

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

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS CELULARES
TUBULARES POR METODOLOGÍA DE DESCELULARIZACIÓN**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

PRESENTA:

DAVID EDUARDO ABAD CONTRERAS

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA CRISTINA PIÑA BARBA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. DAVID MAURICIO GIRALDO GÓMEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.
DR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ PÉREZ
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A Artemisa,

*Lo logramos, entre muchas cosas
más.*

*A la familia que estoy formando:
Casilda, Helga y Pichirilo.*

Agradecimientos

A la **Dra. María Cristina Piña Barba**, por su asesoría, por brindarme el apoyo y los recursos necesarios para realizar este proyecto, por su guía, su confianza, paciencia y amistad.

Al **Dr. David Mauricio Giraldo Gómez**, por la dirección, coordinación y apoyo, con su experiencia y recursos para realizar el proyecto, por su confianza y guía.

Al **Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez** por su apoyo académico y técnico, por su comprensión y confianza.

A mis compañeros de laboratorio de Biomateriales del IIM de la UNAM: Tannia, Juan Manuel y José Luis, por su apoyo constante y compañerismo. A Emilio e Isaac por su apoyo en el desarrollo de este proyecto. A Yolik por su inquietud e iniciativa. A Karen y Lorena, sin su trabajo y apoyo constante este proyecto no sería el mismo.

A los técnicos: por su gran trabajo y el apoyo que me brindaron siempre, sin ellos no hubiera sido posible este trabajo: al Dr. Omar Novelo y al Fis. Carlos Flores del Instituto de Investigaciones en Materiales. Al Biol. Armando Zepeda y Francisco Pasos del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Medicina. A la Biol. Julieta García del Instituto de Nacional de Rehabilitación. A la I.Q. Karla Eriseth Reyes Morales del Laboratorio de Análisis Térmico del Instituto de Investigaciones en Materiales. A la Biol. Verónica Rodríguez de la Facultad de Medicina. A la Biol. Ivonne Sánchez, Biol. Irma López y M.C. Elba Carrasco de la Unidad de Microscopía de la Facultad de Medicina. Al Dr. Carlos Arturo Hinojosa Becerril, al Dr. Leonardo A. Rodríguez y al Lic. Miguel Ángel Méndez Sosa del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. A la Dra. Patricia González del Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos del Posgrado de Odontología.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría.

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)**, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM, a través de los proyectos con clave IT100117 y TA200520.

A la **coordinación** y al **personal administrativo** del Posgrado de Ciencia e Ingeniería de Materiales, por su apoyo y compromiso.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** a través del **Instituto de Investigaciones en Materiales** y al **Posgrado en Ciencia e Ingeniería de Materiales**, por formarme como profesionalista.

A mis amigos que han estado ahí para darme un consejo, darme una mano, escuchar atentamente o solo estar junto a mí. En especial a María.

A mi familia, por su apoyo, contención, sabiduría y amor. A todas sus ramas.

RESUMEN

Los procesos de descelularización tienen una gran ventaja sobre cualquier tipo de sustituto, cuando de andamios se habla, se busca crear andamios descelularizados para su posterior aplicación en Ingeniería de Tejidos y como propuesta para investigaciones en Medicina Regenerativa.

Los protocolos de descelularización son específicos para cada órganos o tejidos, variando incluso entre especies y en el uso que se le dará al andamio descelularizado. En este trabajo se compara como el protocolo de descelularización desarrollado en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, aplicado a dos tejidos diferentes resulta efectiva para la utilización de los andamios tubulares resultantes en Ingeniería de Tejidos.

Se obtuvieron andamios tubulares de Vía Biliar de Cerdo joven y Arteria Humana descelularizados, se realizaron caracterizaciones fisicoquímicas e histológicas de dichos tejidos nativos y se compararon con los andamios de matriz extracelular, resultantes de su descelularización.

Esto en respuesta a la gran demanda de órganos para trasplantes que se tiene en México y a las largas listas de espera para poder recibir un órgano. Generando además una posible alternativa para el tratamiento de padecimientos en los que la alta tasa de rechazos en procedimientos anteriores ha provocado que no exista protocolos de trasplante para muchos órganos.

Las técnicas histológicas utilizadas en este trabajo mostraron un protocolo de descelularización efectivo, además de la preservación de la matriz extracelular y de su comportamiento térmico después de haber aplicado el protocolo de descelularización sobre las muestras.

Para medir la efectividad del protocolo de descelularización se realizó la técnica histológica de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E), para comparar los resultados en los tejidos nativos con los de las muestras descelularizadas, cuantificando estos resultados con el software de procesamiento digital de imágenes Image J.

Las demás caracterizaciones se centraron en la evaluación de la arquitectura de la matriz extracelular posterior a la aplicación del protocolo de descelularización.

En todas las caracterizaciones reportadas en este trabajo se muestra una eficiencia del protocolo de descelularización de un $86.8\% \pm 6.83\%$ para la vía biliar de cerdo y de $93.7\% \pm 12.7\%$ para la Arteria Humana, además de la preservación de la Matriz Extracelular, tanto en Vía Biliar de Cerdo como en arteria humana.

ABSTRACT

Decellularization processes have a great advantage over any type of substitute, when we talk about scaffolds, we seek to create decellularized scaffolds for subsequent application in Tissue Engineering and as a proposal for research in Regenerative Medicine.

Decellularization protocols are specific for each organ or tissue, even varying between species and in the use that will be given to the decellularized scaffold. In this work it is compared how the decellularization protocol developed in the Biomaterials Laboratory of the Materials Research Institute of UNAM, applied to two different tissues, is effective for the use of the resulting tubular scaffolds in Tissue Engineering.

Decellularized tubular scaffolds of the bile duct of young pig and human artery were obtained, physicochemical and histological characterizations of said native tissues were performed and they were compared with the extracellular matrix scaffolds, resulting from their decellularization.

This is in response to the great demand for organs for transplantation in Mexico and the long waiting lists to receive an organ. Also generating a possible alternative for the treatment of conditions in which the high rate of rejections in previous procedures has caused that there are no transplant protocols for many organs.

The histological techniques used in this work showed an effective decellularization protocol, in addition to the preservation of the extracellular matrix and its thermal behavior after having applied the decellularization protocol on the samples.

To measure the effectiveness of the decellularization protocol, the histological technique of Hematoxylin and Eosin (H&E) staining was performed, to compare the results in native tissues with those of decellularized samples, quantifying these results with the Image J digital image processing software.

The other characterizations focused on the evaluation of the architecture of the extracellular matrix after the application of the decellularization protocol.

All the characterizations reported in this work show an efficiency of the decellularization protocol of $86.8\% \pm 6.83\%$ for the pig bile duct and $93.7\% \pm 12.7\%$ for the human artery, in addition to the preservation of the extracellular matrix, both in the pig bile duct and in the human artery.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
INTRODUCCIÓN	8
OBJETIVO Y METAS.....	10
1. Justificación.....	11
1.1 Trasplantes, un problema sin resolver.....	11
1.2 Vía Biliar.....	13
1.2.1 Lesiones de Vía Biliar	14
1.3 Arteria.....	16
1.3.1 Injertos Vasculares	19
2. Marco teórico.....	21
2.1 Ingeniería de Tejidos	21
2.2 Matriz Extracelular	22
2.2.1 Colágena	23
2.3 Descelularización.....	25
2.3.1 Métodos de Descelularización	26
2.3.1.1 Agentes Físicos	27
2.3.1.1.1 Perfusión	28
2.3.1.1.2 Agentes Químicos	28
2.3.1.1.3.1 Dodecil Sulfato de Sodio SDS	29
2.3.1.1.3 Agentes Biológicos.....	30
2.3.1.1.3.1 DNasa	30
2.3.1.1.3.2 Hidrólisis enzimática	31
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	32
3.1 Procuración de las Muestras.....	32
3.1.1 Vía Biliar Porcina.....	32
3.1.2 Arteria Humana	33
3.2 Preparación de la Muestra para su Caracterización	34

3.3	Protocolo de Descelularización	35
3.4	Efectividad del Proceso de Descelularización	37
3.4.1	Histología.....	38
3.4.1.1	Tinción Hetoxilina y Eosina H&E.....	41
3.5	Preservación de la Matriz Extracelular.....	42
3.5.1	Histología.....	42
3.5.1.1	Tinción Tricrómica de Masson	42
3.5.2	Microscopía Electrónica de Barrido	44
3.5.3	Caracterización Térmica	45
3.5.3.1	Análisis Termogravimétrico.....	45
3.5.3.2	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	46
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1	Efectividad del Proceso de Descelularización	48
4.2	Preservación de la Matriz Extracelular.....	52
4.2.1	Tinción Tricrómica de Masson y Microscopía Electrónica de Barrido	53
4.2.2	Caracterización Térmica	56
	CONCLUSIONES	67
	PERSPECTIVAS	68
	BIBLIOGRAFÍA	69
	ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Comparativa de trasplantes realizados, por institución, en México.[1]	12
Fig. 2. Diagrama de la vesícula biliar, los conductos biliares extrahepáticos, el páncreas, el duodeno y los conductos excretores asociados.[30].....	13
Fig. 3. Fotomicrografía electrónica de barrido de la superficie luminal del conducto biliar recubierto por colangiocitos.[30]	14
Fig. 4. Esquema de las principales características de los vasos sanguíneos.[30]	17
Fig. 5. Diagrama de una arteria muscular.[30]	19
Fig. 6. Estructura general de un aminoácido.[59]	23
Fig. 7. Esquema de la estructura de la colágena. Estructura de triple hélice dextrógira y puentes de hidrógeno entre las cadenas.[60]	24
Fig. 8. Influencia de la concentración micelar crítica en presencia de proteínas. Imagen modificada.[78]	29
Fig. 9. Extracción del conducto biliar extrahepático. (A) Cirugía de extracción. (B) Colédoco canalizado.....	33
Fig. 10 Arteria humana, después de la remoción de tejido adiposo circundante.....	34
Fig. 11. Proceso de descelularización, (A) con dos bombas peristálticas funcionando y 4 muestras dentro de los frascos, sometidas al proceso. (B) Flujo de las disoluciones descelularizantes en el circuito cerrado (muestra señalada con flecha amarilla).....	36
Fig. 12. Agitación de las muestras histológicas, en proceso de deshidratación.	38
Fig. 13. Secado de laminillas después de los procesos de tinción.....	44
Fig. 14. Equipo para liofilización (Labconco).	45
Fig. 15. Equipo TGAQ5000, del Laboratorio de Análisis Térmico del IIM, UNAM.	46
Fig. 16. Equipo DSCQ100 del Laboratorio de Análisis Térmico del IIM, UNAM.	47
Fig. 17. Imagen comparativa de la muestra nativa contra la descelularizada, (A y B) VBC y (C y D) de AH.	48
Fig. 18. Efectividad del proceso de descelularización de VBC.....	50
Fig. 19. Efectividad del proceso de descelularización de AH.....	51
Fig. 20. Evidencias de la preservación de la MEC en las muestras de VBC, después de la aplicación del protocolo de descelularización (células señaladas con flecha amarilla).....	54
Fig. 21. Evidencias de la preservación de la MEC en las muestras de AH, después de la aplicación del protocolo de descelularización (células señaladas con flecha amarilla).....	55
Fig. 22. Perfil de análisis termogravimétrico de muestra nativa de VBC.	56

Fig. 23. Superposición de los perfiles de análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido de la VBC nativa.....	57
Fig. 24. Perfil del análisis de TGA de la VBC descelularizada.....	58
Fig. 25. Perfil del análisis de calorimetría diferencial de barrido y de análisis termogravimétrico de la VBC descelularizada.	59
Fig. 26. Superposición de los perfiles del análisis de TGA de las muestras nativa y descelularizada de VBC.....	60
Fig. 27. Superposición de los perfiles del análisis de DSC de las muestras nativa y descelularizada de VBC.....	61
Fig. 28. Perfil del análisis termogravimétrico de la muestra AH nativa.....	62
Fig. 29. Perfil del análisis termogravimétrico de la muestra AH descelularizada.....	63
Fig. 30. Superposición de los perfiles del análisis de TGA de las muestras nativa y descelularizada de AH.....	64
Fig. 31. Superposición de los perfiles del análisis de DSC de las muestras nativa y descelularizada de AH.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Personas en espera de trasplante en México, comparativa anual.[1,16,17]	11
Tabla 2. Características de los tipos de arteria.[20]	18
Tabla 3. Protocolo de descelularización aplicado.	37
Tabla 4. Proceso de deshidratación de tejidos e inclusión en parafina.	39
Tabla 5. Proceso de rehidratación de laminillas.....	40
Tabla 6. Tinción de H&E.	41
Tabla 7. Tinción tricrómica de Masson.....	43
Tabla 8. Porcentaje de descelularización de las muestras de VBC y AH, según la cuantificación realizada con el software Image J.	52

INTRODUCCIÓN

Llevar a cabo un trasplante exitoso representa una enorme problemática, si se toma en cuenta que, a pesar de todos los avances en agentes inmunosupresores, el rechazo agudo de un trasplante sigue estando en una escala del 20% al 40% de los casos, y aun así ningún trasplante es una solución permanente, ya que se sabe que todos los órganos trasplantados tienen un lento decaimiento en su función, cerca de un 5% anual. [1–4] Ante esta situación, nace un campo de investigación interdisciplinario que busca regenerar, mejorar, mantener o reemplazar funciones biológicas de los órganos y tejidos del cuerpo humano. La Ingeniería de Tejidos, busca como uno de sus principales objetivos la obtención de un andamio adecuado que sirva como soporte para el tejido y las células que se desean reparar. [5–8]

Para la reparación de tejidos es común el uso de polímeros sintéticos, naturales o la combinación de ambos, con lo que se trata de cumplir una serie de características valiosas en la fabricación de andamios. Cabe mencionar, que la selección del material es crucial para la creación de un andamio efectivo, y las características de dichos materiales están directamente relacionado con sus propiedades mecánicas, su perfil de degradación y la posibilidad de ser bioactivos en su composición o al liberar diversas sustancias una vez que son implantados; todas estas características tratan de imitar el funcionamiento biológico de los tejidos nativos. [9,10]

La posibilidad de regenerar tejidos con andamios descelularizados específicos es extremadamente atractiva y prometedora porque permite no solo preservar las características estructurales sino también las señales bioquímicas que pueden inducir una migración adecuada y el desarrollo normal de las células a través del andamio celular generado por esta técnica. [11]

La descelularización de órganos y tejidos es un método para obtención de andamios, que busca la eliminación del material celular de los órganos o tejidos naturales, que incluye la remoción de los antígenos celulares responsables de desencadenar respuestas inmunes, conservando la Matriz Extracelular (MEC) viable, la cual se compone de una mezcla de moléculas estructurales y funcionales. Las estrategias de la descelularización varían de acuerdo con la naturaleza de los tejidos, por lo que es preciso diseñarla adecuadamente para cada órgano o tejido en particular. [9,12–14]

Los protocolos de descelularización utilizan procesos físicos, químicos y biológicos que idealmente remueven los componentes celulares sin afectar adversamente la composición, organización, actividad biológica e integridad mecánica de la MEC nativa. [12,14]

En nuestro grupo de investigación se han venido desarrollando métodos de descelularización para diferentes tipos de tejidos y órganos completos como hueso (Nukbone), tráquea, corazón, riñón entre otros [11,12,15–19]. Sin embargo, cada tipo de protocolo debe ser ajustado a cada órgano o tejido en particular [6,14,20–22]. A la fecha no se ha estudiado la posibilidad de estandarizar un mismo protocolo a diferentes tipos de tejidos u órganos. Partiendo del protocolo de descelularización diseñado en nuestro grupo el cual se aplicó para descelularizar vías biliares extrahepáticas obtenidas de cerdo usando como agentes principales de descelularización el SDS y la DNasa[11], se propone ampliar la caracterización previa llevada a cabo la cual en su momento se centró en la estandarización del protocolo quirúrgico adecuado del tejido fuente sin embargo en este trabajo se propone determinar una cuantificación de la efectividad del proceso así como ampliar la caracterización de la MEC descelularizada obtenida.

Por otro lado se propone por primera vez el uso de un protocolo para la descelularización de un tejido diferente en este caso arteria humana (AH), de manera que se evaluarán los mismos parámetros para determinar la efectividad del proceso y evaluar la calidad de la MEC descelularizada obtenida y de este modo determinar el posible uso de dicho protocolo para la obtención de dos andamios tubulares de origen natural lo que implicaría un aporte importante en el desarrollo de protocolos de descelularización para este tipo de tejidos.

OBJETIVO Y METAS

Objetivo

Comparar los andamios tubulares provenientes de Arteria Humana y la Vía Biliar de Cerdo joven, obtenidos a través del mismo protocolo de descelularización.

Metas

- Evaluar la efectividad del protocolo de descelularización publicado por Ramírez-Marín.[11]
- Evaluar fisicoquímicamente la Matriz Extracelular de Vía Biliar de Cerdo descelularizada.
- Aplicación de protocolo de descelularización en Arteria Humana.
- Evaluar la efectividad del proceso de descelularización de Arteria humana.
- Caracterización fisicoquímica e histológica de la Matriz Extracelular resultante de la descelularización de Arteria Humana.

HIPÓTESIS

Aplicando un protocolo de descelularización que resultó adecuado para Vía Biliar de Cerdo joven, se puede obtener un andamio tubular descelularizado de Arteria Humana, adecuado para Ingeniería de Tejidos.

