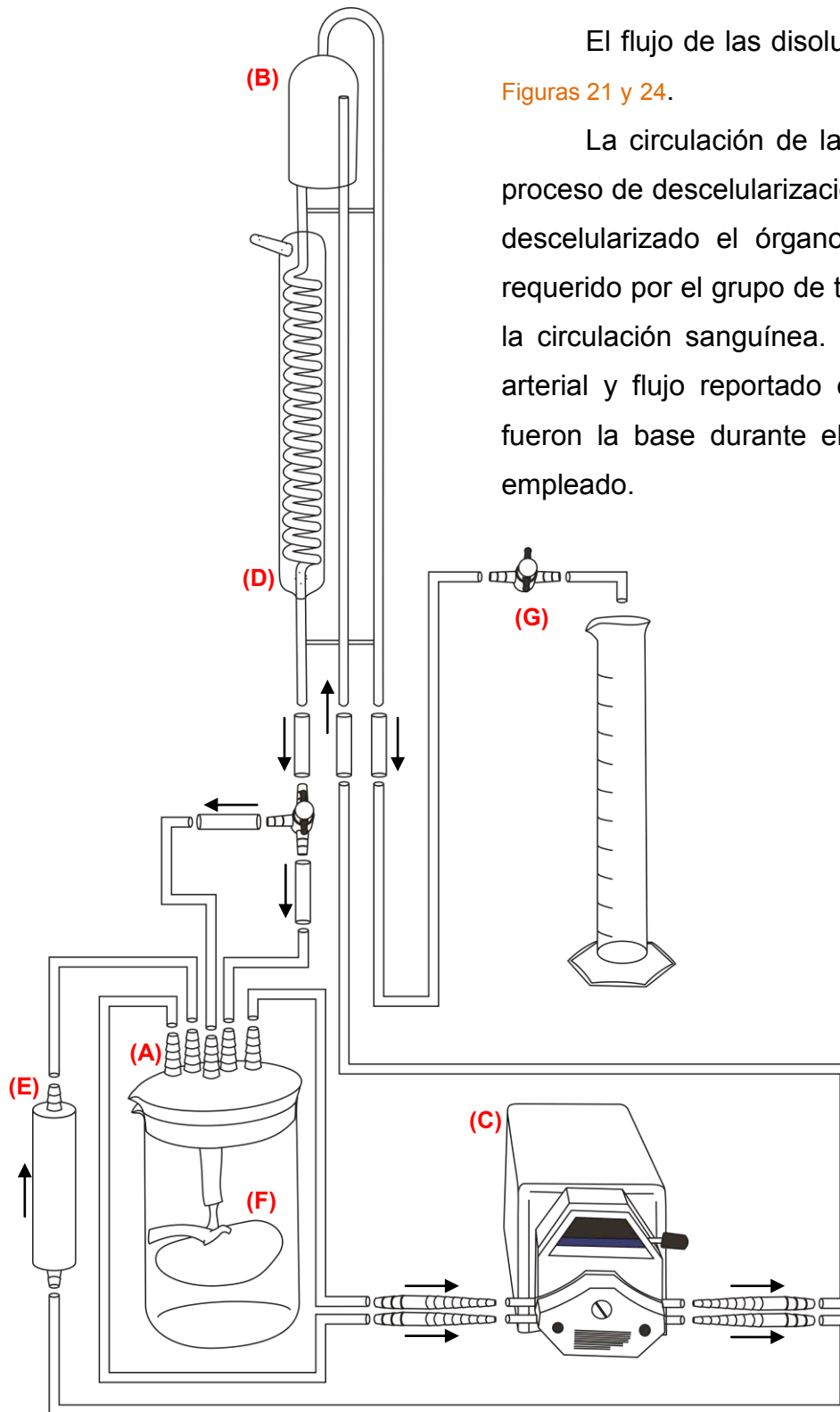


Figura 21. Ensamble de dispositivo Bio-MEC prototipo 01.

El flujo de las disoluciones se observa en las Figuras 21 y 24.

La circulación de las disoluciones durante el proceso de descelularización fue continua y una vez descelularizado el órgano discontinua. Ya que lo requerido por el grupo de trabajo es el flujo similar a la circulación sanguínea. Por tal motivo la presión arterial y flujo reportado en Fisiología Médica (82) fueron la base durante el desarrollo del protocolo empleado.

CONEXIONES DEL PROTOTIPO “Bio-MEC 02”

Se colocaron tres conectores (“a”, “b” y “c”), en la trampa de aire “B”, en “a” se conectó un tramo de manguera 96440 (entrada del flujo), en “b” se conectó un tramo de manguera 96410 y en el extremo una llave de dos vías “v2”, en “c” se colocó una llave de tres vías “v3” con dos conectores “d” y “e” ambos con manguera 96440. Véase [Figura 22](#).

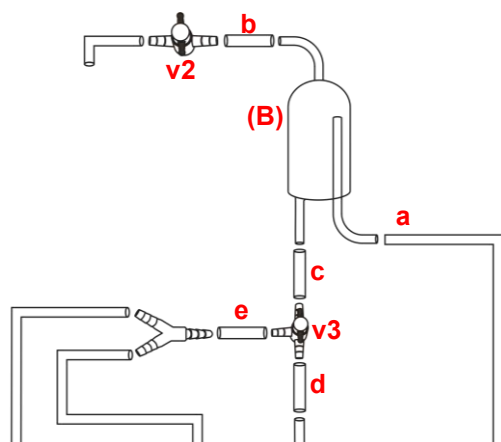


Figura 22. Conexiones utilizadas en la trampa de aire.

En la tapa se colocaron 6 conectores de policarbonato. En el conector central se insertó la manguera “e2” y a 50 mm “e1” (purga de burbujas del órgano) ambas con manguera 96440; en los 4 conectores exteriores se conectaron las mangueras “a’”, “f’” (mangueras 96440, se conectaron a la bomba), f (salida del filtro) y d (órgano). Véase [Figura 23](#).

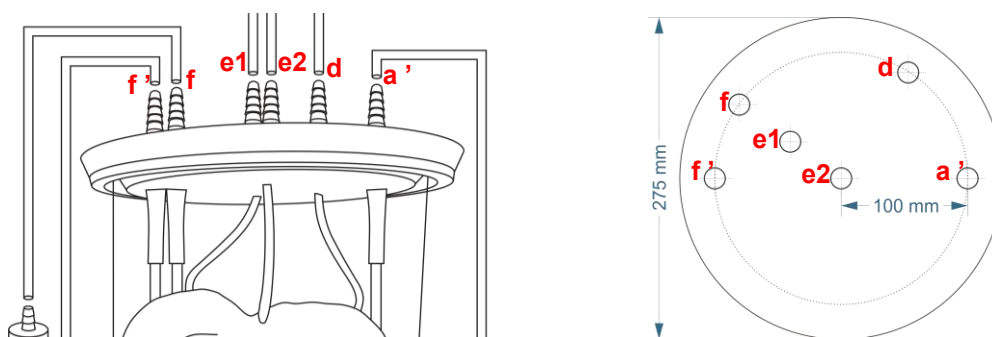
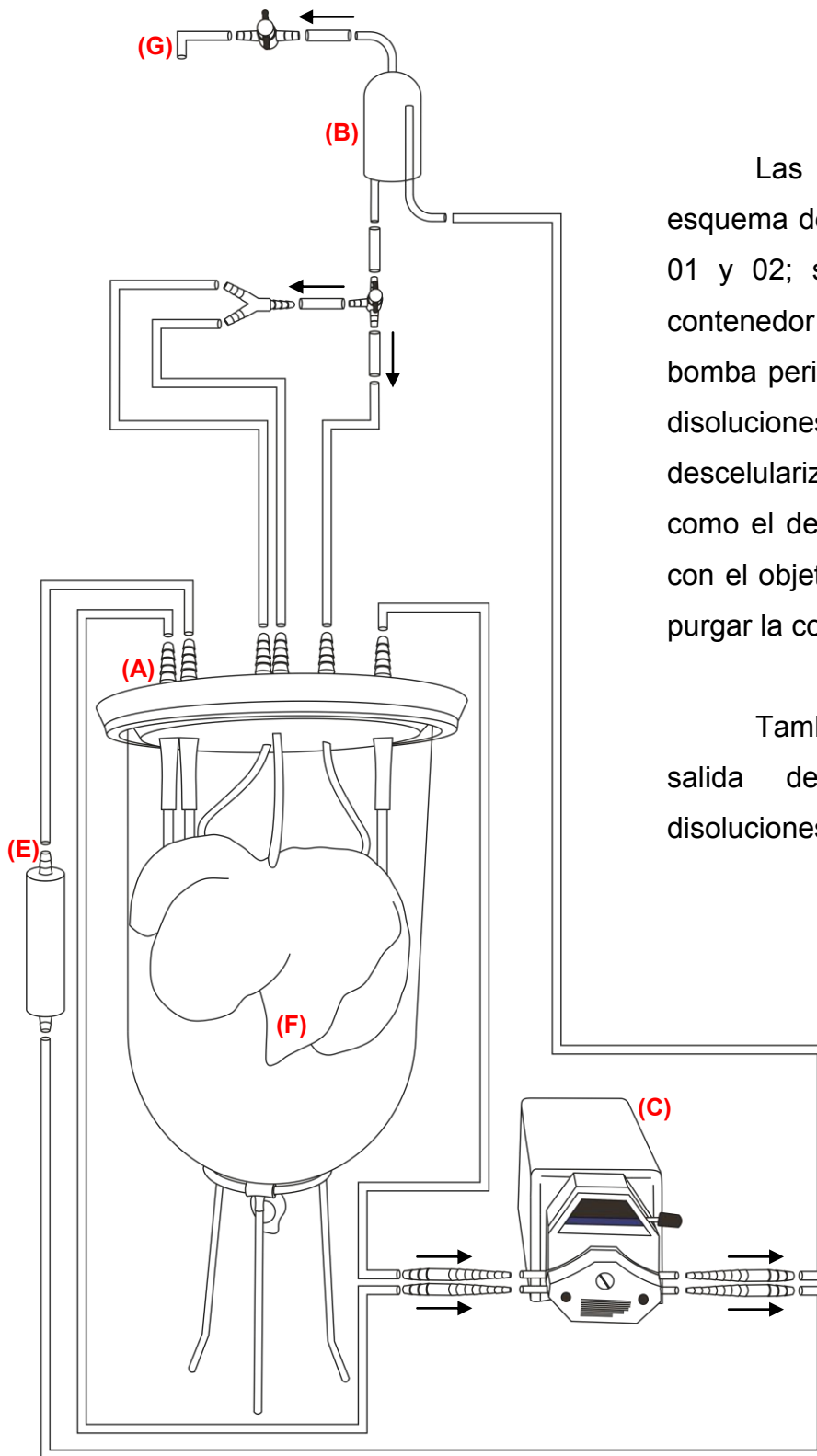


Figura 23. Conexiones utilizadas en la tapa del contenedor.

La manguera que se introduce en el cabezal de la bomba es 96420.



Las Figuras 21 y 24 muestran el esquema del dispositivo Bio-MEC prototipo 01 y 02; se ilustran las conexiones del contenedor "A" a la trampa de aire "B", a la bomba peristáltica "C" y el recorrido de las disoluciones a través de la columna de descelularización "D" y el filtro "E", así como el desvío por la válvula de tres vías con el objetivo de perfundir el órgano "F" y purgar la columna de descelularización.

También se muestra la línea de salida del aire eliminado de las disoluciones "G".

Figura 24. Ensamble de dispositivo Bio-MEC prototipo 02.

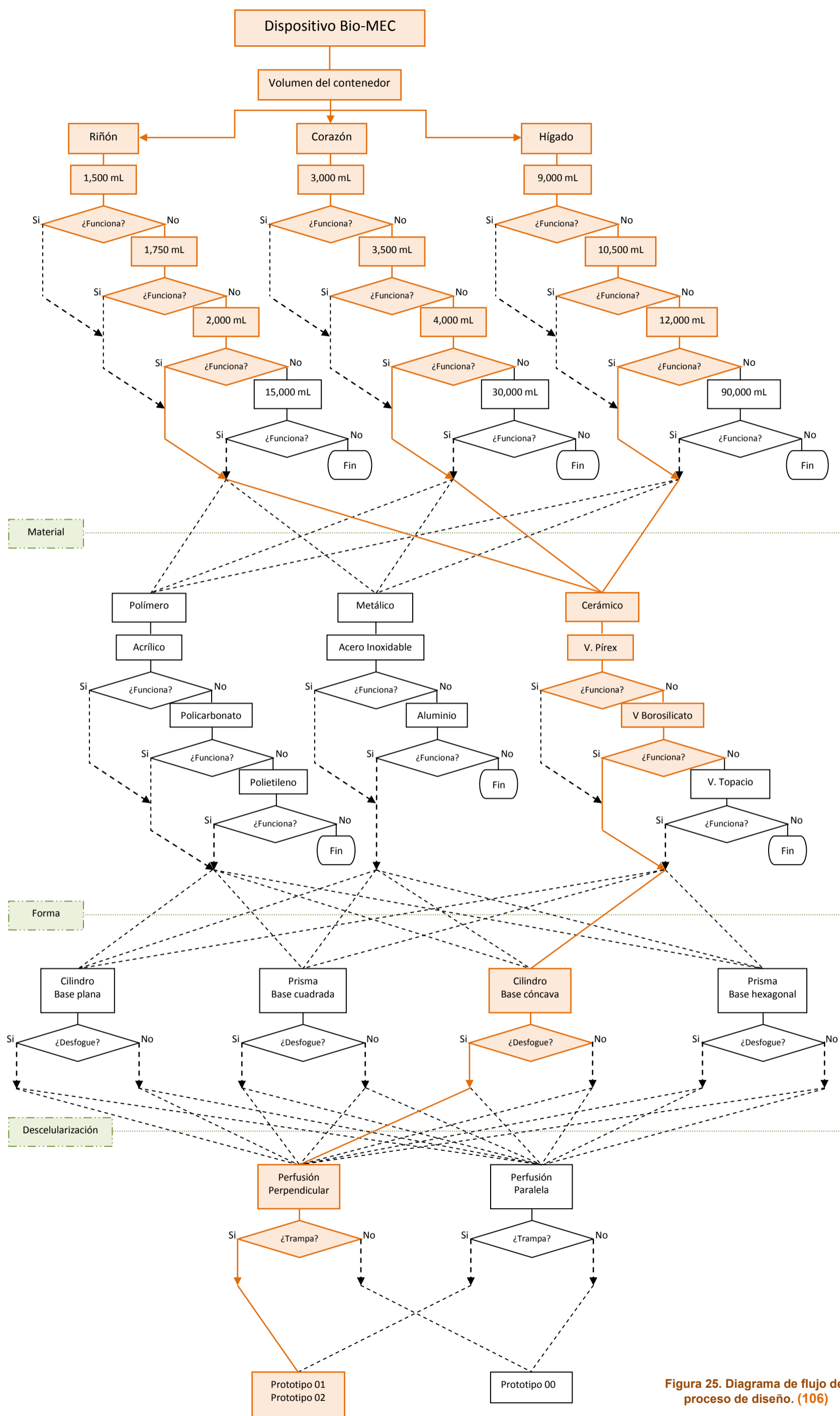


Figura 25. Diagrama de flujo del proceso de diseño. (106)

PREPARACIÓN DEL ÓRGANO PARA LA DESCELULARIZACIÓN

1. Canular arteria(s) y/o vena(s) del órgano (figura 26):

Se inspeccionó el órgano y se descartó si presentan daños físicos como: cortes, desgarres o deformaciones. Se introdujo un conector de policarbonato de tal manera que no obstruyera las vías alternas, el cual fue sujetado con ligaduras. Se verificó la ausencia de fugas en el catéter introduciendo solución salina.

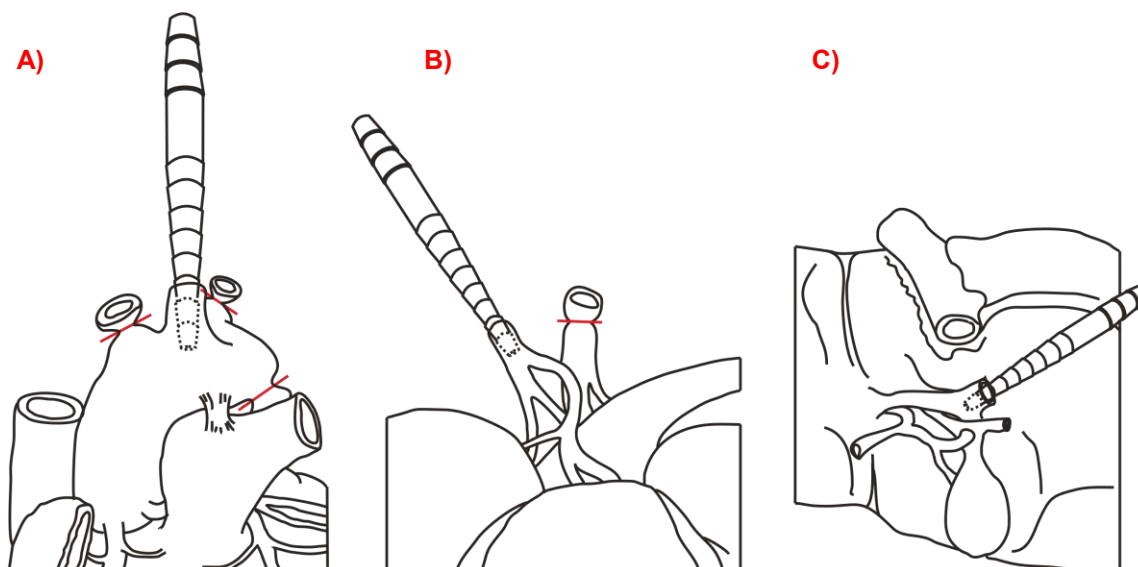


Figura 26. Ilustración de la forma en la que se insertan los conectores en los órganos. A) aorta en el corazón, B) arteria renal en el riñón, C) vena porta en el hígado.

2. Eliminar sangre:

Se perfundió la disolución de PBS-Heparina hasta eliminar la mayor cantidad de sangre, esto con la finalidad de evitar la coagulación en capilares y prevenir desgarres durante la descelsularización (Figura 38, 20% del proceso).

3. Desinfección del órgano:

Se colocó en una disolución de Penicilina, Estreptomina y Anfotericina con Heparina por 4 h.

MONTAJE EN DISPOSITIVO “BIO-MEC”

1. Montaje: Se Colocó el órgano en el dispositivo Bio-MEC introduciendo el conector de policarbonato, de la arteria, en el conector “d” (Figuras 19 y 22) de la tapa del dispositivo.
2. Llenado de la columna y purga de aire: Se llenó la columna con agua desionizada y se purgó el aire de las mangueras, de la columna y trampa de aire (mangueras “b”) y del órgano (mangueras “e”) ya que las burbujas pueden convertirse en obstrucciones.
3. Perfusión: Una vez que se eliminó el aire y burbujas del dispositivo, se perfundió agua desionizada para quitar restos de medicamento de los pasos anteriores con la finalidad de preparar el órgano para la descelularización.

PERFUSIÓN DE DISOLUCIONES DESCELULARIZANTES

1. Perfundir la disolución de SDS al 1 % por 12 h.
2. Perfundir la disolución de SDS al 0.5 % por 6 h.

A partir de este punto, preferentemente se realiza entre 4 °C y 8 °C.

3. Perfundir agua desionizada por 2 h.
4. Perfundir la disolución PBS por 72 h haciendo cambios de disolución cada 24 h.
5. Perfundir la disolución que contiene desoxirribonucleasa I por 1 h.
6. Perfundir la disolución PBS por 72 h haciendo cambios de disolución cada 24 h.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS OBTENIDOS

Para un análisis morfológico se utilizó histología y microscopía electrónica de barrido; se compararon dos andamios (MEC: matriz extracelular y COL: colágena tipo I) con análisis térmicos (TGA y DSC) con la finalidad de analizar los rangos de temperatura en los cuales se presentan transiciones como: desnaturalización de las proteínas presentes en el andamio, la degradación del mismo, así como la pérdida de masa; con la espectroscopía infrarroja (IR) se corroboró la presencia de CLG; la presencia de ácido desoxirribonucleico (DNA) en la disolución descelularizante se corroboró mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS). p

HISTOLOGÍA

La histología se utilizó para estudiar los tejidos antes y después de la descelularización, ya que ésta se encarga del estudio de los tejidos de animales y plantas; células, MEC y líquido extracelular. Para la caracterización histológica de los andamios obtenidos, se tomaron muestras de 15 mm de diámetro por 3 mm de espesor, se colocaron en formol por 24 h para fijarlas. También se tomaron muestras de los órganos antes de la descelularización con las mismas dimensiones. Se colocaron en parafina, se hicieron cortes de 5 μm y se hicieron tinciones con tricrómica de Masson.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Las muestras destinadas a ser caracterizadas en microscopía electrónica de barrido (MEB) deben cumplir dos condiciones: estar secas y ser conductoras. Para lo cual se tomaron muestras del órgano nativo y descelularizado, se fijaron en glutaraldehído, se deshidrataron y se desecaron por punto crítico. Una vez secas las muestras se recubrieron con oro (sputtering). Las condiciones del microscopio fueron: filamento de tungsteno, alto vacío, un voltaje de 15 kV y detector de electrones retrodispersados.

ANÁLISIS TÉRMICOS

Para realizar los análisis térmicos, se congeló una sección de riñón descelularizado (15 mm de diámetro por 3 mm de espesor) por 24 h a -20 °C y se liofilizaron 24 h en el equipo “Freezone Labconco”. Se cortaron muestras de 6 mm de diámetro.

- **ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO**

La muestra se calentó en atmósfera de aire sintético con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min y se registró la diferencia de la masa durante este proceso. Una pérdida de masa indica que se llevó a cabo un cambio en el andamio. Se utilizó el equipo “Hi-Res TGA-2950 Thermogravimetric Analyzer”.

- **CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO**

Se utilizó para obtener los puntos térmicos críticos como: transición a gelatina, desnaturalización y degradación de los andamios. La muestra y un crisol de referencia vacío se calentaron a una velocidad de 5 °C/min. La diferencia de la temperatura de ambos crisoles es causada por los puntos térmicos críticos de la muestra. Se utilizó el equipo “Differential Scanning Calorimeter 2910 Modulated TA Instruments”.

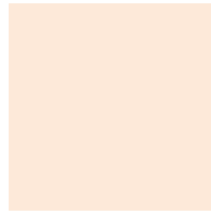
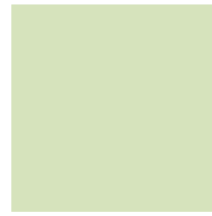
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Se tomó una sección de órgano descelularizado, se congeló a -20 °C por 24 h y liofilizó por 24 h con el equipo “Freezone Labconco”. Se cortaron muestras de 6 mm de diámetro y 3 mm de espesor, se analizaron en el equipo “Scientific Nicolet 6700 FT-IR”.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Los restos de ADN se cuantificaron en alícuotas de la disolución descelularizante (2 mL) desde 0 % hasta 100 % del proceso de descelularización, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro “Epoch BioTek”.

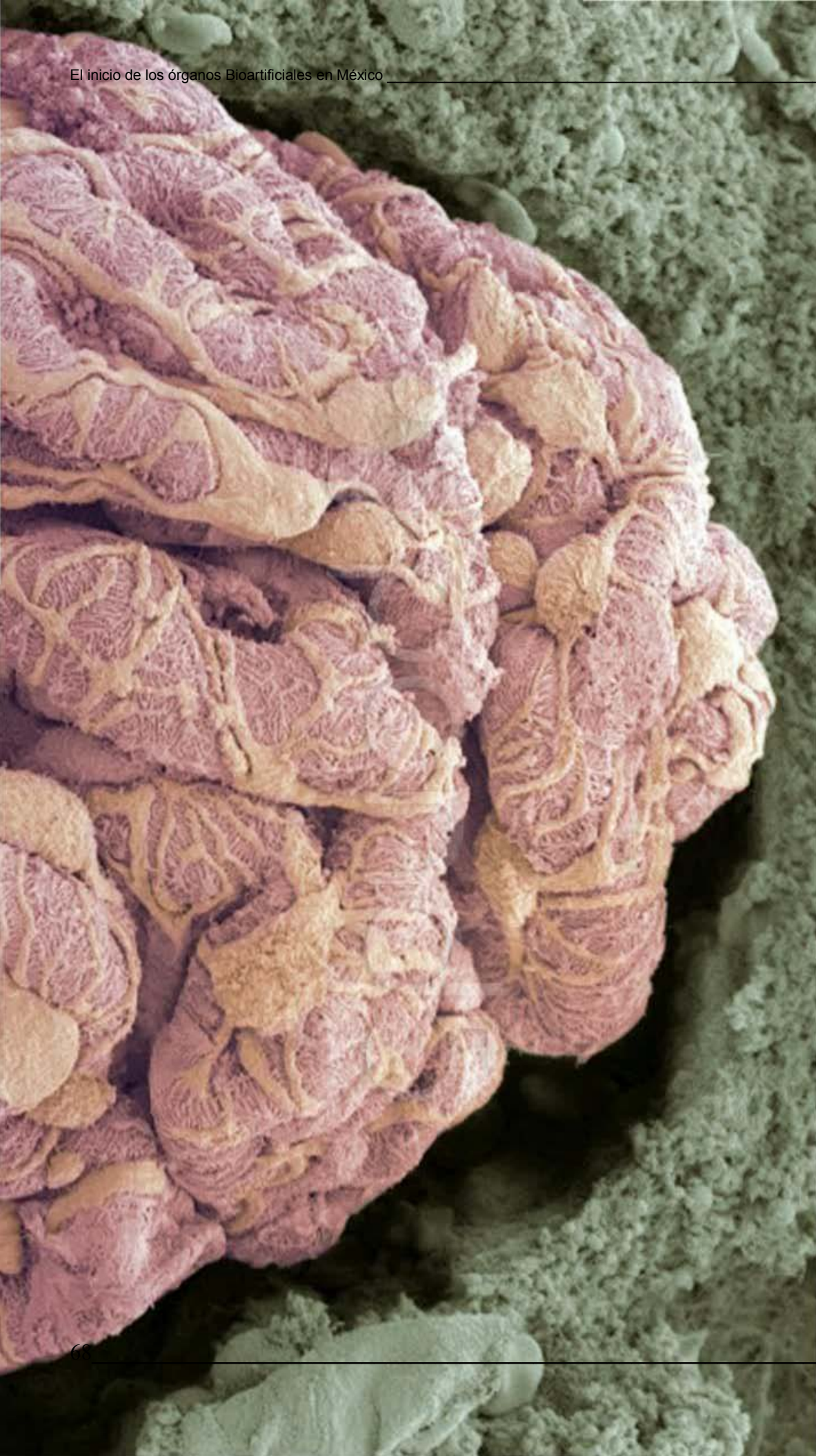




4

Capítulo

Resultados



ENSAYO DE DEGRADACIÓN

El ensayo de degradación en las mangueras utilizadas en el dispositivo Bio-MEC permitió descartar aquellas con cambios en su peso y aquellas que no permitieron el giro del cabezal en la bomba. Los tiempos fueron determinados tomando en cuenta los registrados para la descelularización de los órganos, estos se muestran en las [Tablas 1, 2 y 3](#). También se consideraron los cambios en las dimensiones y el cambio de color, mostrados en las [Figuras 27, 29 y 31](#).

