



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento de la matriz extracelular de hígado de
cerdo para su uso en el cultivo de hepatocitos
primarios de rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G A
P R E S E N T A:**

Paula Zepeda Gutiérrez



DIRECTOR DE TESIS:

M en C Isidoro Aczel Sánchez Cedillo

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



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.

Agradecimientos

A mi madre por inculcarme siempre que el estudio es lo más importante, por haberme apoyado para estudiar la carrera que mejor me pareciera, ir por mí a la Facultad en las noches de lluvia. A mi única hermana por hacerme compañía, ver películas conmigo e ir al gimnasio, aunque que no quiera. A mi abuelo por llevarme a la escuela por la mañana y a mi abuela por siempre tener comida para mi.

A mi novio Omar por apoyarme siempre y a mis amigos por escucharme, acompañarme y divertirme juntos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme una formación académica de calidad durante estos años, por haberme otorgado una beca de intercambio y por convertirse en mi segunda casa.

Al Dr. Aczel Sánchez por su confianza y su apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Juan Suárez del Hospital 20 de noviembre por haberme permitido integrarme a su equipo de trabajo, por orientarme en mis momentos de duda y por tener siempre la disposición de ayudar y trabajar. A Alex, Lalo y Diana por su paciencia al enseñarme nuevas técnicas, por su amabilidad y por brindarme su amistad.

A la Dra. Marina Macías y a Marcela Sosa del Instituto de Fisiología Celular por su guía y apoyo en el trabajo con hepatocitos.

Al Dr. Aureliano Placido del Hospital 20 de noviembre por su apoyo con los cortes histológicos y sus consejos para trabajar con ellos.

Indice

Resumen	2
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Generalidades del Hígado.....	3
Hepatocitos.....	5
Células endoteliales del sinusoide	5
Células de Kupffer	5
Células estrelladas	6
Matriz extracelular.....	6
Colágena	9
Laminina.....	10
Fibronectina	11
Antecedentes.....	13
Aislamiento de matriz extracelular.....	13
Cultivo de hepatocitos en matriz.....	15
Planteamiento del Problema	16
Objetivos.....	17
Hipótesis	17
Método	18
Aislamiento de Matriz Extracelular.....	18
Inmunohistoquímica	18
Tinciones de Masson y Hematoxilina & Eosina	19
Aislamiento de hepatocitos de rata.....	21
Cultivo de hepatocitos primarios sobre matriz extracelular	22
Resultados.....	24
Discusión	33
Conclusión.....	35
Bibliografía.....	36
Anexo	42

Resumen

Los cultivos de hepatocitos primarios son una herramienta útil en el estudio de metabolismo de fármacos, daños hepático, entre otros, sin embargo presentan la dificultad de que *in vitro* pierden estas características en un corto plazo. Diversos investigadores han utilizado la matriz extracelular para complementar los cultivos o bien cómo andamio de las células para mimetizar el microambiente natural de los hepatocitos y así prolongar su uso en la investigación. El objetivo de este trabajo es plantear un método de aislamiento de la matriz extracelular de muestras de tejido hepático que conserve las principales proteínas: colágena, laminina y fibronectina; y utilizar la matriz resultante en el cultivo de hepatocitos primarios evaluando la viabilidad de los mismos.

Abstract

The culture of primary hepatocytes is a useful tool for the study of hepatic functions such as drug metabolism or hepatic injury but has resulted difficult since the hepatocytes lose these characteristics *in vitro*. Several scientists have utilized the extracellular matrix to mimic the natural microenvironment of the cells thus keeping the functionality of the cells. The aim of this project is to present a method to isolate the extracellular matrix of samples of hepatic tissue that preserves the main proteins: collagen, laminin and fibronectin, and subsequently use it in the culture of primary hepatocytes.

Introducción

Generalidades del Hígado

El hígado es uno de los órganos más grandes del sistema digestivo, está localizado en el hipocondrio derecho de la región abdominal y en humanos se encuentra dividido en dos lóbulos por el ligamento falciforme, el derecho que es de mayor tamaño, el izquierdo, y otros dos más pequeños, el cuadrado y el caudado. El tejido está organizado en lobulillos, subunidades de forma hexagonal donde los hepatocitos se distribuyen de forma radiada en torno a una vena central. En el exterior el órgano se encuentra la cápsula de Glisson, una capa de tejido conjuntivo fibroso que encarga de recubrir al órgano y delimitar a los lobulillos hepáticos (Tortora, 2012).

El hígado está compuesto por diferentes células: de Kupffer, estrelladas, endoteliales y hepatocitos; estos últimos son las principales células del hígado, ocupando un 80% del volumen total del órgano y confiriéndole así sus funciones principales:

1. síntesis de proteínas que forman parte del sistema de coagulación, como trombina y protrombina.
2. síntesis de urea a partir de iones de amonio derivados del metabolismo de las proteínas.
3. almacenamiento de glucógeno, hierro y cobre, así como de las vitaminas A, D, E y K.
4. participa en la síntesis y conversión de aminoácidos no esenciales.
5. producción de sales biliar involucradas en el metabolismo de las grasas.
6. conversión del glucógeno y grasa a glucosa y viceversa (Rizzo, 2010).
7. metaboliza xenobióticos y los modifica en metabolitos no tóxicos (Usta et al., 2015).

Para que los hepatocitos puedan llevar a cabo estas funciones metabólicas es necesario que exista un intercambio entre los nutrientes contenidos en la sangre (hormonas, factores de crecimiento, oxígeno, etc.) y los metabolitos producidos por ellos, esto se logra gracias a la estructura anatómica llamada “triada portal” formada por una vena, una arteria y un canalículo biliar, representado en la Ilustración 1 (Usta et al., 2015).

La arteria hepática y la vena porta son vasos contiguos que se ramifican en pequeños vasos para perfundir sangre a todas las células que conforman al hígado; la sangre oxigenada proveniente del corazón llega a los hepatocitos a través de la arteria hepática, mientras que la sangre proveniente

de la vena portal, que constituye cerca del 80% de la sangre total que baña a los hepatocitos, ha sido enriquecida en el tracto gastrointestinal con nutrientes, hormonas y algunas toxinas, sin embargo al ser sangre venosa está libre de oxígeno (Rodes, *et al.*, 2007), ésta sangre es eventualmente colectada por la vena central para regresar a la circulación sistémica. La sangre proveniente de la triada portal se mezcla en los sinusoides hepáticos, capilares que están rodeados por hepatocitos, y es en el espacio de Disse donde ocurre el intercambio metabólico entre los hepatocitos y la sangre. Una consecuencia importante de esta anatomía es que se crea un gradiente de nutrientes y oxígeno entre la triada portal y la vena central lo que origina zonas dentro del lobulillo hepático (Usta et al., 2015).

Los canalículos biliares son los encargados de colectar la bilis e impedir que se mezcle con la sangre. La bilis es uno de los productos más importantes de los hepatocitos, ya que una vez colectada es depositada en la vesícula biliar, donde aguarda a ser excretada al intestino delgado durante el proceso de la digestión.

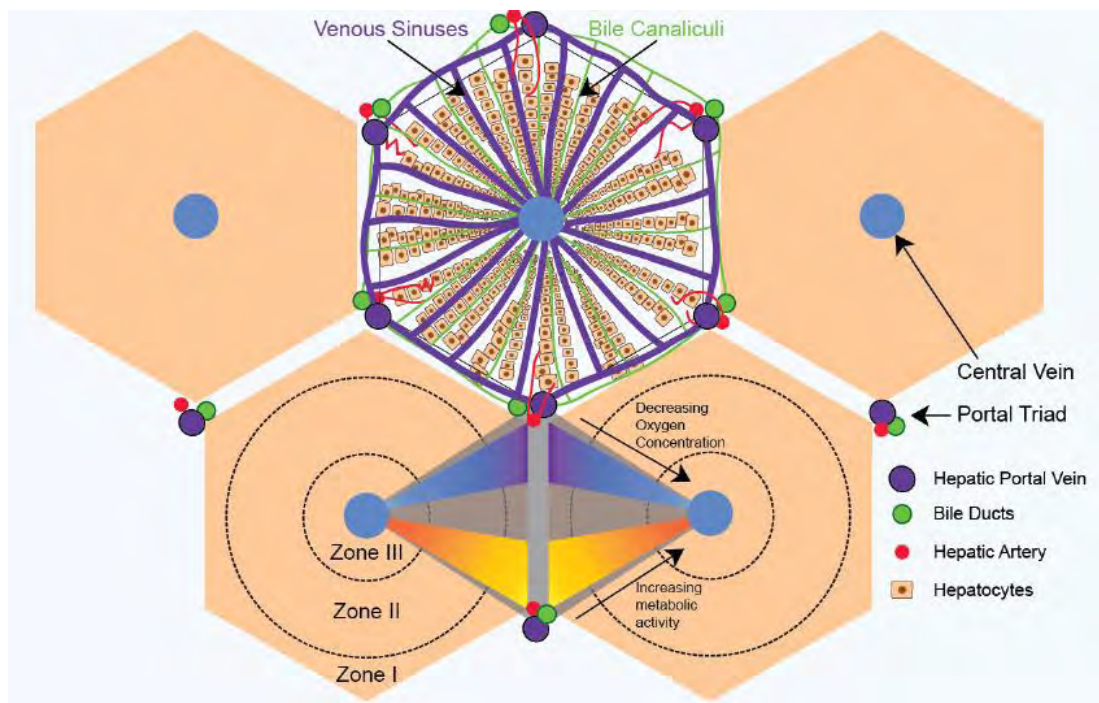


Figura 1. *Esquema de la microestructura del hígado.* Se observa como está conformado el lobulillo hepático. En el centro del hexágono observamos la vena central encargada de recolectar la sangre que baña a los hepatocitos mientras que en cada una de las esquinas encontramos a la triada portal. Esto genera un gradiente de oxígeno, nutrientes y toxinas, que tiene consecuencias en la función especializada de los hepatocitos a lo largo del lobulillo. Tomada de (Usta et al., 2015)

Hepatocitos

Las funciones que llevan a cabo los hepatocitos son sumamente importantes: metabolismo de fármacos, síntesis y secreción de proteínas (especialmente la albúmina), urea, bilis, entre otras (Usta et al., 2015). Para poder realizar estas funciones los hepatocitos poseen una polaridad única en la que una parte de su membrana forma una membrana basal que encara a las células endoteliales separando el flujo sanguíneo sinusoidal mientras que uno o más de los polos apicales contribuyen a la formación del canalículo biliar. El establecimiento de la polaridad es esencial para la funcionalidad del hepatocito y depende de la interacción de un conjunto de factores como las moléculas de adhesión, el citoesqueleto, la unión con otras células y con la matriz extracelular (Gissen & Arias; 2015).

Células endoteliales del sinusoides

Constituyen cerca del 15% del total del órgano, forman un túbulo conocido como sinusoides donde se junta la sangre arterial con la venosa que comunica con el espacio de Disse. La membrana de estas células cuenta con fenestraciones, lo que permite el transporte de nutrientes provenientes del plasma sanguíneo hacia los hepatocitos. También cuentan con numerosos organelos especializados para la endocitosis de sustancias como la albumina, heparina, lipoproteínas, transferrina, lactoferrina y ácido hialurónico (Arii & Imamura, 2000).

Células de Kupffer

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado, conforman aproximadamente el 15% del total de las células presentes en el órgano, si bien tienen la capacidad de moverse se localizan principalmente en el espacio sinusoides, principalmente cerca de la vena porta. Son los encargados de fagocitar cualquier virus, bacteria, parásito y hongo que llegue por el flujo sanguíneo, además de elementos celulares, endotoxinas e incluso hierro (Arii & Imamura, 2000). Su capacidad fagocítica es tan grande que llegan a evolucionar en células gigantes multinucleadas, que a veces puede llegar a obstruir el espacio sinusoidal. Debido a esto, las células de Kupffer están involucradas en la respuesta a compuestos tóxicos, regeneración hepática y daño hepático crónico y agudo (Usta et al., 2015).

Células estrelladas

También conocidas como células de Ito, se localizan en el espacio de Disse, entre los hepatocitos y las células endoteliales, son las encargadas de almacenar moléculas de retinol y en consecuencia almacenan vitamina A. Son las encargadas de secretar algunos de los principales componentes de la matriz celular, como la colágena, y también las metaloproteinasas, enzimas encargadas de degradar y por lo tanto remodelar la matriz extracelular que dependen de la unión con iones de calcio o zinc; sin embargo, en condiciones patológicas como la cirrosis, los hepatocitos pasan de un estado quiescente a uno activado, se ha demostrado que pierden la capacidad de almacenar vitamina A y su fenotipo cambia comenzando a parecerse a un fibroblasto y son las responsables de secretar grandes cantidades de matriz extracelular (Senoo et al., 2010).