1. Justificación

1.1 Trasplantes, un problema sin resolver

Aún después de las pruebas de compatibilidad, factores como la edad del donador y del receptor, la resistencia o reactividad a ciertos fármacos y riesgos propios de las cirugías pueden provocar complicaciones en un procedimiento ya de por sí complicado como es el trasplante de órganos. La tendencia al aumento de personas en espera de trasplantes se incrementa en lugar de disminuir y tratamientos como la tolerancia inducida, el uso de xenotrasplantes (trasplantes provenientes de otra especie) y los tratamientos celulares en los órganos dañados, han fallado. [18,23,24][2]

Además, en muchos casos no existen estadísticas de ciertos órganos o tejidos trasplantados, ya que a la fecha, debido a sus altas tasas de rechazo, no hay protocolos que se puedan aplicar para tejidos como la tráquea o el intestino, entre otros. Este problema demanda la búsqueda de una estrategia quirúrgica definitiva para los pacientes que requieren soluciones, para los cuales el alotrasplante (trasplante proveniente de otro humano) no ha mostrado ser una solución. [25]

En México el incremento de personas en espera de trasplantes fue de un 11% del 2015 al 2018 (Tabla 1) y la tendencia sigue en aumento, ya que no se ha podido cubrir la necesidad de más de 20 mil personas que siguen en espera de algún órgano. A pesar de que se han diversificado las fuentes de donación de órganos: cuerpos cadavéricos, con muertes cerebral y donadores vivos y los esfuerzos del sector salud lograron un aumento de más de mil trasplantes realizados en ese mismo periodo de años (Fig. 1), aún se está muy lejos de encontrar una solución verdadera a dicha problemática. [1,26,27]

Tabla 1. Personas en espera de trasplante en México, comparativa anual.[1,26,27]

Año	Personas en Espera de Trasplante
2015	19, 729
2016	20, 388
2017	21, 270
2018	21, 893
2019 (primer semestre)	22, 290

Por otro lado, a pesar de todos los avances en agentes inmunosupresores, el rechazo agudo de un trasplante sigue siendo la falla más común (entre un 20% y un 40% de los casos) y la falta de recepción se presenta en el primer mes después de la cirugía. No obstante, aun en los casos en los que se observa un acoplamiento exitoso en los primeros meses, ningún trasplante es una solución permanente ya que en algún momento el órgano fallará, ya sea por consecuencias de la cirugía, por la condición de salud del paciente, por alguna otra patología o por el rechazo del cuerpo del paciente al órgano ajeno. Se sabe que hay un lento decaimiento en la función del trasplante y la estadística muestra que es cercano a un 5% anual. [1–4]

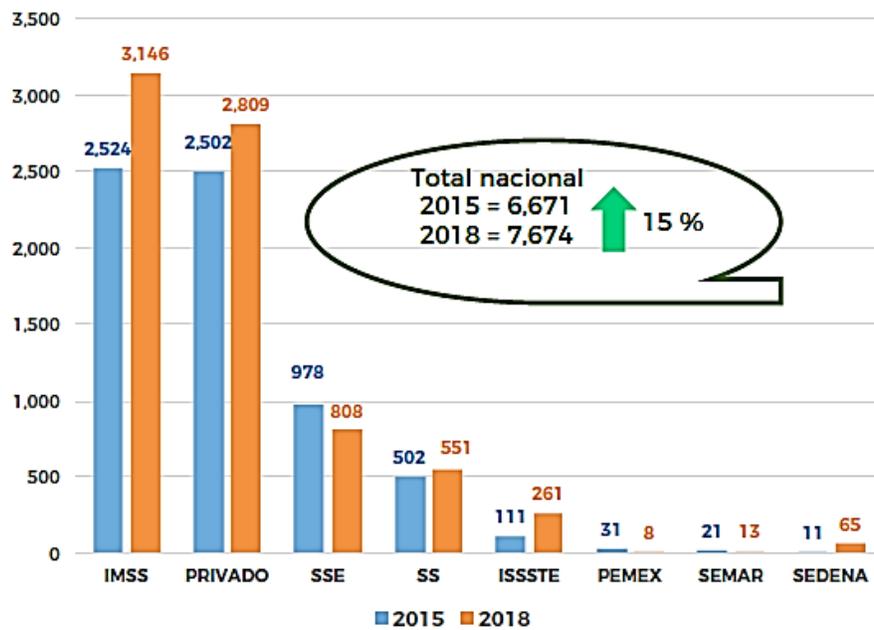


Fig. 1. Comparativa de trasplantes realizados, por institución, en México.[1]

1.2 Vía Biliar

Las principales funciones de la vía biliar extrahepática son las de almacenamiento y transporte de bilis, desde el hígado hasta la luz intestinal de la segunda porción del duodeno, para las funciones digestivas propias de este último. Está conformada por estructuras tubulares que pueden tener muchas variantes anatómicas, pero clásicamente se originan en el conducto hepático derecho e izquierdo, teniendo dos conductos iniciales, que confluyen en el conducto hepático común en el cual desemboca el cístico, formando el conducto colédoco. El conducto colédoco mide aproximadamente 8 a 11 cm de longitud y hasta 8 mm de diámetro (Fig. 2). [11,28,29]

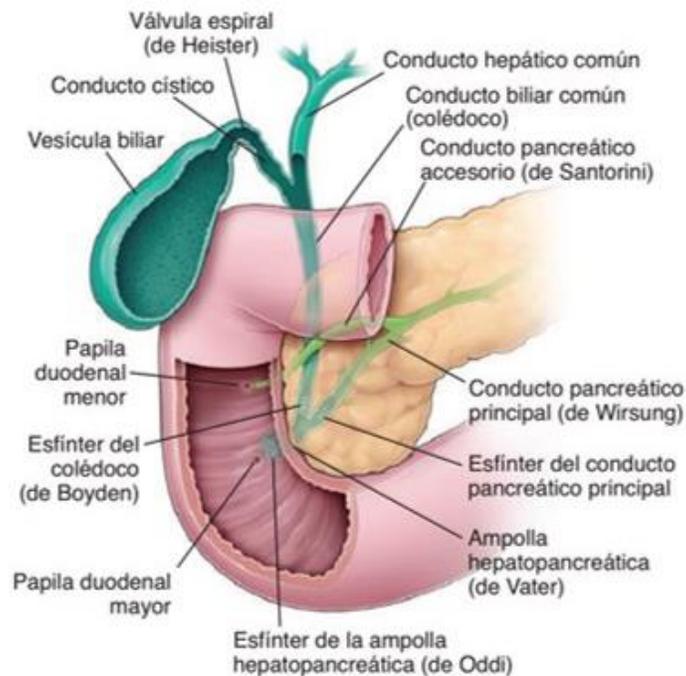


Fig. 2. Diagrama de la vesícula biliar, los conductos biliares extrahepáticos, el páncreas, el duodeno y los conductos excretores asociados.[30]

El árbol biliar tiene un revestimiento de colangiocitos, células epiteliales que vigilan el flujo biliar y regulan su contenido, la región apical de los colangiocitos tiene un aspecto semejante a la misma región de los hepatocitos por las microvellosidades que proyectan a la luz. Además cada colangiocito contiene cilios primarios que detectan los cambios en el flujo biliar que producen alteraciones en su secreción (Fig. 3).[30]



Fig. 3. Fotomicrografía electrónica de barrido de la superficie luminal del conducto biliar recubierto por colangiocitos.[30]

1.2.1 Lesiones de Vía Biliar

La complicación más temida en colecistectomía (extirpación de la vesícula biliar), es la lesión de vía biliar. La opción quirúrgica más usada para su reparación en el caso de lesiones complejas es la reconstrucción mediante la técnica llamada “Hepático yeyuno anastomosis en Y de Roux”, pero debido a las modificaciones anatómicas y fisiológicas en el sistema digestivo, son conocidas muchas de sus complicaciones postoperatorias.[11]

Las complicaciones por cirugía endoscópica de colecistectomía se dan entre 8% y 10% de los casos, pero la de complicaciones más graves son las lesiones iatrogénicas (provocadas por el médico), que además, en su mayoría no se detectan sino hasta 10 días después de la cirugía que causó el daño, produciendo un deceso del 11% y una disminución de la calidad de vida del resto de los pacientes afectados por este tipo de heridas, que requieren siempre una cirugía de corrección del árbol biliar. Este tipo de lesiones ha tenido un aumento en los últimos años, ya que por su mínima invasión, menor tiempo de recuperación y dolor del paciente, los cirujanos han optado por la cirugía laparoscópica; sin embargo se sabe que con la utilización de esta técnica, las lesiones iatrogénicas han aumentado. [29,31]

Actualmente la opción más usada para la reparación de lesiones complejas en vía biliar, es la hepático yeyuno anastomosis en Y de Roux, pero su completo éxito depende de la conjunción de muchos aspectos que deben de cumplir los pacientes que aspiran a esta cirugía, además de la técnica del cirujano, sin embargo, mejora la calidad de vida de las personas que se someten al procedimiento. No hay que olvidar que la hepático yeyuno anastomosis en Y de Roux, puede tener complicaciones tardías como colangitis recurrente, estenosis y cirrosis biliar secundaria, entre otras, explicadas por la unión antinatural de un epitelio con una mucosa, además de la ausencia del esfínter de Oddi, provocando reflujo hacia el árbol biliar. [11,32–35]

Se han realizado intentos de reparación parcial o total de la vía biliar, con materiales sintéticos o biológicos, sin embargo, aún no se ha logrado un material que tenga las características necesarias para un andamio efectivo. La descelularización de VBC se muestra como una alternativa probable para la reparación de las lesiones en dicho tejido. [36–38]

Se han realizado con anterioridad investigaciones de regeneración de vía biliar extrahepática en lesiones de modelos porcinos, con andamios descelularizados con repoblación celular *in situ* exitosa, a partir de andamios provenientes de conductos urinarios. Probando que ciertos tejidos estructurales pueden ser remplazados con andamios descelularizados, sin mayor problema, logrando una repoblación y diferenciación celular por mecanotrasducción exitosas. Sin embargo, no existe algún trabajo reportado en el desarrollo de andamios acelulares precedentes de vía biliar extrahepática con el fin de la regeneración del mismo tejido, manteniendo su misma fisiología e histología. [39,40]

1.3 Arteria

Las arterias y venas en principio tienen una anatomía similar, están compuestas por 3 capas llamadas túnicas, que desde la luz hacia el exterior de esta se describen de la siguiente forma:

- **Túnica íntima**, es la capa más interna y se compone a su vez de tres capas, la pared endotelial es una capa simple de células endoteliales escamosas, seguida de lámina basal de las células endoteliales, compuesta principalmente por colágeno, proteoglucanos y glucoproteínas, y por último la capa subendotelial, que consta de tejido conjuntivo laxo. En el caso de las arterias una lámina de material elástico fenestrado, la membrana elástica interna, que permite que la difusión de sustancias alcance las células más internas.
- **Túnica media**, que se compone principalmente de células musculares lisas, que en la arteria es bastante gruesa y termina en la membrana elástica externa, formada de elastina. Las células musculares lisas producen componentes extracelulares como elastina, fibras reticulares y proteoglucanos.
- **Túnica adventicia**, se compone en su mayoría de colágeno y algunas fibras de elastina. En la arteria se caracteriza por ser bastante delgada. [30,41]

La función principal de los vasos sanguíneos es comunicar la sangre bombeada por el corazón a todas las partes del organismo, las arterias reciben la sangre oxigenada del corazón y la conducen hasta los capilares sanguíneos, donde ocurre un intercambio entre la sangre y los demás tejidos, para regresar hacia el corazón por las venas (Fig. 4).[42,43]

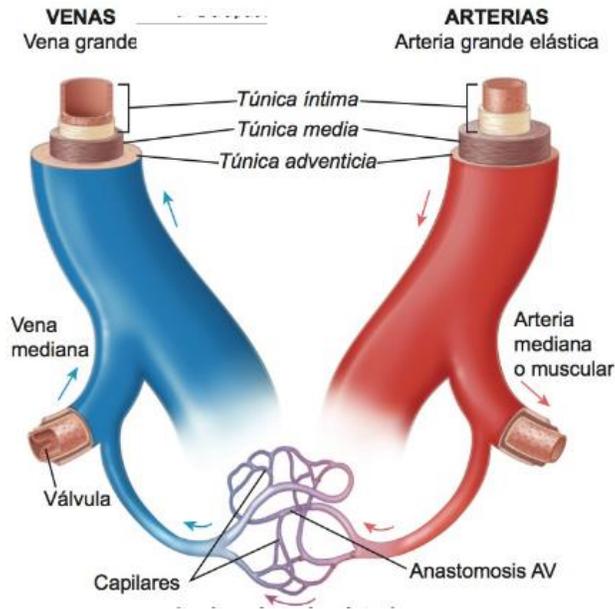


Fig. 4. Esquema de las principales características de los vasos sanguíneos.[30]

Según su espesor y las diferencias en la composición de las capas, desde el punto de vista histológico, se pueden clasificar los diversos tipos de arterias (Tabla 2). Aunque en general toda su superficie interna se encuentra tapizada por un endotelio plano simple, llamado endotelio, formado por células endoteliales que tienen una participación activa en una variedad de interacciones entre la sangre y el tejido conjuntivo. Las células endoteliales son responsables de una barrera de permeabilidad selectiva, permitiendo el paso selectivo de ciertas moléculas de la sangre hacia los tejidos y viceversa, también producen anticoagulantes y sustancias antitrombóticas, y finalmente con la secreción de vasoconstrictores y vasodilatadores regulan el flujo sanguíneo y la resistencia vascular. [41,43]

Tabla 2. Características de los tipos de arteria.[30]

Arterias				
Vaso	Diámetro	Túnica íntima (capa interna)	Túnica media (capa intermedia)	Túnica adventicia (capa externa)
Arteria grande (arteria elástica)	> 10 mm	- Endotelio - Tejido conjuntivo - Músculo liso	- Músculo liso - Membranas elásticas	- Tejido conjuntivo - Fibras elásticas
Arteria media (arteria muscular)	2 -10 mm	- Endotelio - Tejido conjuntivo - Músculo liso - Membrana elástica interna prominente	- Músculo liso - Fibras colágenas - Relativa escasez de tejido elástico	Más delgada que la túnica media - Tejido conjuntivo - Algunas fibras elásticas
Arteria pequeña	0.1 - 2 mm	- Endotelio - Tejido conjuntivo - Músculo liso - Membrana elástica interna	- Músculo liso (8-10 capas celulares) - Fibras colágenas	Más delgada que la túnica media - Tejido conjuntivo - Algunas fibras elásticas
Arteriola	10 – 100 μ m	- Endotelio - Tejido conjuntivo - Músculo liso	- Músculo liso (1-2 capas celulares)	Más delgada que la túnica media - Fina vaina de tejido conjuntivo mal definida
Capilar	4 – 10 μ m	- Endotelio	No hay	No hay

En este trabajo se aplicó el protocolo de descélularización descrito por Ramírez-Marín [11] a arterias musculares, en este tipo de arterias predominan las células musculares lisas en la túnica media, cuya contracción ayuda a mantener la presión arterial, además de tornarse visible la membrana elástica interna (Fig. 5). [30,42]

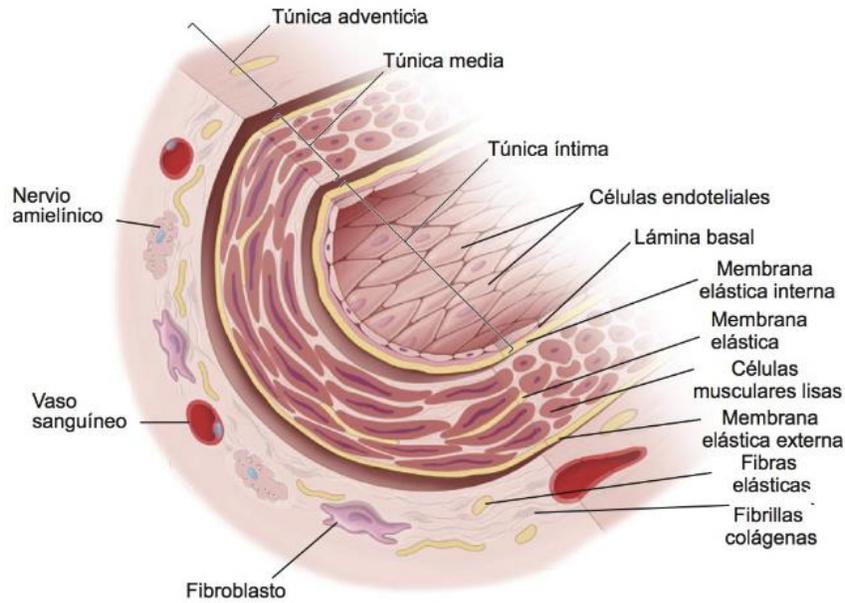


Fig. 5. Diagrama de una arteria muscular.[30]

1.3.1 Injertos Vasculares

Las enfermedades vasculares continúan aumentando en todo el mundo y el tratamiento depende en gran medida del reemplazo de los vasos sanguíneos dañados. Los tratamientos más comunes son los injertos autólogos, sin embargo, existen contraindicaciones previas que impiden dicho procedimiento, como una enfermedad vascular subyacente o un previo injerto autólogo. Se han realizado proyectos dentro de la Ingeniería de Tejidos como posibles soluciones clínicas a dichos padecimientos, pero se enfrentan a las limitaciones propias de los andamios sintéticos: la obtención de una arquitectura adecuada, propiedades mecánicas suficientes, una población suficiente de músculo liso y un fenotipo correcto.[44–47]

Gracias a la interacción entre la colágena, las láminas de elastina y la densidad celular de músculo liso de la MEC, las propiedades mecánicas de la pared arterial son únicas. Los andamios diseñados para su aplicación tienden a fallar en su aplicación *in vivo*. Todas estas limitaciones han potenciado el uso de tejidos descelularizados como injerto, superando los desafíos que no han podido realizar sus contrapartes sintéticas. Los andamios descelularizados presentan condiciones ideales para su unión, crecimiento celular e integridad mecánica, sin embargo, la densidad de la matriz resultante puede traer problemas para la recelularización, especialmente de la túnica media.[14,48–50]

El objetivo de esta investigación es obtener y caracterizar un andamio tubular para Ingeniería de Tejidos a partir del tejido arterial humano descelularizado, aplicando el mismo protocolo que la VBC y comparar las características de dichos andamios, ya que los protocolos de descelularización generalmente son únicos para cada tejido u órgano en particular, de manera que la estandarización de un mismo protocolo para tejidos de especies diferentes aportaría un avance importante para las metodologías de descelularización descrita hasta el momento.

2. Marco teórico

2.1 Ingeniería de Tejidos

Como ya se mencionó, la Ingeniería de tejidos se sirve de técnicas y conocimientos de distintas ciencias para brindar respuestas a los retos de la funcionalidad de órganos y tejidos mediante la obtención de andamios que puedan mantener, mejorar o regenerar sus funciones biológicas. [5–8]

Con el fin de regenerar, mantener o reemplazar funciones biológicas de órganos y tejidos del cuerpo humano, se han llevado a cabo grandes esfuerzos por parte de diferentes ciencias, tratando de obtener un andamio adecuado, que sirva como soporte para el tejido y las células, si es el caso, que se desea reparar. Es así como nace la Ingeniería de Tejidos, que a lo largo de su historia se ha enfrentado con varios retos que se deben superar para encontrar un andamio adecuado, como lo son la vascularidad, porosidad, propiedades mecánicas, composición y bioactividad, que en su conjunto logren mimetizar la matriz extracelular humana. El diseño y control de estas características son probablemente el mayor desafío para el campo de la Ingeniería de Tejidos. [5–7,9,15]

La interfase entre células y andamio debe de ser claramente entendida, para poder tener un diseño óptimo, deben ser desarrollados de modo tal, que sean compatibles con sistemas vivientes o células vivas. En los últimos años se ha tenido un avance considerable en la fabricación de andamios sintéticos y naturales repoblados con células diferenciadas o mesenquimales, los cuales se han fabricados con diferentes técnicas como: bioespumas, hidrogel, electrohilado, impresión 3D, entre otras, incluyendo la combinación entre ellas.[18,30,36]

2.2 Matriz Extracelular

La biomimética es el área de la ciencia que tiene como objetivo el estudio de la naturaleza y sus funciones, como inspiración de tecnologías, con el fin de tratar de imitar sus características y ventajas en aplicaciones diversas. En la Ingeniería de Tejidos, especialmente en el diseño de andamios, la biomimética es un camino potencial para el éxito de la respuesta celular. La matriz extracelular (MEC) biológica nativa, contribuye a la integridad mecánica, desempeña importantes funciones de señalización y regulación en el desarrollo, mantenimiento y regeneración de los tejidos. Es por ello por lo que andamio utilizado en la Ingeniería de Tejidos puede ser considerado como una MEC artificial. [5,16,53]

Todos los andamios manufacturados para la regeneración tisular, en alguna medida tratan de imitar la MEC nativa, o al menos su funcionamiento, en este sentido, los andamios derivados de la MEC natural ofrecen una ventaja comparativa frente a otro tipo de andamios, debido a que tienen una arquitectura similar al estado nativo apto para las células y su reproducción.[9]

La MEC natural es una estructura dinámica que se remodela activamente gracias a las células con las que interactúa, además de participar en el control de la expresión genética de tejidos específicos a través de una variedad de mecanismos de transducción, en sinergia con señales provenientes de factores de crecimiento y hormonas. Lo cual se ve aún muy lejano de lograr para la Ingeniería de Tejidos, en andamios manufacturados. [40,54]

La descelularización es una técnica atractiva para la obtención de andamios acelulares para su uso en regeneración de órganos y tejidos, manteniendo la arquitectura del tejido nativo, incluyendo la conservación de vasos sanguíneos, y los biofactores presentes en la MEC, los cuales son necesarios para la proliferación celular. La MEC está formada principalmente de proteoglicanos y glicoproteínas estructurales que sirven de andamio celular y componen las fibras de tejido conjuntivo.[15,30,55]

La MEC provee el microambiente físico, en el cual las células viven, proporciona un sustrato para el anclaje de las células, sirve como vía de transmisión de señales del entorno a la célula, que influye en proliferación, diferenciación y muerte celular. La forma de las células y la arquitectura tisular tridimensional determinan la función celular. Esto se puede observar en la deformación del núcleo celular según su tipo de sustrato, si la célula se cultiva en un sustrato 3D presenta un núcleo esférico u ovoide, en cambio al ser cultivadas en sustratos 2D el núcleo se aplana. [56,57]

Actualmente se desarrollan muchos experimentos para entender y manipular la interacción del microambiente y las células, utilizando principios de bioingeniería y biofísica. Su estudio repercutirá en el entendimiento y tratamiento de varias ramas de la ciencia, sin embargo, algo que ha aportado el estudio de la mecanotransducción (proceso que tienen las células de percibir su entorno y adaptarse a él mediante cambios en el citoesqueleto transmitidos hasta el núcleo, los cuales van desde un cambio en su forma hasta la expresión de nuevas proteínas)[40] es que la tendencia a la biomimética nos acerca al mejor funcionamiento biológico en su complejidad, por lo que el uso de un andamio nativo, como el que se obtiene de la descelularización apunta a tener mejores resultados en la Medicina Regenerativa.