Todas las mangueras sumergidas en TBF tuvieron un aumento en su masa ([Figura 28](#)), cambiaron de color y disminuyeron su diámetro interno y externo, así como su longitud ([Figura 27](#)). De las mangueras degradadas en TX1 más del 50% disminuyeron su masa ([Figura 30](#)), hubo un cambio de color y un aumento en su diámetro interno y externo así como en su longitud ([Figura 29](#)).

Lo que se observó con las mangueras sumergidas en SDS es un comportamiento tanto de aumento de masa como de disminución en la misma ([Figura 32](#)), más del 60% de las muestras se mantuvieron alrededor del 100% de su masa inicial y los cambios de color y dimensiones fueron notables en los extremos de las mangueras ([Figura 31](#)).

Tabla 1. Masas registradas en las mangueras sumergidas en TBF.

Manguera	Masa inicial (g)	Masa día 5 (g)	Masa día 10 (g)	Masa día 15 (g)	% en masa día 5	% en masa día 10	% en masa día 15	
00001	1.0813	1.1929	1.2300	1.3044	110.3163	113.7550	120.6326	←
00180	0.5890	0.6326	0.6471	0.6761	107.3939	109.8585	114.7878	←
96410	0.5577	0.5814	0.5892	0.6050	104.2406	105.6542	108.4813	←
96400	0.5675	0.5888	0.5958	0.6100	103.7445	104.9927	107.4890	←
96420	0.5637	0.5825	0.5887	0.6012	103.3262	104.4350	106.6525	←
96440	0.5583	0.5810	0.5885	0.6036	104.0570	105.4093	108.1139	←
96419	0.4302	0.4594	0.4691	0.4885	106.7759	109.0346	113.5518	←
06434	0.4538	0.4729	0.4792	0.4919	104.1979	105.5972	108.3958	←
06424	0.4539	0.4873	0.4984	0.5206	107.3474	109.7966	114.6949	←
06440	0.5727	0.6166	0.6312	0.6605	107.6654	110.2206	115.3309	←
06418	0.5866	0.6325	0.6477	0.6783	107.8162	110.4216	115.6325	←
06509	0.5724	0.6270	0.6451	0.6815	109.5300	112.7067	119.0601	←
06475	0.4551	0.4654	0.4688	0.4756	102.2523	103.0030	104.5045	←

Tabla 2. Masas registradas en las mangueras sumergidas en TX1.

Manguera	Masa inicial (g)	Masa día 5 (g)	Masa día 10 (g)	Masa día 15 (g)	% en masa día 5	% en masa día 10	% en masa día 15	
00001	1.1351	1.1686	1.1797	1.2020	102.9469	103.9292	105.8938	←
00180	0.5686	0.5552	0.5507	0.5418	97.6433	96.8578	95.2867	←
96410	0.5873	0.5890	0.5896	0.5907	100.2895	100.3859	100.5789	←
96400	0.5616	0.5626	0.5629	0.5636	100.1781	100.2374	100.3561	←
96420	0.5602	0.5610	0.5612	0.5617	100.1339	100.1785	100.2678	←
96440	0.5569	0.5579	0.5582	0.5589	100.1796	100.2394	100.3591	←
96419	0.4369	0.4291	0.4264	0.4212	98.2033	97.6043	96.4065	←
06434	0.4562	0.4440	0.4399	0.4318	97.3257	96.4343	94.6515	←
06424	0.4499	0.4405	0.4374	0.4311	97.9106	97.2142	95.8213	←
06440	0.5899	0.5609	0.5512	0.5319	95.0839	93.4452	90.1678	←
06418	0.5933	0.5734	0.5668	0.5535	96.6459	95.5278	93.2918	←
06509	0.5697	0.5422	0.5330	0.5147	95.1729	93.5639	90.3458	←
06475	0.4519	0.4520	0.4520	0.4521	100.0221	100.0295	100.0443	←

Tabla 3. Masas registradas en las mangueras sumergidas en SDS.

Manguera	Masa inicial (g)	Masa día 5 (g)	Masa día 10 (g)	Masa día 15 (g)	% en masa día 5	% en masa día 10	% en masa día 15	
00001	1.1428	1.1625	1.1690	1.1821	101.7195	102.2926	103.4389	←
00180	0.6154	0.6118	0.6106	0.6082	99.4150	99.2200	98.8300	←
96410	0.5562	0.5559	0.5558	0.5556	99.9461	99.9281	99.8921	←
96400	0.5304	0.5306	0.5307	0.5308	100.0377	100.0503	100.0754	←
96420	0.5545	0.5546	0.5546	0.5547	100.0180	100.0240	100.0361	←
96440	0.5476	0.5473	0.5471	0.5469	99.9361	99.9148	99.8722	←
96419	0.3405	0.3857	0.4007	0.4308	113.2599	117.6799	126.5198	←
06434	0.4484	0.4487	0.4488	0.4490	100.0669	100.0892	100.1338	←
06424	0.4372	0.4373	0.4373	0.4374	100.0229	100.0305	100.0457	←
06440	0.5805	0.5465	0.5351	0.5124	94.1344	92.1792	88.2687	←
06418	0.5708	0.5461	0.5378	0.5213	95.6640	94.2186	91.3280	←
06509	0.5765	0.5419	0.5303	0.5072	93.9896	91.9861	87.9792	←
06475	0.4257	0.4256	0.4256	0.4255	99.9765	99.9687	99.9530	←

DEGRADACIÓN DE MANGUERAS CON TBF

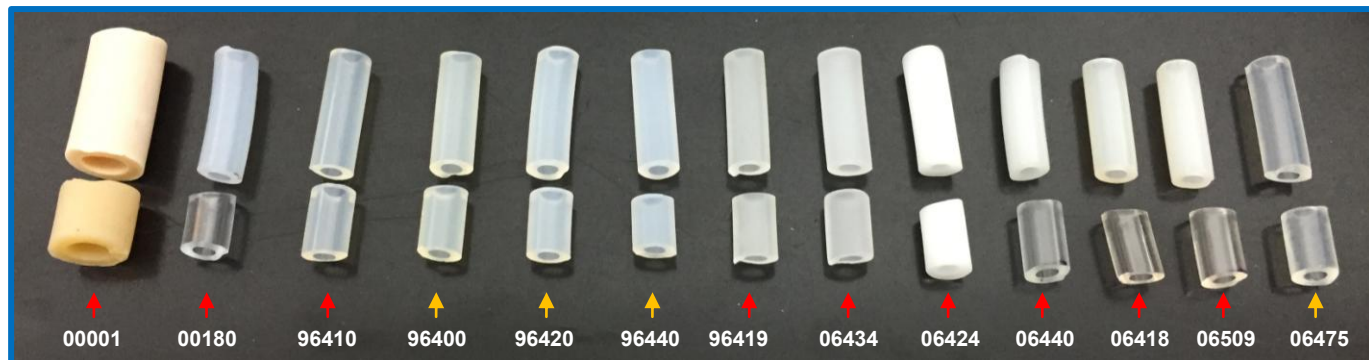


Figura 27. Cambios en el diámetro y color de las mangueras sumergidas en TBF. El control es la manguera inferior. Las mangueras con cambios son marcadas con rojo y las cuatro que presentaron menor cambio con amarillo.

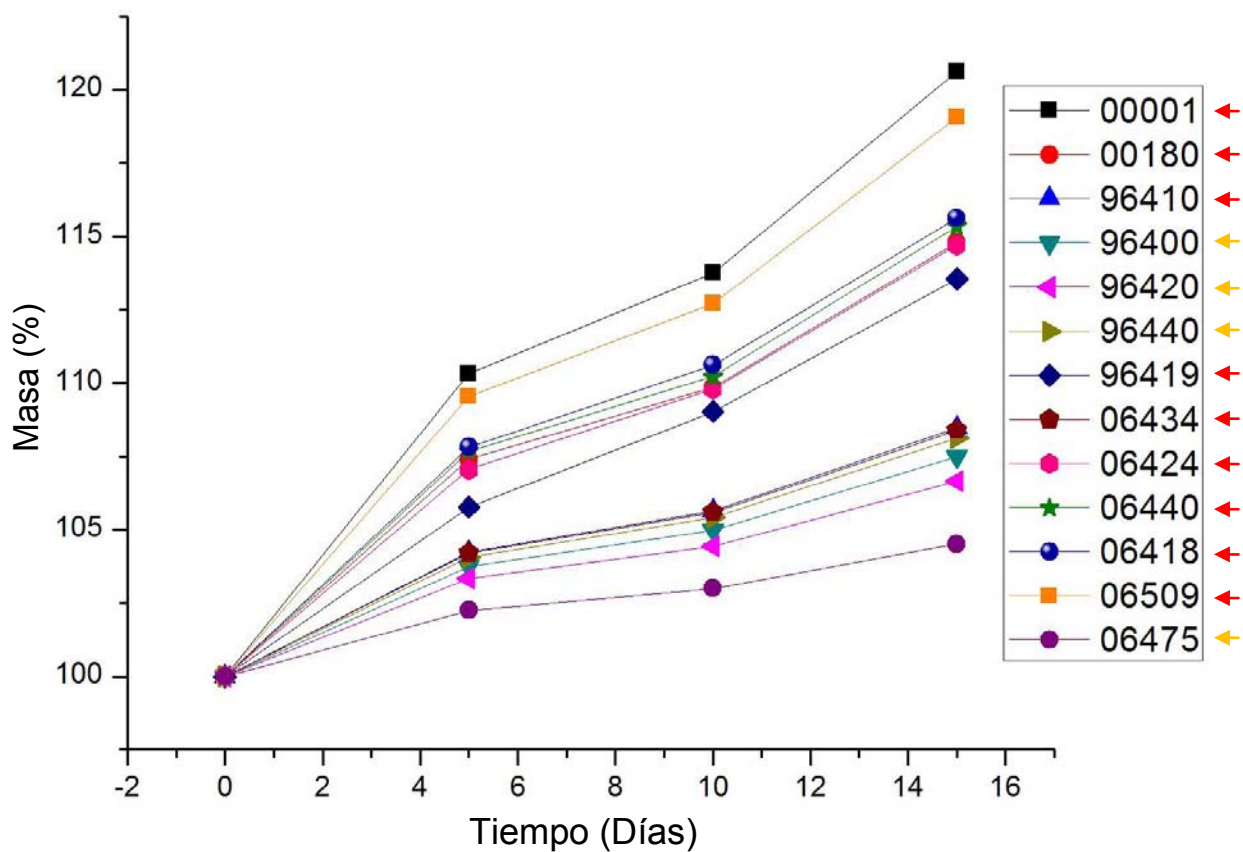


Figura 28. Cambio en la masa de las mangueras sumergidas en una disolución de TBF. Es claro que existe un aumento de masa en todas las mangueras pero las mangueras con cambios mayores son marcadas con rojo.

DEGRADACIÓN DE MANGUERAS CON TX1

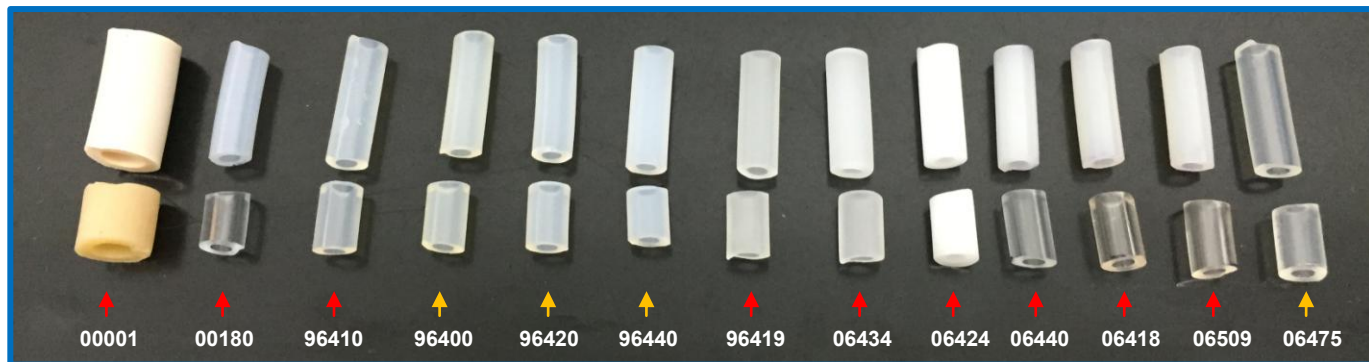


Figura 29. Cambios en el diámetro y color de las mangueras sumergidas en TX1. La manguera inferior es el control. Las mangueras con cambios son marcadas con rojo y las cuatro que presentaron menor cambio con amarillo.

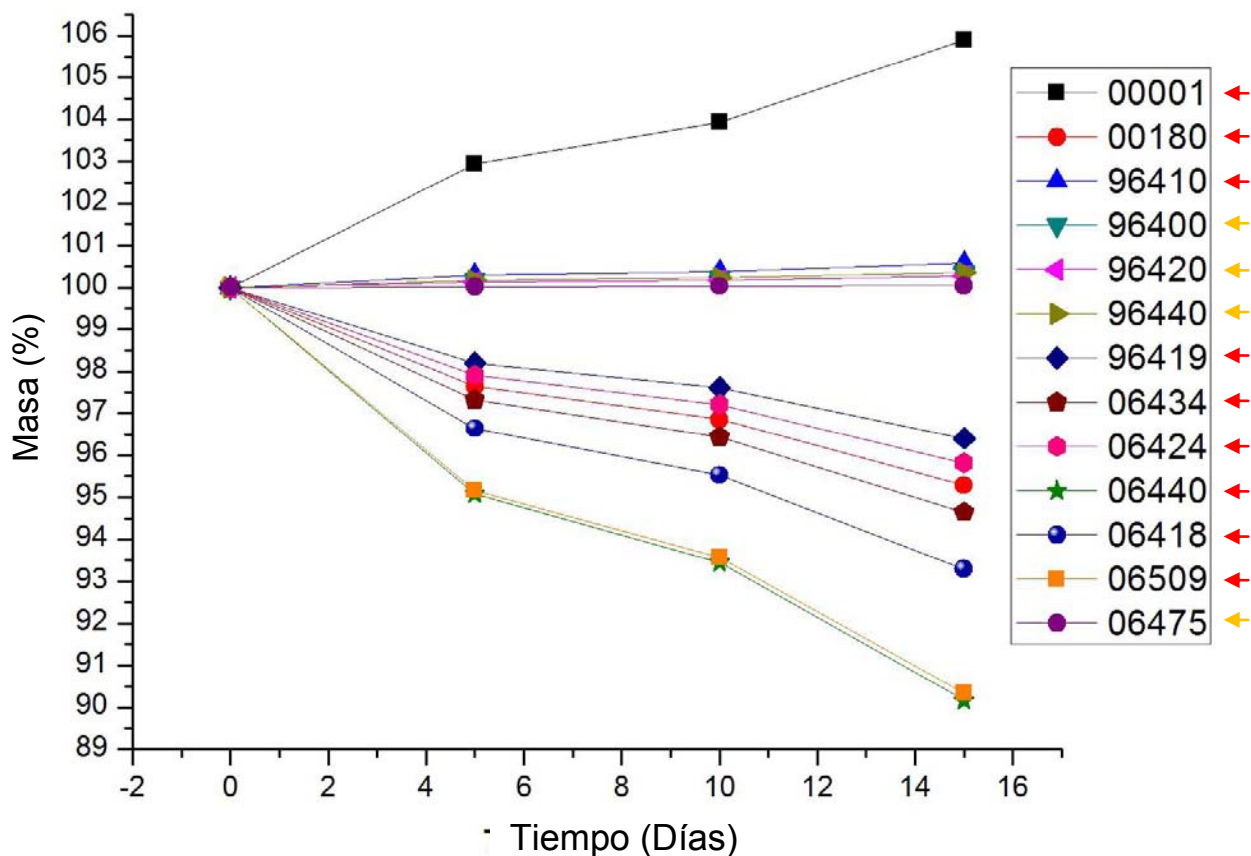


Figura 30. Cambio en la masa de las mangueras sumergidas en una disolución de TX1. Se observa un decremento de masa y las mangueras con cambios mayores son marcadas con rojo.

DEGRADACIÓN DE MANGUERAS CON SDS

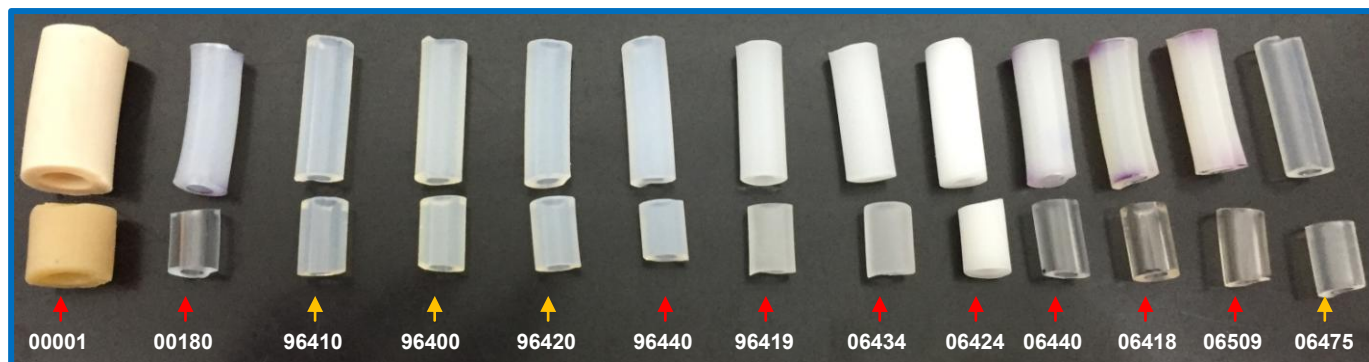


Figura 31. Cambios en el diámetro y color de las mangueras sumergidas en SDS. El control es la manguera inferior. Las mangueras con cambios son marcadas con rojo y las cuatro que presentaron menor cambio con amarillo.

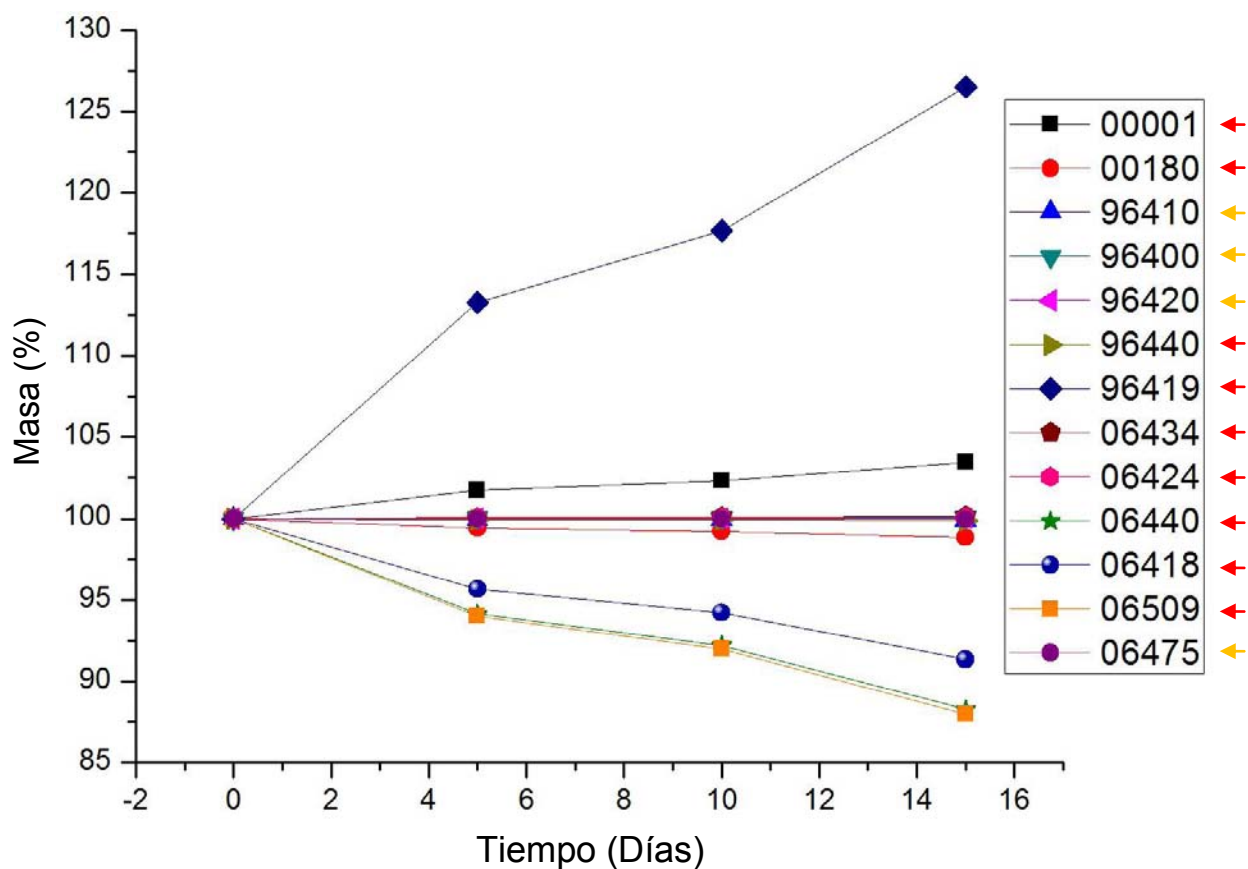


Figura 32. Cambio en el peso de las mangueras sumergidas en una disolución de SDS. Se observa una mayor estabilidad de peso y las mangueras con cambios mayores son marcadas con rojo.

DESCELULARIZACIÓN: INMERSIÓN Y AGITACIÓN

La primera prueba que se realizó para eliminar las células de un órgano y al mismo tiempo probar los agentes químicos, fue la inmersión de secciones de órganos (Figura 33) en las disoluciones descelularizantes a una concentración del 1 %. Se registró el avance de la descelularización al cabo de 1 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h (no ilustradas). Sin embargo la descelularización sólo se llevó observó en una pequeña región de la sección del órgano (máximo 3 mm) después de las 8 h (Figura 34), lo que descartó este método para descelularizar un órgano completo.

La segunda prueba realizada, además de estar inmersas las secciones de órgano, la disolución se mantuvo con una agitación constante, sin embargo, no se observaron resultados favorables (Figura 35) ni cambios considerables.

Una tercera prueba fue sumergir la sección del órgano en la disolución y someterla a una sonicación pero este método aumentó la temperatura de la disolución, y el órgano presentó una consistencia gelatinosa además de que partes del órgano se deshicieron y presentaron una textura grumosa, posiblemente por el tiempo excesivo con la sonicación. (No ilustrada)



Figura 33. Sección de órgano sin ser sometido a algún tratamiento (control).

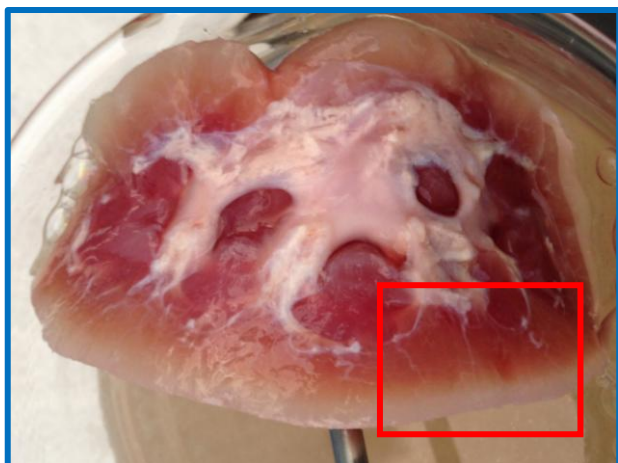


Figura 34. Sección de órgano tratada con una solución de SDS al 1%, descelularización por inmersión.

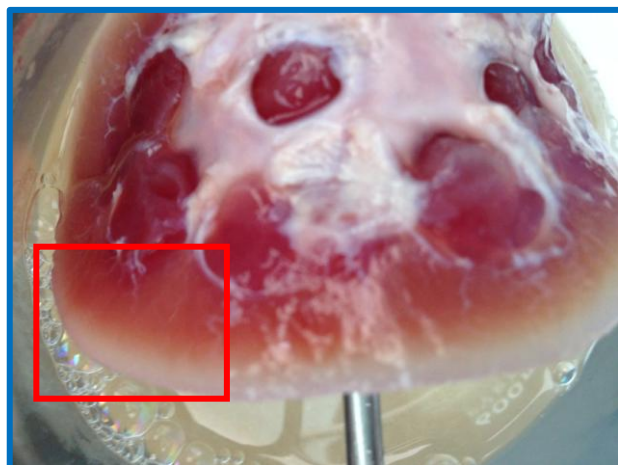


Figura 35. Sección de órgano tratada con una solución de SDS al 1%: descelularización por inmersión y agitación.

DESCELULARIZACIÓN: CON DISPOSITIVO BIO-MEC

La descelularización por perfusión, utilizando el dispositivo Bio-MEC (Figuras 41 y 42) proporcionó andamios en tres dimensiones en condiciones óptimas. Sin embargo, los primeros intentos por obtener un andamio, tomando como referencia el flujo reportado en Fisiología Médica (82) (Tabla 4), no dieron resultados favorables ya que los órganos que se intentaron descelularizar explotaron (Figura 36) por lo que fue necesario disminuir el flujo más de un 84%.

Tabla 4. Flujo sanguíneo, en reposo, de varios órganos en un varón adulto.

Región	Masa (kg)	Flujo de sangre	
		mL/min	mL/min (*)
Hígado	2.6	1500	57.7
Riñón	0.3	1260	420
Cerebro	1.4	750	54
Piel	3.6	462	12.8
Músculo esquelético	31	840	2.7
Músculo cardíaco	0.3	250	84
Todo el cuerpo	23.8	336	1.4

* Flujo de sangre en 100 g de tejido

Después de disminuir el flujo se obtuvieron órganos completos y descelularizados, con una apariencia blanca semitranslúcida, sin desgarres y una textura firme (Figura 37, 39 y 35).