Matriz extracelular

Los tejidos de cualquier organismo están compuestos por células y una red que las sostiene: la matriz extracelular. La matriz está conformada fundamentalmente por agua, proteínas y polisacáridos, aunque cada tejido posee una topología y composición que la hacen única en cada caso. Dichos componentes son producidos en general por las mismas células que componen el tejido o bien provienen del aporte sanguíneo (Silvera & Barrios, 2002). La matriz extracelular se divide en dos tipos para su estudio: la intersticial y la pericelular. La primera se encuentra principalmente en el tejido conectivo y normalmente consiste en colágena, proteoglicanos, ácido hialurónico, elastina y fibronectina, mientras que la segunda rodea a las células comunicando a la membrana plasmática con el exterior y está compuesta por colágena IV, laminina, proteoglicanos, heparán sulfato, nidogen y fibulina, lo que le da una mayor rigidez (VS, Lebleu; 2007).

Es importante mencionar que la matriz extracelular es una estructura dinámica que constantemente es remodelada tanto por factores enzimáticos como no enzimáticos, y sus componentes moleculares están sujetos a modificaciones post-traduccionales. Es a través de estos cambios que la matriz extracelular genera las propiedades físicas y químicas características de cada órgano, como lo son la fuerza y elasticidad necesarias para mantener la integridad del mismo, la retención de agua y acción de buffer que brinda son importantes para mantener la homeostasis extracelular. Por esto, la matriz extracelular tiene un papel importante en los procesos de adhesión, apoptosis, migración, diferenciación y proliferación (Frantz, C. et al; 2010).

Para que la matriz extracelular sea capaz de ejercer sus funciones existen macromoléculas contenidas en ella que son capaces de retener factores de crecimiento y otras citocinas que son liberados al microambiente cuando la matriz es degradada por las enzimas líticas como la colagenasa que son producidas ya sea por macrófagos, linfocitos o leucocitos (Rozario & Desimone, 2011) (Silvera & Barrios, 2002). En resumen, la estructura de la matriz extracelular y su composición molecular son importantes para:

1. la supervivencia y diferenciación fenotípica de las células (Pedersen, J.A.; 2010).
2. almacenar citocinas y factores de crecimiento (Shute, J., 2012).
3. el desarrollo de diversas patologías y enfermedades (Hansen, Genovese, Leeming, & Karsdal, 2015).

La matriz extracelular debe interactuar con las células para que éstas puedan llevar a cabo sus funciones de acuerdo a las necesidades del organismo. Un ejemplo de los receptores encargados de comunicar a la matriz con las células son las integrinas. Las integrinas son glicoproteínas transmembranales formadas por la asociación de dos subunidades, α y β , unidas entre sí por uniones no covalentes y son mediadoras de las interacciones célula-célula y célula-matriz (ver Ilustración 2) ; muchas de estas acciones son mediadas por la secuencia RGD (secuencia específica de residuos de aminoácidos que tiene el tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico, es un elemento clave para la adhesión de las células a la matriz) (Silvera & Barrios, 2002). Las integrinas ejercen la función de receptores para las moléculas de la matriz extracelular, o bien para otros tipos celulares. Cuando una integrina se une a un componente de la matriz extracelular se genera una cascada de señalización que le indica a la célula el proceso que debe realizar a continuación (Berrier *et al*, 2007); por ejemplo, cuando una célula se encuentra unida a la matriz extracelular esto es captado por una integrina que a su vez genera una cascada de señalización de supervivencia (Meredith J. E. *et al*, 1993), esto quiere decir que si una célula llegara a desprenderse de la matriz esta señal de supervivencia se interrumpiría provocando la muerte de la célula.

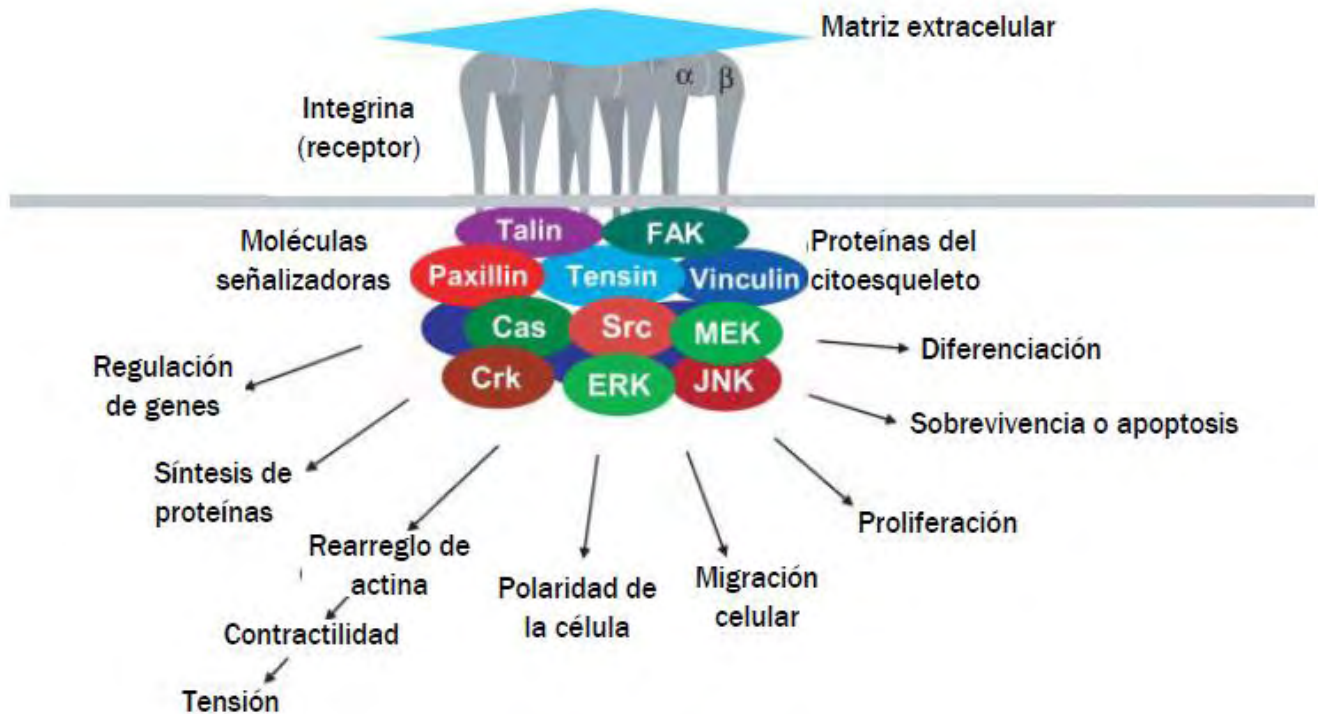


Figura 2. Interacción entre la matriz extracelular y la célula mediada por integrinas. Las señales mecánicas o químicas provenientes de la matriz extracelular son captadas por receptores transmembranales conocidos como integrinas, que interactúan con moléculas de señalización citoplasmáticas que generan diferentes respuestas como migración, diferenciación o proliferación. Tomada de Hernández-Bazán (2012).

En general las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular se pueden dividir en cuatro sistemas para su estudio: sistema colágeno, sistema elástico, proteoglicanos y glicoproteínas como la laminina y fibronectina, entre otras. Estos grupos realizan sus funciones sincronizadamente; esto hace que la matriz sea calificada como un complejo funcional. Por ejemplo, los colágenos y el sistema elástico constituyen la arquitectura de la matriz extracelular, mientras que las glicoproteínas actúan como moléculas de adhesión al sustrato intercelular. Los glicosaminoglicanos y proteoglicanos tienen un papel fundamental en el equilibrio hidroelectrolítico y ácido básico, e incluso en algunos tejidos pueden llegar a regular la diferenciación y proliferación celular (Arenas & de Zurbarán, 2002). Los proteoglicanos consisten en cadenas largas de polisacáridos unidas covalentemente a una proteína, mientras que los glicosaminoglicanos son polímeros compuestos por la repetición del mismo disacárido unidos covalentemente a un proteoglicano (Alberts et al., 2015).

En el hígado sano los componentes de la matriz extracelular están distribuidos principalmente en la cápsula de Glisson, en los vasos sanguíneos portales y en los ductos biliares, mientras que en el espacio de Disse se localiza matriz que asemeja a la membrana basal que contiene laminina, fibronectina, nidogen y proteoglicanos. Fibras de colágena tipo I, III y IV se encuentran en el espacio perivascular y los vasos portales, en la matriz extracelular intersticial podemos encontrar fibronectina y colágena (Okazaki, Yonezawa, & Mayne, 1996). La Figura 3 muestra como la colágena tipo IV forma una red lo que le permite a las células acomodarse y tener soporte dentro del hígado.

Colágena

La colágena es la proteína fibrosa más abundante del cuerpo, es el principal elemento estructural de la matriz extracelular, le brinda rigidez al tejido limitando su elasticidad y participa en procesos de adhesión, migración y desarrollo (Rozario & Desimone, 2011). Existen varios tipos de colágena, creando así una súper familia de proteínas cuya característica general es que está formada por una triple hélice de cadenas pro- α que se mantienen unidas por la formación de puentes de hidrógeno con dominios globulares que son los responsables de la flexibilidad de la molécula (Arenas & de Zurbarán, 2002).

Se han descrito 28 tipos de colágenas diferentes, la función de una molécula de colágena depende de la estructura cuaternaria que adquiere cuando se agrega con otras moléculas de colágena y se incorpora a la matriz extracelular. Existen dos grandes grupos en esta súper familia: colágenas fibrilares y no fibrilares. Todos los tipos de colágena no fibrilar separan la triple hélice en al menos una región, mientras que las fibrilares poseen un dominio particular en el extremo N-terminal llamado "minor helix" que como su nombre lo indica, contiene una triple hélice pequeña (Gordon & Hahn, 2010). De acuerdo con esta clasificación, las colágenas no fibrilares son: IV, VI, VII, VIII, X. A su teniendo en cuenta la constitución y presentación de las fibras se dividen en: a) las que forman membrana: IV, VI Y VIII; b) con interrupción de la triple hélice: XI, XII Y XIV y c) forma fibras de anclaje es el tipo VII. Las colágenas fibrilares son: I, II, III, V y XI (Arenas & de Zurbarán, 2002).

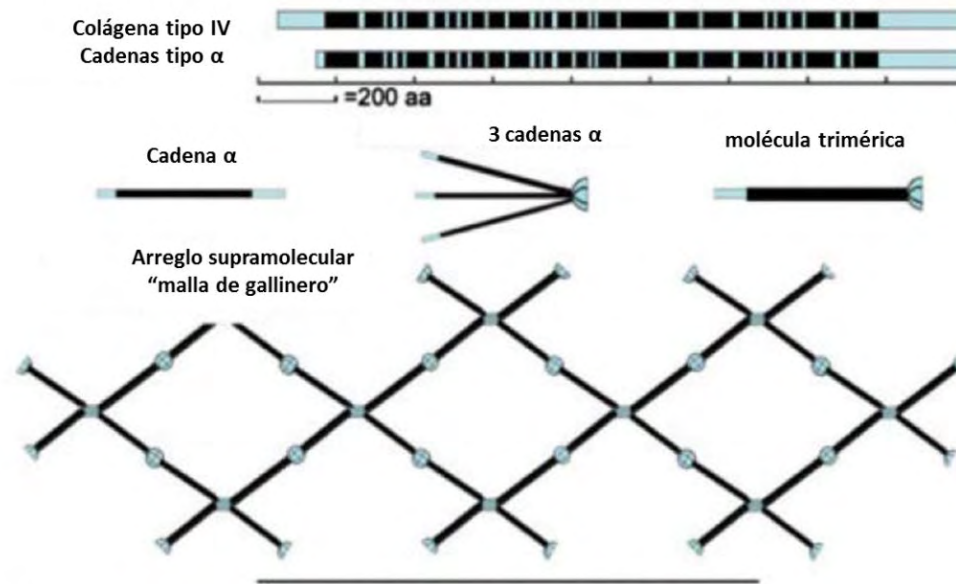


Figura 3. *Estructura cuaternaria de la colágena tipo IV*. Las cadenas tipo alfa se ensamblan en una molécula trimérica, formando la triple hélice. A su vez, la triple hélice interacciona con otras moléculas de colágena en la matriz extracelular dando lugar al arreglo supramolecular que asemeja a una “malla de gallinero”. Tomada de (Gordon & Hahn, 2010).

Laminina

La laminina es una proteína heterodimérica formada por tres cadenas largas ($\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$) unidas por puentes disulfuro que le dan forma de cruz (Arenas & de Zurbarán, 2002), lo que le permite interactuar con otras lamininas o bien con otras proteínas de la matriz extracelular y formar una malla (ver Figura 4). Además, la laminina es capaz de unirse a las integrinas y así dirigir el destino de las células, por ejemplo, durante la organogénesis (Durbeej, 2010).