2.2.1 Colágena

La colágena es la proteína más abundante en los mamíferos, componente principal de muchos tejidos. Esta proteína contiene tres cadenas polipeptídicas helicoidales, llamada la triple hélice. La colágena es insoluble en agua y difícil de ingerir por enzimas del tracto gastrointestinal. La estructura primaria de la colágena es muy singular. Su molécula está conformada principalmente de un 33% de glicina, 12% prolina y 9% de hidroxiprolina, junto con algún otro aminoácido.[58,59]

Por su parte las unidades estructurales de las proteínas son los aminoácidos. En el caso de la colágena, el más sencillo de ellos es la glicina. Un α -aminoácido consta de un grupo amínico, un grupo carboxílico, un átomo de hidrógeno y un grupo R distintivo que se denomina cadena lateral, todos ellos unidos por un átomo de carbono- α , adyacente al grupo carboxilo (Fig. 6). En el caso de la glicina, la cadena lateral está formada por un átomo de hidrógeno.[59]

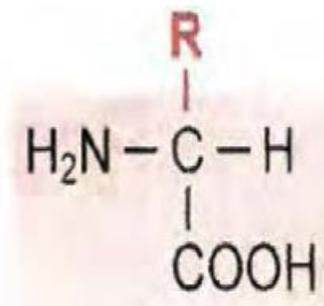


Fig. 6. Estructura general de un aminoácido.[59]

La prolina es otro de los aminoácidos que compone la colágena, se compone de una cadena lateral alifática, pero difiere de otros aminoácidos del mismo tipo en que la cadena lateral está unida tanto al nitrógeno como al carbono- α , formando una cadena cíclica. Con frecuencia la prolina se encuentra en los codos de las cadenas proteicas dobladas y tiene la característica de ser hidrofílica.[59]

Tres cadenas polipeptídicas de colágena enrolladas se asocian formando una superhélice, donde las tres hélices se enrollan a su vez sobre un eje central (Fig. 7). Las cadenas se mantienen unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno. La triple hélice forma una unidad estructural llamada *tropocolágena*. [15,59,60]

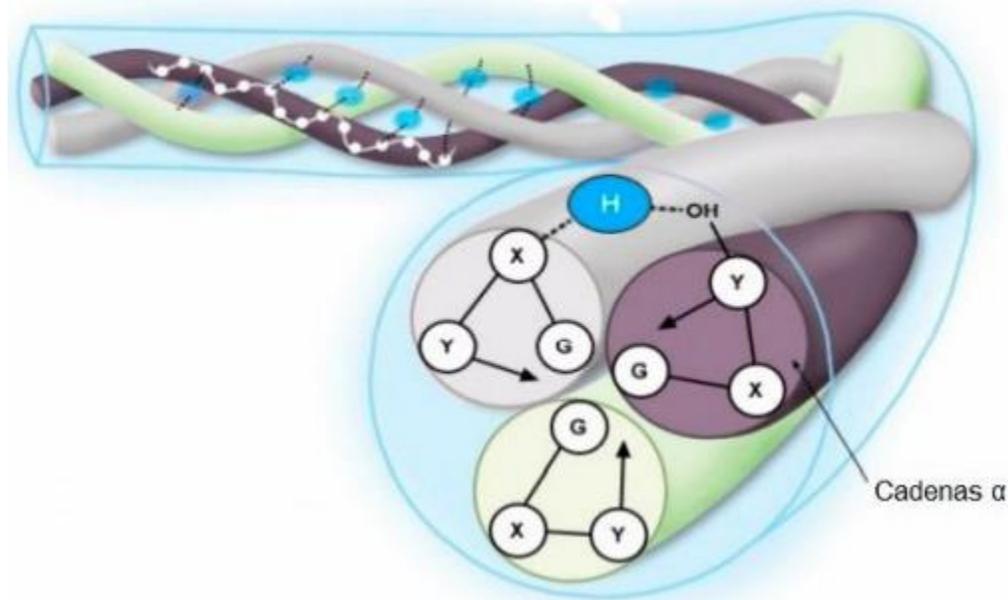


Fig. 7. Esquema de la estructura de la colágena. Estructura de triple hélice dextrógira y puentes de hidrógeno entre las cadenas.[60]

Existen diversos tipos de colágena de acuerdo con las cadenas participantes en la composición de la superhélice. Las unidades de tropocolágena se disponen en hileras y estas a su vez se disponen en haces que constituyen fibrillas. Todas las unidades de tropocolágena tienen la misma orientación y dejan un espacio entre sí, de tal manera que no entran en contacto.[15,59]

Las tropocolágenas de hileras adyacentes establecen uniones mediante un tipo de enlace de cadenas laterales de lisina o hidroxilisina, que otorgan al conjunto una mayor resistencia mecánica, que a la tracción suele ser muy grande, llegando a soportar 10kg de peso una sola fibra de 1 mm de diámetro. [15,59]

2.3 Descelularización

El tratamiento efectivo para muchos tipos de enfermedades resulta ser el alotrasplante de órganos o tejidos (proveniente de otro individuo de la misma especie), aunque, aún con los esfuerzos en el área médica, siguen existiendo grandes riesgos en este tipo de procedimientos, tales como la baja compatibilidad, morbilidad del donador, respuesta inflamatoria, falla del trasplante y el principal problema con los injertos es el rechazo por parte del receptor. [2,61,62]

Diversos estudios han demostrado que el rechazo que experimentan los aloinjertos por parte de los receptores se debe a una respuesta inmunitaria frente a antígenos que se encuentran en la superficie de las células provenientes del injerto. Dichos antígenos son glicoproteínas denominadas Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), que todos los vertebrados superiores expresan en sus genes y específicamente en humanos se denomina HLA (*Human Leucocyte Associated Antigens*). [15,63,64]

Existen dos tipos de moléculas MHC, de clase I y de clase II. Cuando las células T del receptor reconocen una versión extraña de HLA en algún tejido desencadenan una reacción inmunitaria, lo que provoca el rechazo del injerto. La descelularización, se basa en la teoría de la eliminación de cualquier riesgo de rechazo y respuesta inmune frente a los trasplantes, eliminando cualquier indicio de material celular del donador, incluyendo las moléculas MHC. [15,63,64]

La descelularización consiste en extraer las células y materiales nucleicos remanentes de un órgano o tejido, los cuales pueden ser reconocidos como agentes extraños para el sistema inmune del receptor. Se utilizan diferentes métodos y soluciones para romper la membrana celular, eliminando los restos y dejando tan solo la MEC, compuesta de una compleja mezcla de proteínas estructurales y funcionales con el fin de presentar entidades organizadas estructuralmente tales como la colágena, elastina, glucosaminoglucanos (GAGs) y fibronectina. [14,16,65–67]

Los andamios obtenidos mediante procesos de descelularización tienen una gran ventaja sobre cualquier otro andamio, ya que la MEC resultante contiene la microarquitectura nativa y algunos componentes bioquímicos del tejido a reemplazar. También se ha demostrado que son andamios con buena biocompatibilidad y permiten el crecimiento de células nativas. [15]

La descelularización de órganos y tejidos es una técnica que se perfila como posible solución para el reemplazo total del órgano en los casos en los cuales el trasplante convencional no ha tenido éxito. Para su posible uso en la regeneración de órganos y tejidos, además de eliminar el material genético del donante, se debe garantizar la obtención de la matriz extracelular (MEC), conservando su composición e integridad estructural. Muchos métodos de disrupción y eliminación celular pueden cumplir muy bien su cometido, se trata de distintas soluciones utilizadas a altas concentraciones y por tiempos prolongados, con la desventaja de poder dañar y degradar hasta cierto punto la MEC y su morfología.[12,21]

Se sabe también que la remoción de los antígenos celulares MHC minimiza el riesgo de rechazo del tejido u órgano, independientemente de tratarse de un andamio alogénico (proveniente de un individuo de la misma especie) o xenogénico (proveniente de otra especie), debido a que los componentes de la MEC preservada son altamente similares entre diferentes especies de vertebrados superiores, lo que abre la posibilidad del uso de andamios descelularizados de origen xenogénico, para su aplicación en humanos. [18,21]

Se ha demostrado que un proceso de descelularización adecuado mantiene la composición fisiológica relevante de la MEC, así como su microambiente nativo, incluyendo muchas veces su vascularidad, estabilidad mecánica y porosidad, lo cual es importante para la actividad biológica del andamio, desempeñando importantes funciones de señalización y regulación en el desarrollo, mantenimiento y regeneración. [5,18,68]

Si bien los andamios obtenidos por descelularización cuentan con enormes beneficios, aún existen desafíos por resolver, la especificidad de cada tejido implica un protocolo diferente en todos los casos, que debe ser optimizado. Las diferencias entre especies, edades e individuos pueden significar una variabilidad alta entre la longitud y espesor del tejido. Una descelularización incompleta puede tener los mismo efectos de rechazo que un trasplante normal y los agentes descelularizantes pueden alterar la bioactividad y la integridad estructural del andamio .[14,53,69,70]

2.3.1 Métodos de Descelularización

Los protocolos de descelularización pueden involucrar una mezcla de procesos químicos, físicos y biológicos que idealmente remueven los componentes celulares sin afectar adversamente la composición, organización, actividad biológica e integridad mecánica de la MEC nativa. Se busca favorecer en primera instancia la lisis celular, es decir la ruptura de su membrana extracelular, de modo que se destruya la célula. [18,23,71]

Existen trabajos recientes donde se han logrado descelularizar con éxito órganos como el corazón, pulmón, hígado, riñón, tráquea y páncreas. Sin embargo, los protocolos de descelularización son altamente dependientes y sensibles a las características del tejido nativo, por lo que cada tejido u órgano se tiene que trabajar con un protocolo diferente para poder ser descelularizado efectivamente, lo que significa que el trabajo en un tejido que no pueda ser utilizado en el humano, carece de aplicación en la clínica. El xenoinjerto de origen porcino descelularizado y el aloinjerto resultan mucho más adecuados para la aplicación humana, debido a los componentes de la MEC y a su morfología. [6,11,18,21,72]

El primer protocolo de descelularización se propuso en 1975, combinando métodos químicos y biológicos que incluían membranas de diferentes tejidos. Los protocolos más recientes y con mejor efectividad combinan procesos de tratamientos físicos, químicos y biológicos. En términos generales un protocolo de descelularización típico contiene los siguientes pasos: (1) Lisis de la membrana celular por medio de tratamientos físicos y soluciones iónicas, (2) separación de los componentes celulares de la MEC usando tratamientos enzimáticos, (3) solubilización de los componente citoplasmáticos y nucleares de la célula a través de tratamientos con detergentes y finalmente (4) lavado y remoción de los remanentes celulares de la MEC. Todos los pasos pueden ser completados con agitación mecánica y ser repetidos las veces necesarias para aumentar la efectividad del método. [12,14,23,71,73,74]

Es importante conocer el principio de acción de los agentes dentro de un protocolo de descelularización, ya que la estrategia debe ser optimizada en función al tejido, controlando duración, concentración y variables ambientales, siempre analizando la efectividad del método y los efectos en la composición, arquitectura y funcionalidad de la MEC obtenida.

2.3.1.1 Agentes Físicos

Los agentes físicos en la descelularización se basan en la modulación de variables físicas como la temperatura, fuerza y presión sobre el tejido u órgano, con la finalidad de romper las membranas celulares. Los agentes físicos pueden incluir: devastado, agitación, sonicación, gradiente de presión, ciclos de congelación y descongelación, electroporación (rotura de la membrana celular mediante exposición a pulsos eléctricos), perfusión y uso de fluidos supercríticos. La ventaja de algunos de estos métodos es que también remueven los restos de materia celular remanente en la MEC. [23,66]

2.3.1.1.1 Perfusión

La perfusión consiste en introducir de manera lenta pero continua un líquido en un tejido u órgano, a través del lecho vascular. Como posible desventaja puede presentarse una excesiva presión de bombeo que pueda llegar a dañar la MEC. Se debe de utilizar disoluciones con agentes químicos que actúen sobre las células, para llevar a cabo la descelularización. Gracias a la presión del fluido, el agente descelularizante tiene un mejor alcance por difusión sobre todo el volumen del órgano o tejido, y tiene la cualidad de arrastrar los restos resultados de la lisis celular.[16,62,75,76]

2.3.1.2 Agentes Químicos

Los agentes químicos son los utilizados más comúnmente para la lisis celular. El uso de ácidos y bases se utiliza para eliminar residuos de queratina en ciertos tejidos y logra catalizar la degradación hidrolítica de biomoléculas, componentes del citoplasma y ácidos nucleicos, sin embargo, tiene efectos adversos en el contenido de GAGs. Las disoluciones hipotónicas e hipertónicas causan la lisis celular por efecto osmótico. Los detergentes iónicos o no iónicos pueden solubilizar las membranas celulares, con el riesgo de llegar a disociar las proteínas de la MEC. El uso de alcoholes facilita la delipidación, deshidratando el tejido y llevando a la lisis celular. [23,66,76]

Los detergentes iónicos, por su naturaleza de surfactante polar, cuando se aumenta la concentración en medio acuoso, las moléculas cargadas forman micelas, pequeños conglomerados esferoideos, que mantienen la parte hidrofóbica de la molécula en la parte interior y la hidrofílica en la exterior. Cada detergente tiene una concentración micelar crítica (CMC), a la cual empiezan a formarse dichas micelas, pasando la CMC los detergentes iónicos solubilizan membranas biológicas y forman micelas mixtas de detergente, fosfolípidos y proteínas integrales de membrana, llegando a dañar la MEC. Por debajo de la CMC, las moléculas del detergente se unen a las regiones hidrofóbicas de la mayoría de las proteínas integrales de membrana celular y las hacen solubles en disoluciones acuosas (Fig. 8).[77]

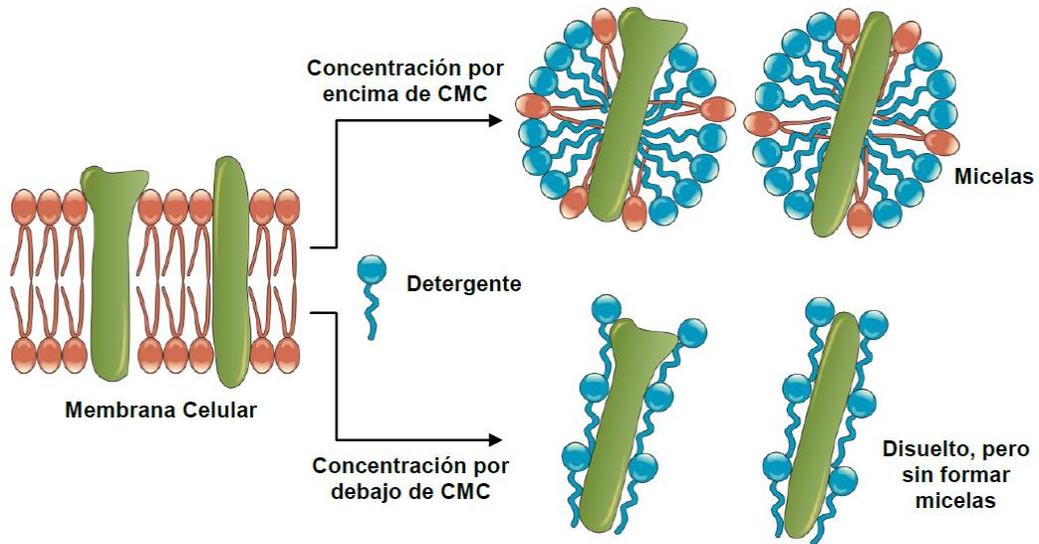


Fig. 8. Influencia de la concentración micelar crítica en presencia de proteínas.
Imagen modificada.[78]

2.3.1.3.1 Dodecil Sulfato de Sodio SDS

El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente iónico utilizado en varios protocolos de descelularización de diferentes órganos y tejidos. El SDS solubiliza las membranas celulares y nucleares con un alto índice de efectividad, así como las proteínas desnaturalizadas, sin embargo, puede provocar daño en las fibras de colágena de la Matriz Extracelular (MEC); y eliminarlo completamente del tejido requiere varios ciclos de lavado. [6,11]

2.3.1.3 Agentes Biológicos

Se distinguen dos tipos de agentes biológicos, los enzimáticos y no enzimáticos. Las enzimas comúnmente usadas en la descelularización incluyen nucleasas, tripsinas, colagenasas, lipasas, dispasas y termolinasas. Estas enzimas pueden proveer alta especificidad en la remoción de residuos celulares o de componentes indeseables de la MEC. Sin embargo, una de las mayores desventajas son los residuos de dichas enzimas, que pueden generar algún tipo de reacción inmune en el receptor del implante o dificultad para la posterior recelularización del andamio. Se puede combinar la acción de los agentes enzimáticos con los no enzimáticos para mejorar los efectos de la descelularización, un ejemplo de ellos son los agente quelantes, que ayudan en la disociación de las células de las proteínas de MEC interrumpiendo la unión de la colágena y la fibronectina, por medio de la quelación de cationes divalentes. [6,66]

2.3.1.3.1 DNasa

La DNasa es una enzima, especialmente una endonucleasa, que cataliza la escisión de la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster (enlaces covalentes que se dan entre dos oxígenos de un grupo fosfato y los grupos hidroxilo de otras dos moléculas distintas. Fundamentales en la formación de ácido nucleicos) entre los monómeros de ácidos nucleicos. [79]

Es una enzima que cataliza la hidrólisis del DNA a oligosacáridos y moléculas más pequeñas, su síntesis ocurre mediante la transcripción y traslación de genes de DNasa, en el citoplasma. Tiene que ver con la purificación del RNA.[39]

Los dos tipos principales de DNasa son la DNasa I y la DNasa II. La DNasa I se codifica con el gen humano DNASE1, su función principal es el reciclaje del ADN, aunque también está involucrado en la fragmentación del ADN durante la apoptosis, específicamente escindiendo los enlaces adyacentes a un nucleótido pirimidina. Por otro lado, la DNasa II solo escinde al ADN monocatenario, siendo funcional al pH ácido, por lo que se le conoce como ácido DNasa. [39,79]

2.3.1.3.2 Hidrólisis enzimática

Las enzimas en los sistemas biológicos constituyen la base de muchas reacciones complejas que caracterizan los fenómenos vitales y algunas catalizan la hidrólisis de los materiales, la cual se produce cuando el polímero tiene principalmente enlaces inestables y cierto grado de hidrofilia. La característica principal de una reacción enzimática es su especificidad, la molécula sobre la que actúa la enzima se denomina sustrato, con el cual interactúa la enzima, para formar un complejo intermediario, para posteriormente descomponer el complejo intermediario para formar los productos y regenerar la enzima. [80]

Se entiende como hidrólisis enzimática, la que se produce por hidrolasas. Se nombra con el sustrato seguido por la palabra hidrolasa, en el caso de ser una enzima muy específica, se usa el prefijo del sustrato con terminación "asa".