Figura 36. Riñón sometido a una perfusión en el Bio-MEC con flujo similar al reportado en la literatura.

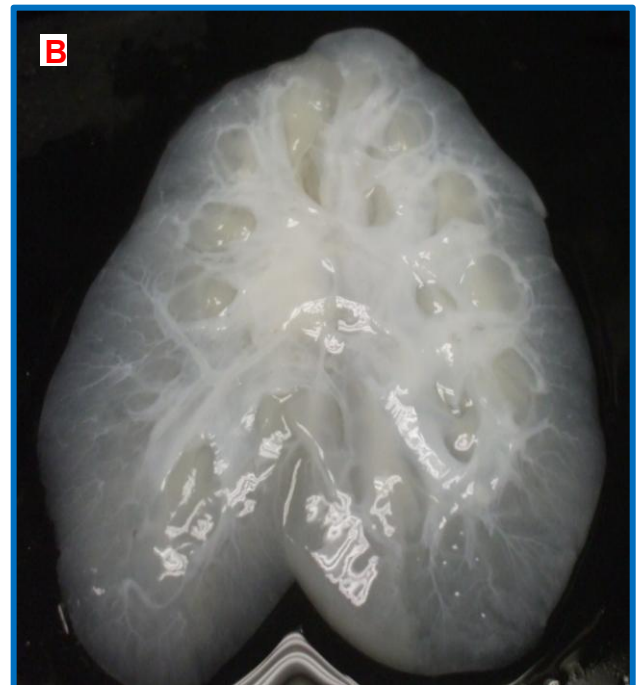
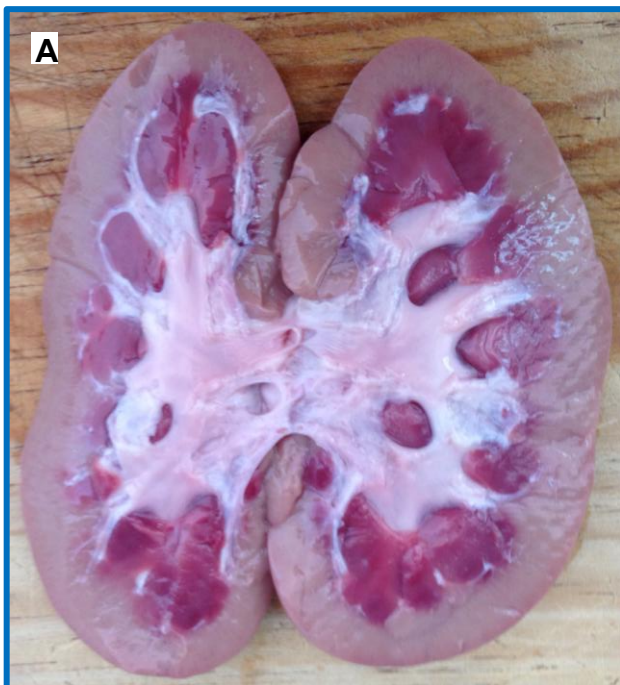


Figura 37. Corte longitudinal de riñón: Arquitectura interna del riñón. A) Nativo y B) Descelularizado.

La descelularización del riñón se muestra en la **Figura 38** y el corazón en la **Figura 39**. Se observó el cambio en el aspecto del órgano durante el tratamiento con SDS, la figura permite visualizar la integridad del órgano al ser procesado.

- Antes de iniciar el protocolo se observó el órgano nativo, con células y sangre (0 %).
- Después de un 20 % del protocolo, se eliminó la totalidad de la sangre y se inició la descelularización.
- Después de un 40 % de avance, se pudo observar la descelularización con regiones de color beige claro.
- Después del 60 %, la descelularización fue evidente ya que se observaron grandes regiones acelulares (beige semitranslúcido) y las áreas con células se observaron con manchas de color naranja-marrón.
- Cuando el órgano está por arriba del 80 % de descelularización, no fueron distinguibles las regiones con células, se observó un color beige semitranslúcido en todo el órgano, por la presencia de los residuos celulares. La disolución final es color marrón. Los andamios se lavaron con la disolución PBS.
- Al 100 % del protocolo, el órgano presentó un aspecto blanco semitranslúcido. La solución se ilustra en la **Figura 37**.

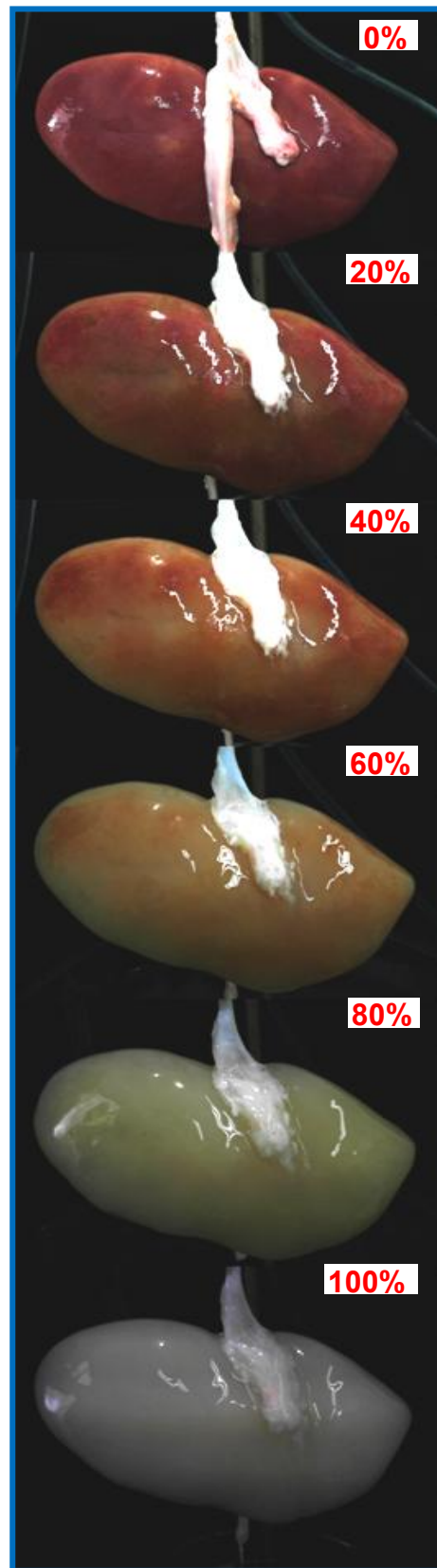


Figura 38. Cambios en el color durante el proceso de descelularización.

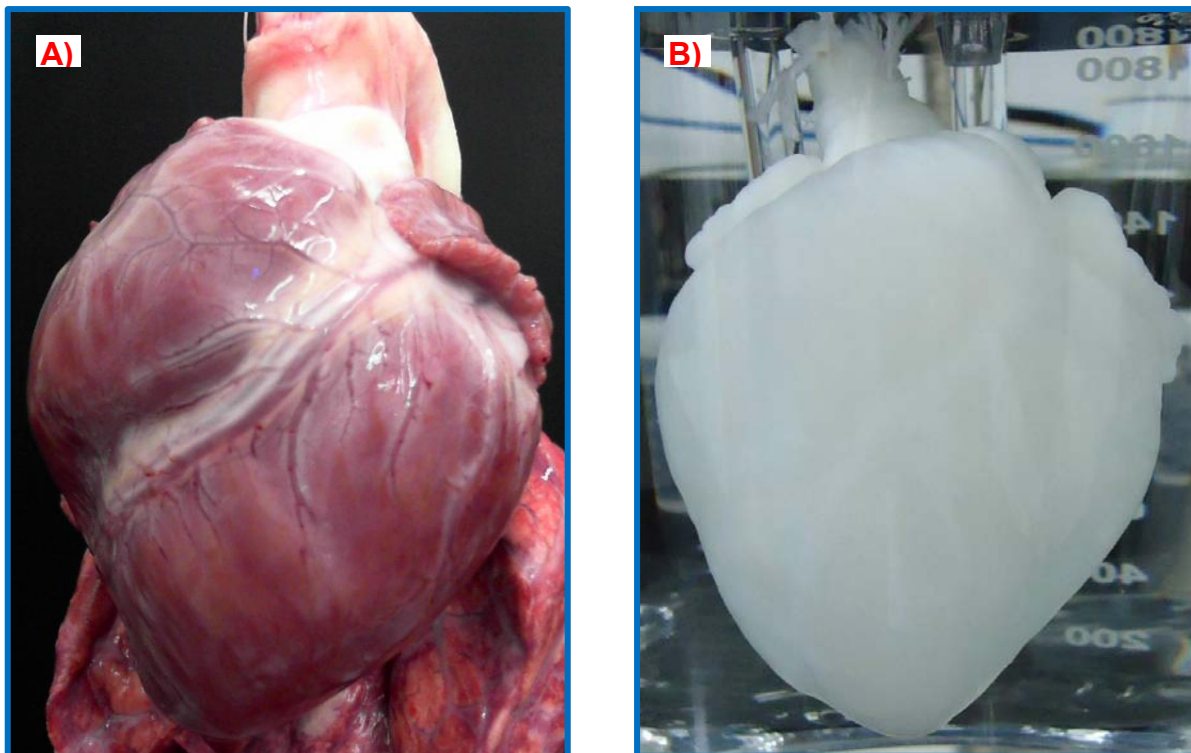


Figura 39. Corazón descelularizado en el dispositivo Bio-MEC 01: A) Corazón nativo (0 % del proceso) y B) Corazón descelularizado (100 % del proceso).

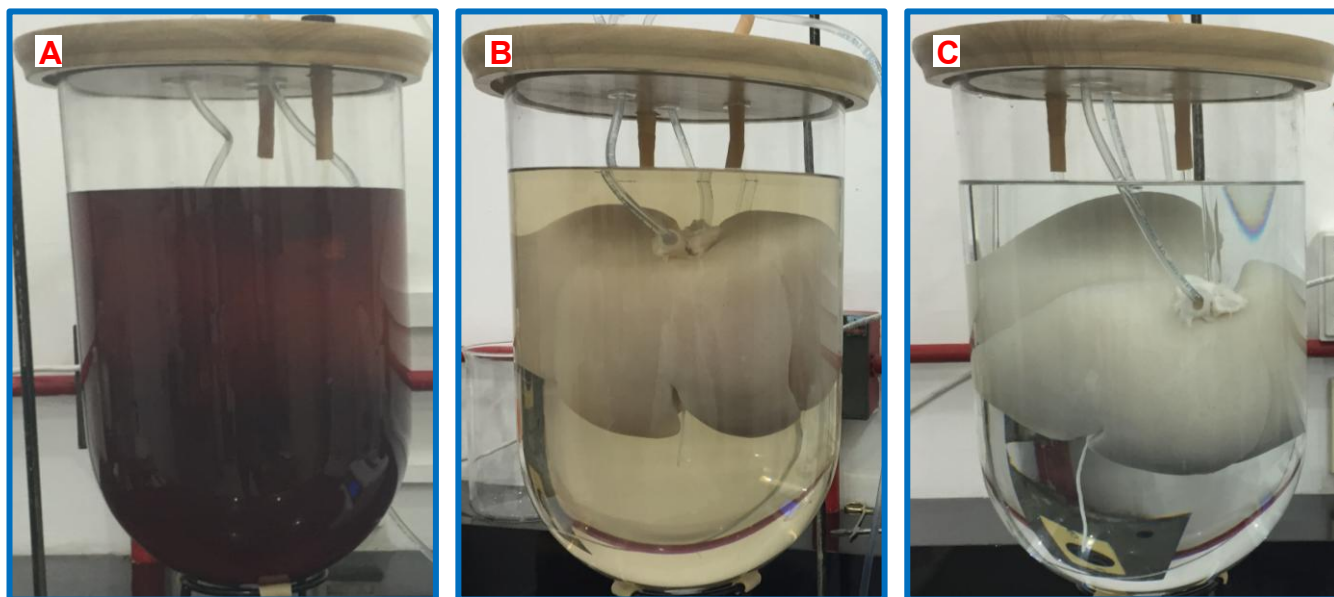


Figura 40. Contenedor del Bio-MEC 02 en la cual se muestra el cambio de color en la solución descelularizante debido al contenido celular extraído del órgano: A) 100% del proceso; antes de cambiar la solución, B) 100% del proceso; después de cambiar la solución para remover residuos y C) Solución enzimática.

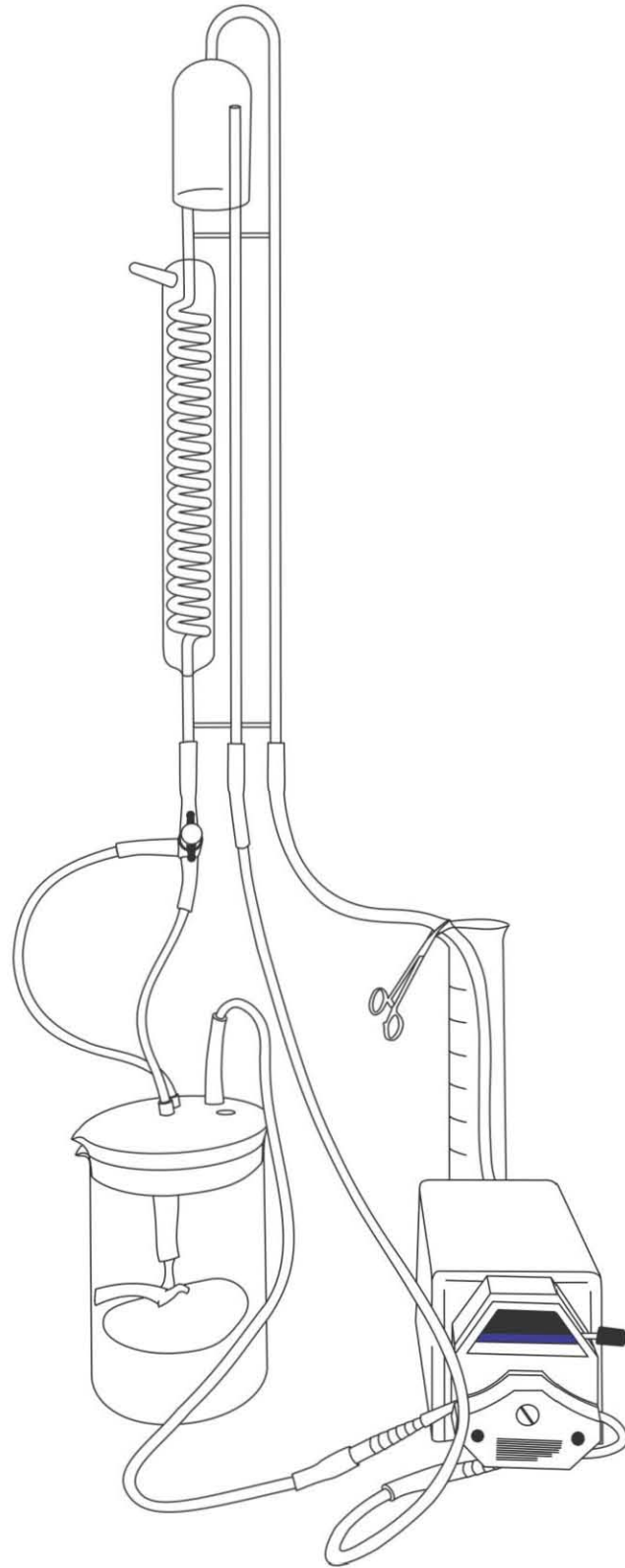


Figura 41. Dispositivo “Bio-MEC prototipo 01” (simplificado): en perspectiva con un punto de fuga.

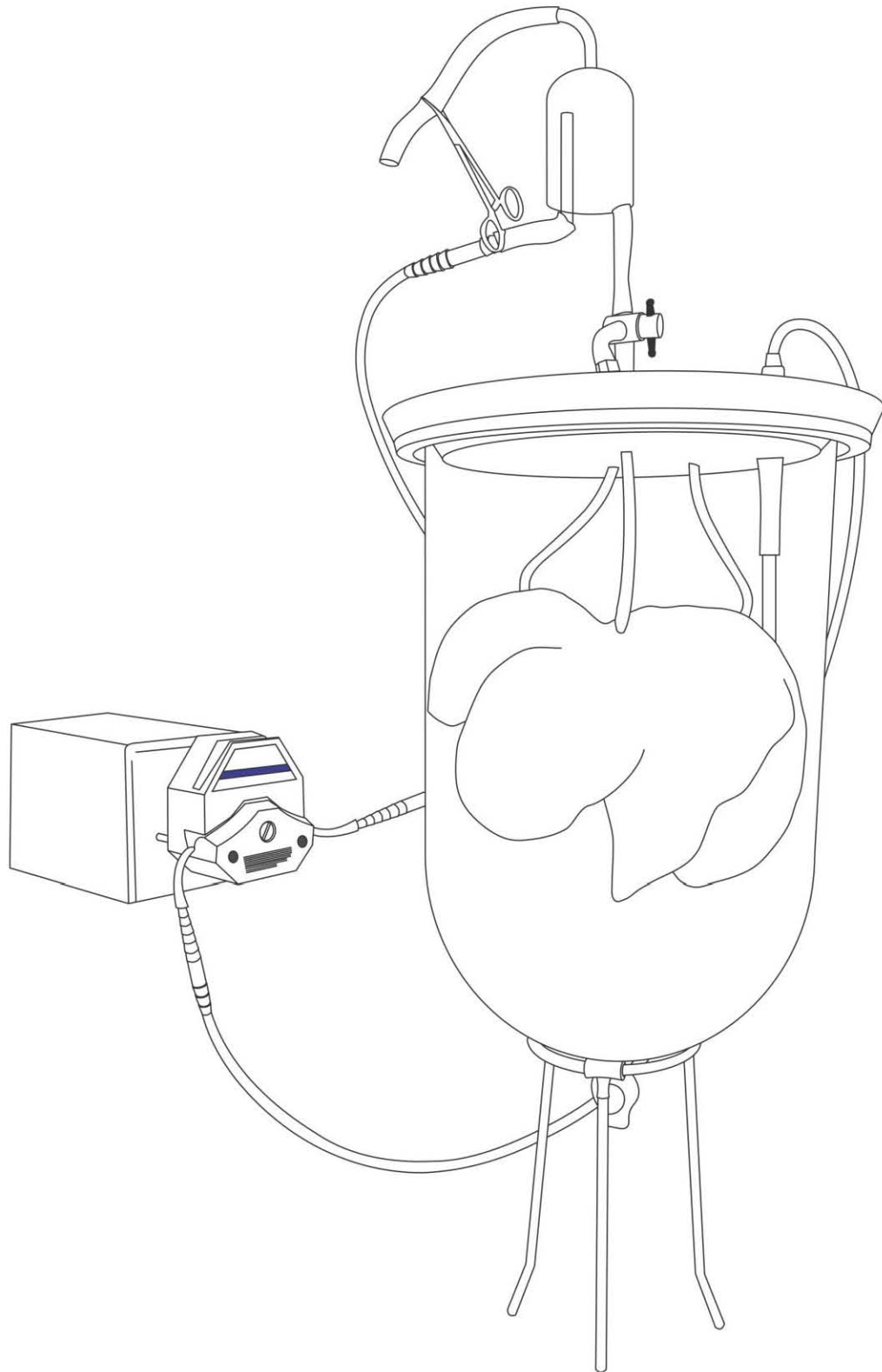


Figura 42. Dispositivo “Bio-MEC prototipo 02” (simplificado): perspectiva con dos puntos de fuga.

HISTOLOGÍA

Se realizó la caracterización del andamio obtenido con técnicas histológicas, con la finalidad de evaluar los resultados de la metodología propuesta para la descelularización y verificar si la estructura del andamio obtenido es favorable.

La tinción tricrómica de Masson, es una técnica de coloración que permitió visualizar claramente las fibras de CLG que forman fibras gruesas, diseñadas para dar resistencia; también evidenció, aunque en menor intensidad, las fibras reticulares; además del citoplasma y núcleos. Esta caracterización requirió del microscopio óptico y diferentes químicos para teñir estructuras biológicas específicas.

- Fibras de colágena se tiñen de color azul-morado o verde.
- El citoplasma se tiñe en violeta-rojo.
- Fibra muscular, glóbulos rojos y queratina se tiñen de rojo.
- Los núcleos se tiñen de color marrón.

RIÑÓN

En las imágenes subsecuentes (Figuras 43-45), para un análisis rápido, en la imagen “A” muestra el tejido nativo con las células teñidas de color rosa y la MEC de color morado, en la imagen “B” es notable la ausencia de células quedando únicamente la MEC de color morado.

La nefrona y los tubos colectores forman la unidad estructural y funcional del riñón. En un tubo colector desembocan varias nefronas. La nefrona consta del corpúsculo renal y la porción tubular. El corpúsculo renal está formado por el glomérulo, rodeado por la cápsula glomerular. Un análisis con aumentos bajos de una muestra del tejido renal permitió observar zonas ricas en estructuras glomerulares y tubulares cortados longitudinal y transversalmente. Después de la descelularización los riñones mostraron una apariencia blanca semitranslúcida, la tinción tricrómica de Masson reveló la permanencia de la MEC y la ausencia de células (Figura 43 B), comparada con el riñón control (Figura 43 A).

En la Figura 44 B se observan las unidades estructurales intactas después de la descelularización del riñón: “a” el corpúsculo; compuesto por el glomérulo y la cápsula de Bowman, “b1” túbulo renal cortado transversalmente y “b2” túbulo renal cortado longitudinalmente. Se puede observar en la Figura 44, “a” el espacio interglomerular sin color, por ausencia de tejido biológico, “b” la cápsula de Bowman de color morado y “c” el glomérulo formado por capilares sanguíneos, partes fundamentales del corpúsculo renal. La cápsula fibrosa es descelularizada con la metodología propuesta pero es parcialmente desprendida durante el proceso de descelularización, como consecuencia de un aumento en el volumen del órgano, se puede observar en la Figura 45.

Estas estructuras son más susceptibles a los cambios de presión en el fluido que circula dentro de ellas, por esta razón fueron las estructuras de análisis en este trabajo, ya que pueden desgarrarse, colapsarse o presentar una descelularización ineficiente.

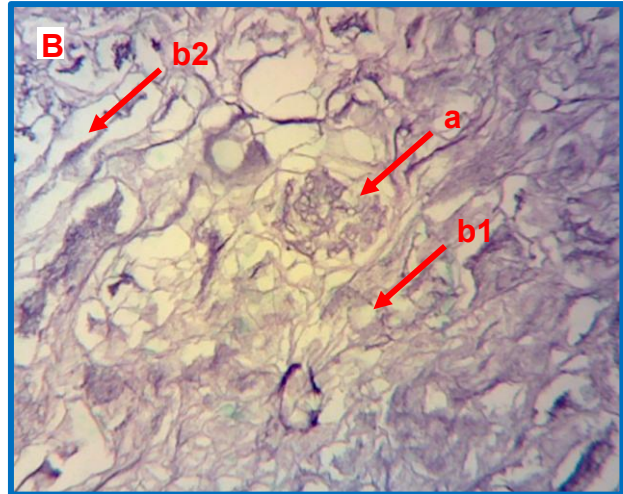
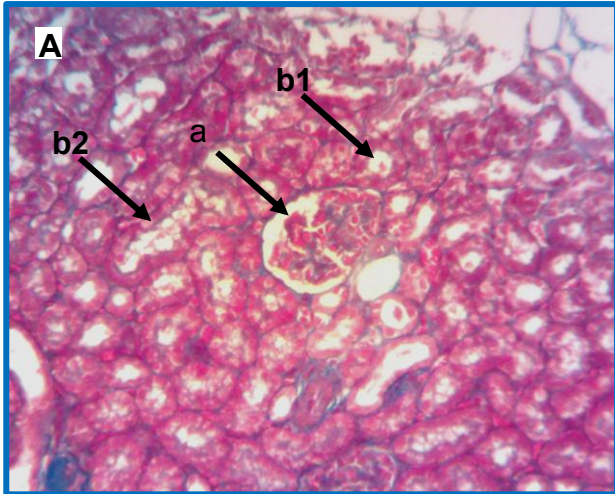


Figura 43. Histología de riñón: A) riñón nativo y B) riñón descelularizado.

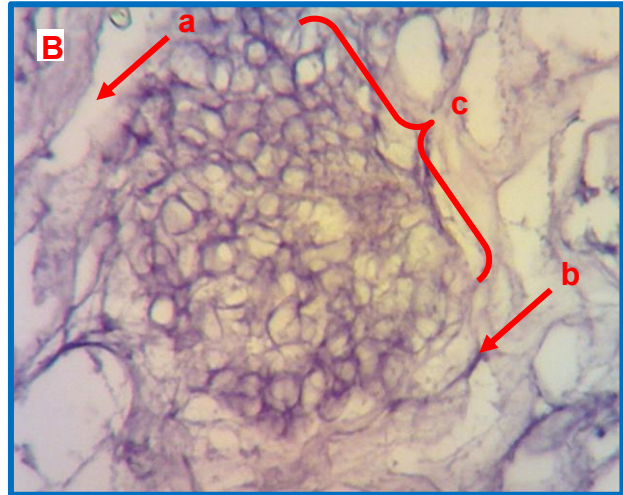
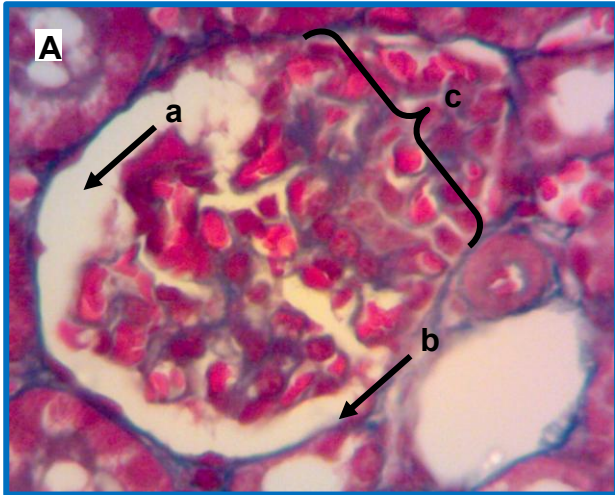


Figura 44. Corpúsculo renal: A) riñón nativo y B) riñón descelularizado.