La laminina es el principal componente de la membrana basal, una capa de la matriz extracelular presente en la base de los tejidos epiteliales, sin embargo, el hígado humano adulto no posee membrana basal, por lo que la laminina la podemos encontrar formando parte de los ductos biliares y durante el desarrollo embrionario del hígado (Khalaj, 2016). En el año 1991 Martínez-Hernández y colaboradores demostraron que la laminina es un potente factor para la regeneración hepática después de una hepatectomía. En 2011 Y.N. Kallis y colaboradores encontraron que cuando la matriz extracelular comienza a degradarse, deja libre a la laminina que es necesaria para mantener el fenotipo biliar/progenitor del hígado, y para que los hepatocitos mantengan su

fenotipo diferenciado la laminina debe ser eliminada. Sin embargo, la laminina posee diferentes dominios funcionales, uno de los cuales presenta alta afinidad por el perlecano, otros por el nidógeno y al menos dos por el receptor celular para la laminina, lo que hace a la laminina una proteína necesaria para la presencia de proteoglicanos (Tickle, n.d.).

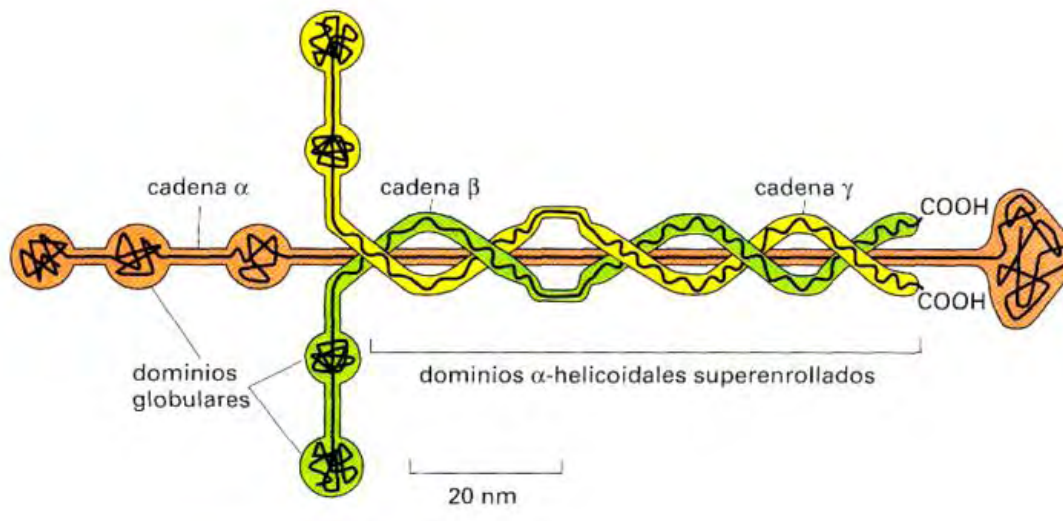


Figura 4. Estructura cuaternaria de la laminina. Se observa como las subunidades se entrelazan para formar un trímero con forma de cruz. Cada una de las cadenas polipeptídicas está constituida por más de 1500 residuos de aminoácidos. Tiene la capacidad de unirse tanto a las fibras de colágena como a las integrinas presentes en la membrana celular. Tomada de (Tickle, n.d.).

Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína dimérica que se encuentra de forma soluble en el plasma o bien en la matriz extracelular de los tejidos (Salmerón-Sánchez M, et al. 2011). Se organiza a modo de red mediante un proceso mediado por integrinas y tiene la capacidad de interactuar con diversas macromoléculas que median el comportamiento celular. Entre sus principales funciones está la remodelación de tejidos durante la embriogénesis y participar en los procesos de cicatrización (Lucena et al. 2007).

En los tejidos son los fibroblastos y las células epiteliales los responsables de sintetizar y secretar fibronectina, sin embargo, son los hepatocitos los principales productores de la forma soluble de la proteína presente en el plasma, que es de suma importancia para el proceso de coagulación. Se

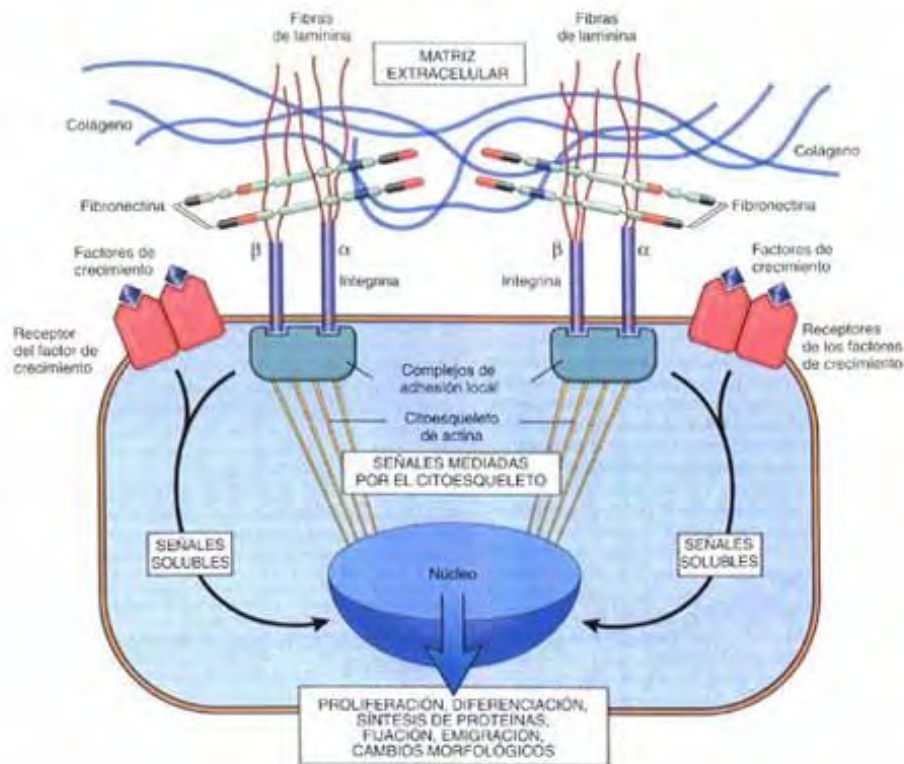


Figura 6. *Relación que existe entre la laminina, la fibronectina y la colágena con las integrinas.* Ubicadas en la membrana celular, las integrinas, al ser estimuladas por los componentes de la matriz extracelular desencadenan vías de señalización que pueden generar respuestas de diferenciación celular, migración, etc. Tomada de <http://www10.uniovi.es/anatopatodon/modulo5/08matriz.htm>

Antecedentes

Aislamiento de matriz extracelular

El proceso de descelularización se lleva a cabo al perfundir con detergente un tejido, los detergentes comúnmente utilizados son el SDS y el Triton X-100 (Park et al., 2013)(Faulk, 2014), con el fin de que la membrana lipídica de las células se rompa, lisándolas y conservando así la matriz extracelular; ambos detergentes poseen características diferentes que permiten una descelularización eficiente, sin embargo, se desconocen las diferencias entre las matrices aisladas resultantes y sus efectos en el cultivo, ya sea utilizando los detergentes en conjunto o uno sólo (Kock et al., 2011) .

Existen varios protocolos previamente descritos donde se puede dejar el tejido inmerso en detergente y en agitación durante varias horas (Park et al., 2013), o bien canular al órgano y con

ayuda de una bomba llevar a cabo la perfusión (Lee, 2014)(Kock et al., 2011) ; éste último es el más utilizado debido a su eficiencia en lisar completamente las células del interior del tejido. Este procedimiento generalmente se utiliza para descelularizar el hígado completo y posteriormente resembrarlo con células, para esto es necesario que el hígado conserve la cápsula de Glisson, con la finalidad de que el detergente circule por el órgano sin salirse. Del mismo modo, no existe un consenso en cuál es la concentración adecuada a la que se debe usar el detergente e incluso cual detergente o la mezcla de estos es más efectiva en estos protocolos, mientras unos han utilizado concentraciones tan bajas como 0.1% (Park et al., 2013) otros autores llegan hasta 3% (Sellaro,2010).

En el año 2013, Kyung-Mee Park y colaboradores llevaron a cabo un estudio en donde observaron que el SDS en una baja concentración es más eficiente que una alta, la cual puede dañar la matriz resultante, además que no existe una relación proporcional entre la concentración y el tiempo de descelularización.

En la tabla 1 se muestra el modo de acción de los detergentes más comúnmente utilizados en el proceso de descelularización de tejidos y los efectos resultantes en la matriz extracelular resultante.

Tabla 1. *Efectos ocasionados sobre la matriz extracelular por diferentes métodos.* Tomada de (Crapo, Gilbert, & Badylak, 2011).

Agente/Técnica	Modo de acción	Efectos en la MEC
SDS	Solubiliza las células y las membranas nucleicas. Tiende a desnaturalizar proteínas.	Es efectivo al remover ácidos nucleicos y proteínas citoplasmáticas de tejidos densos. Desorganiza la ultraestructura, daña las fibras de colágeno y a los glucosaminoglicanos y remueve factores de crecimiento.
Triton X-100	Interrumpe las interacciones DNA-proteína, lípido-lípido y lípido-proteína y en menor medida las interacciones proteína-proteína.	Existen resultados contradictorios, donde la eficiencia de descelularización depende del tejido. Desorganiza la ultraestructura y remueve los glucosaminoglicanos.
Agitación	Puede lisar las células, es comúnmente utilizado para facilitar la exposición al químico y remover el material celular resultante.	Si el procedimiento es agresivo se puede dañar la integridad de la matriz.
Perfusión	Facilita la exposición al químico y la lisis de las células.	Si la presión aumenta se puede dañar el tejido.

Cultivo de hepatocitos en matriz

En el pasado se han realizado numerosos experimentos en los que se pretende mimetizar la estructura histológica del hígado con el fin de preservar las características que presentan *in vivo*. Un cultivo de hepatocitos *in vitro* sobre uno de estos andamios que imitan la ultraestructura del hígado se considera exitoso si las células logran mantener su fenotipo y sus funciones por más de 28 días, para esto es necesario evitar el proceso de transdiferenciación (la conversión de una célula completamente diferenciada y madura a otro tipo celular diferente) que sufren los hepatocitos en cultivo de manera espontánea, esto para permitir que se realicen diversos estudios de mayor duración como toxicológicos o de daño hepático crónico (Utsa, 2015). Se piensa que la transdiferenciación ocurre por el cambio de un factor de transcripción clave que altera su desarrollo y puede ser provocada por un cambio físico o químico en el microambiente celular que no involucra la mutación de genes (Shen, Burke, & Tosh, 2004).

Se han utilizado tanto extractos de matriz digerida con enzimas como tripsina o ácido, y también el tejido descelularizado fresco o liofilizado, mostrando resultados favorables en comparación con el uso de la colágena comercial. En 2006, Bryan Brown y colaboradores aislaron matriz extracelular de hígado de cerdo, entre otros órganos, con una serie de lavados con agua ionizada, tripsina y Tritón X-100, con lo que obtuvieron “hojas de matriz extracelular” y sembraron fibroblastos de la línea celular NIH3T3 y HMECs. Encontraron que si bien las células proliferaban y llegaban a la confluencia, no invadían el interior de la matriz (Brown et al., 2006).

En el hígado *in vivo* se ha observado el fenómeno de transdiferenciación en los hepatocitos, después de una lesión en las células de los conductos biliares, los hepatocitos cambian a colangiocitos para reparar el daño (Yanger et al., 2013). En hepatocitos en cultivo se ha observado el fenómeno de desdiferenciación, donde los hepatocitos presentan un fenotipo fibroblastoide y se ha propuesto diversas modificaciones al cultivo tradicional en una capa de colágena con el fin de preservar el fenotipo de las células por mayor tiempo, por ejemplo utilizar cultivos 3D (Gómez-Lechón et al., 1998) o bien solubilizar la matriz con ayuda de enzimas para suplementar los medio de cultivo (Loneker, Faulk, Hussey, D'Amore, & Badylak, 2016).

Planteamiento del Problema

Los hepatocitos primarios de rata constituyen un modelo de investigación bastante útil para estudiar procesos de daño hepático, metabolismo de fármaco y capacidad de replicación o apoptosis. Sin embargo, presentan la limitante de que los hepatocitos en cultivo simple pierden espontáneamente sus características; se ha demostrado que la matriz extracelular aislada tiene componentes estructurales que favorecen una función diferenciada de hepatocitos primarios de rata.

A pesar de estas observaciones, no se conoce cuál es el impacto del proceso de descelularización sobre la matriz extracelular aislada como andamio para su uso en el cultivo de hepatocitos primarios de rata, ni si existe un cambio en el tratamiento de descelularización que se utilice.

Objetivos

General:

- Evaluar comparativamente la viabilidad y morfología de hepatocitos primarios de rata en cultivo sobre una matriz extracelular de hígado de cerdo vs. el cultivo sobre colágena comercial.