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Este trabajo se basa en la Hipótesis de que dos andamios tubulares como los son la Arteria Humana (AH) y la Vía Biliar de Cerdo (VBC), pueden ser obtenidos mediante la misma metodología de descelularización descrita previamente por Ramírez-Marín [11]. Enfocado en demostrar la efectividad del proceso sobre los andamios naturales obtenidos sin afectar significativamente la configuración de la Matriz Extracelular (MEC).

En el presente capítulo se describe la metodología para obtener un protocolo de descelularización de órganos tubulares, que se aplicó a dos órganos diferentes, tanto a VBC (Vía Biliar de Cerdo) de cerdo como a AH (Arteria Humana).

La efectividad del proceso de descelularización se evaluó comparando la muestra descelularizada con el tejido nativo. Se cuantificaron los núcleos celulares visibles gracias a las tinciones histológicas hematoxilina y eosina (H&E), con software de procesamiento digital.

Para evaluar la preservación de la MEC se utilizaron diversas técnicas de caracterización, por parte de la histología se utilizó la tinción Tricrómica de Masson, se hicieron pruebas térmicas para evaluar la degradación, y las muestras se observaron con la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), que también puede dar una estimación de la descelularización, ya que las micrografías a más de 500X permiten ver algunas células en las muestras nativas, que no se presentan en las muestras descelularizadas.

3.1 Procuración de las Muestras

3.1.1 Vía Biliar Porcina

Se trabajó con cerdos raza Landrace, se obtuvieron 9 muestras (n=9) de conducto biliar extrahepático colédoco, de entre 5 y 8 cm de largo y 3 mm de diámetro. Todos de machos jóvenes de entre 25 y 30 kg. En condiciones estériles, durante las prácticas quirúrgicas laparoscópicas del departamento de Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) (Fig. 9).

Las muestras se mantuvieron en una disolución amortiguadora e isotónica de buffer de fosfatos, PBS (SIGMA) concentrada al 1X (se prepararon 2 sobres de 1g en 2 L de agua desionizada estéril) y mantenidas a 4 °C para su traslado inmediato al Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

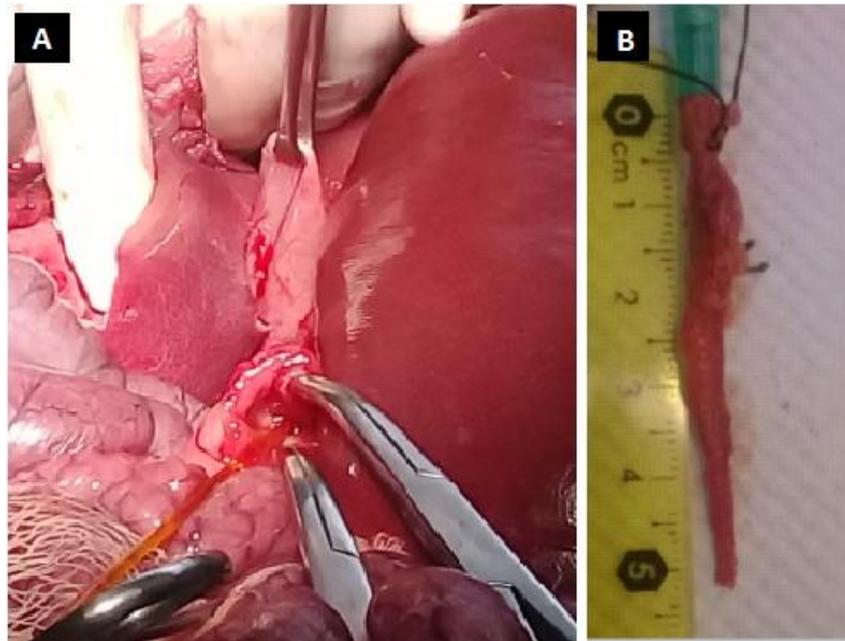


Fig. 9. Extracción del conducto biliar extrahepático. (A) Cirugía de extracción. (B) Colédoco canalizado.

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a la ley de bienestar animal, siguiendo la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999.[81]

3.1.2 Arteria Humana

Las muestras de Arteria Humana se facilitaron del INCMNSZ, provenientes del departamento de Cirugía Vasculat, tejido proveniente de cadáver humano. Se obtuvieron 10 muestras (n=10) de extremidades inferiores de entre 8 y 10 cm de largo y 5 mm de diámetro (Fig. 10).

La experimentación con tejido humano se realizó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación del INCMNZZ, con el registro CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20166627.



Fig. 10 Arteria humana, después de la remoción de tejido adiposo circundante.

Las muestras se mantuvieron en una disolución amortiguadora e isotónica de PBS al 1X y mantenidas a 4 °C para su traslado inmediato al Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

3.2 Preparación de la Muestra para su Caracterización

La toma de muestras para su posterior caracterización se llevó a cabo con el mismo protocolo tanto en VBC como en AH, ya que las técnicas utilizadas fueron las mismas en ambos tejidos, aplicadas de igual manera en las muestras nativas y las descélularizadas. Una vez que se tuvieron las muestras en el Laboratorio de Biomateriales, dentro de la campana de flujo laminar y con ambiente e indumentaria estéril, se procedió a hacer 6 cortes con bisturí, de cada una para su posterior caracterización (Fig. 13):

- 1) Muestra control para histología: Se fijaron dos cortes de la muestra aproximadamente 0.5 cm de ancho cada uno, en dirección transversal a la luz y se sumergieron en 5mL de una disolución de paraformaldehído (PFA) (MACRON) al 4 % de peso en agua destilada estéril, durante 24 horas; se realizó un cambio de medio, a 5 mL PBS 1X (Sigma-Aldrich) y se preservó hasta que se llevó a cabo la caracterización histológica.
- 2) Muestra control para SEM: El corte se fijó en una disolución de Glutaraldehído (EMS) al 2.5% de volumen en agua destilada estéril, a 4 °C.
- 3) Muestra control para análisis térmico: Se tomaron dos cortes de aproximadamente 2 mg cada uno (un corte para Análisis Termogravimétrico y el otro para Calorimetría Diferencial de Barrido), se preservó a una temperatura de -40 °C, para su posterior liofilización.

3.3 Protocolo de Descelularización

El protocolo de descelularización empleado en ambos tejidos es el estandarizado en el mismo grupo de trabajo (Marín, JY. 2020)[11]. Se trabajó en condiciones estériles, dentro de la campana de flujo laminar.²⁸

Por parte de la VBC, se sujetó a un catéter del #22 con sutura seda 3-0 (ETHICON) de su sección distal, unido mediante un adaptador (Masterflex) a una manguera (Masterflex #16), por donde circularon las diferentes disoluciones descelularizantes. Mientras que la AH se sujetó con la misma sutura directamente en la manguera, debido a la diferencia de diámetro con la VBC.

El resto del proceso de descelularización se realizó de igual manera sobre la VBC y la AH. La muestra se colocó en un sistema cerrado, dentro de un frasco de vidrio estéril con capacidad de 300 mL, sumergida dentro de 200 mL de la disolución descelularizante en turno (Tabla 3); el extremo suelto de la manguera se sumergió en los mismos 200 mL de disolución descelularizante, de tal forma que la parte media de la manguera se colocó dentro de una bomba peristáltica de rodillos (Masterflex, easy-load), haciendo fluir las disoluciones descelularizantes con una velocidad de flujo de 46 mL/min (Fig. 11).

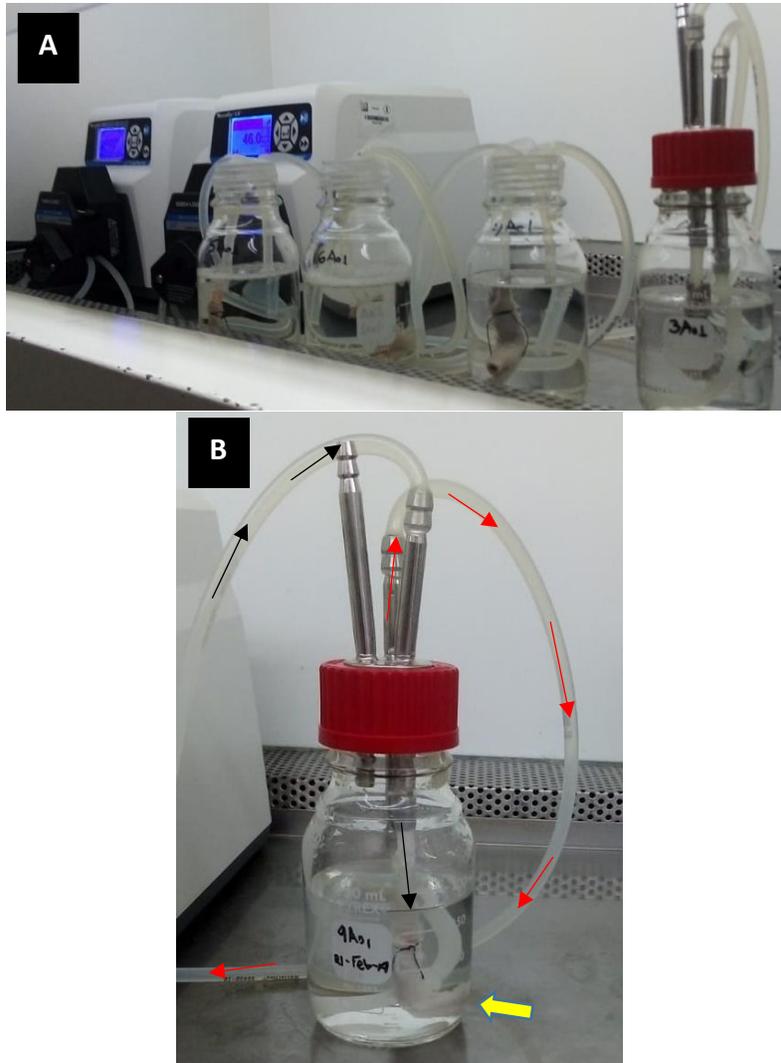


Fig. 11. Proceso de descelularización, (A) con dos bombas peristálticas funcionando y 4 muestras dentro de los frascos, sometidas al proceso. (B) Flujo de las disoluciones descelularizantes en el circuito cerrado (muestra señalada con flecha amarilla).

Cada bomba peristáltica tiene 2 cabezales, lo que le permite trabajar con dos muestras al mismo tiempo de manera independiente (Fig. 11, A). En el arreglo utilizado para el proceso de descelularización, el flujo de las disoluciones descelularizantes impulsado por la bomba peristáltica se hace pasar por dentro del andamio tubular y su retorno hacia la bomba (Fig. 11, B).

Durante el proceso de descelularización, los órganos tubulares se expusieron a diversas disoluciones en distintos tiempos de exposición, el protocolo total tiene una duración de 8 días, a temperatura ambiente, dentro de la campana de flujo laminar. El protocolo de descelularización utilizado en esta investigación se describe a continuación (Tabla 3):

El flujo de las disoluciones se hizo pasar en dirección distal a proximal. Los cambios de disolución se realizaron cada 24 horas, previo a 3 lavados con 200 mL de agua Mili-Q en las mismas condiciones de perfusión.

- 1) Se introdujo en una disolución de dodecil sulfato de sodio, SDS (SIGMA) al 1% (1% de peso en agua desionizada estéril). Se perfundió por un lapso de 96 horas, haciendo cambios de disolución cada 24 horas.
- 2) En las mismas condiciones, se cambió de disolución por buffer fosfato salino, PBS (Sigma-Aldrich) 1X y se mantuvo durante 24 horas.
- 3) Se dejó perfundiendo por 24 horas más en una disolución de DNasa-1 (Roche) a una concentración de 0.001 mg/mL en disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) (Gibco).
- 4) Finalmente, en las mismas condiciones de perfusión, se hizo el cambio de disolución a 200 mL de agua desionizada estéril, se mantiene durante 48 horas, con un cambio a las 24 horas.

Tabla 3. Protocolo de descelularización aplicado.

Disoluciones	Tiempo total
SDS 1% de peso en agua desionizada estéril	96 h
PBS 1% de peso en agua desionizada estéril	24 h
DNasa-1 0.1 mg/mL	24 h
Agua desionizada estéril	72 h

3.4 Efectividad del Proceso de Descelularización

Un correcto protocolo de descelularización en un tejido u órgano para regeneración tisular garantiza la preservación de la arquitectura, además de eliminar el material celular entre un 70% y 80%.[74] Las técnicas de caracterización utilizadas en este trabajo buscan comprobar la efectividad del proceso de descelularización y la preservación de la MEC de los diferentes tejidos.

3.4.1 Histología

La caracterización histológica se realizó de la misma manera para todas las tinciones utilizadas en este trabajo de investigación, asegurando así un proceso uniforme para todas las muestras. Los procesos de deshidratación y de inclusión se realizaron en el Instituto de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INR).

La muestra destinada a estas técnicas de caracterización, como se menciona anteriormente en este trabajo, se encontraba preservada en PBS 1X a 4 °C.

Todas las muestras se sometieron a una cascada de deshidratación, con agitación constante dentro de 10 mL en diferentes diluciones de etanol (Fig. 12), por 30 minutos cada una, posteriormente a la deshidratación, se aclaró la muestra con Xilol con el mismo sistema de agitación (Tabla 4). Las muestras deshidratadas y aclaradas con Xilol se sumergieron en parafina, dicho proceso se llevó a cabo en dos pasos, colocando cada corte en un frasco con 8 mL de parafina, dentro de un horno a 50 °C, antes del proceso de inclusión.



Fig. 12. Agitación de las muestras histológicas, en proceso de deshidratación.

Algunas de las disoluciones de la cascada de deshidratación tienen que ser cambiadas después de utilizarse, ya que los cortes histológicos pueden llegar a dejar precipitados en ellas. Tal es el caso del Etanol al 96% que se utiliza durante 30 min, en dos ocasiones distintas, lo que significa que después del tiempo asignado se cambió de nuevo por Etanol al 96% (Tabla 4).

Las muestras se incluyeron en parafina, dentro de casetes de inclusión en el INR, a los que se les realizaron cortes de 3 μm y un ángulo de 5° en el microtomo (Leica). Los cortes se colocaron en baño maría para mantenerlos sin dobleces y finalmente se colocaron en portaobjetos, para después secarse y desparafinar.

Tabla 4. Proceso de deshidratación de tejidos e inclusión en parafina.

Disolución	Tiempo (min)
Etanol 70%	30
Etanol 80%	30
Etanol 96% (1)	30
Etanol 96% (2)	30
Etanol 100% (1)	30
Etanol 100% (2)	30
Etanol 100% (3)	30
Xilol (1)	15
Xilol (2)	15
Parafina (1)	30
Parafina (2)	60

Antes de teñir los cortes histológicos, todos los portaobjetos se introdujeron en el horno a una temperatura de 60 °C para retirar los restos de parafina, durante 30 minutos. Además, todas las muestras se sometieron a un proceso de rehidratación, sumergiendo los portaobjetos en las distintas soluciones de la cascada de rehidratación (Tabla 5). Finalmente, las muestras se tiñeron con diferentes técnicas: Hematoxilina y Eosina (H&E) y Tricrómica de Masson, según las características del tejido a observar en el microscopio óptico.

Tabla 5. Proceso de rehidratación de laminillas.

Disolución	Tiempo
Xilol (1)	5 min
Xilol (2)	30 s
Etanol 100% (1)	30 s
Etanol 100% (2)	30 s
Etanol 96% (1)	30 s
Etanol 96% (2)	30 s
Etanol 80%	30 s
Etanol 70%	30 s
Etanol 60%	30 s
Etanol 50%	30 s
Agua bidestilada (1)	30 s
Agua bidestilada (2)	5 min

3.4.1.1 Tinción Hematoxilina y Eosina H&E

Para realizar la tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) todas las soluciones fueron filtradas antes de utilizarse y se verificó la efectividad de los diferentes pasos del proceso observando en el microscopio óptico. Los portaobjetos se sumergieron en diferentes soluciones por cierta cantidad de tiempo (Tabla 6). Con dicha tinción se espera observar las estructuras basófilas, como los núcleos celulares en todo azul, gracias a la hematoxilina, mientras que la eosina teñirá las estructuras acidófilas de color rosa o rojo, tales como el citoplasma y la mayoría de los tejidos. [30]

Tabla 6. Tinción de H&E.

Disolución	Tiempo
Hematoxilina de Harris	6 min
Agua corriente a flujo constante	5 min
Etanol con ácido clorhídrico al 1% V/V	2 veces de 2 s
Agua corriente a flujo constante	1 min
Disolución saturada de carbonato de litio	2 veces de 2 s
Agua corriente a flujo constante	10 min
Etanol 80% pre-eosina	2 min
Eosina solución de trabajo	2 min
Etanol 96% (1) tinción	30 s
Etanol 96% (2) tinción	30 s

3.5 Preservación de la Matriz Extracelular

Muchos procesos de descelularización de tejidos logran ser efectivos en cuanto a la eliminación de material celular de la MEC, sin embargo, una alta exposición a los agentes descelularizantes puede dañar las proteínas estructurales de la MEC y cambiar sus propiedades fisicoquímicas.