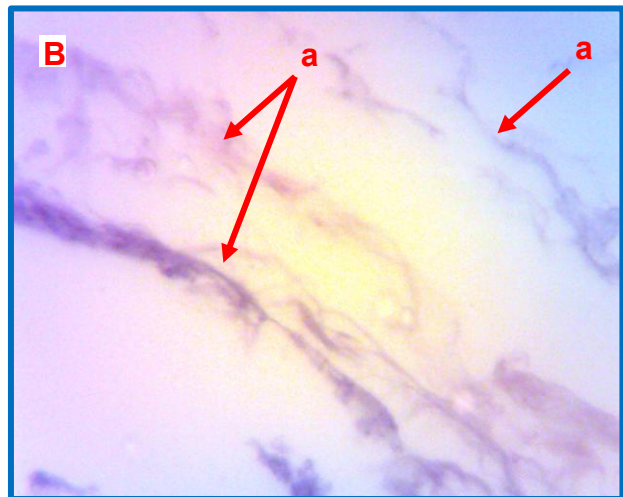
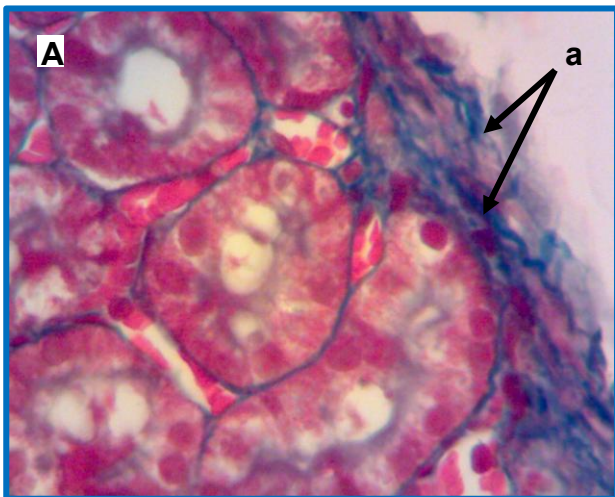


Figura 45. Cápsula fibrosa desprendida del riñón.

HÍGADO

Al igual que los resultados del riñón, la imagen “A” muestra el tejido nativo y la imagen “B” el tejido descelularizado. Con un análisis a bajos aumentos se pudo identificar la unidad funcional básica del hígado, para esta investigación es fue el lobulillo hepático (Figura 46 Aa-Ba). Los lobulillos son estructuras aproximadamente hexagonales de 1-2 mm de diámetro. En algunas especies, como el cerdo, están muy bien delimitados por tabiques conectivos vascularizados Figura 46 Ab-Bb; en el ser humano los límites son imprecisos.

Cada lobulillo tiene elementos vasculares; hay una vena central (Figura 46 Ac-Bc), en torno a la cual se forma el lobulillo, que recoge la sangre venosa y la vacía en las venas hepáticas, (Figura 46 Ad-Bd), por estas venas recorre el 70 % de la sangre en el hígado, el otro 30 % circula por las arterias hepáticas (Figura 46 Ae-Be).

Un análisis a 400X reveló una gran abundancia de MEC y pocas células entre los lobulillos hepáticos y en los tabiques conectivos, mostrado en la Figura 47 Aa y la mayor concentración de células entre las placas hepáticas en el interior del lobulillo como lo muestra la Figura 47 Ab, esto fue corroborado con el tejido descelularizado de hígado al existir grandes espacios sin tinción azul propia de la MEC, lo cual puede observarse en la Figura 47 Ba-Bb. Las venas y arterias son conservadas después de la descelularización (Figura 48 a).

Un análisis con ampliaciones mayores, mostró que la estructura de las arterias y venas está conformada por fibras de CLG y elastina (Figura 48 a) rodeadas de MEC (Figura 48 b). Aparentemente, la MEC presente en el hígado fue muy escasa, según lo mostrado por las técnicas histológicas.

Por tal motivo fue necesario un análisis que proporcione más información de cómo está distribuida la MEC en el andamio obtenido, porque los análisis de histología proporcionan información en 2D y el propósito es obtener un andamio de MEC en 3D.

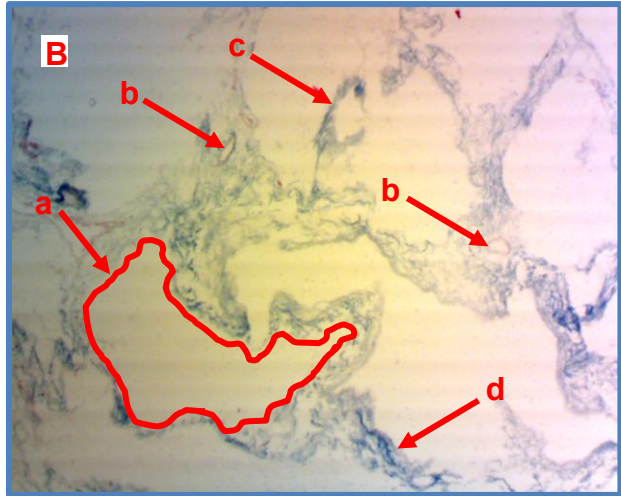
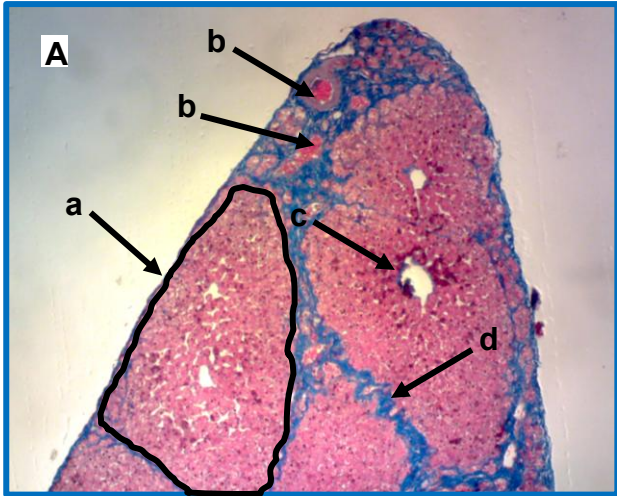


Figura 46. La estructura fundamental del hígado: a) el lobulillo hepático, b) arterias y c) venas hepáticas d) MEC.

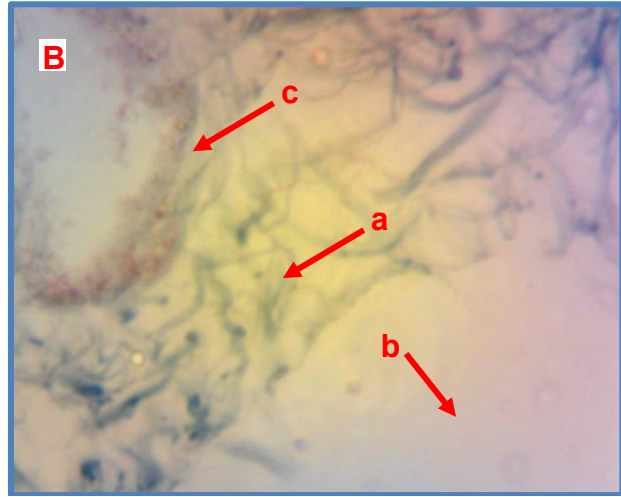
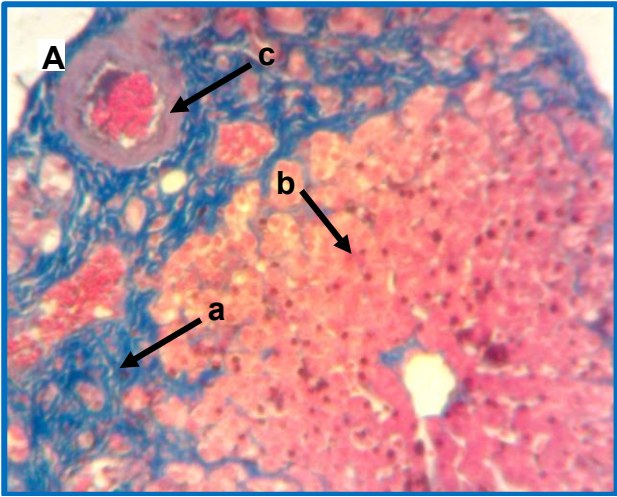


Figura 47. Matriz extracelular del hígado: a) MEC del tabique conectivo, b) lobulillo hepático y c) arteria.

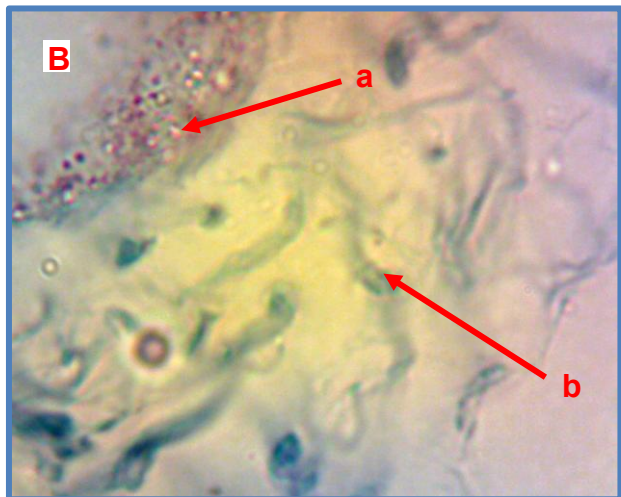
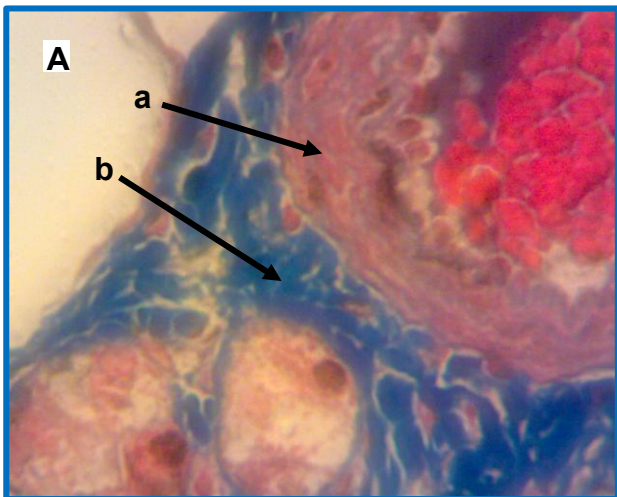


Figura 48. Matriz extracelular: a) arterias y b) tabique conectivo.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La caracterización con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) proporcionó información que no es posible obtener con las técnicas histológicas como: la morfología del glomérulo, de los tubos colectores y de la cápsula fibrosa, todas características propias del riñón, antes y después de ser descelularizados.

En el caso del hígado, la disposición de la MEC en el interior del lobulillo, el grosor de las venas y arterias, así como la cápsula fibrosa hepática, son las partes esenciales que se estudiaron en esta caracterización.

Las muestras nativas de riñón e hígado (con células) no tuvieron problema al momento de fijarlas con glutaraldehído y su posterior desecado por punto crítico, sin embargo, las muestras descelularizadas tuvieron el inconveniente de colapsar al momento de ser desecadas por punto crítico. Este colapso se hace evidente hasta el momento de analizar las muestras en el microscopio.

RIÑÓN

Los resultados obtenidos para el riñón mostraron a bajos aumentos (Figura 49 A) el glomérulo y los tubos recolectores, pero en la Figura 49 B, se observó un colapso de la estructura después de ser descelularizada, lo que dificultó encontrar los glomérulos, ya que el espacio entre el glomérulo y la cápsula de Bowman no fue visible, y todo el andamio parece tener la misma topografía.

Después del análisis observamos una estructura de líneas paralelas características de los tubos colectores (Figura 49 Bb), y en torno a ellos nos enfocamos en la búsqueda de los glomérulos.

La morfología superficial de los glomérulos, comparada con el tejido nativo (Figura 50 A), es rugosa debido a la falta de células, se mantiene la forma semiesférica y no se observaron desgarres en ellos o en los túbulos conectores (Figura 50 B).

En una sección con un corte transversal del tejido nativo, se pudo observar el glomérulo como una esfera sólida y su alrededor mantuvo una apariencia sólida (Figura 51 A) como consecuencia de los glóbulos rojos en su interior. Sin embargo, un corte transversal en el glomérulo del tejido descelularizado mostró el interior del glomérulo vacío, también se observó el tejido circundante en forma de fibras (Figura 51 B).

En general no fue favorable la preparación de la muestra para observar la estructura del riñón, después de ser descelularizado, esto fue corroborado en tres muestras, hasta el momento de ser analizadas en el microscopio electrónico de barrido.

En virtud de estos resultados, se optó por cambiar el método de preparación de las muestras de MEC con la finalidad de evitar el colapso observado.

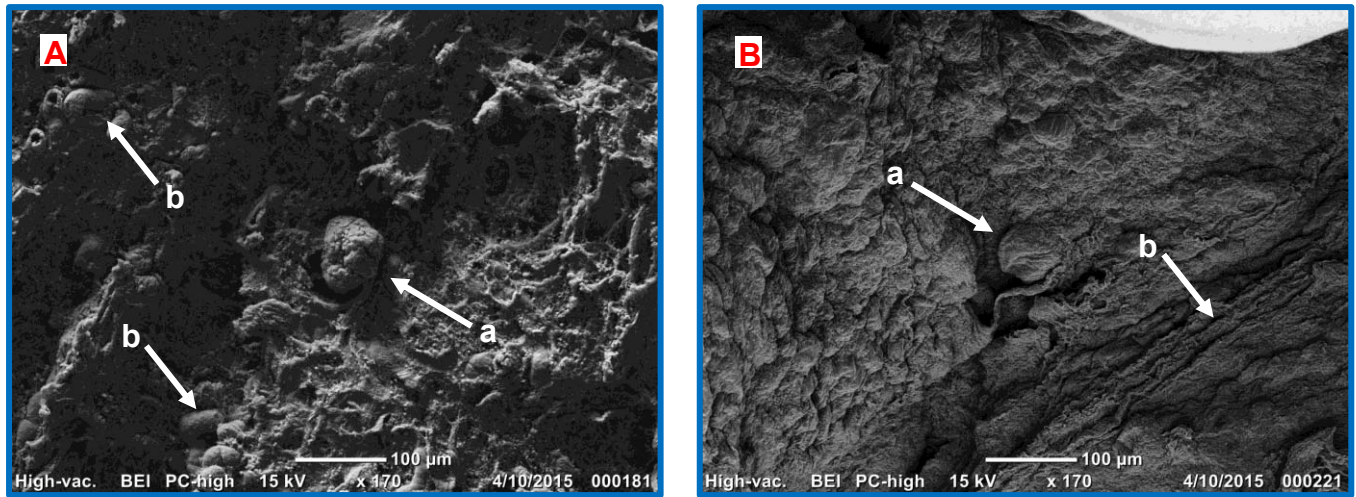


Figura 49. Glomérulos (a) y túbulos conectores (b): A) tejido nativo y B) tejido descelularizado.

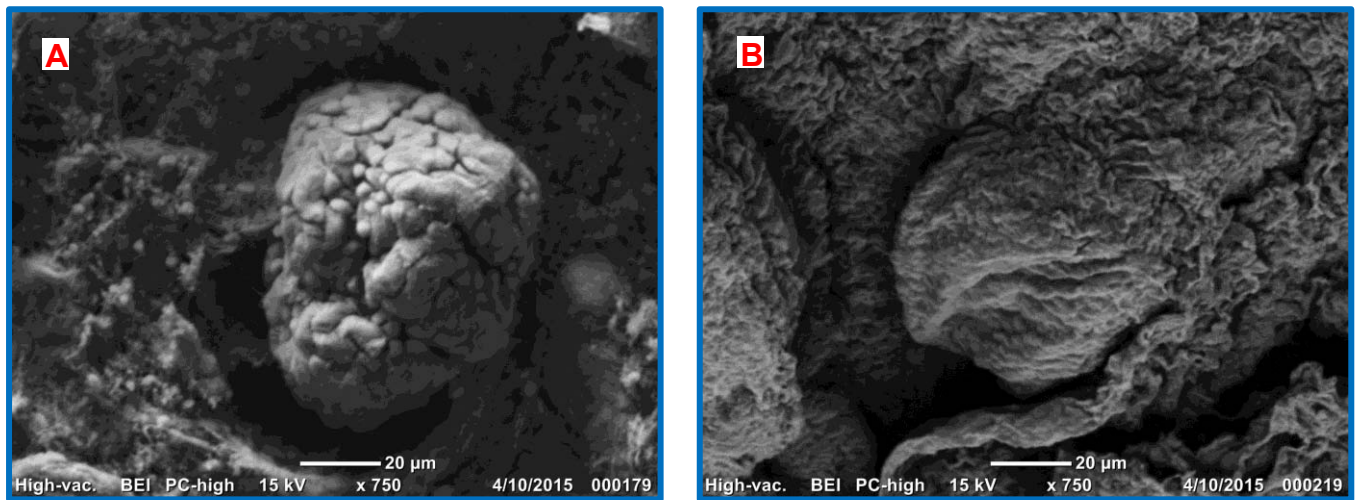


Figura 50. Topografía del glomérulo, A) tejido nativo y B) tejido descelularizado.

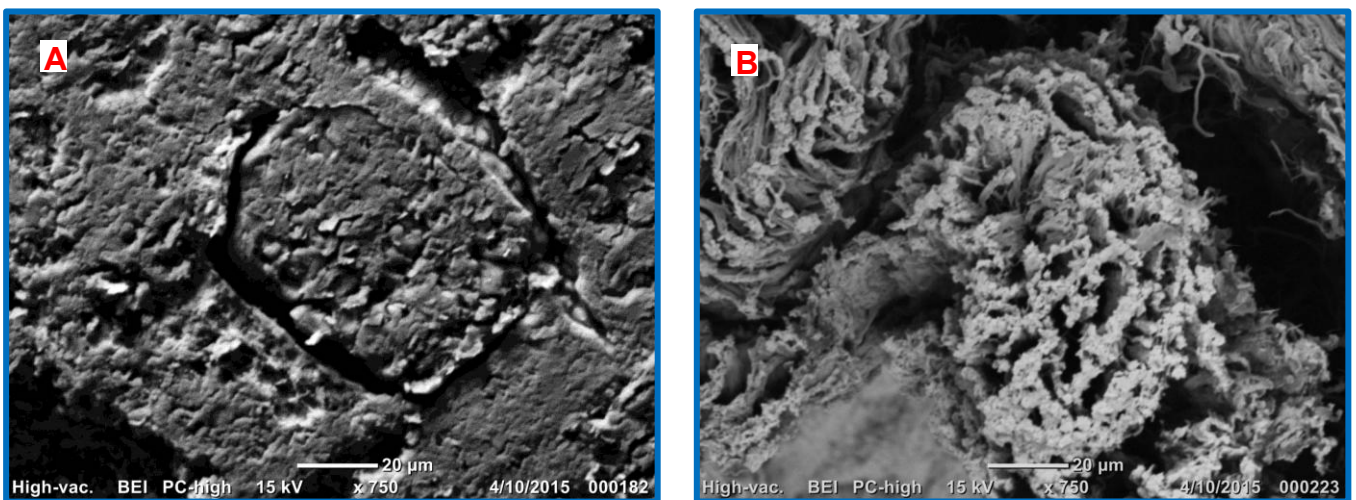


Figura 51. Corte transversal del glomérulo que muestra su morfología interna.

HÍGADO

En el caso del hígado, se observó con mayor claridad la ausencia de las células, gracias a los grandes espacios vacíos (huecos) que se observaron en los lobulillos hepáticos (Figura 52), debido a que la MEC es escasa un el interior pero abundante entre los lobulillos.

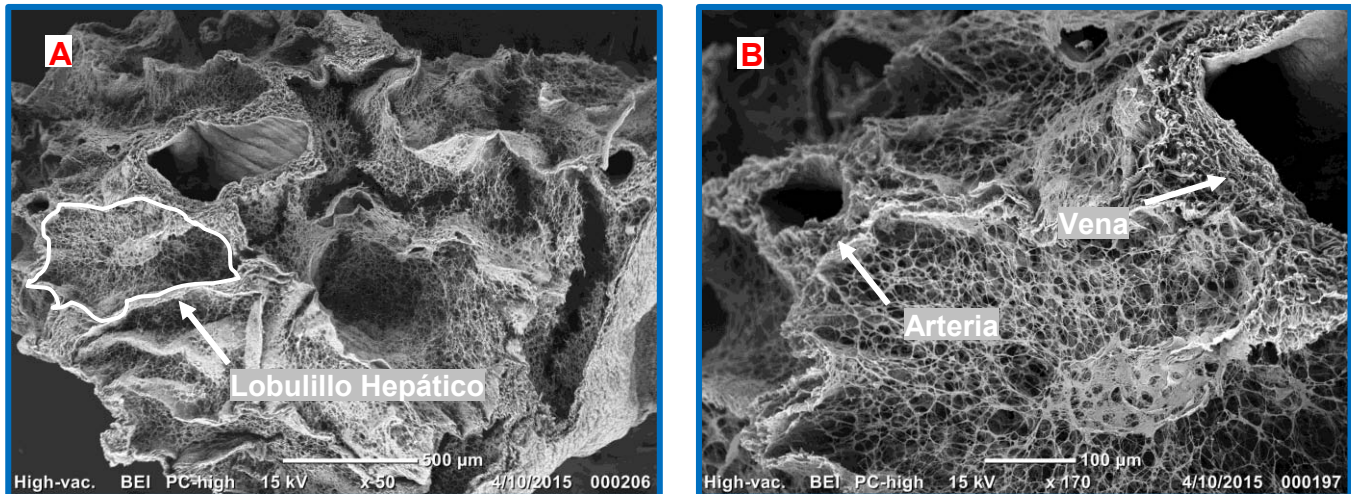


Figura 52. Globulillos hepáticos: A distribución general de la matriz extracelular y B interior del globulillo.

Las arterias mostraron una estructura compacta, formada por fibras de CLG y poros pequeños, la cápsula fibrosa también es descelularizada y mantuvo su integridad. (Figura 53)

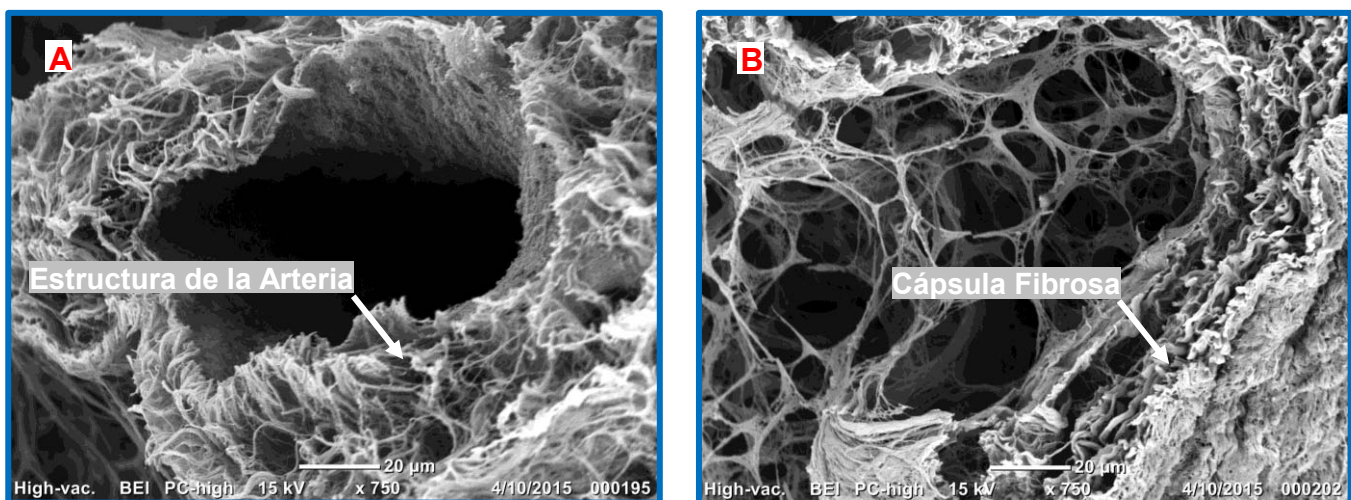


Figura 53. A) Estructura de una arteria descelularizada y B) estructura de la cápsula fibrosa.

ANÁLISIS TÉRMICOS

Los cambios de pH, así como las variaciones en la temperatura influyen en la solubilidad de las proteínas, este aspecto fisicoquímico puede verse afectado hasta el punto de producir la precipitación proteica. Esto se debe a que los enlaces que mantienen la conformación globular de la proteína se rompen, promoviendo que la proteína adopte una conformación filamentosa. De este modo, la interacción de las moléculas de agua con las moléculas proteicas está disminuida, por lo que las proteínas tienden a unirse entre sí dando lugar a grandes partículas que precipitan.

Las proteínas que se hallan en ese estado no pueden llevar a cabo la actividad para la que fueron diseñadas, en resumen, no son funcionales. Esta variación de la conformación de las proteínas se denomina desnaturalización. La desnaturalización respeta los enlaces peptídicos ya que al volver a las condiciones iniciales la proteína puede recuperar la conformación nativa, lo que se denomina renaturalización.

Los cambios que sufre el andamio de matriz extracelular (MEC) comparado con un andamio de CLG tipo I, fueron analizados mediante calorimetría diferencial de barrido y la estabilidad térmica, así como la pérdida de masa, con un análisis termogravimétrico.

CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

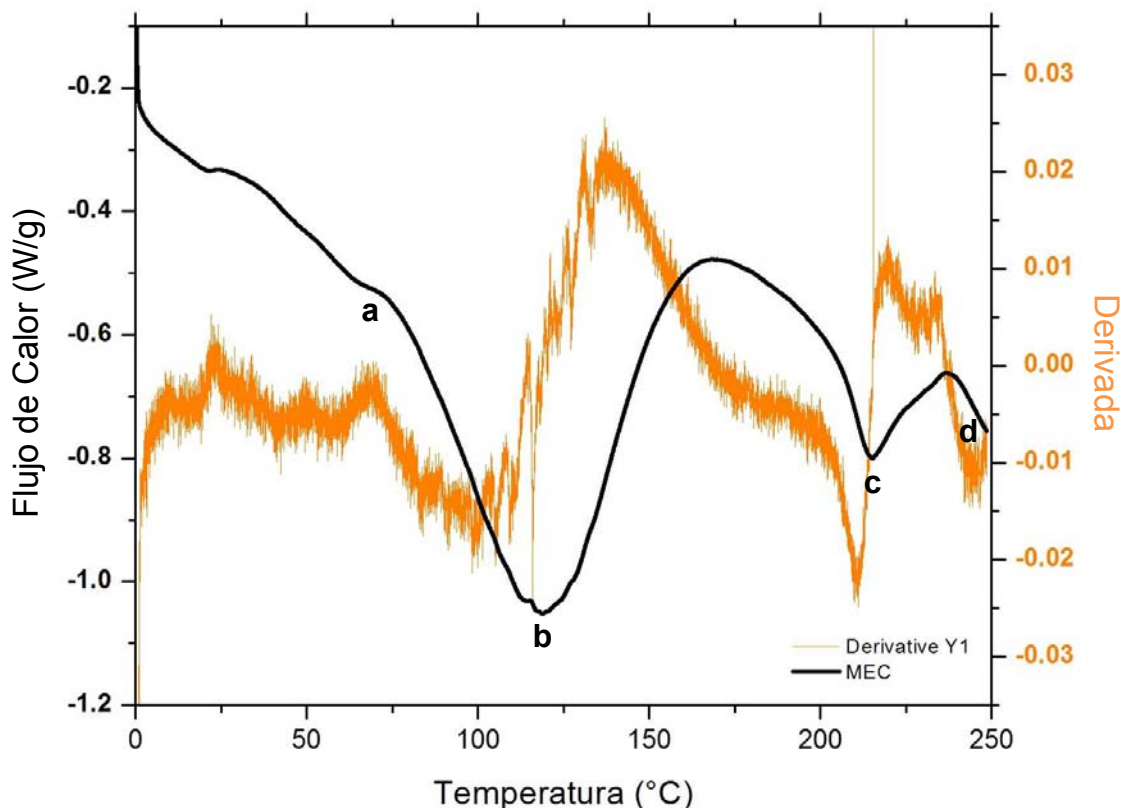


Figura 54. DSC del andamio obtenido por descelularización de riñón.