Particular:

- Evaluar la eficiencia de descelularización de los detergentes más utilizados: Tritón X-100 y SDS; así como evaluar la calidad de la matriz extracelular resultante en cuanto a la conservación de las proteínas laminina y fibronectina.
- Evaluar la viabilidad de hepatocitos primarios de rata en cultivo sobre una matriz extracelular de hígado de cerdo vs. el cultivo sobre colágena comercial.
- Evaluar el tiempo en que los hepatocitos primarios de rata conservan su fenotipo diferenciado cultivados sobre la matriz extracelular de hígado de cerdo.

Hipótesis

El cultivo primario de hepatocitos de rata sembrados sobre la matriz extracelular de hígado de cerdo permanecen viables y diferenciados por más tiempo en comparación con el cultivo primario tradicional, que es colágena comercial de cola de rata. Por lo que una matriz descelularizada previamente con SDS será más favorable para la supervivencia y mantenimiento de los hepatocitos en cultivo.

Método

Aislamiento de Matriz Extracelular

Cerdos Yorkshire de aproximadamente 30Kg fueron proporcionados por el departamento de Cirugía Experimental del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre después de haber sido utilizados en el entrenamiento de cirugía bariátrica por los residentes del mismo. El hígado fue dividido en 5 fragmentos de aproximadamente 350g y congelados a -20°C para su uso posterior.

El fragmento de hígado fue cortado en fragmentos de 1 x 1.5 x 0.5 cm, y posteriormente sometidos a 2 lavados con PBS frío con 1% de penicilina/estreptomicina, 1 hora cada uno a 70rpm en un agitador orbital.

Para el proceso de descelularización se dividieron los trozos previamente lavados en PBS en 3 grupos: SDS al 0.1%, 1% y Triton X-100 al 1%. El tejido estuvo sumergido y en agitación durante 48h, la solución fue cambiada cada 12h. Todo el procedimiento fue realizado a temperatura ambiente (20°C). Para finalizar el tejido fue lavado nuevamente en PBS con 1% de penicilina/estreptomicina 3 veces, dos horas cada vez (Park, K. et al; 2013).

Una vez aislada la MEC se procedió a la fijación química con formaldehído al 10% durante 24 horas.

Inmunohistoquímica

Al pasar 24 horas en fijación la muestra se embebió en parafina para proceder con la técnica de inmunohistoquímica, con el fin de observar las proteínas laminina y fibronectina, debido a su relación con la red de colágena y las integrinas presentes en la membrana de las células. Primeramente, se realizaron cortes de la MEC con 2µm de grosor con ayuda de un microtómo. Se usó un baño de flotación para montar los cortes sobre portaobjetos tratados previamente con polo-L-lisina para proporcionar mayor adherencia.

Para remover la parafina fue necesario colocar los cortes durante 30 minutos en una incubadora a 87°C, posteriormente se sumergieron los cortes en xileno fresco 2 veces durante 5 minutos, posteriormente en una solución con 1:1 de etanol con xileno, alcohol al 100%, 96% y 60%, esto con el fin de rehidratar la muestra, finalmente los cortes fueron colocados en agua destilada. Para exponer al antígeno las muestras fueron sumergidas en 1mM de EDTA (pH 9)

hirviendo, y manteniéndolas por debajo del punto de ebullición durante 18 minutos. No fue necesario enfriar. Para realizar la tinción con los anticuerpos las muestras fueron lavadas con agua destilada 2 veces durante 5 minutos. Se utilizaron cubiertas plásticas (cover plates) para utilizar un menor volumen de anticuerpo y soluciones. Se le colocó a las muestras peróxido de hidrógeno al 3% para inhibir las peroxidasas que pudieran estar presentes. Posteriormente se procedió con un lavado de PBS 1M (pH 7.4) por 2 minutos.

Se agregaron 100µl del anticuerpo deseado (Anti-Laminin antibody y Anti-fibronectin antibody, Abcam), previamente el anticuerpo fue diluido en BSA a una proporción 1:50. Las muestras se dejaron incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se realizó un lavado con PBS durante 2 minutos para seguir con el sistema de detección por el anticuerpo secundario, del cual se agregaron 100µl y se dejó incubar durante 10 minutos. Se realizó un último lavado con PBS durante 2 minutos y se colocó 100µl de estreptavidina durante 10 minutos. Para detectar el anticuerpo secundario se agregaron 80µl de diaminobencidina y se colocó 1mL de sustrato-cromógeno DAB y 50µl de cromógeno DAB.

Se lavó con agua corriente y se sumergieron las muestras en hematoxilina durante 5 minutos, esto para asegurar que se hayan retirado las células efectivamente. Se realizó otro lavado en agua corriente y posteriormente en hidróxido de amonio al 3%. Para finalizar las muestras se colocaron en alcohol al 60%, 96% y 100%. Se le coloca una gota de resina Etelan y se montó el cubreobjetos. Las muestras se dejaron secar toda la noche antes de tomar las fotografías. De cada muestra se tomaron 3 campos al azar.

Tinciones de Masson y Hematoxilina & Eosina

La matriz extracelular aislada fue fijada en formaldehído al 10% por 24hrs, y posteriormente se embebió en parafina tras un proceso de deshidratación mediante alcoholes graduales. Primeramente, se realizaron cortes de 5µm con la ayuda de un micrótopo, y se montaron estos cortes en un portaobjetos previamente tratado con poli-L-lisina utilizando un baño de flotación.

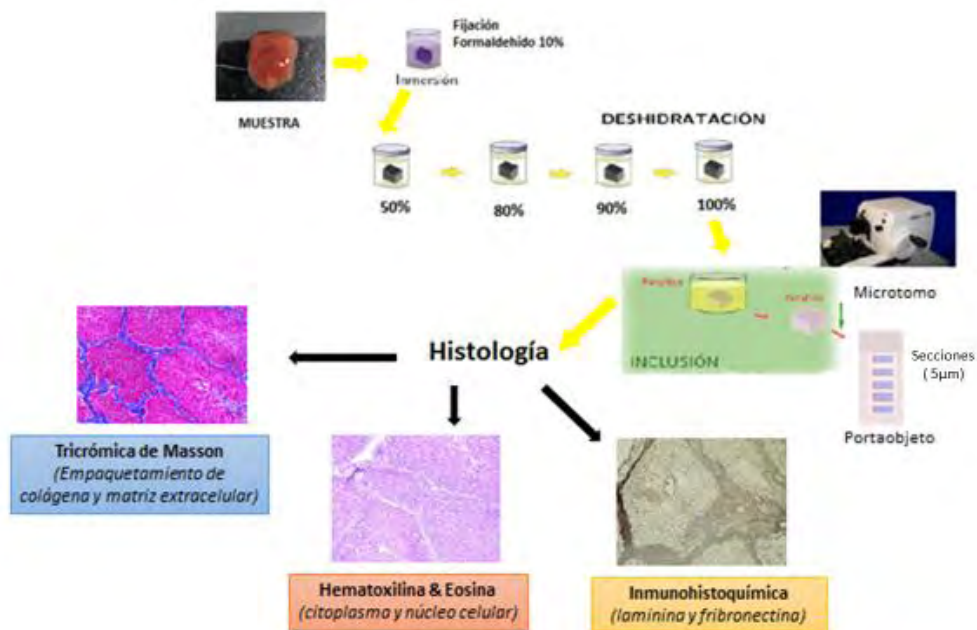


Figura 7. Esquema del procedimiento de histología. Modificada de (Vera Gómez, 2013)

Para iniciar con la tinción de HyE fue necesario desparafinar los cortes con xilol durante 20 minutos e hidratarlos pasando por alcoholes graduales (96° y 70°) y agua destilada. A continuación, las muestras se colocaron en hematoxilina durante 10 minutos y se realizó un lavado en agua corriente durante un minuto, después, fueron sumergidas rápidamente en eosina y seguido nuevamente por alcoholes graduales (70° y 96°) finalizando con xilol. Las muestras se mantuvieron sumergidas en xilol hasta que fueron montadas utilizando resina sintética para colocar el cubreobjetos. Tras esta tinción se puede observar al microscopio que los núcleos presentan un color violeta mientras que el citoplasma adquiere un color rosado.

Para la tinción de Masson las muestras fueron sometidas al mismo proceso de desparafinación e hidratación descrito anteriormente. Posterior a esto las muestras se sumergieron en solución de bouin durante 1 hora tras la cual se realizó un lavado con agua corriente hasta que el color amarillo se dejó de observar, después las muestras fueron sumergidas en hematoxilina durante 5 minutos y se realizó un lavado con agua corriente y fueron sumergidas en solución biebrich scarleth-fuchsin

ácida durante 2 minutos. Se realizó un lavado con agua destilada y se aclaró con solución de ácido fosfotungstico-fosfomolibdico durante 10 minutos, después se lavó con agua destilada.

Por último, las muestras se sumergieron en solución azul de anilina durante 5 minutos y se realizó un último lavado con agua destilada, se aclaró con ácido acético frío por 3 minutos. Para montar el cubreobjetos se deshidrataron las muestras nuevamente con alcoholes graduales y xilol. Se utilizó resina sintética para fijar el cubre. Al observar al microscopio el citoplasma adquiere un color rojo, los núcleos, negro y las fibras de colágena, azul.

Aislamiento de hepatocitos de rata

Para el aislamiento de hepatocitos se utilizaron ratas Wistar de aproximadamente 250g. Fueron anestesiadas con una mezcla de xilacina y ketamina (40/5 mg/Kg de peso) inyectada por vía intramuscular. Una vez que la rata ya no respondía a estímulos se procedió a colocarla en posición para la cirugía (Sosa-Garrocho, 2016).

Se realizó un corte en la parte abdominal de manera que los intestinos quedaran expuestos, con ayuda de una toalla de papel se hicieron a un lado para exponer la vena porta. Se realizó un pequeño orificio en esta vena y se procedió a introducir la cánula y ligarlas, posteriormente se colocó el hígado en el perfusor mostrado en la Figura 8.

Se perfundió el órgano con solución de Krebs-Ringer sin Calcio (amortiguado con NaHCO_3 a pH de 7.3-7.4 y gaseo con una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2) para remover la sangre (todas las soluciones deben estar a 37°C). Una vez que el hígado cambió a un color rosa claro se cambió a una solución de Krebs-Ringer + CaCl_2 durante 3 minutos y después se perfundió con Krebs-Ringer + CaCl_2 + colagenasa durante 30 minutos aproximadamente en un sistema de recirculación. Una vez digerido el hígado se colocó en una caja de Petri estéril con solución Krebs-Ringer + CaCl_2 y se liberaron las células con la ayuda de una punta de micropipeta. La mezcla resultante fue filtrada con una malla de nylon de 300-500 μm para remover agregados y fragmentos de tejido. El filtrado se colocó en un tubo de 50mL y se llevó a un volumen de 45mL con Krebs-Ringer + CaCl_2 y se agitó suavemente por inversión. Se centrifugó a 500rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente,

sobrenadante fue removido, el pellet resultante fue resuspendido en la misma solución y se realizaron dos lavados más (Sosa-Garrocho, 2016).

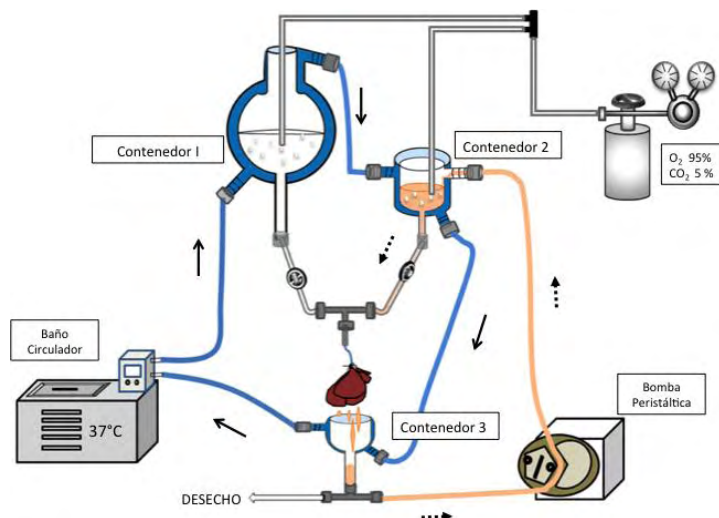


Figura 8. *Aparato de perfusión para el aislamiento de hepatocitos.* Se recircula agua a 37°C con el fin de mantener tanto las soluciones como al órgano a esta temperatura durante el procedimiento de aislamiento. En el contenedor 1 se coloca el Krebs Ringer, el contenedor 2 se utiliza para verter la colagenasa y el contenedor 3 mantiene al hígado y recolecta la colagenasa para recircularla con ayuda de una bomba de perfusión. Tomada de (Sosa-Garrocho, 2016).