El presente trabajo pretende preservar la MEC del tejido descelularizado, para lo cual se sometieron las muestras de VBC y de AH a diferentes caracterizaciones, comparando los tejidos antes y después de ser sometidos al proceso de descelularización. La tinción tricrómica de Masson donde se pueden visualizar las fibras de colágena, microscopía electrónica de barrido en la cual se puede observar la morfología superficial y caracterización térmica para establecer posibles cambios en la estabilidad térmica del material por efectos del proceso, ya que cambios como este pueden ser asociados a degradación sobre las moléculas que componen un material. [82]

3.5.1 Histología

El procedimiento histológico mencionado anteriormente se aplicó a todos los cortes colocados en los portaobjetos, posterior a la deshidratación se separaron las muestras destinadas a la tinción H&E y las reservadas para la tinción Tricrómica de Masson, y hasta este momento se diferencian los procedimientos de cada una.

3.5.1.1 *Tinción Tricrómica de Masson*

La tinción tricrómica de Masson toma su nombre de los tres colorantes que se utilizan en esta técnica, hematoxilina férrica, azul de anilina y fucsina, que se caracterizan por teñir los elementos acidófilos como el músculo, el citoplasma y la queratina de color rojo, los núcleos celulares de azul oscuro o negro y la colágena de color azul (Tabla 7).²⁰

Tabla 7. Tinción tricrómica de Masson.

Disolución	Tiempo
Disolución de Bouin	1 h (a 56°C)
Agua corriente a flujo constante	Hasta aclarar la muestra
Agua destilada	30 s
Hematoxilina de hierro de Weigert	10 min
Agua corriente a flujo constante	10 min
Agua destilada	30 s
Fucsina ácida escarlata de Brebich	15 min
Agua destilada	Sumergir 10 veces por 2 s
Disolución ácida fosfotúngstico-fosfomolibdico	10 min
Disolución azul de anilina	5 min
Agua destilada	Sumergir 10 veces por 2 s
Ácido acético al 1%	3 min
Etanol 96% (1) tinción	30 s
Etanol 96% (2) tinción	30 s

Terminando todas las tinciones se continúa con la deshidratación de las laminillas (Tabla 5), que se fijaron con resina y se dejaron secar por 24 horas (Fig. 13), antes de proceder a la observación en microscopio Axiozoom del Departamento de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Terminando el proceso de teñido, los cortes histológicos se observaron en el microscopio Axiozoom del Departamento de Microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM, a diferentes aumentos, para observar las distintas estructuras microscópicas de las muestras.



Fig. 13. Secado de laminillas después de los procesos de tinción.

3.5.2 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barridos (SEM, por sus siglas en inglés) es parte de las caracterizaciones que nos permiten verificar la preservación de la arquitectura de la MEC, ya que provee una imagen superficial de gran amplificación y definición.

A los cortes destinados a SEM se les sometió a un proceso de fijación con osmio, que es un metal pesado que impregna la muestra para facilitar el contraste frente al flujo de electrones. Se les realizaron 3 lavados en agitación, con 3 mL una solución de buffer de cacodilato de sodio a 0.1 M, a 4 °C. Se preservó en una disolución de 2.5% de Glutaraldehído y se repiten los lavados en cacodilato. La muestra se osmicó, haciendo un lavado en tetraóxido de osmio al 1% y se lavó con cacodilato de sodio por última vez. Finalmente se secó en cámara de CO₂ por punto crítico y se recubrieron con oro por sputtering por 4 minutos.[83]

Las muestras se observaron a diversos aumentos (20X, 100X, 500X, 1000X y 2000X) desde su parte luminal, con un voltaje de 10 kV.

3.5.3 Caracterización Térmica

La estabilidad térmica de los andamios de VBC y AH, se evaluó por análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA y DSC, por sus siglas en inglés). Previo al estudio, para eliminar cualquier rastro de agua fisisorbida que pudiera interferir con los resultados, las muestras de aproximadamente 0.5 cm³, se sometieron a liofilización, dejando las muestras selladas con Parafilm dentro de un tubo de 15 mL lleno de sílice, para evitar su rehidratación (Fig. 14).



Fig. 14. Equipo para liofilización (Labconco).

3.5.3.1 *Análisis Termogravimétrico*

Los análisis termogravimétricos de las muestras se realizaron en el equipo del Laboratorio de Análisis Térmico del IIM, *TA Instruments TGAQ5000* (TA Instruments), con un intervalo de estudio de 25 °C hasta 500 °C, con una rampa de 10 °C/min, con gas de purga de nitrógeno, en charolas de alúmina (Fig. 15).



Fig. 15. Equipo TGAQ5000, del Laboratorio de Análisis Térmico del IIM, UNAM.

La prueba se realizó a 2 muestras de VBC nativas y sus correspondientes descelularizadas, mientras que se analizaron 3 muestras nativas de AH con su correspondiente muestra descelularizada.

3.5.3.2 Calorimetría Diferencial de Barrido

La prueba de calorimetría diferencial de barrido se realizó en un rango de temperaturas de 25 °C a 500 °C, con una rampa de 10 °C/min con nitrógeno como gas de purga y en charolas de platino cerradas. Se realizaron en el equipo del mismo laboratorio, *TA Instruments DSCQ100* (TA Instruments). La prueba se realizó en dos muestras de cada tejido, VBC y AH nativas y sus correspondientes descelularizadas. (Fig. 16)



Fig. 16. Equipo DSCQ100 del Laboratorio de Análisis Térmico del IIM, UNAM.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efectividad del Proceso de Descelularización

Este trabajo contempla diversas caracterizaciones que prueban la eficacia del protocolo de descelularización empleado. Macroscópicamente, se observó un cambio gradual de color en ambas muestras, la VBC (Vía Biliar de Cerdo) y la AH (Arteria Humana), durante el proceso de descelularización por perfusión, hasta llegar a estar completamente blancos, reteniendo su estructura anatómica macroscópica (Fig. 17).

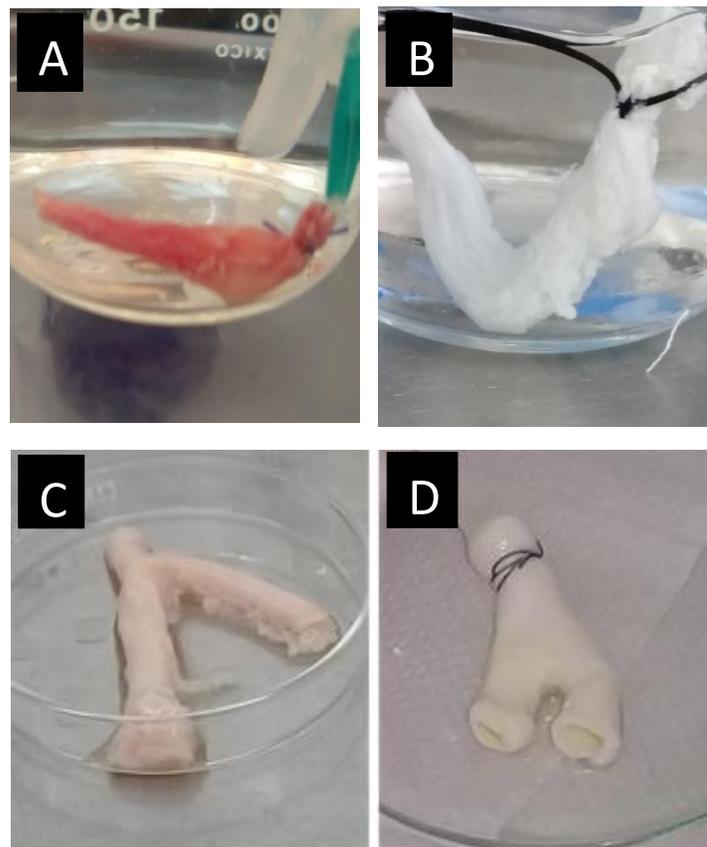


Fig. 17. Imagen comparativa de la muestra nativa contra la descelularizada, (A y B) VBC y (C y D) de AH.

Posterior a la tinción de H&E, se midió la efectividad del proceso de descelularización en ambos tejidos (AH y VBC), utilizando un software de análisis de imagen (Image J) para cuantificar los núcleos celulares en las micrografías observadas con el microscopio Axiozoom de la Unidad de Microscopía en la Facultad de Medicina de la UNAM (Fig. 18 y 19). Se tomó en cuenta la medida mínima de diámetro de los núcleos celulares que pueden encontrarse en ambos tejidos (4 μm) y su equivalencia en pixeles de acuerdo al aumento de la imagen (112x y 179x).[30,42]

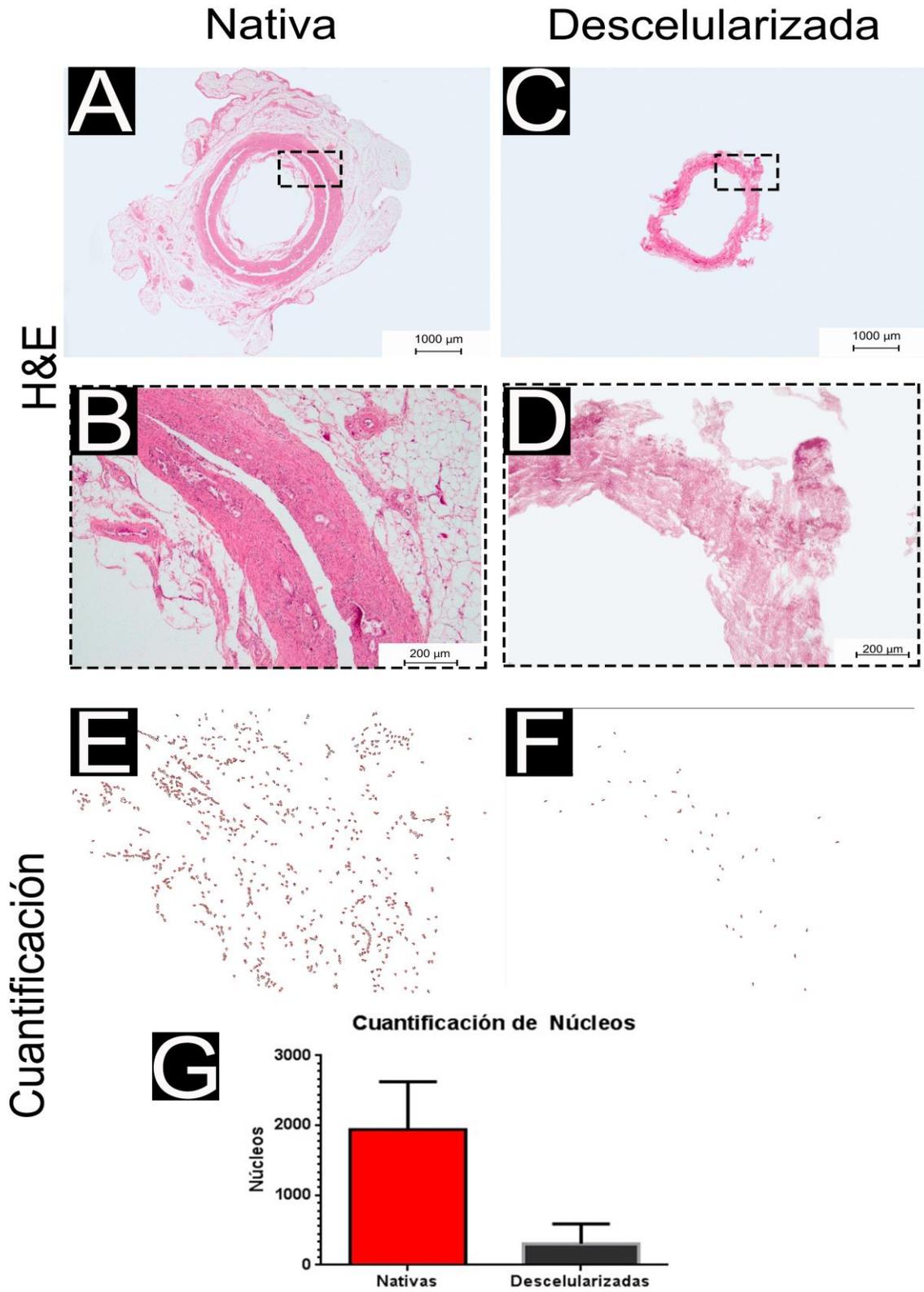


Fig. 18. Efectividad del proceso de decelularización de VBC.

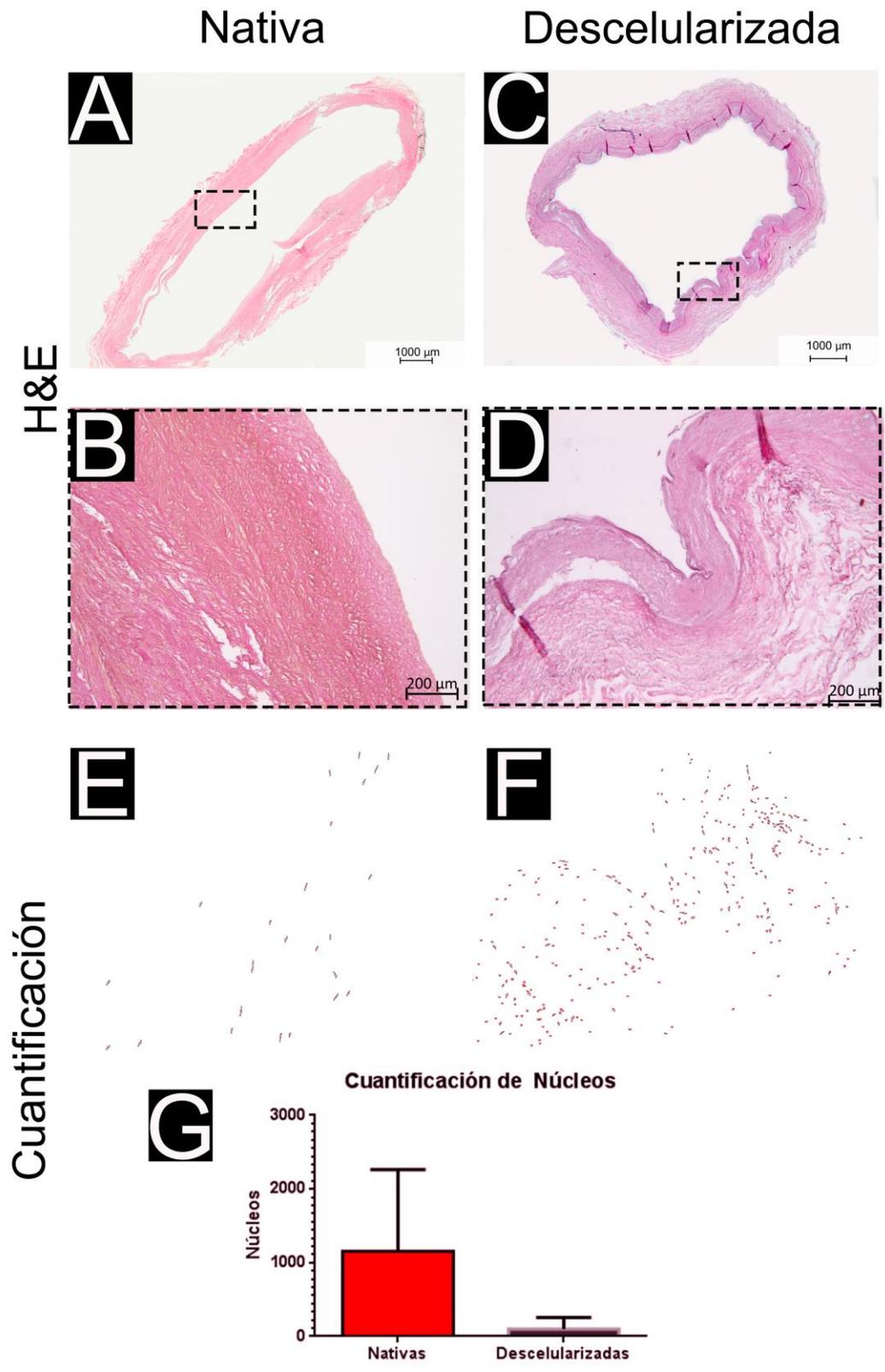


Fig. 19. Efectividad del proceso de descelerización de AH.

Se observan las micrografías de las muestras de AH y VBC tras el proceso de tinción H&E, mostrando la remoción del material nuclear posterior a la aplicación del protocolo de descelularización (Fig. 18 y 19, A y C), se aplicó un aumento mayor a dichas micrografías de tal forma que los núcleos celulares pueden ser captados por el software Image J (Fig. 18 y 19, B y D), para poder cuantificar los núcleos celulares presentes en dicha micrografía (Fig. 18 y 19, E y F). Con los resultados de la cuantificación de 5 muestras de VBC y su contraparte descelularizadas se mostró una diferencia significativa de la cantidad de núcleos celulares presentes ($p < 0.5$) (Fig. 19, G). De igual manera se estudiaron 9 muestras de AH y su contraparte descelularizada ($p < 0.5$) (Fig. 18, G). [6,30]

Para conocer la efectividad del protocolo de descelularización en ambos tejidos, se calculó el promedio de descelularización de los cortes histológicos de VBC y de AH (Tabla 8), los resultados concuerdan con la literatura, que menciona que el porcentaje de descelularización mínimo para aprovechar los andamios en las aplicaciones de Ingeniería de Tejidos debe ser entre 70% y 80%. Ambos tejidos se encuentran por encima de este rango.[21,74]

Tabla 8. Porcentaje de descelularización de las muestras de VBC y AH, según la cuantificación realizada con el software Image J.

Efectividad del Protocolo de Descelularización		
Tejido	Porcentaje de descelularización	Desviación estándar
Vía Biliar de Cerdo	86.80%	± 6.83%
Arteria Humana	93.70%	± 12.7%

4.2 Preservación de la Matriz Extracelular

La preservación de la arquitectura y las características fisicoquímicas de la MEC, posterior a la aplicación de un protocolo de descelularización, es una de las cualidades que debe tener un andamio descelularizado que se pretenda aplicar en Ingeniería de Tejidos y en especial como sustitución de un órgano.

Con la tinción histológica de Masson se pretende demostrar que el protocolo de descelularización que se aplicó en este trabajo logra eliminar el citoplasma celular de los tejidos nativos, manteniendo la morfología y densidad de las fibras de colágena de la MEC.

Con la microscopía electrónica de barrido (SEM) se puede observar la morfología superficial de las muestras, además de la forma del tejido. Aplicando esta caracterización a las muestras nativas y comparándolas con las descelularizadas, se puede apreciar el daño superficial a la arquitectura de la MEC causado por el protocolo de descelularización.

Las caracterizaciones térmicas mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), con el objetivo de establecer si las características macromoleculares que componen los tejidos se alteraron y son detectables a partir de cambios térmicos, si su estabilidad térmica se afectó se puede asociar a degradaciones sobre las moléculas que componen el material.

4.2.1 Tinción Tricrómica de Masson y Microscopía Electrónica de Barrido

Las micrografías de tinción tricrómica de Masson, las micrografías de SEM y las pruebas térmicas nos permiten analizar la preservación de la MEC, comparando los resultados de las muestras nativas con respecto a las descelularizadas (Fig. 20 y 21)

La tinción de Masson nos permite distinguir el citoplasma en coloración violeta, mientras que las fibras de colágena se muestran azules, en el caso de la comparativa de las muestras nativas contra las muestras descelularizadas, se observa una pérdida de material celular casi en su totalidad, mientras que las fibras de colágena de la MEC se mantienen con la morfología y densidad de las muestras nativa (Fig. 20 y 21, A y C)[30,43]. Incluso observando las micrografías a aumentos más grandes (179X) las fibras de colágena se mantienen con una morfología adecuada en ambos tejidos (Fig. 20 y 21, B y D).