En la **Figura 54** se observan las siguientes regiones: (86) (87) (88) (89) (90)

- | | | | |
|-----------|---------------|------------------------|------------|
| a) | 50°C - 70°C | Transición a gelatina. | Max. 63°C |
| b) | 96°C - 137°C | Desnaturalización. | Max. 118°C |
| c) | 190°C - 220°C | Degradación. | Max. 215°C |
| d) | Mayor a 245°C | Combustión. | |

ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

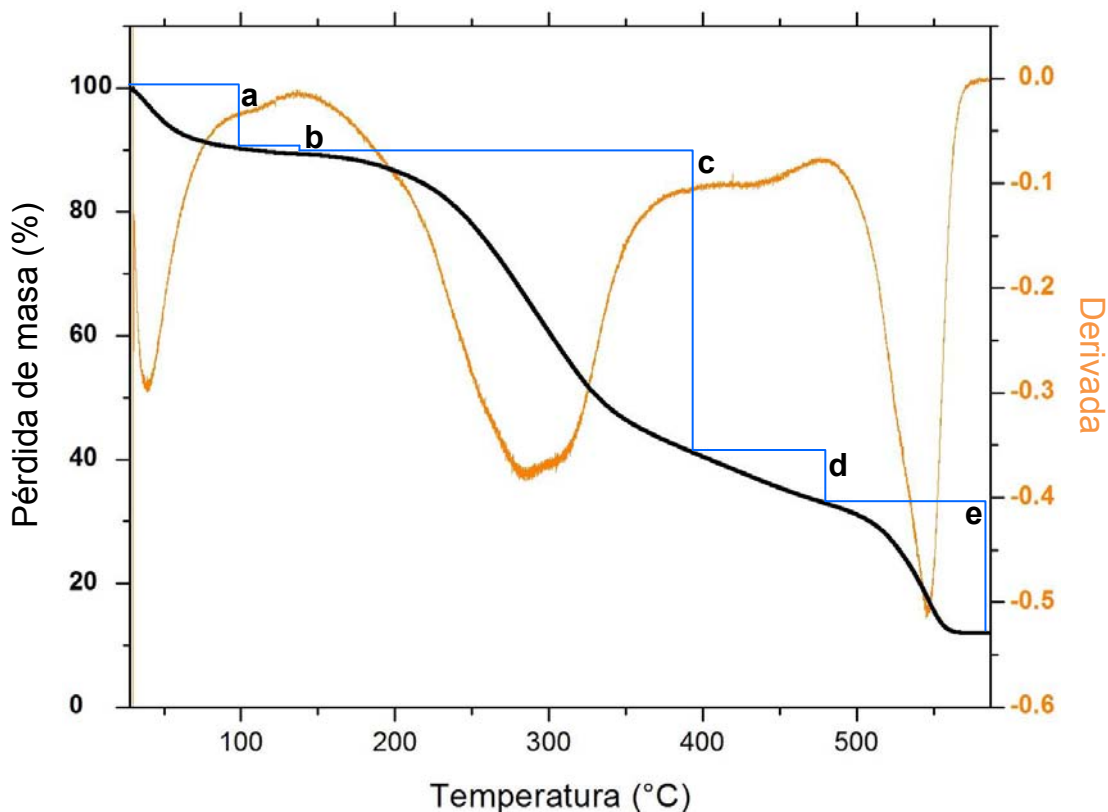


Figura 55. Termograma del andamio obtenido por descelularización de riñón.

En la Figura 55 se observan las siguientes regiones: (87) (88) (90)

Temperatura.	Fenómeno.	Pérdida de masa.
a) 30°C - 96°C	Pérdida de agua por deshidratación.	10%
b) 96°C - 137°C	Desnaturalización.	1%
c) 137°C - 400°C	Pérdida de peso por combustión.	40%
d) 400°C - 476°C	Pérdida de peso por combustión.	7%
e) 476°C - 600°C	Pérdida de peso por combustión.	21%

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

La espectroscopía es el estudio de las interacciones de la radiación electromagnética con la materia. Cada tipo de espectroscopía utiliza energía de longitudes de onda correspondientes a una región del espectro electromagnético, por ejemplo, la espectrometría ultravioleta-visible permite hacer mediciones de materiales que absorben o emiten en la región del ultravioleta cercano y el infrarrojo cercano; la espectrometría de infrarrojo utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético.

La espectroscopía infrarroja comprende las longitudes de onda desde 400 - 4000 nm aproximadamente. Ofrece la posibilidad de medir diferentes tipos de vibraciones en los enlaces atómicos a frecuencias diferentes y el análisis de los espectros de absorción infrarroja indica qué tipo de enlaces están presentes en la muestra.

La espectroscopía UV-VIS comprende longitudes de onda desde 200 - 800 nm aproximadamente. Algunas disoluciones absorben y reflejan radiación en esta zona y tal radiación es responsable del color característico en la muestra.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

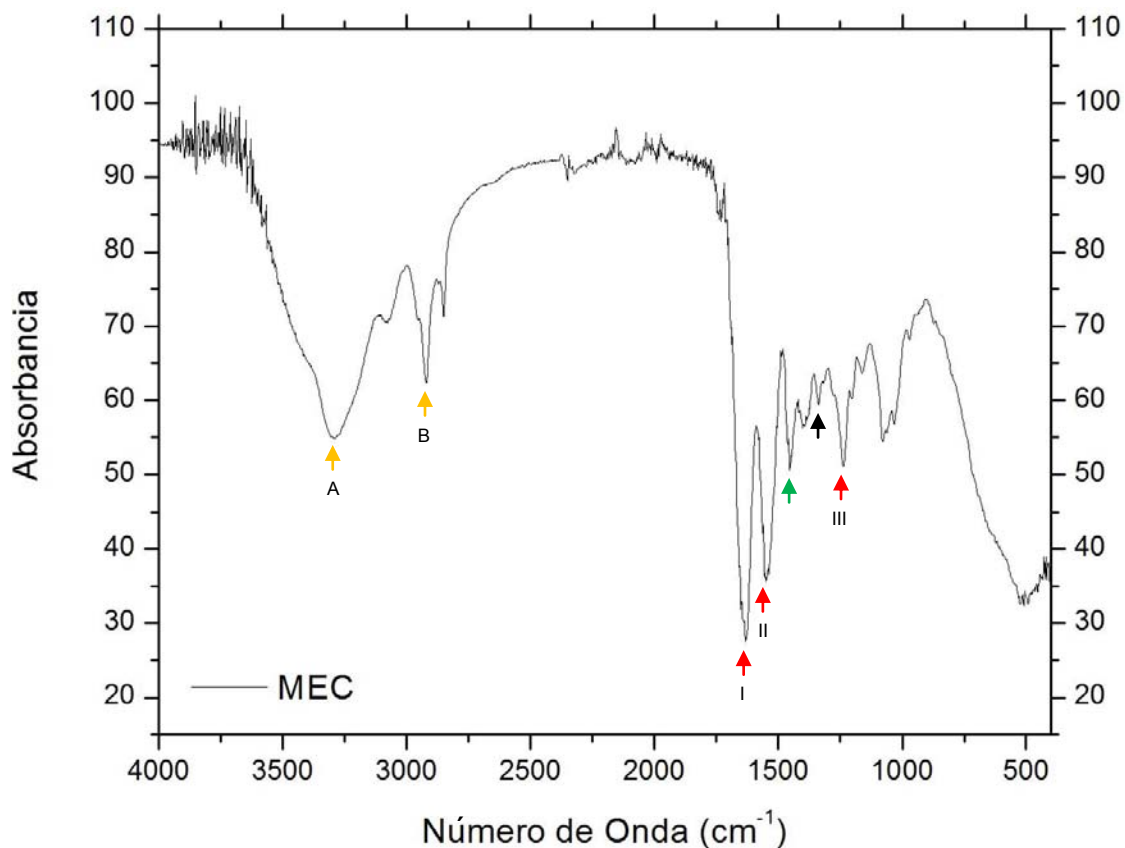


Figura 56. Espectro IR del andamio obtenido por descelularización.

Bandas características en el espectro obtenido por IR (Figura 56). (88) (91) (92) (93) (94)

No. de onda	Grupo		Característica
3290	Amida A	↑	Vibración por estiramiento del grupo NH
2975	Amida B	↑	Vibración por estiramiento asimétrico del grupo NH ₂
1633	Amida I	↑	Vibración por estiramiento del grupo C=O
1552	Amida II	↑	Vibración por deformación del grupo N-H
1229	Amida III	↑	Vibración por estiramiento del grupo C-N
1320	Carboxilo	↑	Vibración por estiramiento del grupo COO
1450	Anillo Pirrol	↑	Vibraciones del anillo Pirrol.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE

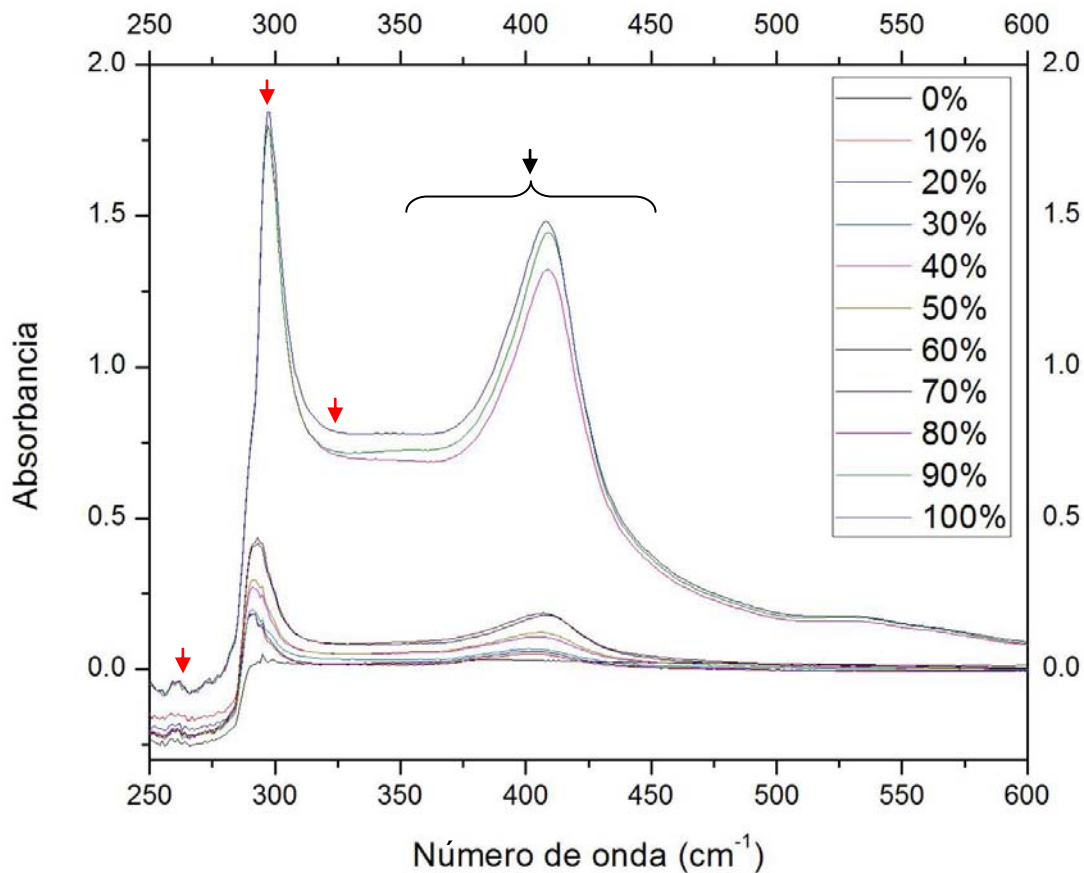
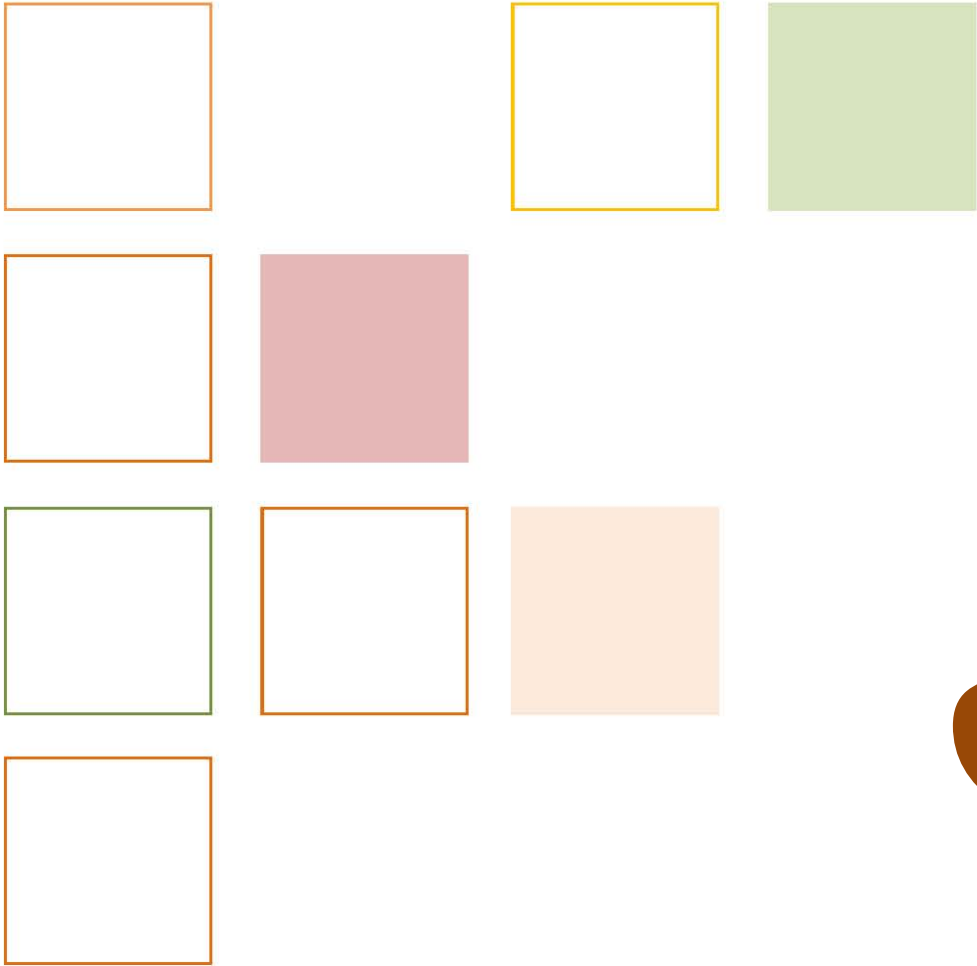


Figura 57. Espectro UV-VIS de la disolución descelularizante durante el proceso de descelularización.

Se observan en la Figura 57 tres regiones para visualizar el aumento de DNA-RNA y una para las proteínas en la disolución descelularizante: (95) (96) (97) (98)

DNA-RNA: 260 cm⁻¹, 280 cm⁻¹ y 320 cm⁻¹.

Proteínas: Región de 350 cm⁻¹ hasta 450 cm⁻¹.



5

Capítulo

Discusión



Las mangueras que se descartaron del ensayo de degradación presentaron cambios entre los que podemos mencionar: cambio en sus dimensiones (largo y diámetro), variación en su masa entre el 6 % y 25 %, algunas presentaron cambio en el color y se hicieron rígidas además no permitieron el giro del cabezal.

Del ensayo de degradación se seleccionaron cuatro mangueras que no presentaron cambios en cada disolución (Figura 58; Gráficas A, B, C). Se descartó la manguera 06475 para ser utilizada en el cabezal de la bomba, ya que forzaba el giro del cabezal pero se puede utilizar en algunas conexiones del dispositivo. La manguera con el mejor comportamiento en las tres disoluciones es la **96420** fabricada con silicón y diseñada para estar en contacto con disoluciones biológicas. En segundo lugar están las mangueras **96440**, **96400** y **96410** también fabricadas con silicón, estas tres últimas se utilizaron en el dispositivo y son recomendables para ser utilizadas en el cabezal de la bomba peristáltica.

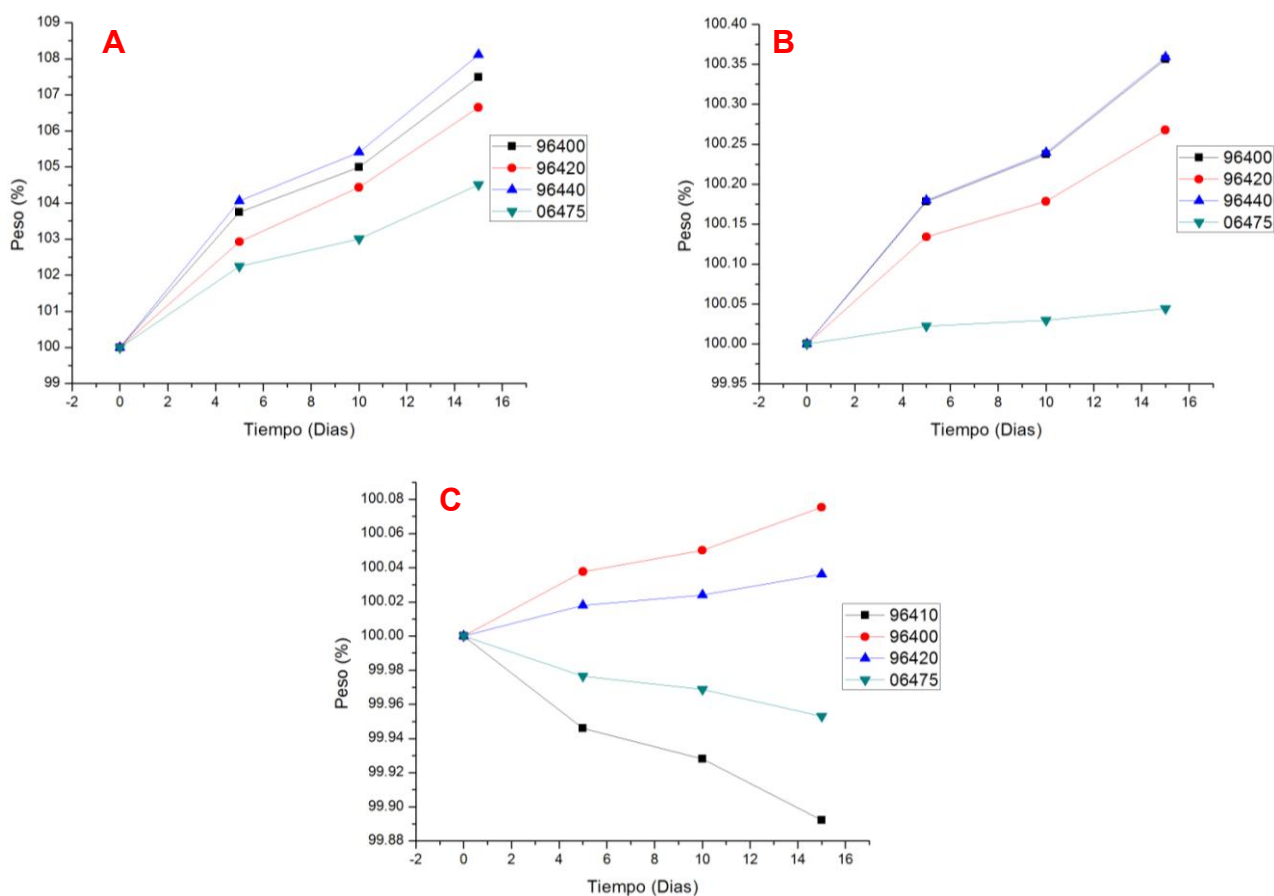


Figura 58. Gráficas de las mangueras con el mejor comportamiento en: A) TBF, B) TX1, C) SDS.

Las pruebas de descelularización por inmersión no fueron viables para descelularizar órganos, sin embargo, los resultados obtenidos son de importancia ya que éste es el método recomendado para descelularizar órganos sin venas y arterias, como la tráquea, cartílago y córnea, o que su espesor es pequeño comparado con el largo y ancho, a manera de ejemplo esófago, piel, pericardio y vejiga.

De los resultados obtenidos en la inmersión de secciones de órganos, se descartó utilizar el TBF, ya que dejaba una capa aceitosa difícil de eliminar, además, su hoja de seguridad indica que provoca daños al sistema nervioso y genera problemas en la calidad de la sangre.

Los **agentes químicos** restantes TX1 y SDS se utilizaron en el dispositivo Bio-MEC prototipo 00 para evaluar su efectividad en el proceso de descelularización, ambos permitieron una descelularización efectiva, sin embargo, el Tritón X100 compromete la integridad del órgano, ya que al finalizar el protocolo se observó que los órganos pierden la firmeza y son difíciles de manipular. Se observó este comportamiento con disoluciones al 1 % TX1 y en la combinación SDS-TX1. Los órganos con textura firme y de fácil manipulación se obtuvieron con el empleo de SDS.

El **volumen** de la disolución descelularizante que se utilizó, preparada con relación al volumen promedio, fue la cantidad mínima necesaria para la obtención de andamios, ya que permitió obtener resultados favorables. Un volumen menor no permitió la descelularización debido a una saturación de la solución con material celular.

Las **concentraciones** de los agentes químicos que se probaron para descelularizar, en el menor tiempo posible y a un bajo costo, fueron 0.1 %, 0.3 %, 0.5 % y 1 %, utilizando el riñón como primer órgano a descelularizar. Las primeras dos concentraciones fueron descartadas debido a que la eliminación de células se prolongaba por periodos de 6 y 10 días (0.3 % y 0.1 %, respectivamente). Esto se debe a que el detergente a bajas concentraciones se adhiere a las paredes del dispositivo, así como en las venas y arterias, además, se inicia el proceso de degradación de la membrana celular pero no se extrajo el contenido celular del órgano por la falta de formación de micelas en las proteínas.

Las concentraciones del 1 % y 0.5 %, en la descelularización, permitieron obtener andamios descelularizados en un promedio de 1 y 2 días respectivamente. Concentraciones mayores provocan la disgregación del interior del órgano.

El **flujo** que se utilizó en la solución descelularizante, fue 85 % menor que el flujo reportado en la fisiología médica (mL/min), ya que un flujo mayor a 60, 20 y 100 mL/min (riñón, corazón e hígado respectivamente) provocó desgarres o el incremento de volumen tal que el órgano literalmente explota.

El diseño del dispositivo Bio-MEC se realizó para facilitar la obtención de andamios de MEC a partir de órganos de cerdo. El dispositivo Bio-MEC prototipo 00 fue construido a partir de piezas, contenedores y conectores que se pueden diseñar, construir y/o adquirir a bajo costo, demostrando que la falta de recursos económicos, en este trabajo, no fue una limitante para generar aportes científicos y tecnológicos de impacto a la sociedad y con calidad internacional.

El dispositivo Bio-MEC tiene contenedores de varios tamaños que permiten la descelularización de un órgano como el riñón o el hígado y contenedores que pueden descelularizar hasta 3 o 4 órganos al mismo tiempo.

La trampa de aire tiene la finalidad de que la descelularización se efectúe de manera continua y homogénea, ya que es importante la ausencia de burbujas en la disolución para que no formen tapones en venas y arterias.

Es indispensable que la solución descelularizante se mantenga a bajas temperaturas, motivo por el cual, los dispositivos Bio-MEC cuentan con un refrigerante acoplado en la columna. Existen diseños compactos y permiten ser utilizados en equipos de refrigeración.

El objetivo del dispositivo Bio-MEC, además de descelularizar, se pretende que permita hacer la recelularización de los órganos, para lo cual se requiere acondicionar el dispositivo con termómetros, medidores de pH, camisas de temperatura y mantener una concentración constante de CO₂.

Comparando el andamio de MEC, obtenido en el dispositivo Bio-MEC, con el andamio COL que se tiene como referencia en el laboratorio, se observó que el andamio obtenido por descelularización (Figura 59 A), se desnatura aproximadamente 23 °C por arriba de la temperatura de desnaturalización del andamio de CLG; y su degradación inició 7 °C, por arriba de la temperatura observada en los andamios de CLG lo cual se observa en la Figura 59 B.