En el último lavado las células fueron resuspendidas en PBS + penicilina/gentamicina y Percol en volúmenes iguales, esto bajo condiciones estériles. Se centrifugó nuevamente a 800rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante que contiene a células no parenquimatosos y/o muertas. Se resuspendieron las células en medio DMEM suplementado con 10% FBS y penicilina/gentamicina a temperatura ambiente antes de la siembra.

Cultivo de hepatocitos primarios sobre matriz extracelular

Para realizar el cultivo de los hepatocitos primarios se dividieron en 3 grupos: control, corte de matriz proveniente de los tratamientos con SDS al 1% y al 0.1% que demostraron ser los más efectivos. Para el grupo control se colocaron 2ml de colágena comercial en una caja de Petri de plástico, mientras que para utilizar la matriz se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se realizaron cortes de 5µm de la matriz extracelular previamente embebida en parafina y se montaron en portaobjetos previamente tratado con poli-L-lisina. Se procedió a

desparafinar en un horno a 80°C durante 15 minutos, después se rehidrató la matriz con alcoholes graduales y agua desionizada. Posterior a la rehidratación se mantuvieron las muestras en PBS.

2. Se lavaron las muestras con PBS + antibióticos (vactrin, penicilina, estreptomina y fungizona).
3. Se colocaron los portaobjetos en una caja de Petri estéril y se sometieron a luz UV durante 15 minutos.
4. La matriz se incubó con medio attachment toda la noche a 37°C.
5. Para realizar la siembra se retiró el medio attachment y se colocaron 2mL de las células resuspendidas previamente y se dejaron adherir durante 3 horas tras las cuales se revisó que las células estuvieran adheridas. Posteriormente se agregaron 10mL de medio feeding a modo que quedara completamente cubierto el tejido en el portaobjetos.

Fotografías fueron tomadas antes de sembrar las células, 24 horas y 5 días después de la siembra. Para realizar la prueba de viabilidad se colocaron 500µL de azul tripano en la caja Petri.

Resultados

Para el aislamiento de matriz extracelular se tomaron fotografías a las 0, 24 y 48 horas después de someterse al lavado con SDS al 0.1% o 1% y con Triton X-100 al 1%. Se observó que el tratamiento con Triton X-100 fue el menos efectivo en la descelularización del tejido, en las Fig9D y Fig9G podemos observar que el color del tejido pasó de ser rojo pardo a rosa claro, lo que indica la presencia aún de células, bajo este tratamiento no se encontraron modificaciones en el tamaño de la muestra.

Para ambos tratamientos con SDS se observaron cambios tanto en el tamaño como en el color. En la Fig 9B podemos observar que los bordes de la muestra presentan un color blanco, mientras que el centro tiene un color rosado, en la Fig 9E se observa que el color rosa del centro permanece aunque es más tenue, la presencia de células se puede verificar con la tinción de H&E mostrada en la Figura 10 mientras que a las 48h el grupo de SDS 1% se muestra totalmente blanco (Fig 9F). En el tratamiento de SDS 0.1% se pudo observar un leve aumento en el tamaño (del 7%) mientras que el grupo de SDS 1% se mostró una disminución promedio del 23%.

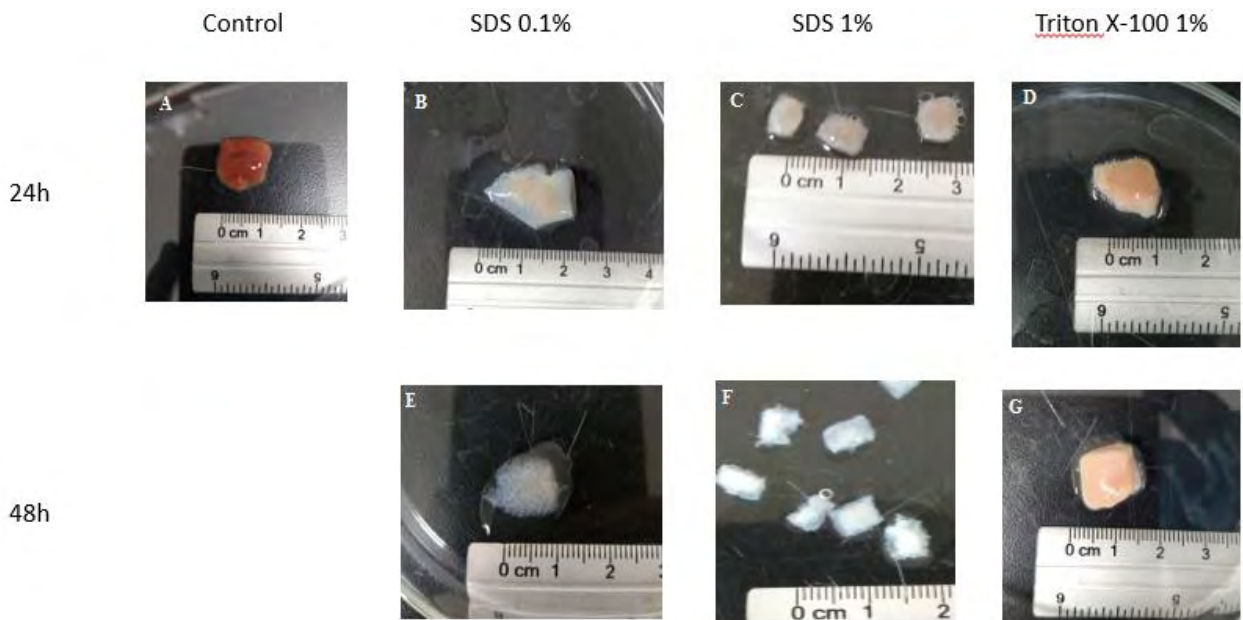


Figura 9. Se muestra el cambio de color y tamaño que sufren los fragmentos de hígado 24h (B, C y D) y 48h (E, F y G) después de cada tratamiento. El control (A) muestra un fragmento de hígado a las 0h antes de pasar por cualquiera de los tratamientos con detergentes.

Las tinciones de H&E demostraron que el SDS al 1% es más efectivo para remover las células al interior del tejido usando el método de agitación, el grupo de Triton X-100 se pueden observar alteraciones en el tejido, sin embargo, existe la presencia de células después de 48 horas. El grupo SDS 0.1% fue efectivo para remover la mayoría de las células sin embargo, al momento de manipular la matriz se observaron alteraciones en la integridad de la matriz extracelular, como se muestra en la Figura 10C y 10D.

Las tinciones histológicas revelaron la microestructura de la matriz resultante y el efecto de los detergentes utilizados sobre el tejido. En las figuras 10G y 10H tenemos el grupo tratado con Triton X-100 al 1%, la tinción de H&E (Fig 10G) reveló que el tejido no se descelulariza sino más bien pierde fragmentos lo que explica el cambio de color observado anteriormente (Fig 9G), sin embargo, podemos observar con la tinción de Masson (Fig 10H) que la colágena de la matriz extracelular se conserva a pesar de esta fragmentación, debido a la ineficiencia en la descelularización el grupo de Triton X-100 no se sometió a la técnica de inmunohistoquímica ni posteriores.

En las figuras 10A y 10B observamos al grupo control, con ambas tinciones podemos ver la microestructura del hígado, el lobulillo hepático con forma hexagonal y al centro de esta la vena central. La figura 10B muestra como la matriz extracelular rodea al lobulillo hepático y le da su forma, además de que existe una cantidad importante de colágena abriéndole paso a la vena central.

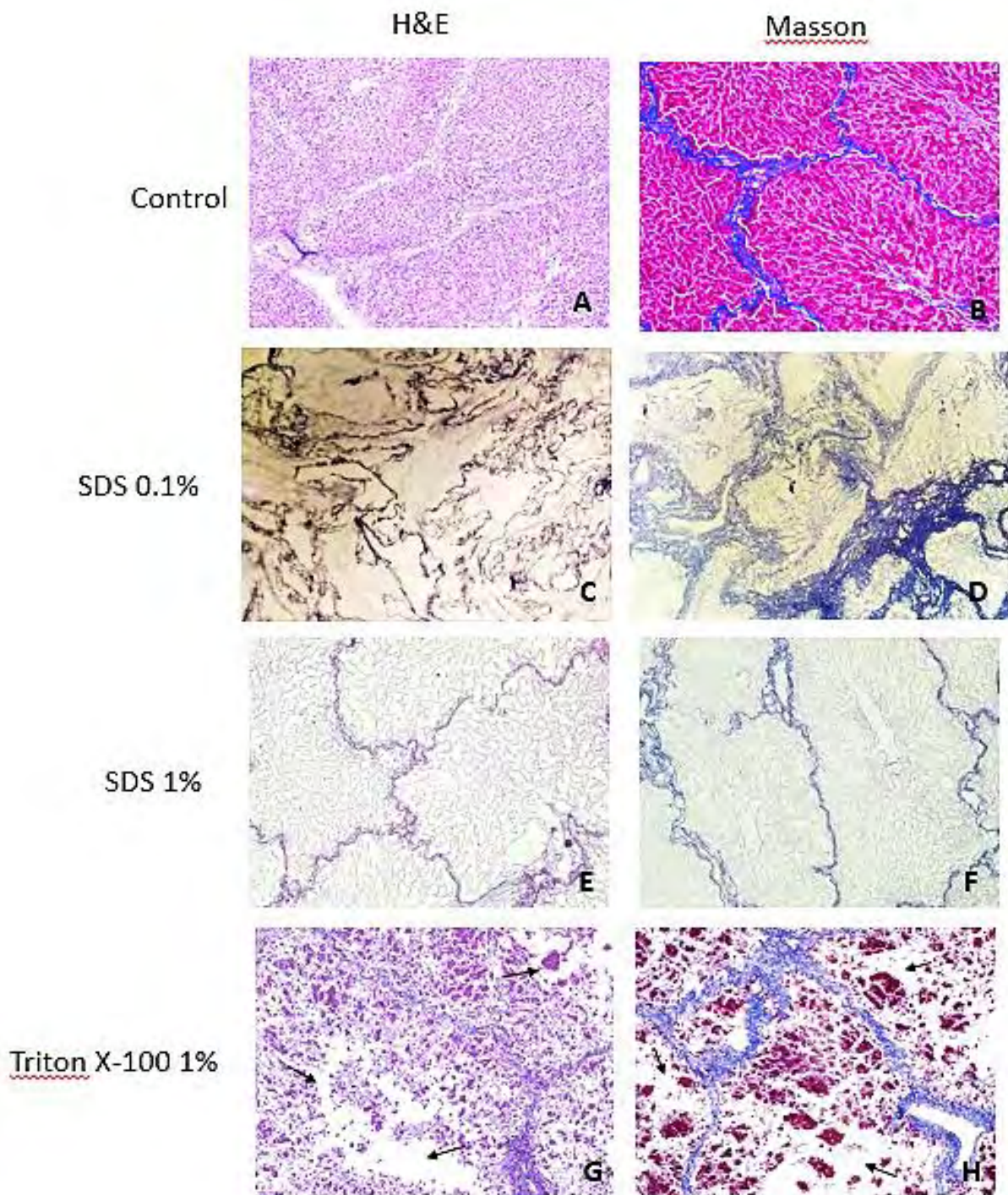


Figura 10. *Tinciones histológicas de H&E y Masson en los diferentes grupos.* En la parte superior se observan las tinciones de H&E, donde las células toman un color morado, mientras que, en la parte inferior, la tinción de Masson muestra las células en un color rosa brillante y la colágena en color azul. Las flechas en Fig.2G y 2H señalan la fragmentación del tejido, que no se presenta en los otros grupos. Amplificación de todas las fotografías 10X.

Para ambos grupos tratados con SDS se observó una alta eficiencia en el proceso de descelerización, el grupo tratado con la menor concentración de SDS (Fig 10C y 10D) mostró ausencia de células de manera constante al no observarse núcleos celulares en ninguna de las tinciones, sin embargo, la matriz resultante quedó con una consistencia difícil de manipular, al observar la Fig10C se aprecia que la matriz ha perdido integridad, si bien la microestructura del lobulillo hepático está presente, se encuentra manera distorsionada, se observa la forma poligonal colapsada. Por el otro lado, para el grupo tratado con SDS al 1% la descelerización fue completa (Fig 10E), no se observaron núcleos y la matriz preservó eficientemente la forma poligonal del lobulillo hepático sin colapsar (Fig 10F). Debido a estos resultados se procedió con la técnica de inmunohistoquímica en ambos grupos tratados con SDS y no con el grupo tratado con Triton 1%.

En la técnica de inmunohistoquímica se buscó la presencia de las proteínas laminina y fibronectina. El grupo control se observó positivo para laminina alrededor de vasos sanguíneos considerados parte de la triada portal (Fig 11A) mientras que la fibronectina se presentó distribuida en el espacio que existe entre las fibras de colágena, tanto la que rodea al lobulillo hepático como la que se encuentra de manera intersticial (Fig 11B). En el grupo tratado con SDS al 0.1% se observó presencia de estas proteínas a pesar de que la matriz había perdido integridad, en la Figura 11C se aprecia una señal positiva para laminina distribuida en el interior del lobulillo hepático colapsado y no se aprecia la presencia de vasos sanguíneos, igualmente en la Fig 11D se observa que la fibronectina está en el interior del lobulillo colapsado.