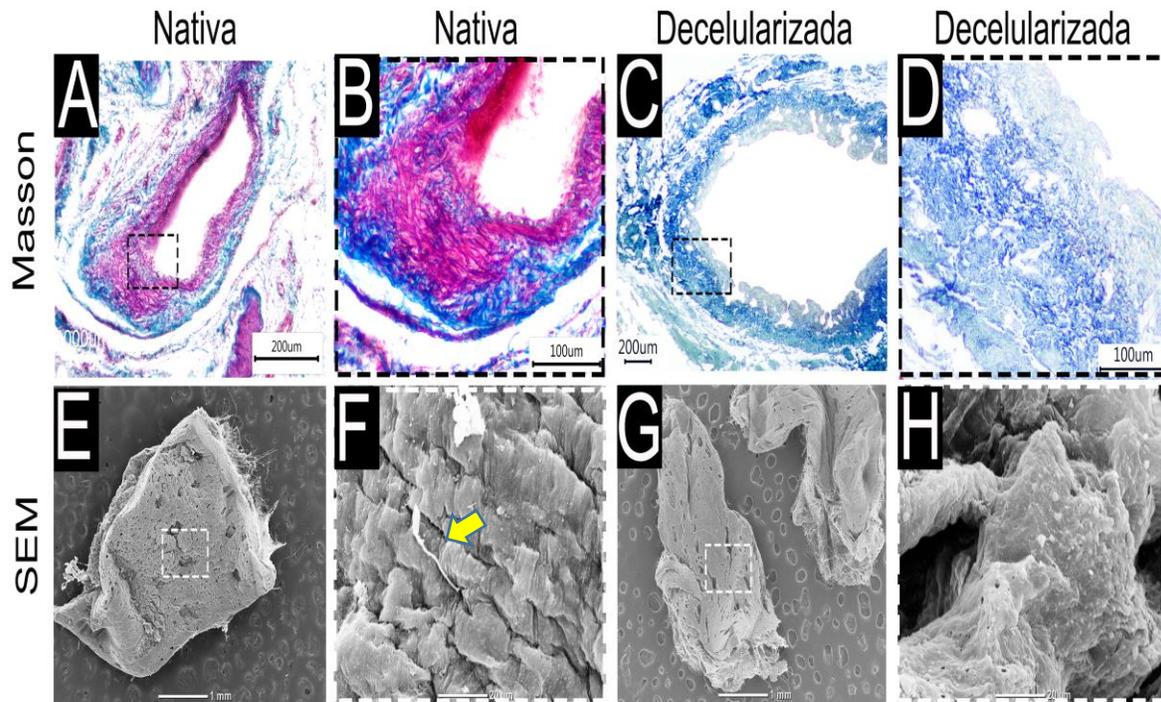


Fig. 20. Evidencias de la preservación de la MEC en las muestras de VBC, después de la aplicación del protocolo de descelularización (células señaladas con flecha amarilla).

Por parte de las micrografías de SEM, la morfología superficial de las muestras nativas es prácticamente idéntica que la de las muestras descelularizadas (Fig. 20, E y G; Fig. 21, E y F; todas a 20X), incluso en la AH (Fig. 21, H y J, ambas a 1000X) se notan fibras de la MEC con apariencia similar en la muestra nativa (Fig. 21, H, a 1000X) y después de la aplicación del protocolo de descelularización (Fig. 21, J, a 1000X).

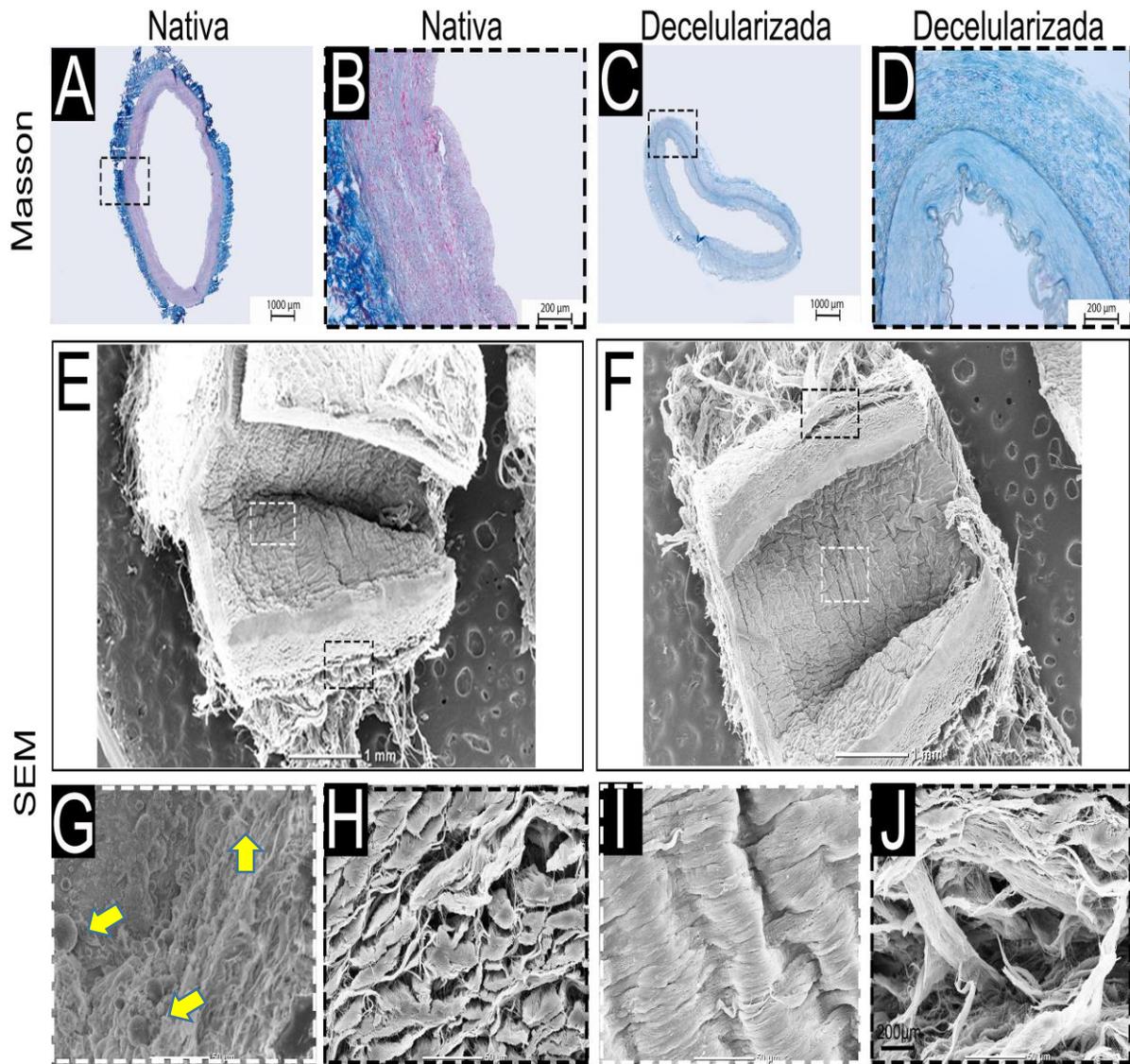


Fig. 21. Evidencias de la preservación de la MEC en las muestras de AH, después de la aplicación del protocolo de descelularización (células señaladas con flecha amarilla).

En la cara luminal de las muestras nativas (cara interna de los órganos tubulares) de ambos tejidos, se logran observar células en las micrografías (Fig. 20, G; Fig. 21, F, ambas a 20X). En el caso de las muestras de AH son consistentes con células endoteliales, que se confirma con su tamaño, de 15 μm a 30 μm de diámetro[30] (Fig. 20, G, a 1000X); mismas que no están presentes en la micrografía en la misma zona de la muestra descelularizada de AH (Fig. 21, I, a 1000X) . Mientras que en la micrografía nativa de VBC (Fig. 20, F, a 1000X) se logra mostrar el cilio primario de la parte apical de un colangiocito, célula característica de la cara luminal de la VBC, que con el cilio sobresaliente de la MEC pueden censar el flujo de los fluidos que conduce en sus funciones naturales, como parte de los conductos biliares; células que no se observan en la micrografía de la muestra descelularizada, observada con los mismos parámetros de aumento y zona del tejido (Fig. 20, H, a 1000X)

4.2.2 Caracterización Térmica

Los termogramas correspondiente a los análisis a los que se sometieron las muestras de VBC presentaron comportamiento típico de la colágena, según resultados de estudios anteriores[19,61], lo que nos puede sugerir que contamos con este polímero en su mayoría, tanto en las muestras nativas, como en las descelularizadas.

En el perfil del análisis de TGA aplicado a la VBC nativa (con masa inicial de 0.5 mg) se observa una pérdida de masa de 5.89% que ocurre a una temperatura de 89.8°C, una temperatura típica de la deshidratación superficial de la colágena, donde empieza también su desnaturalización [18,19]. El segundo cambio observado es de 1.64% a una temperatura de 216.9°C, correspondiente a un desprendimiento del agua estructural de la molécula (~230°C) [18,19]. Finalmente se observa en el perfil del TGA una pérdida casi completa de la masa de la muestra 63.92% a 500 °C, lo cual se puede interpretar como la descomposición completa del tejido (Fig. 22)

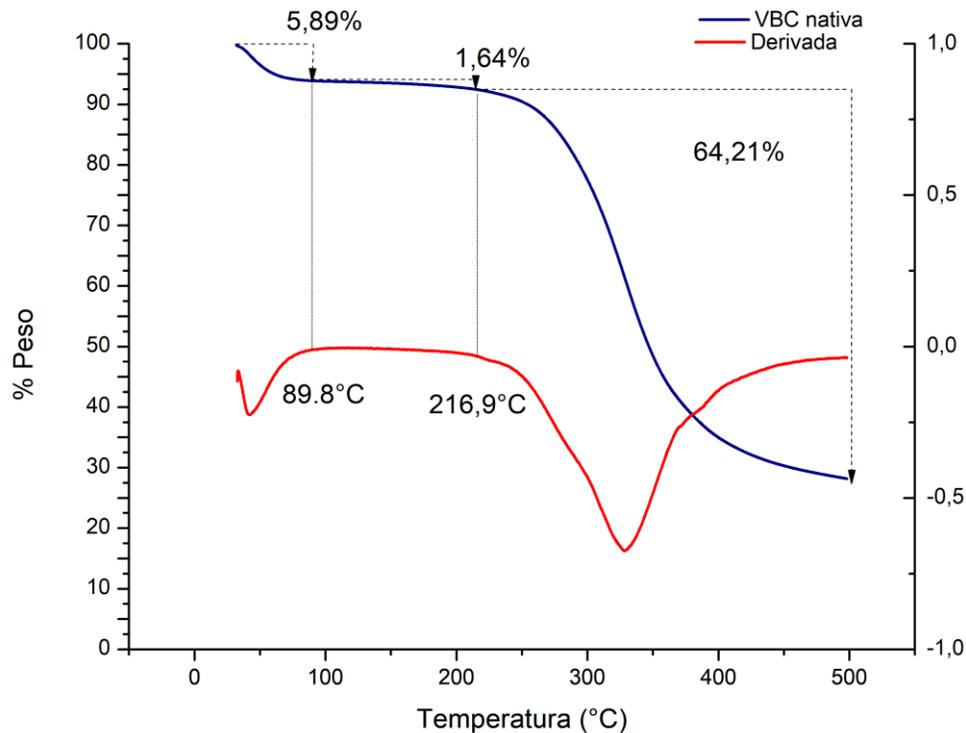


Fig. 22. Perfil de análisis termogravimétrico de muestra nativa de VBC.

Se puede ubicar la temperatura de las transiciones térmicas con la primera derivada de la curva de TGA, la curva DTA (Fig. 22, 24, 28 y 29, curva roja), que muestra el primer cambio exotérmico alrededor de los 450 °C, donde se puede afirmar que inicia la combustión del tejido, procesos observados en los termogramas de TGA de ambos tejidos AH y VBC, en muestras nativas y descelularizadas (Fig. 22, 24, 28 y 29).

Con la superposición del perfil de DSC de la misma muestra nativa de VBC, se confirman la primera variación de masa del perfil del TGA, como procesos de deshidratación, coincidiendo con el primer pico endotérmico del perfil de DSC (Fig. 23); de igual manera se notan más picos endotérmicos, aproximadamente de ~200 °C a ~325°C, que detonan más procesos de desprendimiento del agua estructural de la molécula[19], aunque al tratarse de un pico tan ancho, se podría estar presentando un fenómeno de desdoblamiento de las proteínas de soporte de la MEC, dicho proceso se tendría que estudiar con otra técnica de caracterización, que al tratarse de temperaturas tan altas no están dentro del rango de aplicación de los andamios estudiados en este trabajo, alrededor de 37 °C.

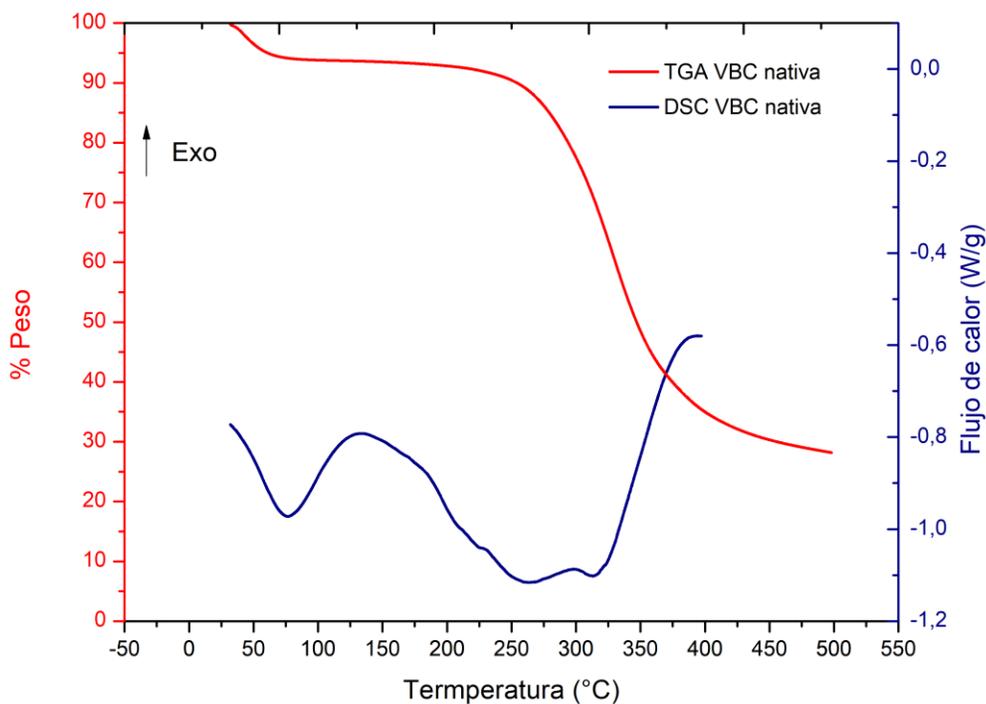


Fig. 23. Superposición de los perfiles de análisis termogravimétrico y calorimetría diferencial de barrido de la VBC nativa.

Para la muestra de VBC descelularizada (con masa inicial de 0.5 mg), el perfil del análisis de TGA muestra la primera pérdida de masa de 4.5% a una temperatura de 96.3 °C, una menor deshidratación y a una temperatura más alta que la muestra nativa. El segundo cambio observado es de 3.1% a una temperatura de 216.9 °C, coincidiendo en la temperatura, pero con una pérdida de masa mayor que la muestra nativa. El decaimiento final a los 500 °C es de 76.1% de la masa, un dato significativamente mayor que en el caso de la muestra de VBC nativa. (Fig. 24)

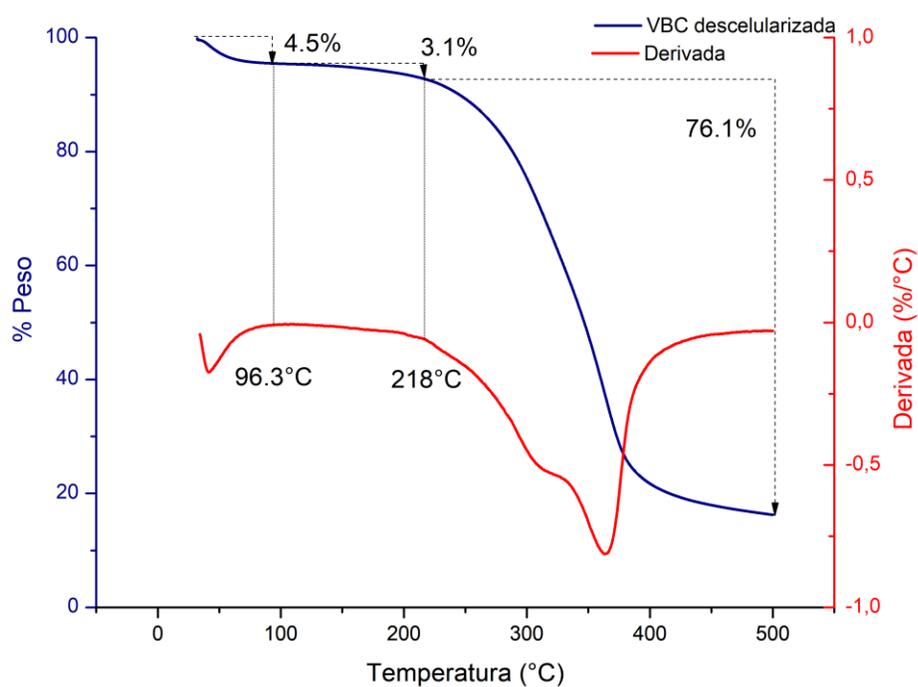


Fig. 24. Perfil del análisis de TGA de la VBC descelularizada.

Con la superposición de los perfiles de TGA y DSC de la muestra descelularizada, se pueden confirmar un comportamiento similar que los termogramas de la muestra nativa.