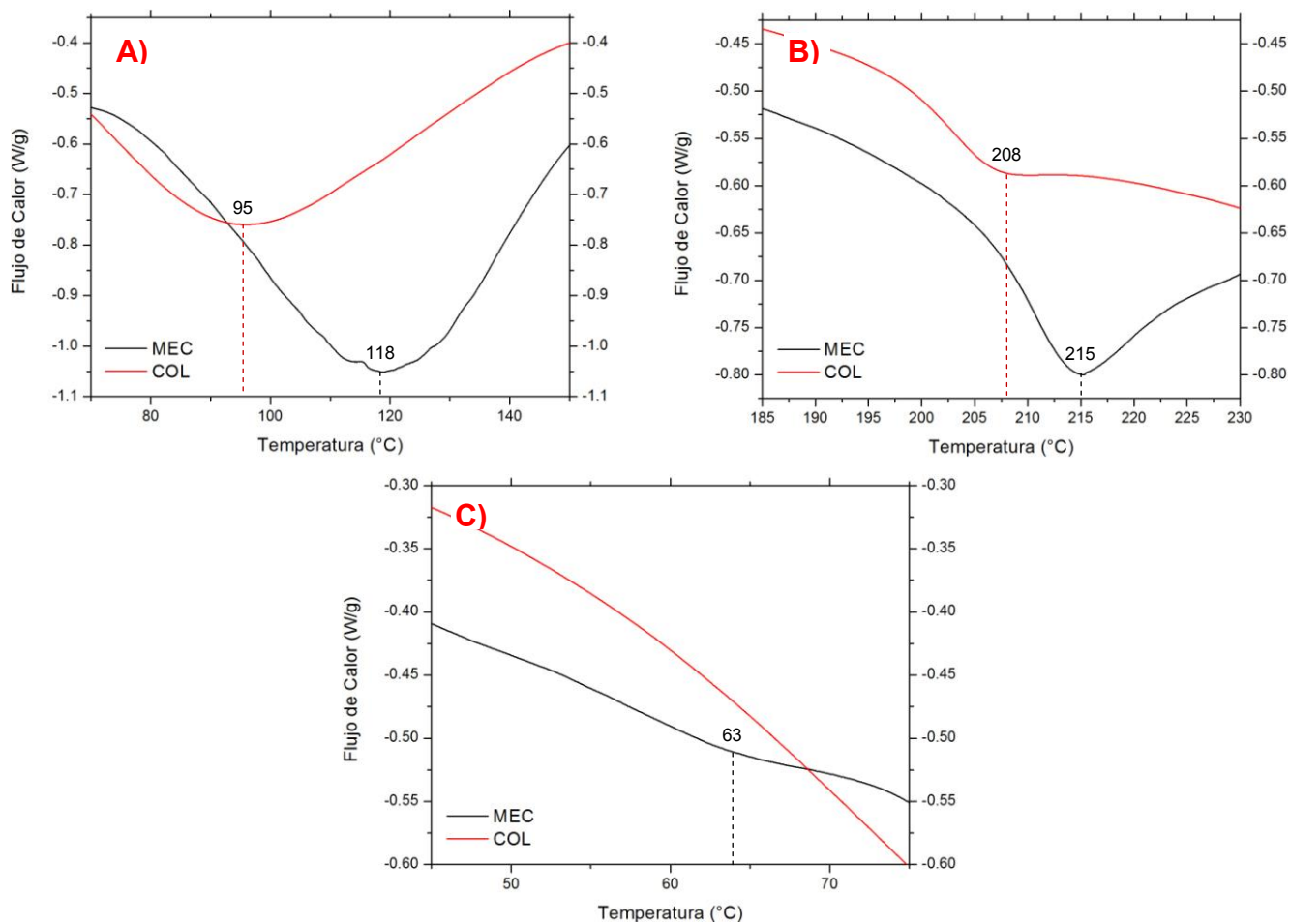


Figura 59. Gráfica A) Desnaturalización, B) Degradación y C) Pre-desnaturalización de los andamios.

Los aumentos en la temperatura de desnaturalización y degradación se deben a que el andamio MEC contiene todos los componentes de la propia matriz extracelular para cada órgano como la colágena tipo I, III y IV, elastina, fibronectina y proteínas de señalización, que en conjunto le confieren mayor resistencia térmica, lo cual sugiere que los andamios obtenidos por descelularización son más resistentes y estables que los de CLG por sí sola.

Sin embargo, debido a que el SDS se utiliza para desnaturalizar proteínas y mantenerlas desplegadas en la cuantificación de proteínas por electroforesis, se observó que el andamio obtenido tiene una pre-desnaturalización (Figura 59 C) la cual es detectada entre 50 °C y 70 °C, esto no afectó al andamio, debido a que existen investigaciones en la fabricación de andamios que utilizan proteínas desnaturalizadas (CLG) como materia prima.

Durante el primer rango de estabilidad, entre 70 y 235 °C, del andamio obtenido por descelularización (MEC), se presentó la desnaturalización de la proteína (Figura 60) y alrededor de los 215 °C inició la degradación de la proteína y posterior a la degradación (137 °C) continuó el proceso de combustión con la mayor pérdida de peso.

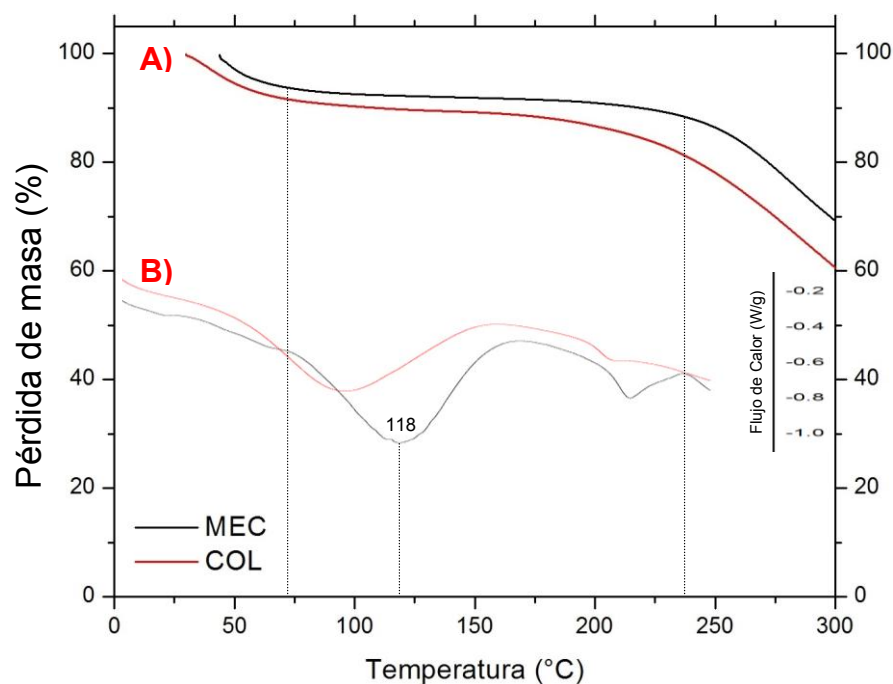


Figura 60. A) Comparación de la pérdida de peso del andamio Matriz Extracelular (MEC) y el colágeno tipo I (COL). B) DSC de ambos andamios.

En la Tabla 5 podemos observar que la prolina (Pro) y la glicina (Gly) se encuentran en todas las cadenas de los diferentes tipos de CLG (color rojo), sin embargo, la alanina se encuentra en la colágena I, II y III; la lisina y la leucina se encuentran en las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ respectivamente de la colágena tipo IV, de esta manera podemos distinguir la contribución de la colágena tipo IV en el espectro de IR (Figura 61).

Tabla 5. Contribución de las unidades de aminoácidos presentes en las cadenas de colágena. En rojo, aquellos con la contribución mayor.

	amino	CI α1(I)	%	CI α2(I)	%	CII α1(II)	%	CIII α1(III)	%	CIV α1(IV)	%	CIV α2(IV)	%
1	Ala A	141	9.63	126	9.22	132	8.88	115	7.84	59	3.54	83	4.85
2	Cys C	18	1.23	9	0.66	19	1.28	22	1.5	20	1.2	21	1.23
3	Asp D	66	4.51	42	3.07	63	4.24	55	3.75	58	3.48	82	4.79
4	Glu E	75	5.12	67	4.9	79	5.31	74	5.05	69	4.13	60	3.5
5	Phe F	27	1.84	23	1.68	24	1.61	23	1.57	46	2.76	57	3.33
6	Gly G	391	26.7	382	28	405	27.2	413	28.2	478	28.6	472	27.6
7	His H	9	0.61	17	1.24	8	0.54	14	0.95	16	0.96	19	1.11
8	Ile I	24	1.64	31	2.27	35	2.35	36	2.46	58	3.48	65	3.8
9	Lys K	58	3.96	50	3.66	67	4.51	62	4.23	94	5.63	82	4.79
10	Leu L	48	3.28	62	4.54	57	3.83	48	3.27	92	5.51	102	5.96
11	Met M	13	0.89	10	0.73	16	1.08	17	1.16	31	1.86	24	1.4
12	Asn N	28	1.91	42	3.07	32	2.15	41	2.8	16	0.96	18	1.05
13	Pro P	278	19	230	16.8	268	18	281	19.2	326	19.5	286	16.7
14	Gln Q	48	3.28	32	2.34	61	4.1	43	2.93	73	4.37	62	3.62
15	Arg R	71	4.85	72	5.27	72	4.84	60	4.09	45	2.7	78	4.56
16	Ser S	60	4.1	51	3.73	50	3.36	73	4.98	70	4.19	64	3.74
17	Thr T	44	3.01	44	3.22	44	2.96	31	2.11	43	2.58	51	2.98
18	Val V	46	3.14	55	4.03	38	2.56	36	2.46	51	3.06	49	2.86
19	Trp W	6	0.41	5	0.37	7	0.47	7	0.48	6	0.36	9	0.53
20	Tyr Y	13	0.89	16	1.17	10	0.67	15	1.02	18	1.08	28	1.64
21		1464	100	1366	100	1487	100	1466	100	1669	100	1712	100

Los espectros de infrarrojo del andamio MEC y el andamio COL, mostraron las mismas bandas (propias de la CLG) pero con cambios en la absorbancia, esto se debe a que el andamio MEC tiene una contribución de colágena tipo I, III (de las cuales es difícil distinguir la colágena tipo I de la III) y IV; mientras que el andamio COL es únicamente colágena tipo I.

Por tal motivo en la colágena tipo IV, la lisina (Lys) y leucina (Leu) tienen una contribución en el espectro de MEC en las bandas que se ubica alrededor de 2850 y 2920 cm^{-1} , y como consecuencia son las bandas que tienen una menor absorbancia, en comparación con el espectro de COL (Figura 61; líneas punteadas).

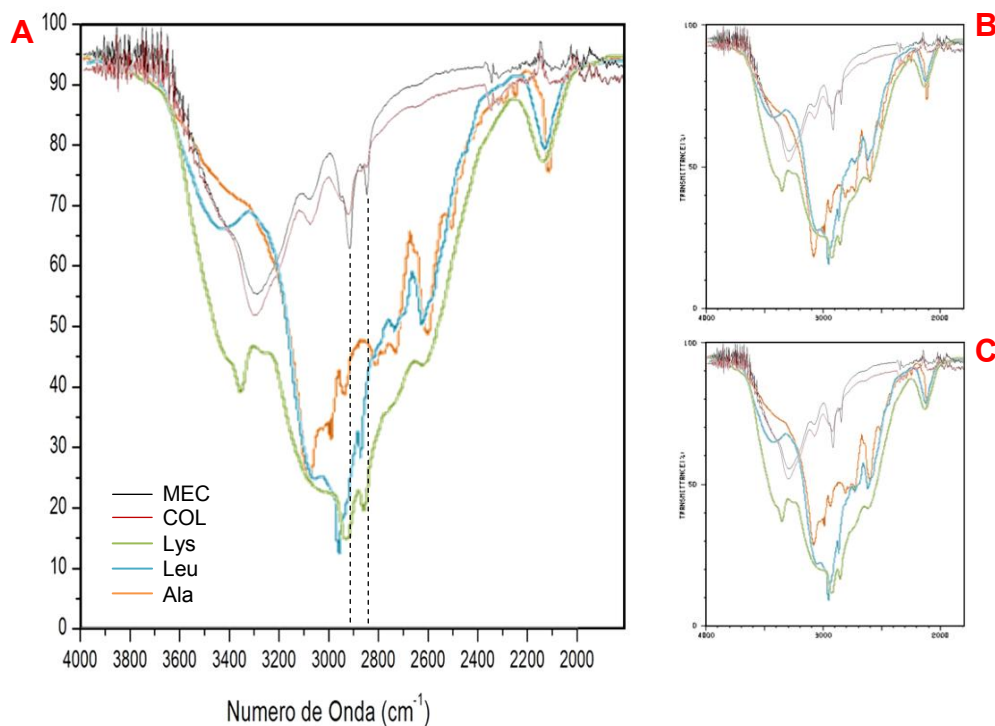
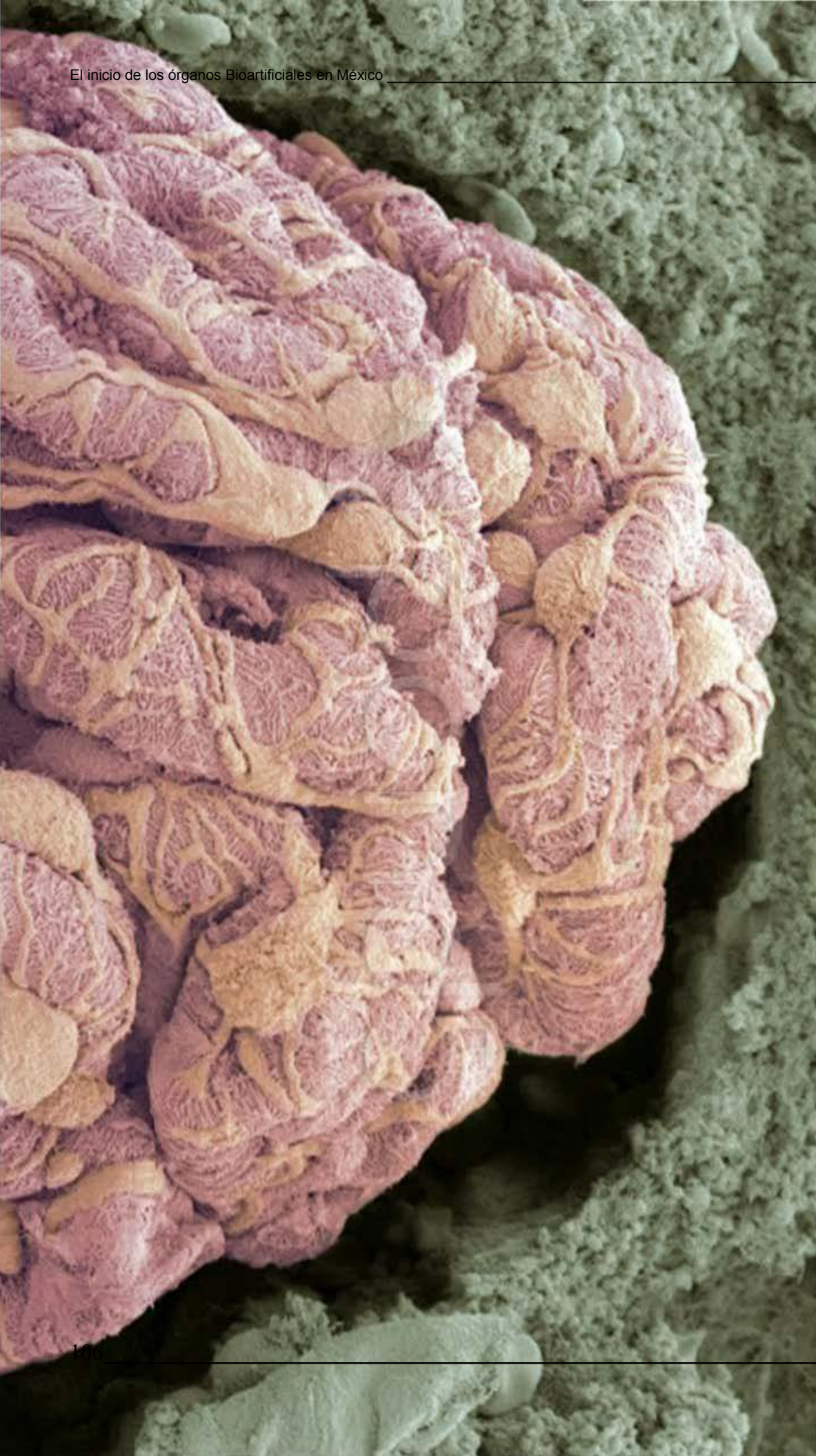


Figura 61. A) Comparación de los espectro de colágena tipo I (COL) y el andamio de matriz extracelular (MEC); B) Colágena tipo I, II, III y C) Colágena tipo IV.

Este análisis fue de utilidad para confirmar la presencia de CLG en el andamio, que es la proteína de mayor porcentaje en el andamio de MEC, sin embargo, es necesario realizar una caracterización más detallada para saber cuál es la contribución de cada una de las colágenas (tipo I, III y IV) presentes en el andamio.

En la [Figura 54](#) se observa como a través del proceso de descelularización también fue posible extraer el material genético (DNA-RNA) del órgano de cerdo. Esto nos asegura que la descelularización también degrada la membrana bilipídica del núcleo celular, lo que permite la extracción de su contenido y de esta manera, junto con la degradación enzimática con desoxirribonucleasa I, se elimina el material genético y por lo tanto permite proporcionar un andamio inmunológicamente no comprometido, con lo que se pretende evitar el rechazo al momento del trasplante.



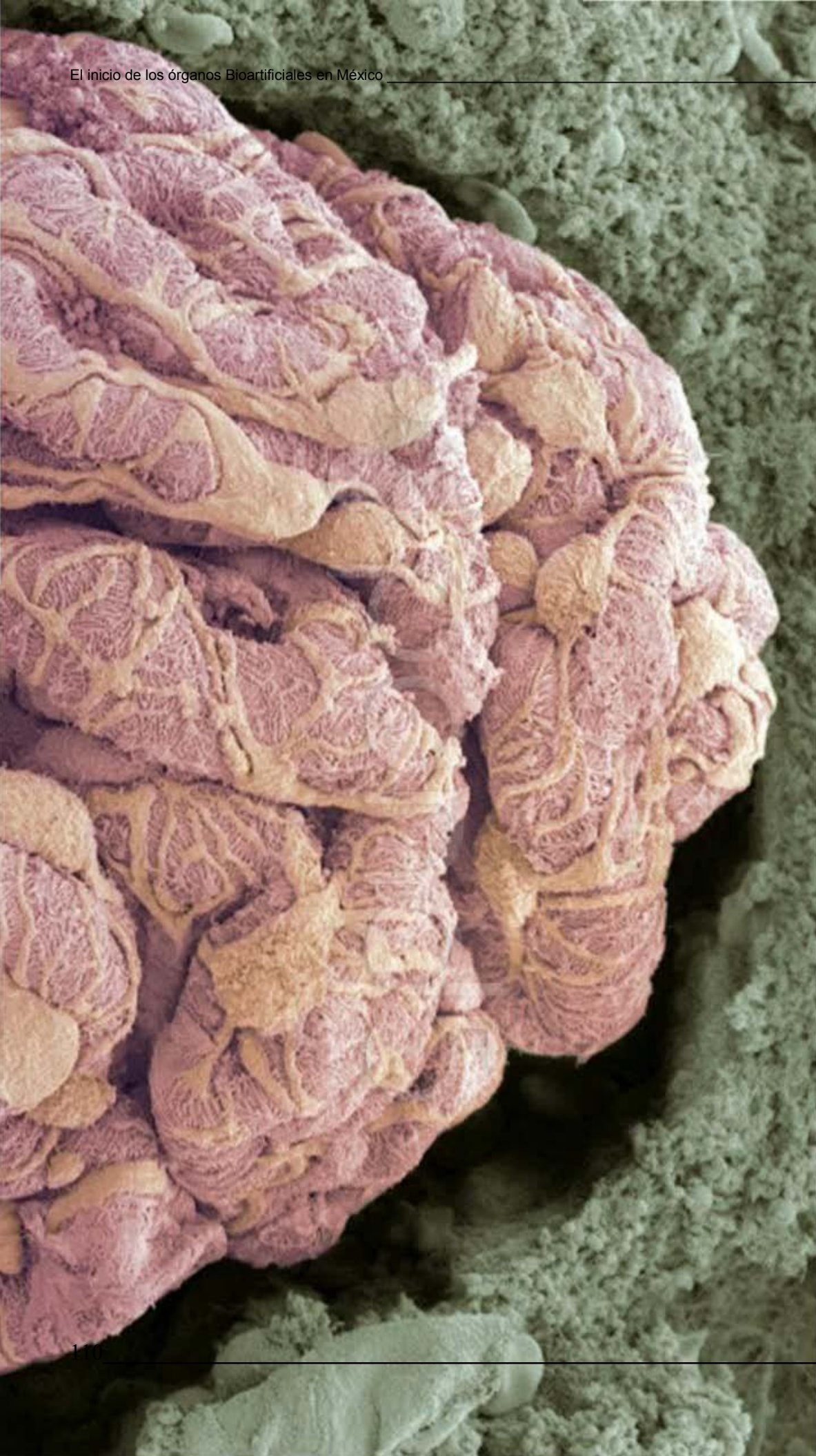
CONCLUSIONES

- Es indispensable que todos los materiales que se utilizan y están en contacto con las disoluciones descelularizantes (mangueras, conectores y contenedores) en cualquier dispositivo, sean sometidos a degradación, ya que las concentraciones del agente químico y los tiempos requeridos en cada etapa afectan el rendimiento y comportamiento de los materiales.
- La descelularización por inmersión es recomendable para tejidos y secciones de órganos en las cuales el largo y ancho son mayores que su espesor.
- Para órganos completos es recomendable utilizar la perfusión de disoluciones.
- Es importante que se tome en cuenta el flujo que se utiliza en la descelularización, así como la concentración de la disolución descelularizante, ya que el comportamiento de las células presentes en cada órgano es diferente.
- El dispositivo Bio-MEC, con sus prototipos 00, 01 y 02, permite obtener andamios de MEC, con las características requeridas para cada órgano, ya que la arquitectura presente en los andamios es igual a la del órgano nativo.

- El andamio obtenido por descelularización tiene un mejor comportamiento que el andamio de CLG (tipo I) que se utiliza como referencia en el laboratorio, ya que las temperaturas de desnaturalización y degradación son mayores a lo esperado, por lo cual es recomendable seguir con esta investigación.
- Los andamios obtenidos con SDS tienen una consistencia favorable para su manipulación y sin vestigios de células.
- Para una mejor investigación, de los parámetros a utilizar en la descelularización, se requieren convenios con instituciones que trabajen la misma especie animal que se utiliza, para garantizar el acceso a la gran cantidad de órganos que se requieren para continuar con este estudio.

PROPUESTAS

- Identificar los tipos de colágena presentes en el andamio.
- Cuantificar los residuos de DNA-RNA en al andamio.
- Realizar pruebas de Biocompatibilidad de los andamio de MEC.
- Iniciar pruebas de recelularización con células troncales y células propias de cada órgano.
- Adecuar el dispositivo Bio-MEC para ser utilizado en la recelularización de los andamios.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system.* **David C. Sullivan, Sayed-Hadi Mirmalek-Sani, Daniel B. Deegan, Pedro M. Baptista, Tamer Aboushwareb, Anthony Atala, James J. Yoo.** 2012, *Biomaterials* Vol. 33, Issue 31, pp. 7756-7764.
2. *Mechanical properties of decellularized tendon cultured by cyclic straining bioreactor.* **Kwang-II Lee, Jung-Soo Lee, Jin-Gu Kim, Kyoung-Tak Kang, Ju-Woong Jang, Young-Bock Shim, Seong-Hwan Moon.** 2013, *Journal of Biomedical Materials Research*, pp. 3152-3158.
3. *Antigen removal for the production of biomechanically functional, xenogeneic tissue grafts.* **Derek D. Cissell, Jerry C. Hu, Leigh G. Griffiths, Kyriacos A. Athanasiou.** 2014, *Journal of Biomechanics*, pp. 1987–1996.
4. *The extracellular matrix as a biologic scaffold material.* **Badylak, Stephen F.** 2007, *Biomaterials*, pp. 3587–3593.
5. *Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ.* **Omar Barakat, Shahrzad Abbasi, Gabriela Rodriguez, Jessie Rios, R. Patrick Wood, Claire Ozaki, Laurie S. Holley, Polly K. Gauthier.** 2012, *Journal of Surgical Research*, pp. 11-25.
6. **Enrique Hilario.** *Prácticas de histología humana.* Universidad del País Vasco : ISBN: 978-84-690-7712-2, 2007.

7. *Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix.* **Matthew J. Robertson, Jessica L. Dries-Devlin, Stefan M. Kren, Jana S. Burchfield, Doris A. Taylor.** 2014, Plos one, pp. 1-10.
8. *Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney.* **Jeremy J Song, Jacques P Guyette, Sarah E Gilpin, Gabriel Gonzalez, Joseph P Vacanti, Harald C Ott.** 2013, Nature Medicine, Vol. 19, No. 5, pp. 646-651.
9. *Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction.* **Bryan N. Brown, Stephen F. Badylak.** 4, Pittsburgh : Elsevier, 2014, Regenerative Medicine: The Hurdles and Hopes, Vol. 163, pp. 268–285.
10. CENATRA. *Centro Nacional de Transplantes.* Secretaría de Salud, noviembre 2, 2015. [Cited: noviembre 2, 2015.] http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html.
11. **Ma, Ian O. Smith and Peter X.** Biomimetic Scaffolds in Tissue Engineering. Tissue Engineering. From Lab to Clinic. *Norbert Pallua, Christoph V. Suschek.* Berlin: Springer, 2011.
12. *Fabrication and characterization of chitosan–gelatin/nanohydroxyapatite–polyaniline composite with potential application in tissue engineering scaffolds.* **Fahimeh Farshi Azhar, Ali Olad & Roya Salehi.** 2014, Designed Monomers and Polymers, pp. 654-667.
13. *3D braidscaffoldsforregeneration of articularcartilage.* **Hyunchul Ahn, Kyoung Ju Kim, Sook Young Park, Jeong Eun Huh, Hyun Jeong Kim, Woong Ryeol Yu.,** 2014, Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, pp. 37-46.
14. *Increased porosity of electrospun hybrid scaffolds improved bladder tissue regeneration.* **Maya Horst, Vincent Milleret, Sarah N€otzli, Srinivas Madduri, Tullio Sulser, Rita Gobet, Daniel Eberli.** 2014, Journal of Biomedical Materials Research, pp. 2116-2124.
15. *Tracheal reconstruction using chondrocytes seeded on a poly(l-lactic-co-glycolic acid)-fibrin/hyaluronan.* **Hyun Jun Hong, Jae Won Chang, Ju-Kyeong Park, Jae Won Choi, Yoo Suk Kim, Yoo Seob Shin, Chul-Ho Kim, Eun Chang Choi.** 2014, Journal of Biomedical Materials Research, pp. 1-9.
16. *Heparin functionalized polyaspartamide/polyester scaffold for potential blood vessel regeneration.* **Giovanna Pitarresi, Calogero Fiorica, Fabio Salvatore Palumbo, Salvatrice Rigogliuso, Giulio Gherzi, Gaetano Giammona.** 2014, Journal of Biomedical Materials Research Part A, pp. 1334-1341.
17. *On the road to bioartificial organs.* **X. Ren, H. C. Ott.** 2014, European Journal of Physiology, pp. 1-11.
18. *Structural characterization of electrospunmicro/nanofibrous scaffolds by liquid extrusion porosimetry: A comparison with other techniques.* **Pablo R. Cortez Tornello, Pablo C. Caracciolo, Teresita R. Cuadrado, Gustavo A. Abraham.** 2014, Materials Science and Engineering C, pp. 335-342.