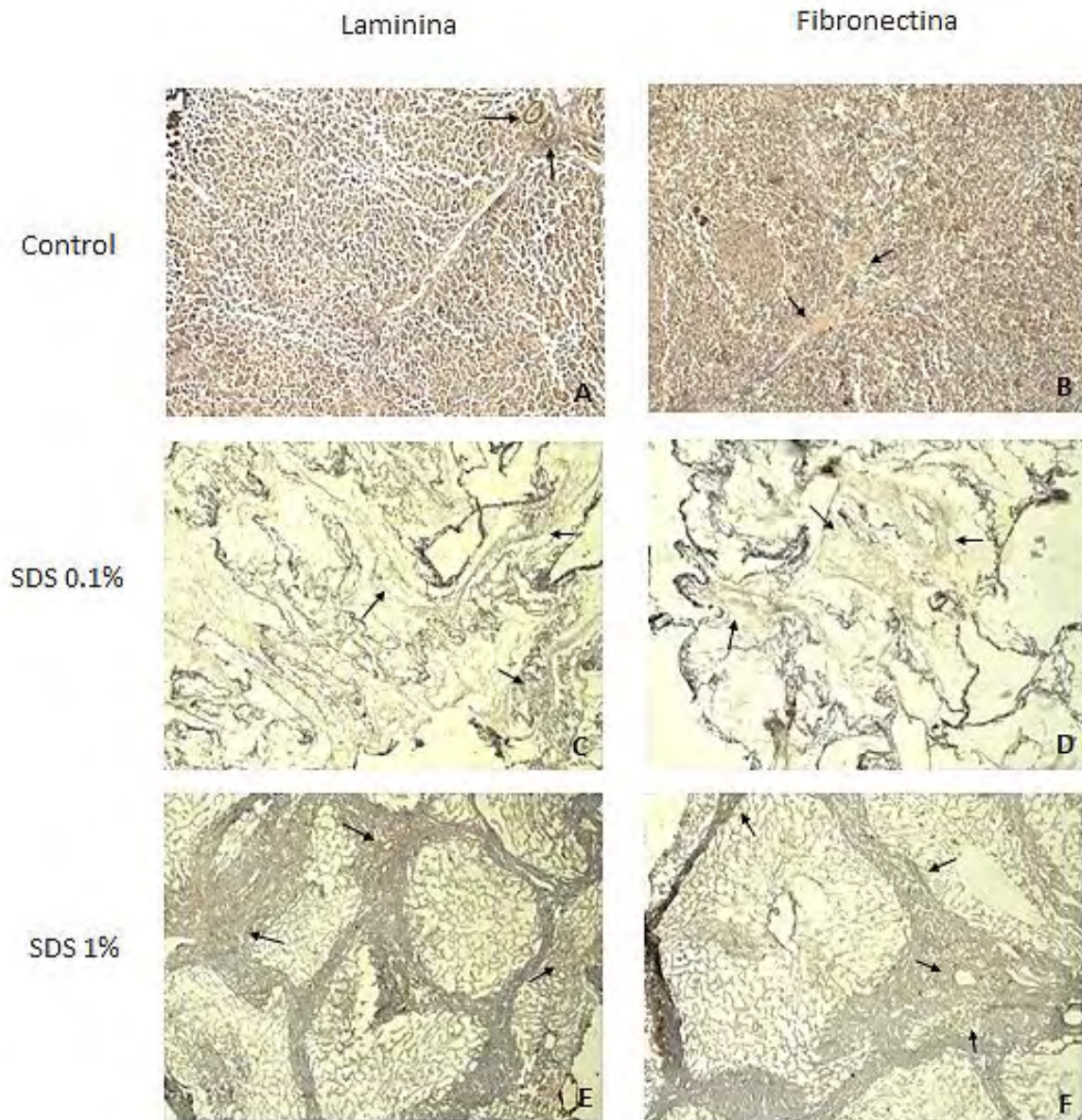


Figura 11. *Distribucion de laminina y fibronectina en la matriz obtenida después del aislamiento.* Inmunohistoquímica para las proteínas laminina (A, C y E) y fibronectina (B, D y F). En todas las imágenes hay presencia de ambas proteínas sin embargo en el grupo de SDS 0.1% la distribución de las proteínas se ve modificada mientras que en el SDS 1% se conserva la misma distribución que presenta el grupo control. Amplificación de todas las fotografías 10X.

En el grupo sometido a SDS 1% se puede apreciar a la laminina en la zona donde estaría la triada portal, lo que sugiere que se conservó la proteína asociada a los vasos sanguíneos (Fig 11E), la fibronectina, de igual manera, se observa asociada a la colágena que rodea al lobulillo y cercana a la triada portal, también se encuentra distribuida de manera uniforme en el interior de este, lo que indica la preservación de la proteína en la matriz intersticial (Fig 11F).

Debido a que ambos grupos tratados con SDS mostraron la presencia de laminina, fibronectina y colágena, se procedió a realizar la siembra de hepatocitos primario.

Previo a la siembra de las células hepáticas, las matrices resultantes de ambos grupos fueron tratadas con medio de cultivo "attachment". Se tomaron fotografías antes de la siembra donde se muestran las fibras de colágena y la estructura del lobulillo para el caso del grupo tratado con SDS 1% (Fig 12B) aún presentes en el portaobjetos tras los diferentes lavados y la incubación en el medio, por lo que se espera que las proteínas laminina y fibronectina asociadas a la colágena también hayan permanecido tras los lavados, y así se observe mayor adherencia de las células al momento de la siembra.



Figura 12. *Matriz extracelular después del aislamiento con SDS.* Fotografía de la matriz extracelular aislada con SDS al 0.1% e hidratada con medio "attachment" antes de la siembra. B. Matriz extracelular aislada con SDS al 1% e hidratada con medio "attachment" antes de la siembra. Amplificación 10X.

Después de realizar la siembra se esperó durante 24 horas para tomar las primeras fotografías (Fig 13A, 13C Y 13E), después de 5 días nuevamente se realizó un registro fotográfico (Fig 13B, 13D Y 13F) donde se buscó la supervivencia de las células, la adherencia al corte de matriz y hepatocitos formando cordones celulares.

A las 24 horas el grupo control tuvo una buena supervivencia de las células, en la figura 13A se observaron numerosos hepatocitos contiguos que formaron una extensa estructura semejante a tejido, además de que estos conservaron una forma casi cuadrada, lo que indica que el fenotipo esta conservado, sin embargo, 5 días después de la siembra (Fig 13B) todas estas estructuras se

perdieron y las células cambiaron a una forma completamente redondas, lo que indica que se perdió la adherencia y las células murieron. Para corroborar esto se utilizó azul tripano que se muestra en la figura 14B, donde se encontró que todas las células se observaron redondas y pequeñas y con un color azul oscuro, lo que indica muerte celular.

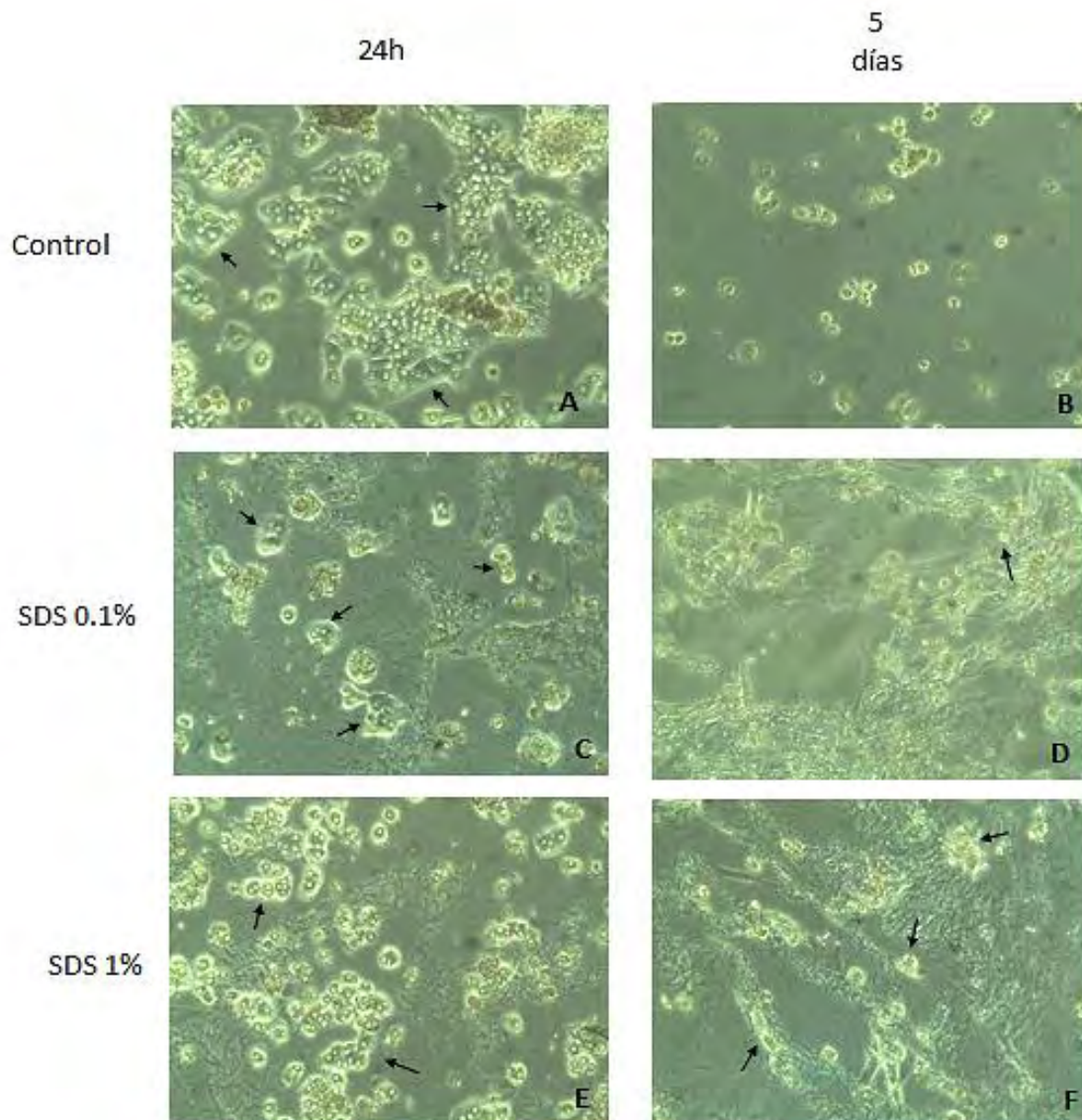


Figura 13. *Cultivo de hepatocitos*. Fotografías tomadas del cultivo de hepatocitos primarios a las 24 horas y 5 días después de la siembra. Las flechas negras indican la presencia de dos o más hepatocitos contiguos, formando un agregado celular que asemeja al tejido. Amplificación de todas las fotografías 10X.

El grupo SDS 0.1% (Fig 13C) mostró hepatocitos dispersos que se adhirieron a la matriz y formaron estructuras semejantes a tejido mucho más pequeñas en comparación con el grupo control. A los 5 días estas estructuras se perdieron y fue difícil localizar hepatocitos que permanecieran en sobre la matriz. Tras realizar la prueba de azul tripano (Fig 14D) se determinó que la mayoría de los hepatocitos habían muerto, se localizaron pocos que fueron considerados como vivos y se observaron numerosos hepatocitos con morfología tipo fibroblasto que fueron identificados por sus proyecciones citoplasmáticas que le daban una apariencia de estrella a la célula.