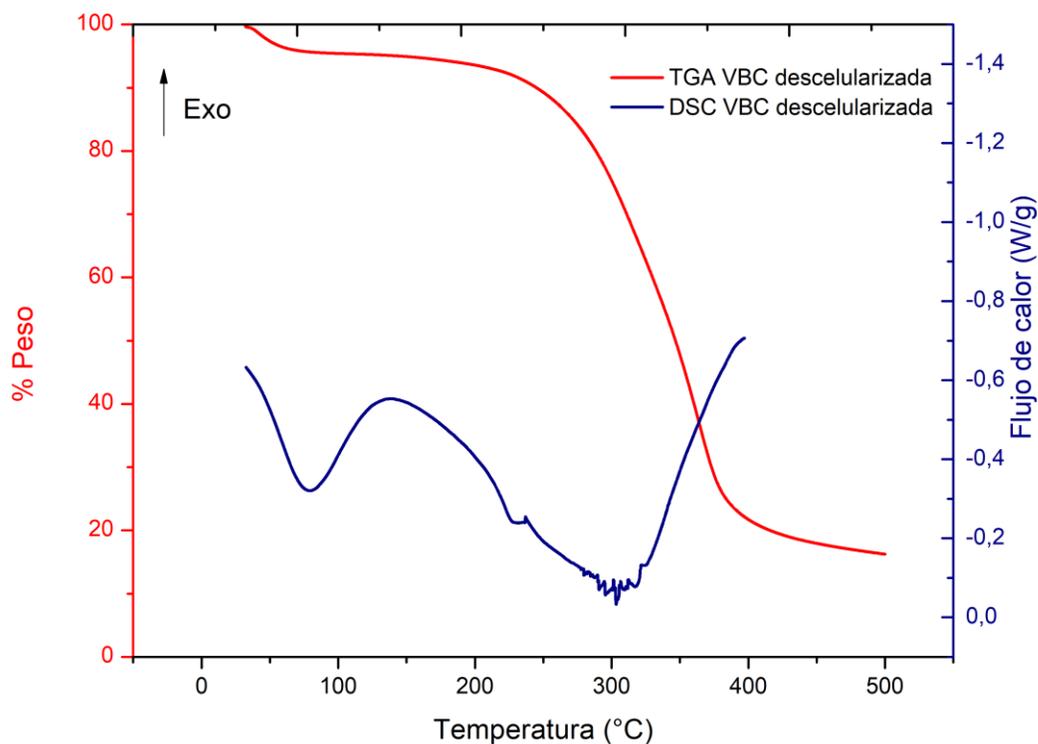


Fig. 25. Perfil del análisis de calorimetría diferencial de barrido y de análisis termogravimétrico de la VBC descelularizada.

Los patrones termogravimétricos de DSC de la muestra de VBC nativa y descelularizada, terminan cerca de los 400 °C, debido a que el equipo de medición (DSCQ100 de TA Instruments) terminó la prueba, debido a la combustión completa de la muestra.

Comparando ambos perfiles termogravimétricos, de las muestras nativa y descelularizada de VBC, se confirma un comportamiento térmico similar, aunque con una pérdida de masa mayor en el caso de la muestra descelularizada, después de los 350 °C.

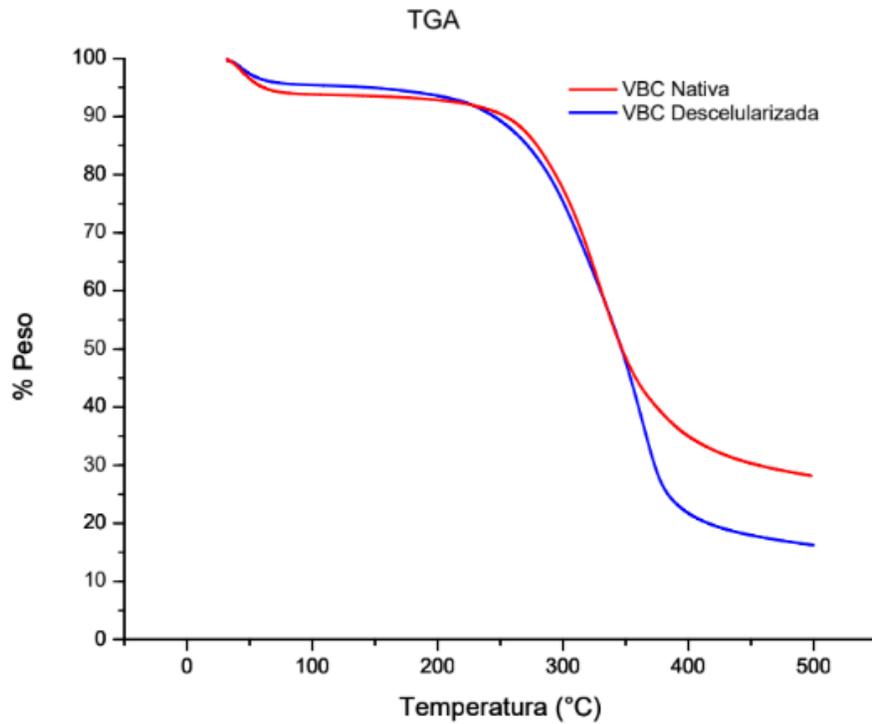


Fig. 26. Superposición de los perfiles del análisis de TGA de las muestras nativa y descelularizada de VBC.

Comparando los perfiles de DSC para las muestras de VBC se observa un comportamiento muy similar, lo cual no se respeta al llegar a ~ 300 °C, lo que indica que la muestra descelularizada se descompone a menor temperatura que la nativa, información que se puede corroborar con los TGA, sin embargo a esta temperatura las lecturas ya no son muy confiables porque los tejidos ya están degradados y se encuentran a una temperatura mucho mayor de lo que estarán en condiciones normales.

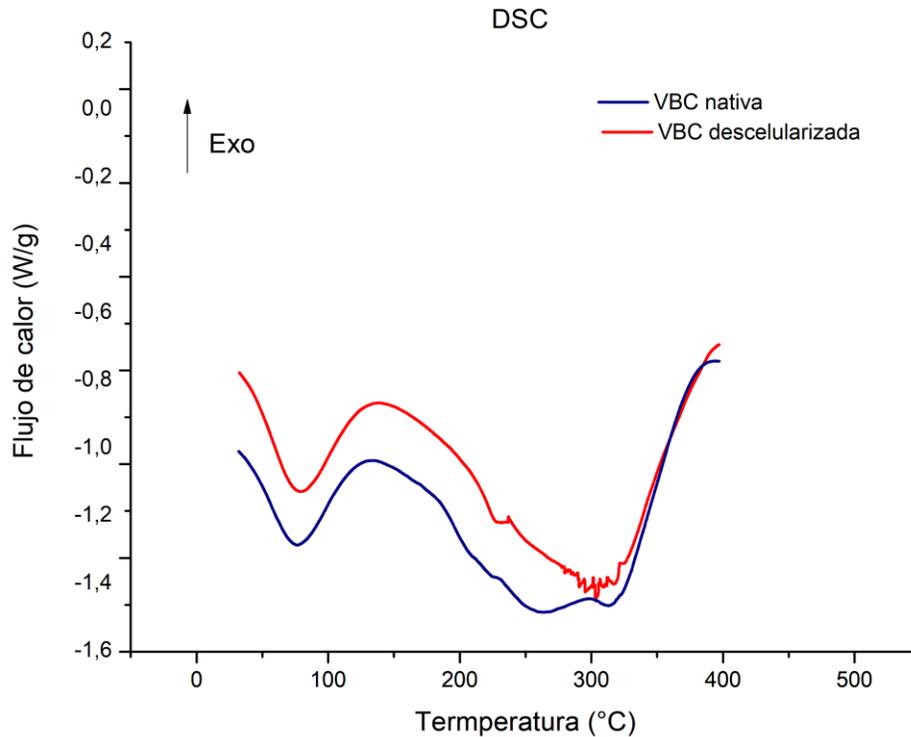


Fig. 27. Superposición de los perfiles del análisis de DSC de las muestras nativa y descelularizada de VBC.

Los termogramas de las muestras AH no se ajustan a los datos reportados en la bibliografía como el comportamiento de la colágena, muestran la primera pérdida de masa de 8.55% en una temperatura de ~ 170 °C en la muestra nativa y de 4.89% a una temperatura ~ 500 °C (Fig. 28 y 29).

En el perfil del análisis de TGA aplicado a la AH nativa (con masa inicial de 2.88 mg) se observa una pérdida de masa de 7.77% que ocurre a una temperatura de 106.9 °C, una temperatura de deshidratación superficial y desnaturalización de la colágena. El segundo cambio observado es de 1.27% a una temperatura de 213. 63°C, correspondiente a un desprendimiento del agua estructural de la molécula (~ 230 °C) [18,19]. Finalmente se observa en el perfil del TGA una pérdida casi completa de la masa de la muestra 60. 59% a 500 °C, lo cual se puede interpretar como la descomposición completa del tejido (Fig. 28)

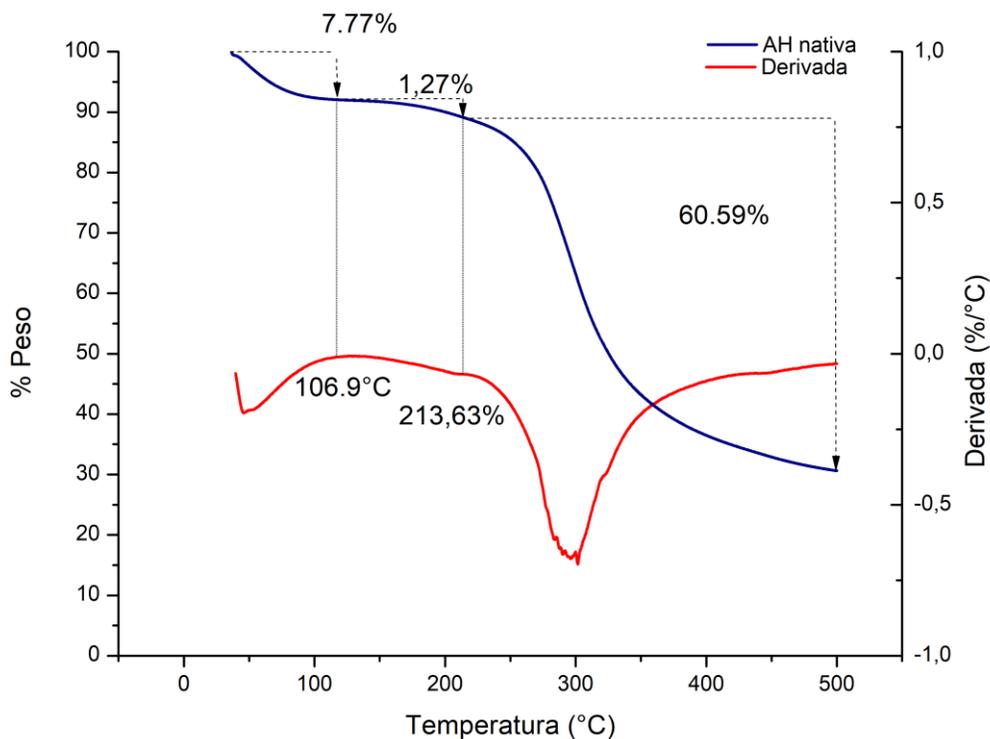


Fig. 28. Perfil del análisis termogravimétrico de la muestra AH nativa.

Para la muestra de AH descelularizada (con masa inicial de 1.85 mg), el perfil del análisis de TGA muestra la primera pérdida de masa de 4% a una temperatura de 101.75 °C, una menor deshidratación que la muestra nativa. El segundo cambio observado es de 2.63% a una temperatura de 222.36 °C, una mayor temperatura y una pérdida de masa mayor que la muestra nativa. El decaimiento final a los 500 °C es de 82.95% de la masa, un dato significativamente mayor que en el caso de la muestra de AH nativa. (Fig. 29)

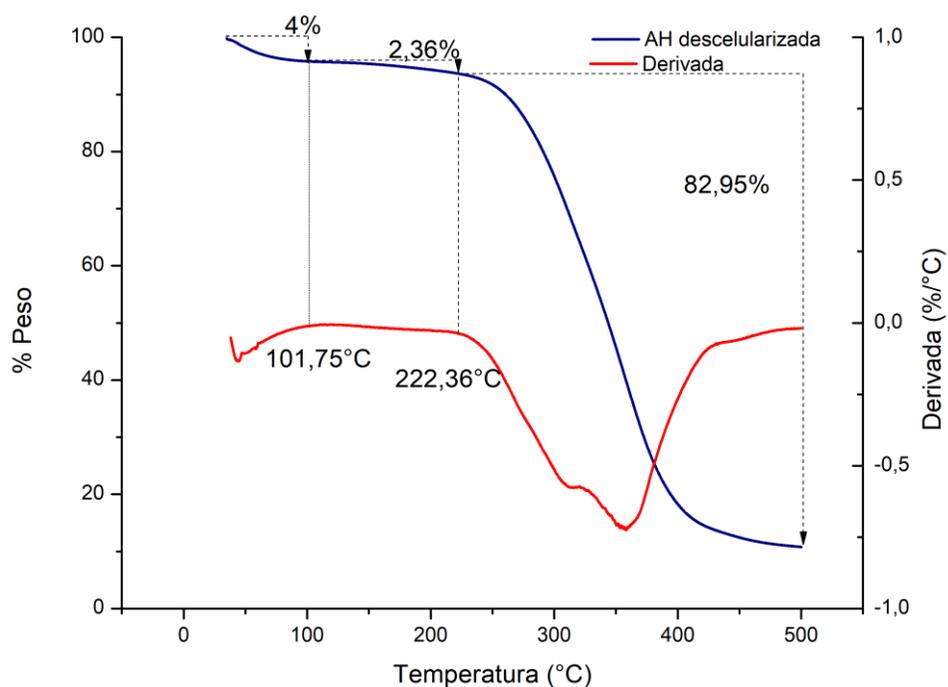


Fig. 29. Perfil del análisis termogravimétrico de la muestra AH descelularizada.

Quando se superponen los dos termogramas correspondientes a las muestras nativa y descelularizada de la AH, se observa un comportamiento similar, notando que la muestra nativa se descompone a una menor temperatura que la muestra descelularizada, sin embargo, el porcentaje final de pérdida de masa es menor a una temperatura de 500 °C que la muestra descelularizada, el mismo comportamiento que se notó con las muestras de VBC.

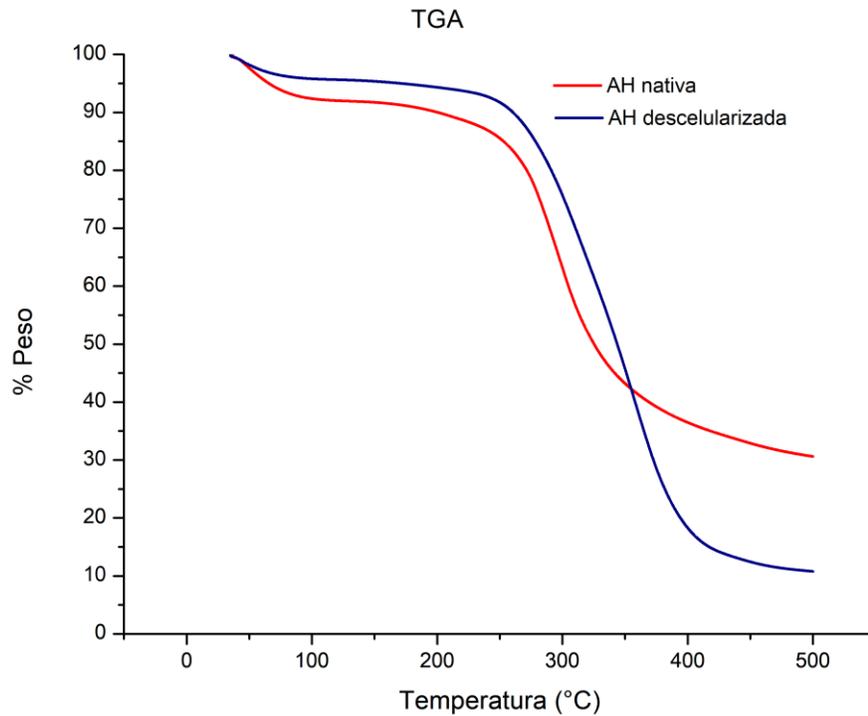


Fig. 30. Superposición de los perfiles del análisis de TGA de las muestras nativa y descelularizada de AH.

Los perfiles del análisis DSC para las muestras de AH, se comportan muy similar, lo que muestra que no hubo variación en el comportamiento térmico del tejido posterior a la aplicación del protocolo de descelularización (Fig. 29), comprobando que no hubo daño en las moléculas de la MEC, esta misma tendencia se nota con los termogramas de las muestras de VBC.

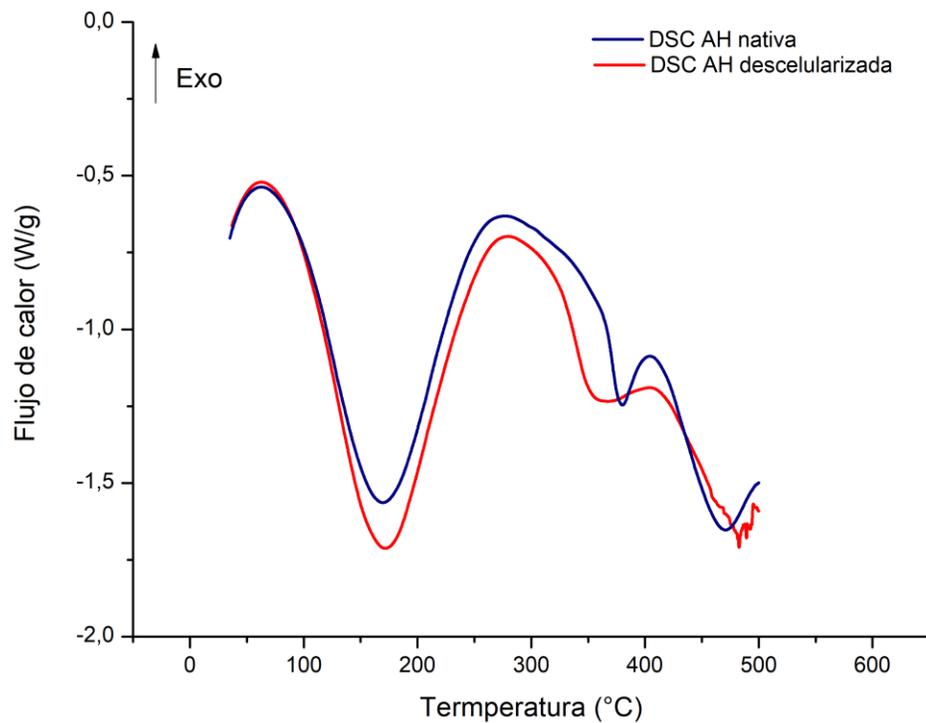


Fig. 31. Superposición de los perfiles del análisis de DSC de las muestras nativa y desceldularizada de AH.

Todos los termogramas señalan que no hay diferencias significativas en las curvas para las muestras nativas comparando con su parte desceldularizada, lo que indica que el proceso de desceldularización no modificó la estructura de la MEC.

En general los termogramas de las muestras nativas muestran una mayor pérdida de peso hasta 150 °C, lo que puede explicarse por humedad propia del material celular que al ser retirada. Sin embargo, la segunda transición térmica es mayor en los tejidos desceldularizados y la diferencia de pérdida de peso hasta los 220 °C (Fig. 22, 24, 29 y 31). Los flujos de calor de los perfiles de DSC en ambos tejidos desceldularizados son prácticamente de la misma intensidad que los tejidos nativos (Fig. 27 y 31), que en conjunto con la información de los análisis de TGA muestran que los tejidos desceldularizados son hidrofílicos, teniendo la capacidad de absorber agua del ambiente.

Contrario al comportamiento de las muestras de VBC, donde se puede asegurar que su componente estructural principal es la colágena, debido a los resultados de las caracterizaciones presentadas en este trabajo; los termogramas de las muestras de AH no se alinean con los datos reportados con anterioridad correspondientes a la colágena. Lo que podría explicarse con dos diferentes escenarios, el primero con la AH presentando distintos tipos de proteína estructural en su MEC, diferentes a la colágena tipo 1; el segundo podría deberse a sobre efectos topográficos del tejido en su caracterización fisicoquímica[84], teoría que se apoya en las anatomía de la arteria muscular (Fig. 5), al tener diferentes tónicas con características tan dispares podrían comportarse como un copolímero en las caracterizaciones fisicoquímicas.