19. *TBA-based freeze/gel casting of porous hydroxyapatite scaffolds.* **Kim, J.H, Lee, J.H, Yang, T.Y, Yoon, S.Y, Kim, B.K, Park, H.C.** 2011, *Ceramics International*, Vol. 37, Issue 7., pp. 2317-2322.
20. *Green synthesis of a new gelatin-based antimicrobial scaffold for tissue engineering.* **Yazdimamaghani, M., Vashae, D., Assefa, S., Shabrangharehdasht, M., Rad, A.T., Eastman, M.A., Walker, K.J., Madihally, S.V., Köhler, G.A., Tayebi, L.** 2014, *Materials Science and Engineering C*, pp. 235-244.
21. *Prolonged presence of VEGF promotes vascularization in 3D bioprinted scaffolds with defined architecture.* **Poldervaart, M.T., Gremmels, H. , Van Deventer, K. , Fledderus, J.O. , Öner, F.C., Verhaar, M.C., Dhert, W.J.A. , Alblas, J.** 2014, *Journal of Controlled Release*, pp. 58-66.
22. *Selective laser sintering in biomedical engineering.* **Mazzoli, Alida.** 2013, *Medical and Biological Engineering and Computing*, Vol. 51, Issue 3., pp. 245-256.
23. **Eleonora Carletti, Antonella Motta, Claudio Migliaresi.** *Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture.* John W. Haycock. *3D Cell Culture: Methods and Protocols.* London: Springer, 2011, pp. 17-40.
24. **Joachim Kohn, Robert Langer, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons Buddy D. Ratner.** *Bioresorbable and Bioerodible Materials. Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine.* San Diego, California: Academic Press, 1996, pp. 64-73.
25. *The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo.* **Matthew M. Stern, Regina L. Myers, Nevin Hammam, Kathryn A. Stern, Daniel Eberli, Stephen B. Kritchevsky, Shay Soker, Mark Van Dyke.** 2009, *Biomaterials* 30, pp. 2393–2399.
26. *Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix.* **Nai-Chen Cheng, Bradley T. Estes, Hani A. Awad, Farshid Guilak.** 2009, *Tissue Engineering: Part A*, Vol. 15, No. 2, pp. 231-241.
27. *La matriz extracelular: morfología, función y biotensegridad.* **Tomás Álvaro Naranjo, Rosa Noguera Salvá, Fernando Fariñas Guerrero.** 2009, *Revista Española Patología*; Vol. 42, No. 4.; pp. 249-261.
28. *Repair of the tympanic membrane with urinary bladder matrix.* **Aron Parekh, Belinda Mantle, Juliane Banks, J. Douglas Swarts, Stephen F. Badylak, Joseph E. Dohar, Patricia A. Hebda.** 2009, *Laryngoscope* 119, pp. 1206-1213.
29. *Comparison of surgisis, alloderm, and vicryl woven mesh, grafts for abdominal wall defect repair in an animal model.* **Robert D. Rice, Farhan S. Ayubi, Zachary J. Shaub, David M. Parker, Peter J. Armstrong, John W. Tsai.** 2009, LLC and International Society of Aesthetic Plastic Surgery, pp. 290-296.
30. *Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand.* **Furkan E. Karabekmez, Ahmet Duymaz, Steven L. Moran.** 2009, American Association for Hand Surgery, pp. 245–249.

31. *A bovine acellular scaffold for vocal fold reconstruction in a rat model.* **Chet C. Xu, Roger W. Chan, Debra G. Weinberger, Guy Efune, Karen S. Pawlowski.** 2009, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, pp. 18-32.

32. *Clinical comparison of the tutoplast allograft and autologous patellar tendon (Bone–Patellar Tendon–Bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament.* **Ottmar Gorschewsky, Andreas Klakow, Kathrin Riechert, Martin Pitzl, Roland Becker.** 2005, *The American Journal of Sports Medicine*, Vol. 33, No. 8, pp. 1202-1209.

33. *In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas.* **Shuji Sasaki, Seiichi Funamoto, Yoshihide Hashimoto, Tsuyoshi Kimura, Takako Honda, Shinya Hattori, Hisatoshi Kobayashi, Akio Kishida, Manabu Mochizuki.** 2009, *Molecular Vision*, pp. 2022-2028.

34. *Decellularization of tissues and organs.* **Thomas W. Gilbert, Tiffany L. Sellaro, Stephen F. Badylak.** 2006, *Biomaterials* 27, pp. 3675–3683.

35. *Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering.* **Pedro M. Baptista, Giuseppe Orlando, Sayed-Hadi Mirmalek-Sani, Mohummad Siddiqui, Anthony Atala, Shay Soker.** 2009, 31st Annual International Conference of the IEEE EMBS, pp. 6526-6529.

36. *Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique.* **Isarawut Prasertsung, Sorada Kanokpanont, Tanom Bunaprasert, Voranuch Thanakit, Siriporn Damrongsakkul.** 2007, *Journal of Biomedical Materials Research Part B. Applied Biomaterials*, pp. 210-219.

37. *The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds.* **Janet E. Reing, Bryan N. Brown, Kerry A. Daly, John M. Freund, Thomas W. Gilbert, Susan X. Hsiong, Alexander Huber, Karen E. Kullas, Stephen Tottey, Matthew T. Wolf, Stephen F. Badylak.** 31, s.l. : Elsevier, 2010, *Biomaterials*, pp. 8626 - 8633.

38. *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation.* **Thomas H. Petersen, Elizabeth A. Calle, Liping Zhao, Eun Jung Lee, Liqiong Gui, MichaSam B. Raredon, Kseniya Gavrilov, Tai Yi, Zhen W. Zhuang, Christopher Breuer, Erica Herzog, Laura E. Niklason.** 2010, *Science*, Vol. 329, pp. 537-541.

39. *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart.* **Harald C Ott, Thomas S Matthiesen, Saik-Kia Goh, Lauren D Black, Stefan M Kren, Theoden I Netoff, Doris A Taylor.** 2008, *Nature Medicine* Vol. 14, No. 2, pp. 213-2210.

40. *Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix.* **Basak E Uygun, Alejandro Soto-Gutierrez, Hiroshi Yagi, Maria-Louisa Izamis, Maria A Guzzardi, Carley Shulman, Jack Milwid, Naoya Kobayashi, Arno Tilles, Francois Berthiaume, Martin Herti, Yaakov Nahmias, Martin L Yarmush, Korkut Uygun.** 2009, *Nature Medicine*. Vol. 16, No. 7, pp. 814-821.

41. *Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds.* **Edward A. Ross, Matthew J. Williams, Takashi Hamazaki, Naohiro Terada, William L. Clapp, Christopher Adin, Gary W. Ellison, Marda Jorgensen, Christopher D. Batich.** 2009, *Journal of the American Society of Nephrology*, pp. 2338–2347.

-
42. *Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung.* **Harald C Ott, Ben Clippinger, Claudius Conrad, Christian Schuetz, Irina Pomerantseva, Laertis Ikonou, Darrell Kotton, Joseph P Vacanti.** 2010, *Nature Medicine* Vol. 16, No. 8, pp. 927-934.
43. *Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response.* **Timothy J. Keane, Ricardo Londono, Neill J. Turner, Stephen F. Badylak.** 2011, *Biomaterials* No. 33, pp. 1771-1781.
44. *Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs.* **Ming He, Anthony Callanan.** 2013, *Tissue Engineering: Part B*, Vol 19, No. 3, pp. 194-208.
45. *Tissue engineering.* **Robert Langer, Joseph P. Vacanti.** 1993, *Science* Vol. 260, pp. 920-926.
46. *Organ engineering - Combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation.* **Anthony Atala, Sean Vicent Murphy.** 2012, *Bioessays* No. 35, pp. 163 - 172.
47. **Norbert Pallua, Christoph V. Suschek.** *Tissue Engineering.* Berlin. Springer, 2011.
48. **Neil A. Campbell, Jane B. Reece.** *Biología 7 Ed.* Madrid, España. Panamericana, 2015.
49. **Leslie P. Gartner, James L. Hiatt.** *Texto Atlas de Histología 2a Ed.* México. McGraw-Hill, 2002.
50. **Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter.** *Introducción a la Biología Celular.* España. Medica Panamericana, 2004. 2a Ed.
51. **Fernández, Juan Carmelo Gómez.** *Biología Molecular de las Membranas Celulares.* España. Ingramur, 1994.
52. **Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell.** *Biología Celular y Molecular. 5a Ed.* Madrid España. Medica Panamericana, 2006.
53. **Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter.** *Introducción a la biología celular 2a Ed.* Madrid España. Medica Panamericana, 2004.
54. *Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation.* **Kristen R. Taylor, Richard L. Gallo.** California : The FASEB Journal, 206, Vol. 20.
55. **Ross, Pawlina.** *Histología; Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular.* España. Medica Panamericana. 2007. 978 950 06 0435 2.
56. *Hacia una nueva generación de biomateriales.* **Dianney Clavijo Grimaldo, Dr. José Edgar Alfonso Orjuela, Carmen Alicia Cardozo de Martínez, Ciro Alfonso Casadiego Torrado, Álvaro Perea Covarrubias.** Colombia. 2010, *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, Vol. 24. No. 0120-8845.

57. *An overview of tissue and whole organ decellularization processes.* **Peter M. Thomas W. Gilbert, Stephen F. Badylak.** 2011, *Biomaterials* No. 32, pp. 3233-3243.
58. *Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component.* **Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF.** 2009, *Biomaterials* No. 30, pp. 1482-1491.
59. *Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement.* **Benjamin D. Elder, Daniel H. Kim, Kyriacos A. Athanasiou,.** 2010, *Neurosurgery*. Vol. 66, No. 4, pp. 722- 727.
60. *Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart.* **John M. Wainwright, Caitlin A. Czajka, Urvi B. Patel, Donald O. Freytes, Kimimasa Tobita, Thomas W. Gilbert, Stephen F. Badylak.** 3, *Pennsylvania.* 2010, *Tissue Engineering: Part C*, Vol. 16.
61. *Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold.* **Liqun Du, Xinyi Wu, Kunpeng Pang, Yongmei Yang.** 2010, *Br J Ophthalmol*. pp. 410-414.
62. *A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc.* **Sarah B. Lumpkins, Nicolas Pierre, Peter S. McFetridge.** 2008, *Acta Materialia* No.4, pp. 808 – 816.
63. *Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart.* **John M. Wainwright, Caitlin A. Czajka, Urvi B. Pate, Donald O. Freytes, Kimimasa Tobita, Thomas W. Gilbert, Stephen F. Badylak.** 2010, *Tissue Engineering: Part C*, Vol. 16, No. 3, pp. 525- 532.
64. *RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering.* **Xiaochao Dong, Xufeng Wei, Wei Yi, Chunhu Gu, Xiaojun Kang, Yang Liu, Qiang Li, Dinghua Yi.** 20, *Springer*, 2009, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, pp. 2327–2336.
65. *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells.* **Erwin Rieder, Marie-Theres Kasimir, Gerd Silberhumer, Gernot Seebacher, Ernst Wolner, Paul Simon, Guenter Weigel.** 2, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Vol. 127, pp. 399-405.
66. *The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels.* **Seiichi Funamoto, Kwangwoo Nama, Tsuyoshi Kimura, Ayako Murakoshi, Yoshihide Hashimoto, Kazuo Niwaya, Soichiro Kitamura, Toshiya Fujisato, Akio Kishida.** 31, *Japan. Elsevier*, 2010, *Biomaterials*, pp. 3590–3595.
67. *Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft.* **Terence Woods, Paul F. Gratzner.** Canada, *Elsevier*, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 7339–7349.
68. *Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties.* **Jeffrey S. Cartmell, Michael G. Dunn.** New Jersey, 1999, *John Wiley & Sons, Inc.*, pp. 134-140.

69. *Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat.* **Steven R. Meyer, Brian Chiu, Thomas A. Churchill, Linfu Zhu, Jonathan R.T. Lakey, David B. Ross.** Canada. Wiley Periodicals, 2006, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 10, pp. 254-262.
70. *Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering.* **Bin Yang, Yifen Zhang, Liuhua Zhou, Zeyu Sun, Junhua Zheng, Yun Chen, Yutian Dai.** 5, Jiangsu, 2010, *Tissue Engineering: Part C*, Vol. 16, pp. 1201-1211.
71. *Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications.* **Ray Neng Chen, Hsiu O Ho, Yu Ting Tsai, Ming Thau Sheu.** 25, Taiwan, 2004, *Biomaterials*, pp. 2679–2686.
72. *Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity.* **Jianye Zhou, Olaf Fritze, Martina Schleicher, Hans-Peter Wendel, Katja Schenke-Layland, Csaba Harasztosi, Shengshou Hu, Ulrich A. Stock.** Germany. Elsevier, 2010, *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 2549–2554.
73. *Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells.* **Masayasu Ozeki, Yuji Narita, Hideaki Kagami, Naoki Ohmiya, Akihiro Itoh, Yoshiki Hirooka, Yasumasa Niwa, Minoru Ueda, Hidemi Goto.** Wiley Periodicals, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 10, pp. 771-778.
74. **Arias, Enrique Battaner.** *Biomoléculas: Una introducción estructural a la Bioquímica.* España. Ediciones Universidad de Salamanca. 2012. pp. 192-197.
75. *Organ engineering – combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation.* **Sean Vincent Murphy, Anthony Atala.** 2012, *Bioessays*, Vol. 35, pp. 163–172.
76. *Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances.* **Yves Martin, Patrick Vermette.** Elsevier. 2005, Vol. 26, pp. 7481–7503.
77. **Wolfinbarger, Lloyd.** *Bioreactor mediated recellularization of natural and tissue engineered vascular grafts.* US 6,416,995 B1 United States Patent, Julio 9, 2002. Bioreactor.
78. *Principles of bioreactor design for tissue engineering.* **Sarindr Bhumiratana, Jonathan Bernhard, Elisa Cimetta, Gordana Vunjak-Novakovic.** Elsevier, 2014, *Principles of Tissue Engineering*. pp. 261-278.
79. **S. Moreno Gray, J. Bayo Bernal.** *Diseño de biorreactores y enzimología.* Murcia. Servicio de Publicaciones: Universidad de Murcia, 1996.
80. **Kory J. Blose, Jeffrey T. Krawiec, Justin S. Weinbaum, David A. Vorp.** Bioreactors for Tissue Engineering purposes. *Principles of regenerative medicine and cell, tissue, and organ Bioengineering.* Elsevier, 2014, pp. 177-185.
81. **J Dubois, Y Martin, JA Chouinard.** Bioreactors for tissue engineering: design, applications, and monitoring. *Principles of Tissue Engineering.* Elsevier, 2011, pp. 383-399.

82. **Kim E. Barrett, Susan M. Barman, Scott Boitano, Heddwen L. Brooks.** *GANONG, Fisiología Médica Ed. 23.* McGraw-Hill, 2010.

83. *Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies.* **Giuseppe Orlando, Christopher Booth, Zhan Wang, Giorgia Totonelli, Christina L. Ross, Emma Moran, Marcus Salvatori, Panagiotis Maghsoudlou, Mark Turmaine, Ginger Delario, Yousef Al-Shraideh, Umar Farooq, Alan C. Farney, Jeffrey Rogers, Samy S. Iskandar.** 34, Winston Salem : Elsevier, 2013, *Biomaterials*, pp. 5915-5925.

84. *Valoración del flujo sanguíneo portal, en niños sanos, mediante ecografía Doppler duplex.* **A.M. López Barrio, M.A. de Palma Gastón, J. Muñoz Conde.** 1, Sevilla. 1996, *Anuales Españoles de Pediatría*, Vol. 44, pp. 45-49.

85. *Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue.* **Bioengineered Hepatic Tissue, David C. Sullivan, Cynthia Zimmerman, Thomas D. Shupe, Bryon E. Petersen.** 2, Florida : Elsevier, 2013, *The American Journal of Pathology*, Vol. 183, pp. 558–565.

86. *Effects of temperature and relative humidity on fibrillar collagen in parchment: A micro differential scanning calorimetry (micro DSC) study.* **Elena Badea, Giuseppe Della Gatta, Tatiana Usacheva.** Russia : Elsevier, 2011, *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 97, pp. 346-353.

87. *Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy.* **Laurent Bozec, Marianne Odlyha.** Biophysical Society, 2011, *Biophysical Journal*, Vol. 101, pp. 228–236.

88. *Thermal analysis study of human bone.* **L. F. Lozano, M. A. Peña Rico, A. Heredia, J. Ocotlán Flores, A. Gómez CORTÉS, R. Velázquez, I. A. Belío, L. Bucio.** 38, México : Kluwer Academic Publishers, 2003, *Journal of Materials Science*, pp. 4777–4782.

89. *Analysis of the molecular mobility of collagen and elastin in safe, atheromatous and aneurysmal aortas.* **V. Samouillan, J. Dandurand, C. Lacabanne, A. Stella, M. Gargiulo, A. Degani, A. Gandaglia, M. Spina.** France : Elsevier, 2012, *Pathologie Biologie*, Vol. 60, pp. 58–65.

90. *Simultaneous TG/DTG–DSC–FTIR characterization of collagen in inert and oxidative atmospheres.* **Andrei Cucos, Petru Budrugaec.** Hungary : Springer, 2014, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 11, pp. 2079–2087.

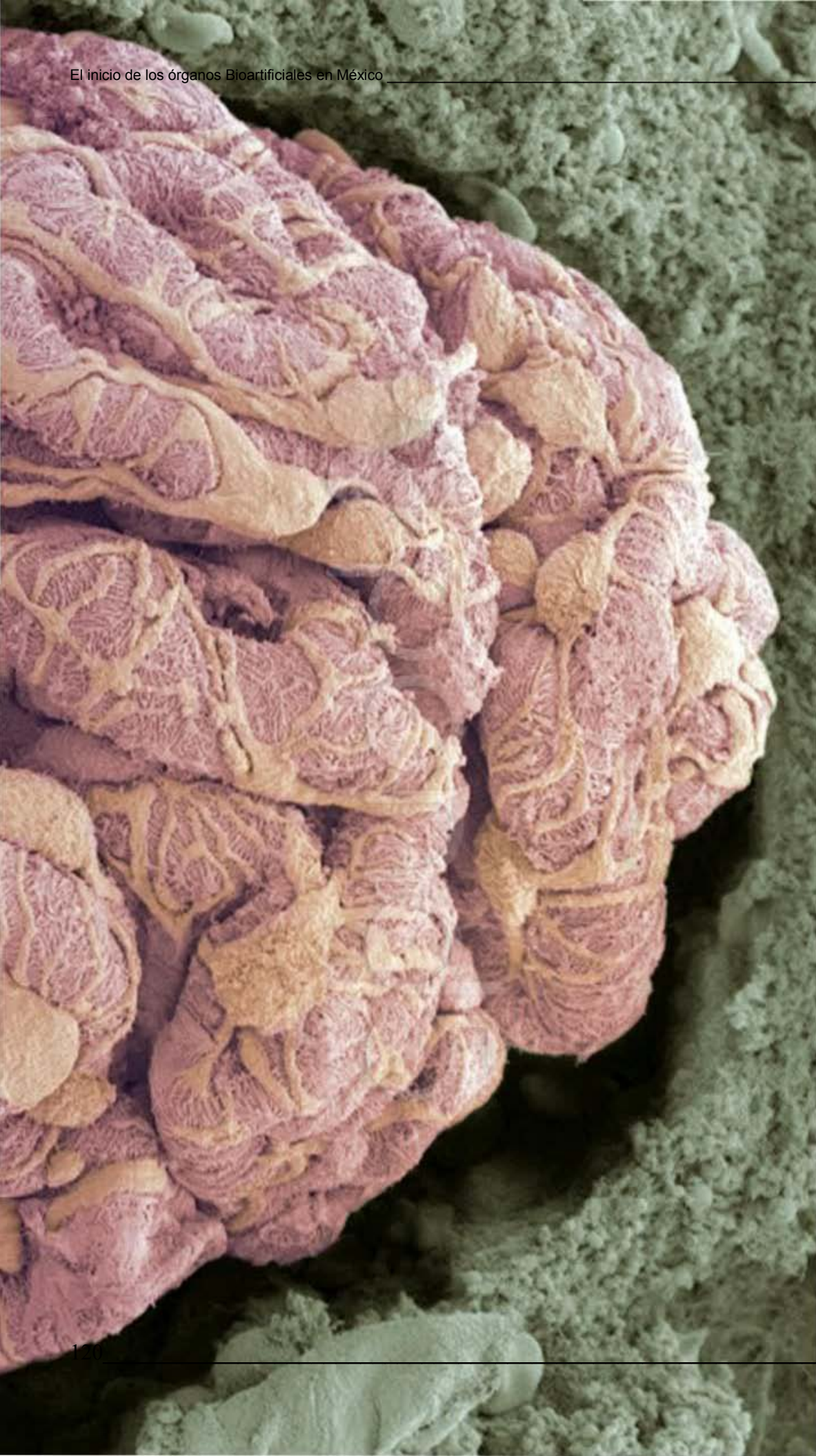
91. *Collagen type I amide I band infrared spectroscopy.* **Benedicto de Campos Vidal, Maria Luiza S. Mello.** Campinas : Elsevier, 2011, *Micron*, Vol. 42, pp. 283–289.

92. *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*).* **J.H. Muyonga, C.G.B. Cole, K.G. Duodu.** Elsevier, 2004, *Food Chemistry*, Vol. 86, pp. 325–332.

93. *FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde.* **Myung Chul Chang, Junzo Tanaka.** Korea : Elsevier, 2002, *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 4811–4818.

94. *Infrared spectroscopy of proteins.* **Barth, Andreas.** 1767, Sweden : Elsevier, 2007, *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 1073–1101.

95. **Elkins, Kelly M.** Determination of DNA Quality and Quantity Using UV-Vis Spectroscopy. *Forensic DNA Biology: A Laboratory Manual*. Elsevier, 2013, pp. 59–62.
96. **Alastair Aitken, Michèle P. Learmonth.** Protein Determination by UV Absorption. J. M. Walker. *The Protein Protocols Handbook*. Totowa, : Humana Press.
97. *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.* **Lowry O. H, Rosebrough N. J, Farr A. L, Randall R.J.** 1951, Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, pp. 265-275.
98. *Catálogo.* **BIO-RAD.** 2004-2005, p. 38.
99. *Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant.* **Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang R-R, Ueno Y, Zheng Y-W, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H.** 2013, Nature, pp. 481–484.
100. *Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds.* **Badylak SF, Taylor D, Uygun K.** 2011, Annual Review of Biomedical Engineering, pp. 27–53.
101. **Ralph Kafesjian, Myron Howanec J R.** *Supercritical Fluid Extraction Process For Tissue preparation.* US 2003/0072677 A1 United States, Octubre 17, 2001.
102. *Towards the creation of decellularized organ constructs using irreversible electroporation and active mechanical perfusion.* **Michael B Sano, Robert E Neal, Paulo A Garcia, David Gerber, John Robertson, Rafael V Davalos.** 83, Virginia : BioMed Central, 2010, BioMedical Engineering OnLine, Vol. 9, pp. 1-16.
103. *The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells.* **Flynn, L.E.** Elsevier, 2010, Biomaterials, Vol. 31, pp. 4715-4724.
104. *Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro.* **Max S. Wicha, George Lowrie, Elise Kohn, P. BagavandoSS, Thomas Mahn.** 1982, Proceedings of the National Academy of Sciences: Cell Biology, Vol. 79, pp. 3213
105. *Decellularization and cell seeding of whole liver biologic scaffolds composed of extracellular matrix.* **Denver M. Faulk, Justin D. Wildemann, Stephen F. Badylak.** Pittsburgh : INASL, 2014, Journal of Clinical and Experimental Hepatology, pp. 1-12.



APÉNDICE A

PROCURACIÓN DE ÓRGANOS CON FINES DE INGENIERÍA DE TEJIDOS Y MEDICINA REGENERATIVA

León Mancilla B¹, Piña Barba C², Martínez Hernández H²

¹ Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UNAM

² Laboratorio de Biomateriales, Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

INTRODUCCIÓN

Los trasplantes de órganos se han documentado desde hace mucho tiempo, pero en gran parte sólo tienen interés histórico. El campo moderno de los trasplantes no se inició sino hasta la última mitad del siglo XX. De un procedimiento experimental efectuado hace aproximadamente 50 años, el trasplante evolucionó hasta constituirse como el tratamiento de elección de la insuficiencia orgánica de etapa final consecutiva a una gran variedad de causas. En la actualidad, el trasplante de riñón, hígado, páncreas, corazón y pulmones es común en todo el mundo. (Schwartz. Brunicardi FC. Principio de cirugía. México D.F.: Mc GrawHill. 9ª. ed. 2011)

Hoy en día el trasplante se acepta de modo amplio y tiene tal éxito que el principal problema que afronta este campo en la actualidad no es la técnica quirúrgica, el rechazo o el tratamiento de complicaciones, sino más bien el abastecimiento de órganos.

El avance de la ciencia y la tecnología en el área médica ha permitido que la esperanza de vida aumente de manera importante en los últimos 30 años. Sin embargo, la enfermedad crónica degenerativa, como la insuficiencia cardíaca, hepática o renal ha aumentado de forma significativa. Los tratamientos terapéuticos actuales implican el trasplante de órganos de donador vivo relacionado o de cadáver, pero la cantidad de pacientes en espera de un trasplante es mayor que la cantidad de órganos disponibles para ser trasplantados, un ejemplo de ello es la segmentación del tejido hepático, con la finalidad de beneficiar a un mayor número de pacientes.

El trasplante es el acto de transferir un órgano, tejido o células de un sitio a otro. Los trasplantes se dividen en tres categorías con base en la similitud del donador y del receptor: autotrasplante, alotrasplante y xenotrasplante. Los autotrasplantes comprenden la transferencia de tejido u órgano de una parte de una persona a otra del mismo individuo. Son el tipo más común de trasplantes e incluyen injertos de piel, injertos venosos para derivaciones, injertos óseos y de cartílago e injertos neurales. Dado que el donador y el receptor son la misma persona y no existe disparidad inmunológica, no se requiere inmunosupresión.

Los alotrasplantes incluyen la transferencia de órganos o tejidos de un individuo a otro diferente de la misma especie, la circunstancia más común en la mayor parte de los trasplantes de órganos sólidos que se practican en la actualidad. Los receptores de aloinjertos requieren inmunodepresión para evitar el rechazo. Los xenotrasplantes consisten en la transferencia a través de barrera de especie. Hoy en día los xenotrasplantes se relegan en gran parte al laboratorio, si se toman en cuenta las barreras inmunitarias potentes y complejas para tener éxito.

Algo de historia de los trasplantes: Alotrasplantes, Autotrasplantes, Xenotrasplantes (Swartz)

La escases de órganos por la falta de cultura de donación, así como los trámites sanitarios que implican una serie de procedimientos legales y médicos, y la falta de infraestructura hospitalaria y personal calificado para la toma y preservación de órganos, imposibilitan los alotrasplantes en México. Los animales empleados para la obtención de órganos deben contar con un estado de salud aceptable que permita garantizar la calidad de los órganos procurados y tratados.