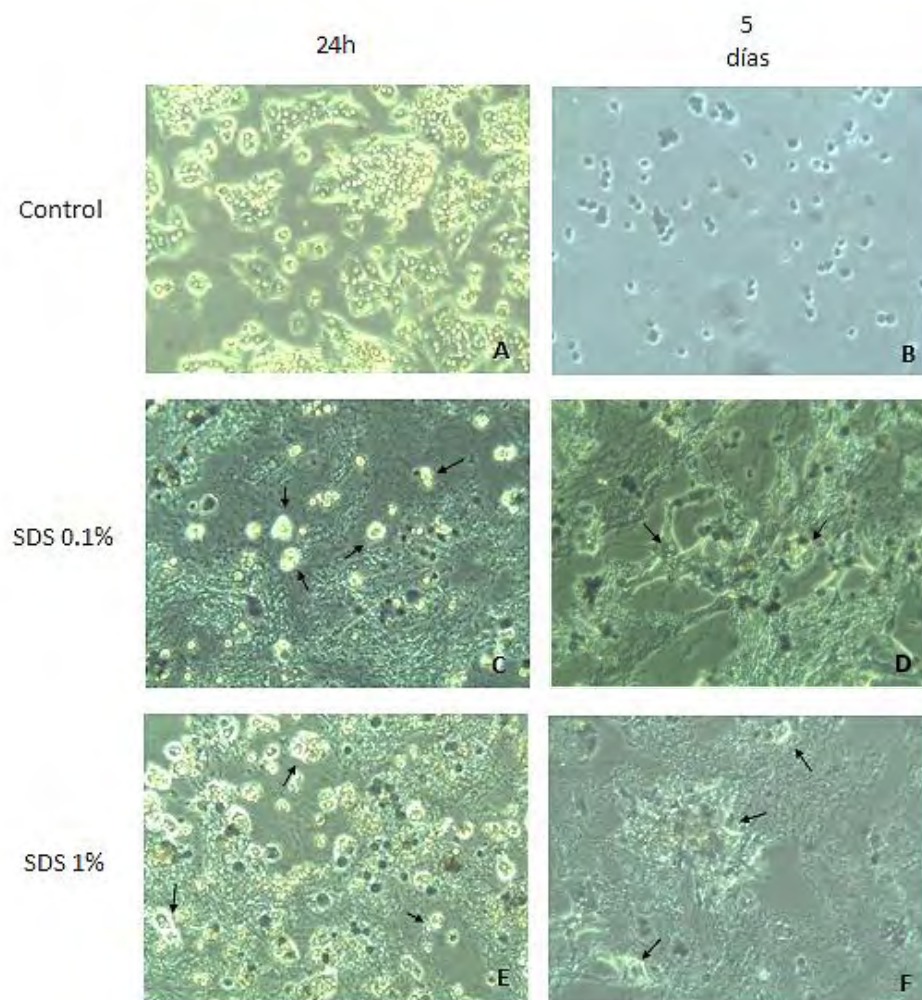


Figura 14. *Prueba de viabilidad celular*. Se agregó azul tripano tras 24 horas y 5 días en los grupos control (A y B), SDS 0.1% (C y D) y SDS 1% (E y F). Las flechas color negro muestran los hepatocitos que permanecen viables. A) se considera que todos los hepatocitos mostrados son viables. Amplificación de las fotografías 10X.

Tras 24 horas la matriz obtenida tras el tratamiento con SDS al 1% mostró tener una mayor adherencia de células sobre ella y más hepatocitos contiguos formando estructuras semejantes a tejido en comparación con el grupo SDS 0.1%, al observar la tinción con azul tripano (Fig 14E) se corroboró la presencia de numerosos hepatocitos vivos. Después de 5 días se observó que la mayoría de los hepatocitos se encontraban transdiferenciados o muertos, y sólo unos pocos permanecieron vivos sobre la matriz, como se muestra en la figura 14F.

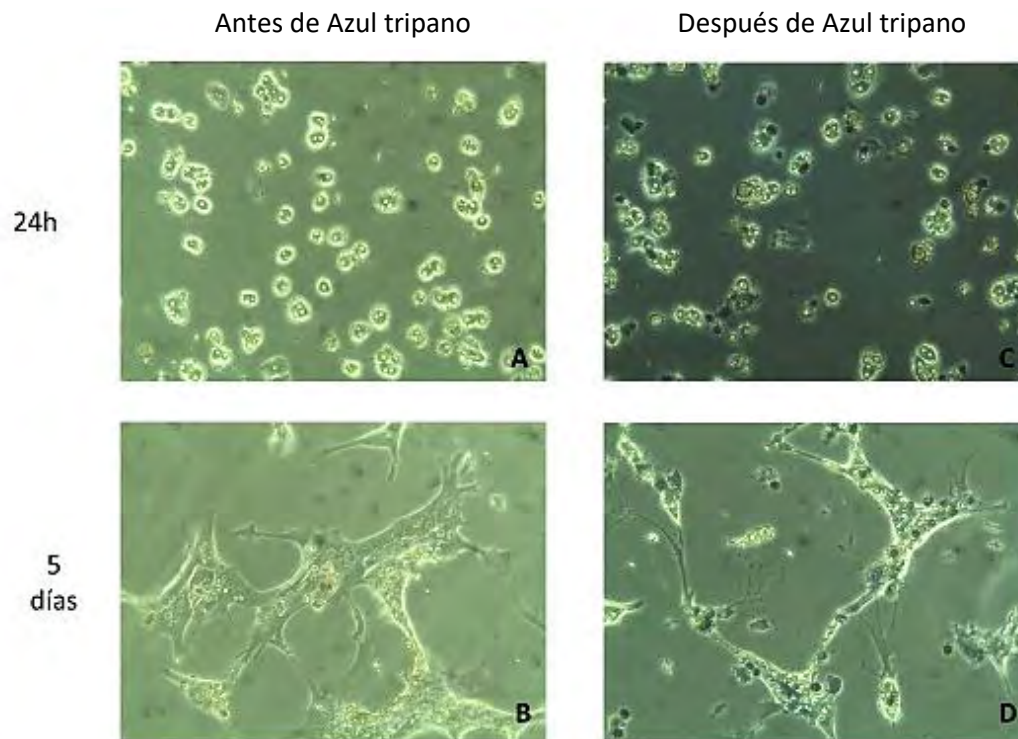


Figura 15. *Células adheridas al vidrio del portaobjetos*. Previo al montaje del corte de matriz los portaobjetos fueron tratados con poli-L-lisina y antes de la siembra con el medio "attachment". Las fotografías fueron tomadas antes (A y B) y después (C y D) de la prueba de viabilidad con azul tripano. Amplificación de todas las fotografías 10X.

Se observaron células que se adhirieron al vidrio del portaobjetos lejos del corte de matriz, pero únicamente en la zona donde se había incubado con el medio "attachment". A las 24 horas, se observó una cantidad considerable de hepatocitos contiguos, tras 5 días en cultivo se encontraron pocas células altamente transdiferenciadas. El corte de matriz, ya fuera del grupo SDS 0.1% o 1% no fue factor para este resultado.

Discusión

Los hepatocitos primarios son lo más cercano que se tiene a un hígado *in vitro* para realizar estudios sobre metabolismo de fármacos, regeneración hepática, enfermedades parasitarias o causadas por virus, o bien patologías más complejas como la fibrosis o el cáncer. El mayor inconveniente que se presenta en los cultivos primario de hepatocitos es el cambio en su fenotipo, que conlleva a la pérdida de las funciones tan preciadas de estas células (Maruel, 2010). Diversos estudios han demostrado que la matriz extracelular desempeña un papel muy importante en mantener la polaridad y las funciones de los hepatocitos en cultivo, al aislarla y utilizarla como sustrato de adhesión para las células o bien para complementar el medio de cultivo se ha logrado extender el tiempo que los hepatocitos en cultivo primario permanecen con su fenotipo diferenciado.

Tras los lavados con los diferentes detergentes se demostró que el Triton X-100 es el detergente menos indicado para descelularizar hígado de cerdo por el método de agitación, ya que las muestras de hígado conservaron un color rosado, y las tinciones histológicas revelaron que el tejido en vez de haber perdido las células de su interior, perdió fragmento completos de tejido, los cuales fueron observados como espacios blancos irregulares en las tinciones de HyE y Masson, en cuanto a éste detergente los resultados obtenidos fueron semejantes a los reportados por Park y colaboradores en 2013, donde se utilizó matriz extracelular de hígado de cerdo para estudiar la respuesta inmune de la misma al ser implantada de manera subcutánea en cerdos experimentales. En ambos grupos tratados con SDS mostraron resultados diferentes a los del grupo de investigación previamente mencionado, donde se encontró que la concentración más eficiente para descelularizar el hígado de cerdo es 0.1% (Park et al., 2013), esto puede deberse a la diferencia en el tratamiento de la muestra previo al protocolo de descelularización, por ejemplo, en el estudio realizado por Park et al el hígado fue perfundido con heparina antes de tomar los fragmentos a tratar, para este trabajo no se utilizó heparina ni ningún otro anticoagulante, además de que el hígado permaneció congelado a -20°C hasta su uso.

El colapso de la microestructura del lobulillo hepático en el grupo SDS 0.1% puede haber ocurrido porque el procedimiento fue realizado a temperatura ambiente la cual permite la acción de diversas enzimas que al lisarse las células quedaron libres en el medio, las cuales digirieron la

matriz, y la baja concentración de SDS no fue suficiente para desnaturalizarlas a diferencia del grupo tratado con SDS al 1%. Si bien el SDS ha sido reportado como un efectivo detergente para la descelularización del hígado (Park et al, 2013) (Uygun et al, 2010), éste puede ser más efectivo para preservar la microestructura de la matriz cuando se utiliza en perfusión, ya que los restos celulares salen del tejido y no permanecen en contacto con este como sucede con el método de agitación utilizado en este trabajo, sin embargo la perfusión solamente puede aplicarse en modelos animales y no para muestras pequeñas, como biopsias humanas.

Por otra parte, ambos grupos tratados con SDS lograron conservar tanto la microestructura como las proteínas laminina y fibronectina, lo que indica que estas proteínas de MEC sobreviven al proceso de aislamiento, fijado y deshidratación y pueden ser utilizadas posteriormente para el cultivo de células. Kock et al. en 2011 demostraron que al perfundir el hígado de rata con una combinación de los detergentes utilizados en este proyecto es posible preservar tanto las proteínas de la MEC como diversos factores de crecimiento importantes en la adhesión celular. El hígado de cerdo es descelularizado igualmente utilizando únicamente el detergente SDS y sin la necesidad de utilizar un sistema de perfusión, además de que preserva efectivamente las proteínas laminina y fibronectina, y posiblemente otros factores favorables para el cultivo de los hepatocitos que hicieron posible la adhesión de los hepatocitos.

Se cree que la unión de los hepatocitos a la MEC podría ser especie específica, sin embargo, Loneker, Faulk, Hussey, D'Amore, & Badylak demostraron que hidrogeles suplementados con MEC de cerdo favorecía el cultivo de hepatocitos primarios de rata, lo que nos da la oportunidad de utilizar de igual manera la MEC de otras especies para el estudio de hepatocitos humanos.

Cabe la posibilidad de que el tratamiento con poli-L-lisina en los portaobjetos ayudara a la adhesión de las células y por esto se haya observado más densidad celular en el vidrio del portaobjetos, en vez de en el corte de matriz, sin embargo, las células no son viables y al poco tiempo las células se desprendieron del vidrio y en vez de perder su fenotipo, murieron en su mayoría, a diferencia del corte de matriz, donde las células fueron observadas hasta los 5 días de cultivo. Esto demuestra que los hepatocitos primarios de rata son capaces de reconocer y permanecer adheridos al corte de matriz extracelular de hígado de cerdo. A pesar de esto los hepatocitos mostraron una forma alargada, por lo que podemos decir que perdieron su fenotipo

a los 5 días de cultivo. El que permanezcan vivos abre la posibilidad de manipular el medio de cultivo o el mismo corte para evitar la pérdida del fenotipo. Phillips & Shephard describen que para cultivar hepatocitos en colágena es necesario una concentración de 3mg/ml, además de la adición de varios factores como insulina y glucocorticoides; a largo plazo, las uniones célula-célula se vuelven más importantes, en el corte histológico de MEC es difícil decir la concentración de colágena en la cual los hepatocitos fueron sembrados (Phillips & Shephard, 2005).

Para llevar a cabo la siembra de los hepatocitos es necesario trabajar en condiciones de esterilidad, debido a ello es necesario filtrar los medios de cultivo, utilizar material estéril para la manipulación y asegurarse que el andamio donde los hepatocitos van a ser sembrados se encuentre estéril, para lograr esto último se expuso a luz UV tanto a las cajas Petri con colágena comercial como a los cortes de matriz rehidratados. Se sabe que la luz uv puede afectar la estructura terciaria de las proteínas, particularmente afecta los residuos aromáticos y los puentes disulfuro, este efecto se ha demostrado para las proteínas presentes en el suero bovino (Neves-Petersen, Gajula, & Petersen, 2012). La laminina al ser rica en cisteína (Sasaki, Kleinman, Huber, Deutzmann, & Yamada, 1988) bien podría ser modificada por el efecto de la luz UV durante el proceso de esterilización antes de la siembra de los hepatocitos, desnaturalizándola, haciendo que los hepatocitos no puedan utilizarla para ayudar la adhesión celular al corte de MEC, pudiendo limitar la adhesión de las células y por esta razón no observamos una adherencia uniforme de las células.