ANTECEDENTES

La ciencia de los biomateriales ha tenido grandes avances en la obtención de andamos 3D por diferentes técnicas como las bioespumas, electrohilado, gel casting, liofilización, prototipado rápido, entre otras, que imitan la estructura de un órgano y son fabricados con biomateriales activos o reabsorbibles. Estos andamios tratan de imitar a la matriz extracelular (MEC) que es secretada por las células y ha mostrado contener señales que afectan la migración celular, proliferación y diferenciación, pero actualmente no es posible sintetizar MEC en el laboratorio debido a la gran complejidad en su composición, la organización 3D y la falta de caracterización ya que la MEC de cada órgano y tejido es diferente.

Existen los andamios biológicos derivados de MEC, son usados en cirugía reconstructiva y medicina regenerativa para reemplazo de tejidos y órganos, estos andamios son obtenidos por una novedosa técnica llamada descelularización, la cual preserva la estructura y composición de la MEC durante el proceso de descelularización. La obtención de tejidos descelularizados se puede lograr con diferentes métodos como producir un gradiente de presión con disoluciones enzimáticas, inducir un fluido supercrítico de dióxido de carbono, la inmersión y agitación en disoluciones detergentes, y por otra parte, la perfusión de varios agentes químicos a través del lecho vascular permite obtener un andamio biológico 3D de MEC para un órgano completo.

La complejidad y la duración del protocolo de descelularización está relacionado con el grado de conservación estructural y biológico requerido para su posterior uso, especialmente para tejidos compuestos y órganos. Esto es importante ya que, cualquier agente o método causará daños en la composición y estructura de la MEC, es deseable la minimización de estos efectos, ya que evitarlo por completo aún no es posible. (Song)

Tabla 1. Antecedentes del uso de biomateriales en combinación con células u órganos descelularizados

TIME	HEART	Refs.	LUNG	Refs.	KIDNEY	Refs.	PANCREAS	Refs.
1800							1894: Xenogenic tissue extracts treat diabetes	
1950	1959: <i>In vitro</i> cardiomyocyte aggregates	[33]						
1970			1976: <i>In vitro</i> culture of alveolar-like, surfactant producing pneumocytes	[53]				
1980							1980: Microencapsulated islets corrected diabetic state in rats	[74]
			1983: <i>Ex vivo</i> culture of whole lung					
1990	1988: Mechanical stretch mediated improved cardiomyocyte orientation	[35]	1986: <i>In vitro</i> differentiation of type II pneumocytes into type I pneumocytes	[55]	1987: BAK Concept Pioneered	[66]		
	1997: <i>In vitro</i> force generating cardiomyocytes	[37]			1996: <i>In vitro</i> tubulogenesis of adult renal proximal tubule cells	[63]		
2000			2001: Disease specific bronchial mucosa generated <i>in vitro</i>	[56]	1999: BAK replace physiologic renal tubule function in uremic dogs	[67]		
	2002: Adult-like myocardium with electrophysiologic & pharmacologic properties		2004: Lung-blood barrier generated <i>in vitro</i>	[57]	2004: Multi-center, randomized, controlled clinical trial of BAK.	[68]	2003: Intraperitoneal growth, development, and differentiation of rat pancreatic anlagen	
	2004: Conductive myocardium with improved electrical physiology	[38]			2005: Multi-center, randomized, controlled clinical trial of BAK.	[68]	2005: Biodegradable scaffolds improve transplant islet survivorship <i>in vivo</i>	
	2005: Re-engineered myocardium improve function <i>in vivo</i>	[39]	2006: <i>In vivo</i> pulmonary tissue angiogenesis	[58]				
	2006: Channel matrices & oxygen carriers increase re-engineered myocardial tissue density	[40]			2007: <i>In vitro</i> differentiation of Wolffian Duct & metanephric mesenchyme		2007: Collagen IV & Laminin coated hydrogel encapsulation improve islet function	[75]
	2008: Rudimentary Pump-functioning bioartificial heart generated basedk upon perfusion-decellularized matrix	[44]	2008: <i>In vitro</i> pulmonary tissue formation				2008: Reprogramming of adult pancreatic exocrine cells into beta cells	
			2008: Successful transplantation of reseeded decellularized trachea in a human	[62]				
			2009: Bioartificial regenerated lung facilitate gas exchange <i>in vivo</i> when orthotopically transplanted	[60, 61]			2009: Islet chamber prevascularization improve survivorship & function	
							2010: Cytokine protective encapsulation of islet cells	
							2010: Bioartificial endocrine pancreas reverse diabetic state	[76]

OBJETIVO

Establecer los requerimientos necesarios para la toma de órganos animales (corazón, pulmón, tráquea, hígado, riñones y vejiga) para realizar tratamiento de descelularización y su posterior caracterización física, química y biológica que permita determinar las características de los órganos (andamios) después del tratamiento de descelularización.

JUSTIFICACIÓN

Es necesario contar con alternativas terapéuticas que permitan disminuir la escasez de órganos en pacientes con falla orgánica terminal a través de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa que pueda resolver el problema a través de un trasplante.

Por lo que es necesario, establecer los procedimientos necesarios para la toma y conservación de órganos animales de buena calidad, para ser tratados con disoluciones detergentes para su descelularización y que permita en un futuro ser empleado en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa; así como sentar las bases para la descelularización de órganos humanos.

INFRAESTRUCTURA

Estructura Física

La toma de órganos se realiza en quirófano con las medidas asépticas necesarias, así como el uso de ropa quirúrgica e instrumental quirúrgico estéril. El quirófano contiene equipo biomédico (monitor de signos vitales y saturación de oxígeno, ventilador automático, tanques de oxígeno, electro-bisturí, entro otros equipos) además de mobiliario como mesa quirúrgica, mesa de Pasteur, mesa de riñón, cubetas metálicas, tripie, contenedores de residuos RPBI, entro otros.



Mobiliario quirúrgico. Fuente directa

Recursos Humanos

Actualmente los grupos de investigación son multidisciplinarios, formados por personal médico, médico veterinario, enfermería, químicos, ingeniería biomédica, lo cual enriquece cada una de las actividades realizadas. Para la toma de órganos participa el cirujano, el primer y segundo ayudante del cirujano, el anesthesiólogo, la enfermera instrumentista, enfermera circulante e ingeniero biomédico.

Recursos Materiales Instrumental quirúrgico

- Pinza de anillos (1 pieza)
- Pinzas de campo (6 piezas)
- Pinzas Kelly (12 piezas)
- Pinzas mosco (6 piezas)
- Pinzas Allis (4 piezas)
- Pinzas Babcock (2 piezas)
- Portagujas (2 piezas)
- Pinza Kantrovich (2 piezas)
- Tijeras Mayo (1 recta y 1 curva)
- Tijera Metzemaum (1 pieza)
- Mango de bisturí No. 4 (1 pieza)
- Mango bisturí No. 3 (1 pieza)
- Cánula Yankauer (1 pieza)
- Pinza de disección Adson con dientes (2 piezas)
- Pinza de disección Adson sin dientes (2 piezas)
- Separador maleable (2 piezas)
- Separador automático (1 pieza)



Bulto quirúrgico

- 4 campos
- 1 sabana de pie,
- 1 sabana riñón, campo doble para envoltura
- 1 sabana hendida
- 4 batas quirúrgicas
- 4 toallas para manos



Recursos Biológicos

Modelo Animal: Cerdo

El animal deberá ser obtenido de una granja que cumpla con los requisitos mínimos de buenas prácticas de producción porcina; dentro de la cual se realiza medicina preventiva (esquema de vacunación -salmonella y leptospira-, aplicación de He, descolmillado, descolado, entre otros procedimientos médico veterinarios) además de proporcionarles alimento balanceado de acuerdo a su etapa de crecimiento, aportando los nutrientes necesarios.

El peso ideal de los lechones utilizados es de 15 a 20 kg, sexo indistinto.

El examen físico, clínico y de laboratorio debe incluir, la inspección de orificios naturales, la auscultación de cavidad torácica (ruidos cardiacos y pulmonares) así como cavidad abdominal (ruidos intestinales), toma de muestra sanguínea para la realización de Biometría Hemática (BH), Química Sanguínea (QS) y pruebas de funcionamiento hepático (PFH). Se anexa tabla de valores normales en el cerdo.

Los lechones empleados para la toma de órganos deberán permanecer mínimo siete días antes del procedimiento quirúrgico, con la finalidad de vigilar su estado de salud; en caso de enfermar el animal, no se utilizará para los fines propuestos.

Solución Preservadora

Para el primer lavado se utiliza solución salina fisiológica fría heparinizada a 4°C; por cada gramo de órgano (peso húmedo) se emplean 50 U de Heparina/5 ml de SSF al 9%.

Para el segundo lavado, se utilizará SSF adicionada con antibióticos y antimicóticos que evite la contaminación del órgano; empleando anfotericina B (0.0625 µg, estreptomycin 25 µg y penicilina 25 U) en 10 ml de SSF

Posteriormente pasa a un bioreactor para la descclularización, punto que no será tratado en este reporte técnico.

METODOLOGÍA

Descripción de la toma y preservación de órganos

Procedimiento anestésico

Previo a la toma de órganos, se indica ayuno de alimento de 8 horas, dejando suministro de agua *ad libitum*, posteriormente se administrará azaperona (Sural) 20 mg/kg IM, como sedante y sulfato de atropina 1mg IM como protector vagal y antisialogogo, previniendo la obstrucción de la vía aérea. Para contar con una vía venosa permeable para la administración de fármacos y disoluciones se canaliza la vena marginal de la oreja (derecha o izquierda) con un catéter corto 20 Fr conectado a un equipo de venoclisis. Se indica solución glucosa al 5% (20-25 gotas/min). Como anestésico general se emplea pentobarbital sódico a una dosis de 80 mg/kg vía IV.

Se coloca cánula endotraqueal de 6-6.5Fr, se insufla globo y se fija con tela adhesiva al morro, posteriormente se conecta a un ventilador automático y se administra 5L/min de oxígeno. Este procedimiento es de suma importancia para que los tejidos se encuentren bien perfundidos y no sufran daño por hipoxia.

Se coloca sonda gastrointestinal tipo Levin de 16 FR (125 cm de longitud y diámetro de 5.28 mm)

Procedimiento quirúrgico.

Posición quirúrgica del animal: se coloca en cúbito dorsal, con las extremidades anteriores y posteriores atadas a la mesa quirúrgica, se realiza asepsia y antisepsia de la región toraco-abdominal con isodine solución. Posteriormente se colocan los campos quirúrgicos y pinzas de campo sobre el área quirúrgica cubriendo tórax y abdomen, al final se coloca la sabana hendida.



Intubación del animal. Fuente directa.

Abordaje quirúrgico: se realiza incisión de la piel por planos hasta llegar a la cavidad abdominal, del apéndice xifoides hasta la sínfisis de pubis, se coloca separador automático de Badford, el cual permite una mejor visualización de las estructuras abdominales. Primero se realiza la disección de hígado, posteriormente se realiza disección de la aorta abdominal y del hilio renal derecho e izquierdo. Ningún órgano se extirpa hasta que todos los órganos estén perfectamente disecados, así como arterias y venas se encuentren referenciados con el uso de seda libre 4-0.



Posición del animal. Fuente directa.



Aplicación de isodine solución sobre la región quirúrgica. Fuente directa.

ÓRGANOS TORÁCICOS

Corazón-Tráquea-Pulmones

Anatomía: La cavidad torácica alberga y protege los pulmones y el corazón como principales representantes de los aparatos respiratorio y circulatorio. Así mismo, sirve de tránsito a estructuras vasculares, linfáticas, nerviosas, esófago y tráquea a través del espacio mediastínico que se topografía entre ambas cavidades pleurales. La tráquea es un tubo membranoso, flexible y cartilaginoso que se extiende desde la laringe, a nivel de las vértebras C4-C5 hasta el nivel de la T5, donde se bifurca en los bronquios principales izquierdo y derecho, dorsalmente a la base del corazón.

Sobre el lado derecho y a nivel del tercer espacio intercostal proporciona un bronquio para el lóbulo craneal del pulmón derecho (bronquio traqueal). El pericardio envuelve el corazón y se une al esternón mediante el ligamento esternopericárdico desde la 3ª costilla hasta el cartílago xifoides del esternón y porción esternal del diafragma. El pericardio contacta extensamente con la pared torácica lateral izquierda a partir del segundo espacio intercostal hasta la 5ª costilla.

Los pulmones derecho e izquierdo ocupan la mayor parte de la cavidad torácica, quedando entre ambos los órganos mediastínicos. El pulmón derecho está subdividido por cisuras en cuatro lóbulos: craneal (apical), medio (cardíaco), caudal (diafragmático) y accesorio (intermedio). El pulmón izquierdo está subdividido en dos lóbulos: craneal (porciones craneal y caudal) y caudal.

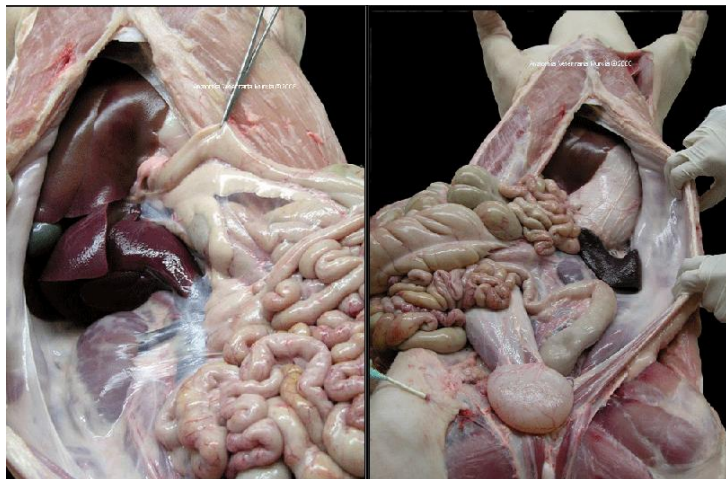
Abordaje Quirúrgico: La cavidad torácica se abre posterior a la disección de los órganos abdominales. Se realiza incisión de la piel, músculo y se desarticula el esternón de las carrillas articulares de las costillas (ya sea derecha o izquierda), se desarticula todo el esternón, desde la quilla hasta la apéndice xifoides. Una vez abierta la cavidad torácica, se identifica el corazón y saco pericárdico, así como los pulmones (derecho e izquierdo).

ÓRGANOS ABDOMINALES

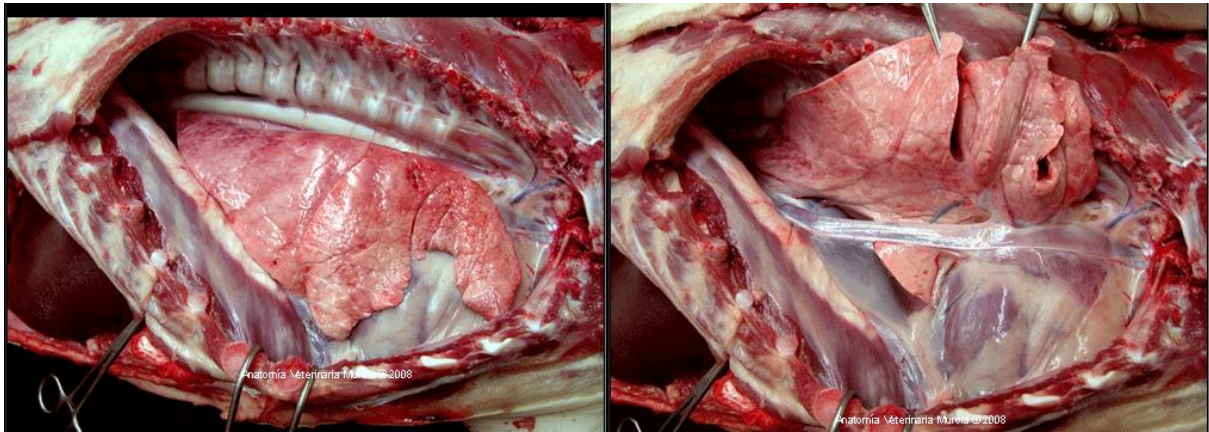
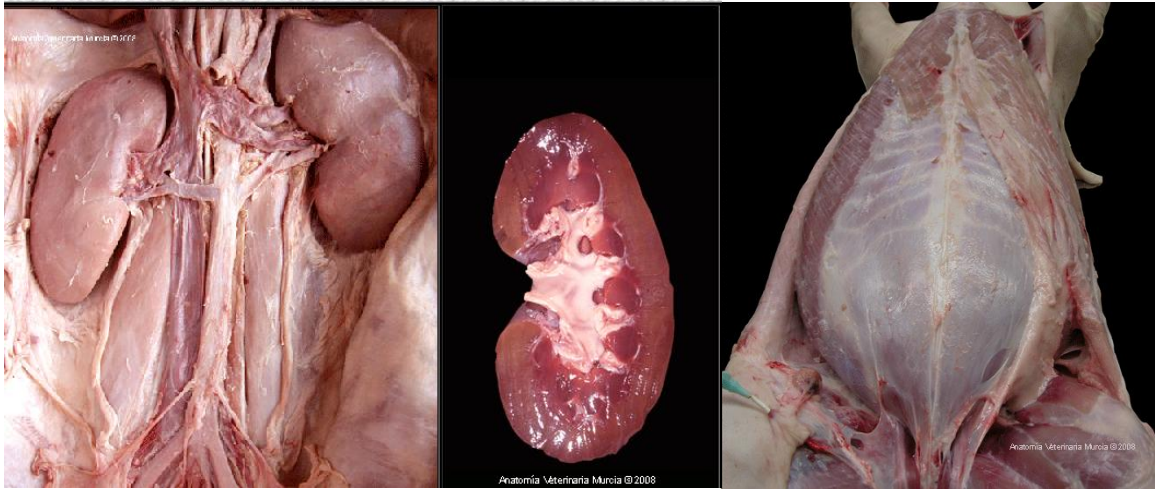
Hígado-Riñones-Vejiga

Anatomía: El abdomen del cerdo se continúa exteriormente, de manera casi imperceptible, con la porción ósea del tórax hasta la pelvis, por lo que el tronco tiene una forma prácticamente cilíndrica en esta especie.

Dissección hepática: este órgano se encuentra en el epicondrío derecho, y su principal sujeción se realiza por el ligamento hepático o cuadrado, el cual lo fija a la pared abdominal. Se libera cortando el ligamento y disecando la vena cava anterior y posterior, así como la arteria hepática.



Dissección renal: son órganos pares retroperitoneales, cubierto por la cápsula renal, el hilo renal se identifica debido a que es el sitio anatómico donde penetra la arteria renal (origen aórtico) y sale la vena renal que se conecta con la vena cava posterior y el uréter que se comunica con la vejiga. La arteria renal principal puede tener una o dos arterias renales accesorias por lo que se debe tener cuidado al momento de la dissección el hilo renal.



Disección de vejiga con uréteres:



GLOSARIO

Donación: acto altruista y gratuito por el cual se ceden órganos y tejidos para fines terapéuticos.

Eficiencia: característica que permite optimizar los recursos para alcanzar el objetivo planeado.

Embalar e identificar órganos y tejidos: Depositar los órganos y tejidos en medios especiales de preservación y resguardo (hieleras y frascos) para su transporte. Etiquetar los depósitos en los que colocaron los órganos y tejidos con datos suficientes que permitan clarificar el tipo de órgano que contienen, la fecha y hora de extracción, iniciales y edad del donante como mínimo pero se sugiere además tipo sanguíneo, institución en la que se extrajo, hora de pinzamiento, responsable del traslado y destino.

Órgano: Entidad morfológica compuesta por la agrupación de tejidos diferentes que concurren al desempeño de los mismos trabajos fisiológicos. Ley General de Salud.

Preservar: Limpiar los órganos y tejidos y embeberlos en disoluciones especiales (denominadas de preservación) a una temperatura de cuatro grados que le permiten al órgano y tejido disminuir su metabolismo y no generar daño en las estructuras.

Extracción. Proceso quirúrgico mediante el cual se obtienen órganos o tejidos con fines terapéuticos.

VALORES NORMALES DE LABORATORIO CLÍNICO

Biometría Hemática	Valores Normales
Hb	10 a 16
Hto	32 - 50
Eritrocitos	5 a 8
Plaquetas	300 - 700
Leucocitos	11,000 - 22, 000
Neutrófilos	28 - 47
Linfocitos	39 - 62
Monocitos	2 a 10
Eosinófilos	0.5 a 11
Basófilos	0 a 2
Creatinina	2
Glucosa	60 - 140

QUÍMICA SANGUÍNEA

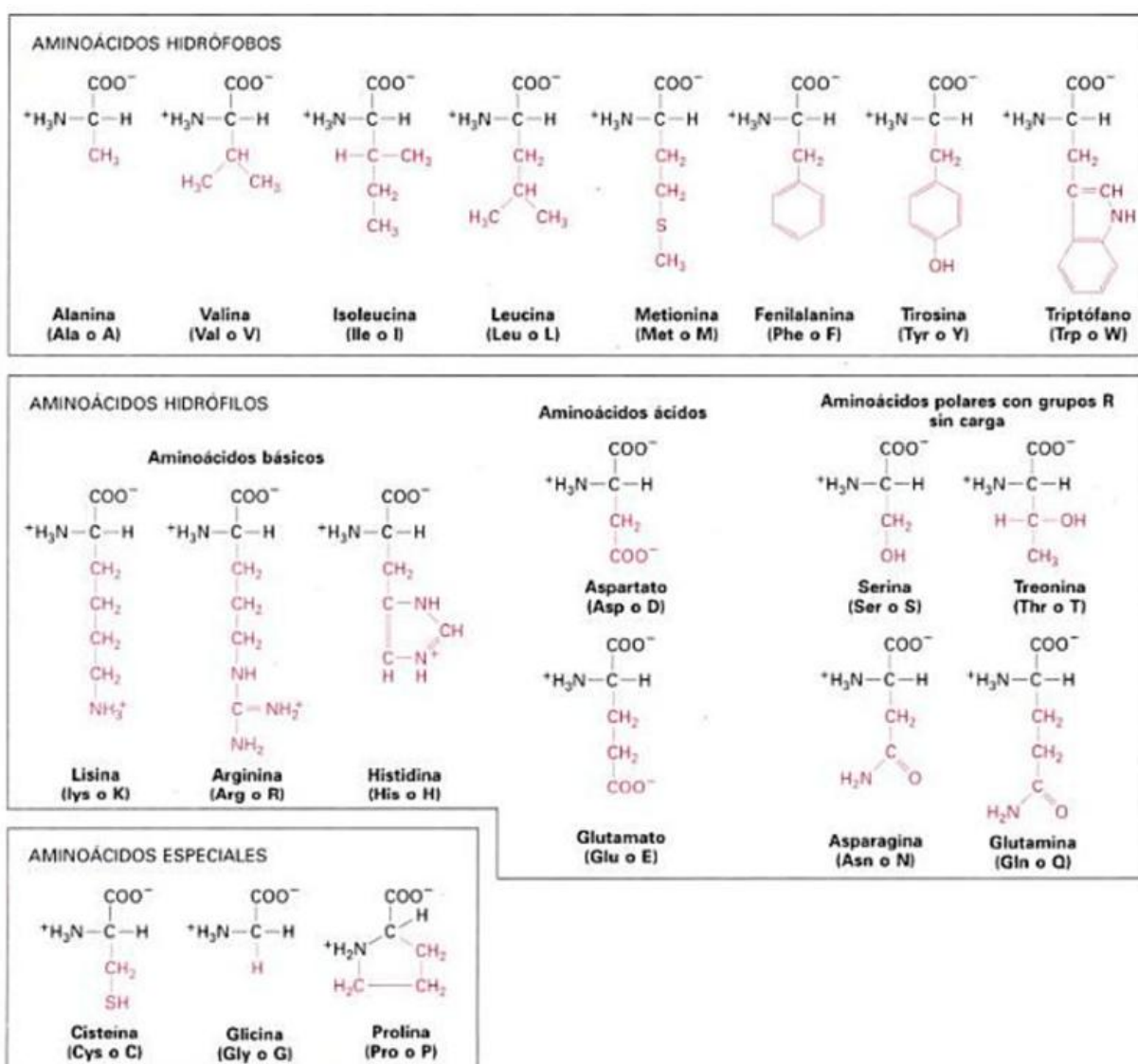
PFH	Valores Normales
Bilirubina total	0.1 a 1
Bilirubina indirecta	0 a 0.9
Bilirubina directa	0 a 0.1
Fosfatasa alcalina	50 a 100

BIBLIOGRAFÍA.

1. Manual de proceso de Procuración, Donación y Trasplante de órganos y Tejidos con fines terapéuticos. Gobierno del Estado de Jalisco. Consejo Estatal de Trasplantes de órganos y Tejidos.
2. www.cenatra.gob.mx
3. <http://mx.prvademecum.com/producto.php?producto=13647>
4. Gil CF, Ramírez ZG, Ayala FM, López AO. Anatomía interactiva del cerdo. www.um.es/anatvet/anatomia. Universidad de Murcia, España
5. Song JJ, tt HC. Organ engineering base on decellularized matrix scaffolds. Trends in Molecular Medicine. 2011; 17 (8): 424-432

APÉNDICE B

Los 20 aminoácidos comunes que constituyen las proteínas. Las cadenas laterales (grupo R; rojo) determinan las propiedades características de cada aminoácido y son la base para agrupar los aminoácidos en tres categorías principales: hidrófobos, hidrófilos y especiales. Se muestran las formas ionizadas que existen a pH (=7) en el citosol. Entre paréntesis se presentan las abreviaturas de tres letras y de una letra para cada aminoácido.



APÉNDICE C

ESTERILIZACIÓN DE DISOLUCIONES

- Colocar agua desionizada en la autoclave hasta el nivel requerido.
- Colocar 700 mL de las disoluciones en frascos de 1000 mL, sin cerrar completamente, colocar un gorro de papel estraza sujetado con cinta de enmascarar.
- Colocar los frascos en la autoclave, cerrar los seguros, abrir la válvula de escape de vapor y encender. El foco rojo se encenderá al estar la resistencia prendida.
 - Colocar la parilla en MAX por aproximadamente 14 minutos.
 - Transcurrido los 14 minutos, cerrar la válvula de escape de vapor y dejar que la presión suba a 15 psi, aproximadamente 10 minutos.
 - Una vez llegada a la presión requerida mover la perilla de encendido en MIN y mantener por 15 minutos.
 - Transcurridos los 15 minutos, colocar la parilla en DESL (APAGADO), y esperar a que baje la presión para poder abrir la válvula de escape de vapor.
- Abrir la tapa de la autoclave y sacar la canastilla para favorecer el descenso de temperatura de las disoluciones.