Conclusión

En el presente trabajo se ha mostrado que la matriz extracelular de hígado de cerdo es eficientemente descelularizada con el uso del detergente SDS a una concentración de 0.1 y 1% mediante el uso de la agitación, sin necesidad de perfundir el tejido, lo que da la posibilidad de estudiar con este método muestras provenientes de órganos completos. La microestructura y las proteínas laminina, fibronectina y colágena son mejor preservadas a una concentración de 1%. Además, es posible utilizar dicha MEC aislada para el cultivo de hepatocitos aún después de que

ha atravesado el proceso de fijación, deshidratación y que haya sido embebida en parafina para su estudio histológico.

El continuar con el estudio de la modificación de técnicas de cultivo es importante para el desarrollo de la investigación clínica de enfermedades como la fibrosis hepática o el cáncer hepatocelular, donde se sabe que la MEC sufre cambios importantes que afectan el funcionamiento y regeneración de los hepatocitos *in vivo*.

Bibliografía

1. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 1999. Reseña Toxicológica del Formaldehído (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). Molecular Biology of the Cell. Journal of Chemical Information and Modeling (6th ed.). Garland Scienci. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
3. Arenas, L. A. S., & de Zurbarán, C. B. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. Salud Uninorte, 16, 9–18.
4. Arii, S., & Imamura, M. (2000). Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 7(1), 40–48. <http://doi.org/10.1007/s005340000070040.534>
5. Basak E Uygun and Martin L Yarmush. (2013). Engineered liver for transplantation. Current Opinion in Biotechnology, 24, 893-899.
6. Berrier A., Yamada K. (2007) Cell-Matrix adhesion. Journal of Cellular Physiology 213:565-573.
7. Brown, B., Lindberg, K., Ph, D., Reing, J., Stolz, D. B., Ph, D., ... Ph, D. (2006). The Basement Membrane Component of Biologic Scaffolds Derived from Extracellular Matrix, 12(3).
8. Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, D. V. M. (2011). NIH Public Access. Biomaterials, 32(12), 3233–3243. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.An>

9. D.M. Faulk, C.A. Carruthers, H.J. Warner , C.R. Kramer , J.E. Reing , L. Zhan, A. D'Amore , S.F. Badylak. (2014). The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomaterialia*, 10, 183-193.
10. Durneej M. (2010) Laminins. *Cell and Tissue Research*. 339:259-268
11. Frantz, C., Stewart, K.M., Weaver, V.M., (2010) The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.* 123 (Pt 24), 4195–4200.
12. Gissen, P., & Arias, I. M. (2015). Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *Journal of Hepatology*, 63(4), 1023–1037. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.015>
13. Gordon, M. K., & Hahn, R. A. (2010). NIH Public Access. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 247–257. <http://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>.Collagens
14. Hansen, N. U. B., Genovese, F., Leeming, D. J., & Karsdal, M. A. (2015). The importance of extracellular matrix for cell function and in vivo likeness. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2), 286–294. <http://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.006>
15. Hernández Bazán, V. (2012). *Análisis de la expresión de moléculas de adhesión y de matriz extracelular en células U-937 estimuladas a través de la aminopeptidasa N (CD13)* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.
16. Hynes R, Yamada K. (1982). Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol*; 95: 369-377.
17. Jung Seung Lee, Jisoo Shin, Hae-Min Park, Yun-Gon Kim, Byung-Gee Kim, Jong-Won Oh and Seung-Woo Cho. (2014). Liver Extracellular Matrix Providing Dual Functions of Two-Dimensional Substrate Coating and Three-Dimensional Injectable Hydrogel Platform for Liver Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 15, 206-218.
18. Khalaj, Z., Lotfi, A. S., & Kabir-Salmani, M. (2016). Laminin matrix promotes hepatogenic terminal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1), 34–42.
19. Kock, J. De, Ceelen, L., Spiegelaere, W. De, & Rogiers, V. (2011). Simple and quick method for whole-liver decellularization : a novel in vitro three-dimensional bioengineering tool ? *Toxicokinetics and Metabolism*, 85, 607–612. <http://doi.org/10.1007/s00204-011-0706-1>

20. Lebleu, V.S., Macdonald, B., Kalluri, R., (2007) Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 232 (9), 1121–1129.
21. Lee, S. M. L., Schelcher, C., Demmel, M., Hauner, M., Thasler, W. E. (2013). Isolation of Human Hepatocytes by a Two-step Collagenase Perfusion Procedure. *J. Vis. Exp. (79)*, e50615, doi:10.3791/50615.
22. Loneker, A. E., Faulk, D. M., Hussey, G. S., D'Amore, A., & Badylak, S. F. (2016). Erratum: Solubilized liver extracellular matrix maintains primary rat hepatocyte phenotype in-vitro (*Journal of Biomedical Materials Research - Part A* (2016) 104A (957-965)). *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 104(7), 1846.
<http://doi.org/10.1002/jbm.a.35778>
23. Lucena, Sara, Arocha Piñango, Carmen Luisa, & Guerrero, Belsy. (2007). Fibronectina: Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. Revisión. *Investigación Clínica*, 48(2), 249-262.
24. Martinez-Hernandez A, Delgado FM, Amenta P. (1991) The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. *Lab Invest*; 64:157-166.
25. Maruel, P. (2010). *Hepatocytes, Methods and Protocols*. Humana Press.
26. Meredith J. E., Fazeli B. & Schwartz M. (1993) The Extracellular Matrix as a Cell Survivor Factor. *Molecular Biology of the Cell* 4:953-961.
27. Neves-Petersen, M. T., Gajula, G. P., & Petersen, S. B. (2012). UV Light Effects on Proteins : From Photochemistry to Nanomedicine. *Molecular Photochemistry - Various Aspects*, 125–158. <http://doi.org/10.5772/37947>
28. Okazaki, I., Yonezawa, T., & Mayne, R. (1996). *New Insights into the Extracellular Matrix*, (ii).
29. Park, K. M., Park, S. M., Yang, S. R., Hong, S. H., & Woo, H. M. (2013). Preparation of immunogen-reduced and biocompatible extracellular matrices from porcine liver. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(2), 207–215.
<http://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.08.023>

30. Pedersen, J.A., Lichter, S., Swartz, M.A., (2010) Cells in 3D matrices under interstitial flow: effects of extracellular matrix alignment on cell shear stress and drag forces. *J. Biomech.* 43 (5), 900–905.
31. Phillips, I. R., & Shephard, E. A. (2005). *Cytochrome P450 Protocols (second)*. New Jersey: Humana Press.
32. Phillips, I. R., & Shephard, E. A. (n.d.). *Cytochrome P450 Protocols (second)*. New Jersey: Humana Press.
33. Rizzo, Donald C. (2010). *Fundamentals of anatomy and physiology*. Third edition. United States of America: Delmar, Cengage Learning.
34. Rodes, J., Benhamou, J.-P., Blei, A., Reichen, J. & Rizzetto, M. (2007) *Textbook of Hepatology*. (ed.) (Blackwell).
35. Rozario, T., & DeSimone, D. W. (2010). The Extracellular Matrix In Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Developmental Biology*, 341(1), 126–140. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.026>
36. Salmeron-Sanchez M, Rico P, Moratal D, Lee TT, Schwarzbauer JE, García AJ. (2011) Role of material-driven fibronectin fibrillogenesis in cell differentiation. *Biomaterials*; 32:2099-105.
37. Sasaki, M., Kleinman, H. K., Huber, H., Deutzmann, R., & Yamada, Y. (1988). Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 16536–16544.
38. Senoo, H., Yoshikawa, K., Morii, M., Miura, M., Imai, K., & Mezaki, Y. (2010). Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell Biology International*, 34(12), 1247–1272. <http://doi.org/10.1042/CBI20100321>
39. Shen, C.-N., Burke, Z. D., & Tosh, D. (2004). Transdifferentiation, metaplasia and tissue regeneration. *Organogenesis*, 1(2), 36–44. <http://doi.org/10.4161/org.1.2.1409>
40. Shute, J., (2012) Glycosaminoglycan and chemokine/growth factor interactions. *Handb. Exp. Pharmacol.* 207, 307–324
41. Silvera Arenas Luz Alba & Barrios de Zurbarán Carmen. (2002). La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*, 16, 9-18

42. Smith, M. L., Gourdon, D., Little, W. C., Kubow, K. E., Eguiluz, R. A., Luna-Morris, S., & Vogel, V. (2007). Force-Induced Unfolding of Fibronectin in the Extracellular Matrix of Living Cells. *PLoS Biology*, 5(10), e268. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050268>
43. Sosa-Garrocho, Marcela. (2016). Aislamiento de células hepáticas. En: "Avances en el Estudio Experimental de la Bioquímica Hepática". (EN EDICION)
44. Tickle, C. (n.d.). Matriz extracelular animal. Retrieved from <http://lacelula.udl.es/aprendre/casos/pdf/MEC.pdf>
45. Tiffany L. Sellaro, Aarati Ranade, Denver M. Faulk, George P. McCabe, Kenneth Dorko, B.S., Stephen F. Badylak, D.V.M., and Stephen C. Strom. (2010). Maintenance of Human Hepatocyte Function In Vitro by Liver-Derived Extracellular Matrix Gels. *TISSUE ENGINEERING*, 16, 1075-1082.
46. Timothy J. Keane, Ricardo Londono, Neill J. Turner and Stephen F. Badylak.. (2012). Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*, 33, 1771-1781.
47. Tortora, G. and Derrickson Wiley, B. (2012). *Principles of Anatomy and Physiology* 13th Ed. United States of America, BBS.
48. Usta, O. B., Mccarty, W. J., Bale, S., Hegde, M., Jindal, R., Bhushan, A., Yarmush, M. L. (2015). Microengineered cell and tissue systems for drug screening and toxicology applications: Evolution of in-vitro liver technologies. *Technology*, 3(1), 1–26. <http://doi.org/10.1142/S2339547815300012>
49. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. (2010). Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 16(7):814–820.
50. Vera Gómez, E. (2013). LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA 3 (TGF- β 3) DURANTE LA REPARACIÓN DE UNA HERIDA DE ESPESOR TOTAL EN LA OREJA DEL RATÓN. Universidad Nacional Autónoma de México, FES Zaragoza.
51. Wenxia Zhang, Lisa Tucker-Kellogg, B.C. Narmada, Lakshmi Venkatraman, Shi Chang, Yin Lu, Nancy Tan, Jacob K. White, Ruirui Jia, Sourav Saha Bhowmick, Shali Shen, C. Forbes

- Dewey Jr., Hanry Yu. (2010). Cell-delivery therapeutics for liver regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 814–826.
52. Y.N. Kallis, A. J. Robson, J. A. Fallowfield (2011). Remodelling of extracellular matrix is a requirement for the hepatic progenitor cell response. *Gut*, vol. 60, no. 4, pp. 525–533.
53. Yanger, K., Zong, Y., Maggs, L. R., Shapira, S. N., Maddipati, R., Aiello, N. M., ... Stanger, B. Z. (2013). Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes and Development*, 27, 719–724.
<http://doi.org/10.1101/gad.207803.112>

Anexo

SDS

10g de SDS (Sigma) fueron diluidos en 100mL de agua destilada para obtener una solución stock al 10%. A partir de esta se hicieron las disoluciones pertinentes.

Triton

10ml de Triton X-100 fueron diluidos en 100ml de agua destilada para obtener una solución stock al 10%. A partir de esta se hicieron las disoluciones pertinentes.

PBS

Se preparó 1L a 10X del cual se hizo la disolución a 1X

NaCl.....80.6g

KCl.....2.2g

Na₂HPO₄.....11.5g

KH₂PO₄.....2g

Krebs-Ringer 1L

NaCl.....7.5g

KH₂PO₄ (10.55%).....1.63ml

MgSO₄ (19.1%).....1.63ml

KCl (5.75%).....6.51ml

NaHCO₃ (6%).....13-18ml

Krebs-Ringer + CaCl₂

Solución de KR (300ml) + CaCl₂ concentración final 1.27 mM (800µl de Sol. al 7.85%)

Percoll

Percoll.....180 ml

HBSS.....18 ml

HEPES.....2 ml

Azul Tripano

Solución al 0.4% en KR/Ca²⁺

Colágena tipo I

1 mg/ml en Ácido Acético 0.02M

Medio de Attachment 1L

DMEM.....500ml
BSA.....100mg
Hepes (1M).....1.5ml
Piruvato de sodio (100mM).....5ml
NaH₂CO₃255mg
Galactosa.....500mg
Prolina.....15mg
Glutamina (200mM).....10ml
Gentamicina (50mg/ml).....0.5ml
Penicilina/Estreptomicina 100X.....5ml
ITS (+).....5ml
Suero bovino fetal.....50ml

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C

Medio de Feeding

DMEM.....500ml
BSA.....100mg
Hepes (1M).....1.5ml
Piruvato de sodio (100mM).....5ml
NaH₂CO₃255mg
Galactosa.....500mg
Prolina.....15mg
Glutamina (200mM).....10ml
Gentamicina (50mg/ml).....0.5ml
Penicilina/Estreptomicina 100X....5ml
ITS (+).....5ml

Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C