Para poder conocer la composición química de la MEC de los tejidos estudiados, se recomiendan otro tipo de técnicas experimentales. La comparativa de los termogramas muestra un comportamiento térmico de las muestras nativas y descélularizadas prácticamente iguales.

CONCLUSIONES

Se compararon los andamios tubulares provenientes de Arteria Humana y Vía Biliar de Cerdo joven, obtenidos a través de la aplicación del mismo protocolo de descelularización

Se evaluó a través de una caracterización fisicoquímica e histológica, la efectividad del protocolo de descelularización aplicado sobre andamios tubulares de Arteria Humana y Vía Biliar de Cerdo.

Se evaluó la Matriz Extracelular resultante de la descelularización de Arteria Humana y Vía Biliar de Cerdo joven.

Los tejidos estudiados tienen un comportamiento térmico diferente que los reportados para la colágena, sin embargo, no se cuenta con experiencia suficiente para saber la causa de estas mediciones. La comparativa de las curvas correspondientes al tejido nativo en comparación con el tejido descelularizado, no muestra una modificación en su perfil térmico.

En todas las caracterizaciones reportadas en este trabajo se muestra una eficiencia del protocolo de descelularización de un $86.8\% \pm 6.83\%$ para la Vía Biliar de Cerdo y de $93.7\% \pm 12.7\%$ para la Arteria Humana, además de una preservación de la Matriz Extracelular, tanto en Vía Biliar de Cerdo como en Arteria Humana. Por lo que se puede asegurar que se obtuvieron andamios de vía biliar de cerdo y arteria humana descelularizados, para su posible aplicación en Ingeniería de Tejidos.

El protocolo de descelularización que resultó adecuado para Vía Biliar de Cerdo joven, se puede aplicar para obtener un andamio tubular descelularizado de Arteria Humana, adecuado para Ingeniería de Tejidos, según los resultados de las caracterizaciones fisicoquímicas e histológicas de este trabajo.

PERSPECTIVAS

En los termogramas se pueden observar las muestras nativas y las descelularizadas, fuera del rango de las condiciones físicas para las cuales se busca aplicar nuestros andamios, como serían los 37 °C promedio del cuerpo humano, por ejemplo, por los que no es objeto de esta investigación llegar a una conclusión de dichas variaciones. Pero se plantea para trabajos posteriores el estudio de dichas variaciones y la relación que tienen con la presencia de material celular.

Mientras mejor se entiendan las variaciones y el comportamiento de los tejidos cuando se les aplican protocolos de descelularización, se podrán predecir y controlar mejor las características de los andamios creados, por lo que caracterizaciones de adicionales que permitan tener una mejor visualización del tema pueden incluirse, tal es el caso de una caracterización mecánica y química más profunda.

Para trabajos futuros, se plantea la posibilidad de recelularizar nuestros andamios descelularizados, exponiéndolos a medio de cultivo rico en células y a una perfusión similar a la utilizada para la descelularización. En el caso de la arteria ya se conocen trabajos previos de la recelularización, sin embargo, no se ha logrado una correcta densidad celular de músculo liso a comparación de la arteria nativa, lo que lleva a problemas en el momento de su implantación. [85]

Se propone estudiar la razón de la variación de los termogramas de la Arteria Humana en comparación con la de la Vía Biliar de Cerdo, la caracterización química con técnicas como la espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) o electroforesis, podrá dar una idea más clara de la estructura de la MEC.

BIBLIOGRAFÍA

1. CENTRA. BOLETÍN ESTADÍSTICO INFORMATIVO DEL CENTRO NACIONAL DE TRASPLANTES. 2018;3.
2. Dogan N, Hüsing-Kabar A, Schmidt HH, Cicinnati VR, Beckebaum S, Kabar I. Acute allograft rejection in liver transplant recipients: Incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure. *J Int Med Res.* 2018;46:3979–90.
3. Rowiński W. Future of transplantation medicine. *Ann Transplant.* 2007;12:5–10.
4. Sayegh M, Carpenter CB. Transplantation 50 years later – Progress, Challenges and Promises. *NEJM.* 2004;351.
5. Lanza R, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering [Internet]. 3°. Burlington, Massachusetts: Academic Press; 2007. Available from: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/detail/detail?sid=7a1dc0f3-2f77-4418-b771-1f274231f06d%40sessionmgr112&vid=0&hid=108&bdata=Jmxhbm9ZXMmc2l0ZT1lZHMtYGl2ZQ%3D%3D#AN=edsjst.JST.JSTAGE.tga.62.12&db=edsjst>
6. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32:3233–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
7. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med.* 2008;3:1–5.
8. Atala A. Engineering organs. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20:575–92.
9. Banguera S, Del Gaudio C, Kuevda E, Gonfiotti A, Bianco A, Macchiarini P. Dynamic decellularization and cross-linking of rat tracheal matrix. *Biomaterials.* 2014;35:6344–50.
10. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The Lancet* [Internet]. 367;:1241–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673606684389>
11. MARÍN JYR. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO CELULAR PROCEDENTE DE VÍA BILIAR EXTRAHEPÁTICA PARA FINES DE MEDICINA REGENERATIVA Y TRASPLANTE. UNAM; 2020.
12. GIRALDO D. PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN CÍCLICO DE TRÁQUEA COMO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO NATURAL 3D PARA INGENIERÍA DE ÓRGANOS. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; 2016.
13. Erdmann S. Tissue Engineering II. *Principles of Tissue Engineering* [Internet]. 2015;1–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-436630-5.50032-5>
14. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27:3675–83.
15. GIRALDO D. OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO ACELULAR PARA SUBSTITUCIÓN DE TRÁQUEA. 2011;72.
16. Martínez H. DESCELULARIZACIÓN DE ÓRGANOS: DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN DISPOSITIVO PARA LA OBTENCIÓN DE ANDAMIOS 3D EL INICIO DE LOS ÓRGANOS BIOARTIFICIALES EN MÉXICO. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; 2015.
17. Hidalgo JL. Elaboración y Caracterización de Membranas de Colágena-Quitósán Entrecruzadas con EDC para la Regeneración Ósea Guiada. UNAM; 2018.
18. Giraldo-Gomez DM, Leon-Mancilla B, Del Prado-Audelo ML, Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Garcíadiego-Cazares D, et al. Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical

characterization. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;59:930–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.094>

19. Del Prado ML. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COLÁGENA TIPO I A PARTIR DE DIFERENTES TEJIDOS BIOLÓGICOS. UNAM; 2012.

20. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;34:6760–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.066>

21. OTT H, TAYLOR D. Descelularización y recelularización de órganos y tejidos. 2008. p. 1–21.

22. Gómez L. Manufactura aditiva de andamios de policaprolactona/hidroxiapatita para regeneración ósea. UNAM; 20017.

23. Walles H, Walles T. Extracellular matrix as biomimetic biomaterial: Biological matrices for tissue regeneration [Internet]. *Compr. Biomater.* Elsevier Ltd.; 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00077-5>

24. Orlando G, Wood KJ, Stratta RJ, Yoo JJ, Atala A, Soker S. Regenerative medicine and organ transplantation: Past, present, and future. *Transplantation*. 2011;91:1310–7.

25. Baiguera S, Gaudio C Del, Bianco A, Macchiarini P. The Bio-Artificial Trachea. *Stem Cell Biol Tissue Eng Dent Sci* [Internet]. Elsevier; 2015. p. 641–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123971579000527>

26. Secretaría de Salud. Centro Nacional de Trasplante (CENATRA). Reporte anual 2018 de donación de trasplante en México. 2019;81. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/427652/Presentacion_anual_2018.pdf

27. CENATRA. Estado Actual de Receptores, Donación y Trasplantes en México 1er Semestre 2019. *J Chem Inf Model*. 2019;

28. Keplinger KM, Bloomston M. Anatomy and embryology of the biliary tract. *Surg Clin North Am* [Internet]. Elsevier Inc; 2014;94:203–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2014.01.001>

29. Chamberlain RS, Blumgart LH. *Hepatobiliary Surgery*. J. Thorac. Oncol. Georgetown, Texas: Landes Bioscience; 2003.

30. Ross MH, Pawlina W. *Histología. Texto y Atlas*. 7°. Philadelphia: Wolters Luwer; 2015.

31. Flum DR, Koepsell T, Heagerty P, Sinanan M, Dellinger EP. Common bile duct injury during laparoscopic cholecystectomy and the use of intraoperative cholangiography: Adverse outcome or preventable error? *Arch Surg*. 2001;136:1287–92.

32. Mercado MA. Early versus late repair of bile duct injuries. *Surg Endosc Other Interv Tech*. 2006;20:1644–7.

33. Dominguez-Rosado I, Mercado MA, Kauffman C, Ramirez-del Val F, Elnecavé-Olaiz A, Zamora-Valdés D. Quality of Life in Bile Duct Injury: 1-, 5-, and 10-year Outcomes After Surgical Repair. *J Gastrointest Surg*. 2014;18:2089–94.

34. Moraca RJ, Lee FT, Ryan JA, Traverso LW. Long-term biliary function after reconstruction of major bile duct injuries with hepaticoduodenostomy or hepaticojejunostomy. *Arch Surg*. 2002;

35. Lubikowski J, Chmurowicz M, Post M. Liver transplantation as an ultimate step in the management of iatrogenic bile duct injury complicated by secondary cirrhosis. *Ann Transpl*. 2012;17:38–44.

36. Li Q, Tao L, Chen B, Ren H, Hou X, Zhou S, et al. Extrahepatic bile duct regeneration in pigs using collagen

scaffolds loaded with human collagen-binding bFGF. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;33:4298–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.003>

37. Rosen M, Ponsky J, Petras R, Fanning A, Brody F, Duperier F. Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration. *Surgery*. 2002;132:480–6.

38. Pérez Alonso AJ, Del Olmo Rivas C, Romero IMH, Cañizares Garcia FJ, Poyatos PT. Tissue-engineering repair of extrahepatic bile ducts. *J Surg Res*. 2013;179:18–21.

39. Wang YM, Zhou P, Wang LY, Li ZH, Zhang YN, Zhang YX. Correlation between DNase I hypersensitive site distribution and gene expression in HeLa S3 cells. *PLoS One*. 2012;7.

40. Dylan D-C, Ana R-H, Mónica B-P, Oliva R-D, Jorge F-R, Javier A. Mecanotransducción: Cómo la célula percibe los estímulos. *Tame* [Internet]. 2015;4:396–401. Available from: http://www.uan.edu.mx/d/a/publicaciones/revista_tame/numero_11/Tam15111-07r.pdf

41. Morphologic and Biochemical Aspects of Arteries and Veins. *Blood Vessel Lymphat Organ Syst* [Internet]. Elsevier; 1984. p. 3–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120425204500063>

42. Arthur C. Guyton., John E. Hall “ Tratado de Fisiología Médica.” 10°. México: McGrawHill - Interamericana; 2005.

43. Junqueira J. *Histología Básica Texto y Atlas*. 5° Reimpre. Barcelona, España: Masson; 2001.

44. Sheridan WS, Duffy GP, Murphy BP. Mechanical characterization of a customized decellularized scaffold for vascular tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;8:58–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.12.003>

45. Roger VL, Go AS, Lloyd-jones DM. Heart disease and stroke statistics. *Am Hear Assoc*. 2011;e18–209.

46. Gray, B.H., Conte, M.S., Dake, M.D., Jaff, M.R., Kandarpa, K., Ramee, S.R., Rundback, J., Waksman R. Atherosclerotic peripheral vascular disease symposium II: lower-extremity revascularization: state of the art. *Circ* 2018. 2008. p. 2864–2872.

47. Zhao, Y., Zhang, S., Zhou, J., Wang, J., Zhen, M., Liu, Y., Chen, J., Qi Z. The development of a tissue-engineered artery using decellularized scaffold and autologous ovine mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31:296–307.

48. O’connell, M.K., Murthy, S., Phan, S., Xu, C., Buchanan, J., Spilker, R., Dalman, R.L., Zarins, C.K., Denk, W., Taylor CA. The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix Biol*. 2008;27:171–181.

49. Dahl, S., Rhim, C., Song, Y., Niklason L. Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries. *Ann Biomed Eng*. 2007;35:348–355.

50. Zhu, C., Ying, D., Mi, J., Li, L., Zeng, W., Hou, C., Sun, J., Yuan, W., Wen, C., Zhang W. Development of anti-atherosclerotic tissue-engineered blood vessel by A20- regulated endothelial progenitor cells seeding decellularized vascular matrix. *Biomaterials*. 2008;29:2628–2636.

51. Kucera KA, Doss AE, Dunn SS, Clemson LA, Zwischenberger JB. Tracheal Replacements: Part 1. *ASAIO* [Internet]. 2007;53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667239>

52. Belsey R. Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea. *Br J Surg* [Internet]. 1950;38:200–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.18003815008>

53. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2005;203:465–70.

54. Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-engineered grafts from human

- decellularized extracellular matrices: A systematic review and future perspectives. *Int J Mol Sci.* 2018;19.
55. Xiao S wei, Wang P chao, Fu W jun, Wang Z xin, Li G, Zhang X. Novel perfusion-decellularized method to prepare decellularized ureters for ureteral tissue-engineered repair. *J Biosci Bioeng [Internet]. Elsevier Ltd;* 2016;122:758–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.06.009>
56. Boudreau N, Jones P. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem Journal.* 1999;10:481–8.
57. Friedl P, Wolf K, Lammerding J. Nuclear mechanics during cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23:55–64.
58. Gómez-Lizárraga KK. Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. UNAM; 2010.
59. Blanco A. Química biológica. 7°. Barcelona: El Ateneo; 1997.
60. Hialurónico Á, En I, Elissetche AB, Nicolás B, Cid AD, Paula M, et al. Entrecruzamiento por tratamiento dehidrotermal de andamios de colágeno y ácido hialurónico impresos en 3d. 2017;
61. Giraldo-Gomez DM, García-López SJ, Tamay-de-Dios L, Sánchez-Sánchez R, Villalba-Caloca J, Sotres-Vega A, et al. Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering. *Mater Sci Eng C [Internet]. Elsevier;* 2019;105:110142. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110142>
62. Petersen T, Calle E, Zhao L, Jung E, Gui L, Al. E. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science (80-).* 2010;329:537–41.
63. Alberts B, Bray D. *Biología molecular de la célula.* 3°. Barcelona: Omega; 2002.
64. Ortiz RMC. Evaluación del Efecto Antitumoral de Epítomos Derivados de Moléculas MHC I en un Modelo Murino de Adenocarcinoma. UNAM; 2016.
65. Vacanti C, Paige K, Seob Kim T, Al. E. Experimental tracheal replacement using tissue- engineered cartilage. *J Pediatr Surg.* 1994;29:201–5.
66. Rana D, Zreiqat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med [Internet].* 2017;11:942–65. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.2061>
67. Beckers LJA, Baragona M, Shulepov S, Vliegenthart T, Van Doorn AR. Mechanical cell lysis device. 14th Int Conf Miniaturized Syst Chem Life Sci 2010, MicroTAS 2010. 2010;1:85–7.
68. Hinds MT, Rowe RC, Ren Z, Teach J, Wu P-C, Kirkpatrick SJ, et al. Development of a reinforced porcine elastin composite vascular scaffold. *J Biomed Mater Res Part A [Internet].* 2006;77A:458–69. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30571>
69. McFetridge PS, Daniel JW, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res [Internet].* 2004;70A:224–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30060>
70. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold materials. *Biomaterials.* 2007;3587–93.
71. Meezan E, Hjelle JT, Brendel K. A simple, versatile, nondisruptive method for the iso- lation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues. *Life Sci.* 1975;17:1721–32.
72. Mercado MÁ, Chan C, Orozco H, Villalta JM, Barajas-Olivas A, Eraña J, et al. Long-term evaluation of biliary reconstruction after partial resection of segments IV and V in iatrogenic injuries. *J Gastrointest Surg.* 2006;10:77–82.

73. Srowoski E, Woodhouse K. Decellularized Scaffolds. *C Biomater*. 2011;Ed. Oxford:369–86.
74. Cervante I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANDAMIOS TEGUMENTARIOS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURALES DE *Cassiopea xamachana*. *Cent. Investig. Científica Yucatán A.C*. 2018.
75. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14:213–21.
76. Hung S-H, Su C-H, Lee F-P, Tseng H. Larynx Decellularization: Combining Freeze-Drying and Sonication as an Effective Method. *J Voice* [Internet]. 2013;27:289–94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892199713000192>
77. Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, et al. *Introducción a la Biología Celuar*. 2°. España: Medica Panamericana; 2004.
78. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, et al. *Biología Celular y Molecular*. 5°. Madrid, España: Médica Panamericana; 2006.
79. Fothergill, M., Goodman, M. F., Petruska, J., & Warshel A. Structure-Energy Analysis of the Role of Metal Ions in Phosphodiester Bond Hydrolysis by DNA Polymerase I. *J Am Chem Soc*. 1995;117:11619–27.
80. Vázquez NAR, Salazar HDA, García JR, Rivera Armenta J, García-Hernández E, Salgado-Delgado R. *Materiales Compuestos De Poliuretano Poroso/Hidroxiapatita*. 2008;9:25–35.
81. *Uso CY LD. Nom-062-Zoo-1999*. 1999.
82. Pietrucha K. Changes in denaturation and rheological properties of collagen–hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2005;36:299–304. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813005001352>
83. Chávez RM. *Fundamentos histológicos de la conservación del fruto de Litchi sinensis Sonn. Determinación en Microscopia de Barrido de cambios del pericarpo*. Universidad Autónoma Metropolitana; 2006.
84. Rice JJ, Martino MM, De Laporte L, Tortelli F, Briquez PS, Hubbell JA. Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2013;2:57–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/adhm.201200197>
85. Neff, L.P., Tillman, B.W., Yazdani, S.K., Machingal, M.A., Yoo, J.J., Soker, S., Bernish, B.W., Geary, R.L., Christ GJ. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *J Vasc Surg*. 2011;53:426–434.

ANEXOS

A continuación, se incluye la carta de autorización del Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, para el protocolo de investigación y extracción de muestras.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



Ciudad de México, a 12 de Septiembre de 2019
No. Oficio MCONTRIG-1264/1919
REG. CONBIOÉTICA-09-CEL-011-2011/627

DR. CARLOS ARTURO HERRERA BECERRIL
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DIRECCIÓN DE QUIRUGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
VASCO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI, DEL TLALPÁN
CIUDAD DE MÉXICO, C.P. 14080
PRESENTE

En respuesta a su oficio del pasado 19 de agosto, correspondiente al protocolo de Investigación Clínica, titulado:

"Biocondensado repoblado con células troncales del tejido adiposo de donador vivo diferenciadas a fenotipo endotelial para el repoblamiento de un conducto venoso en una matriz extracelular obtenida a partir de un donador cadavérico para el desarrollo de injertas vasculares biológicas"
REF. 2473

Le informamos que se toma conocimiento del estado actual del estudio, así mismo se autoriza la reprobación anual con vigencia hasta el 12 de septiembre de 2020.

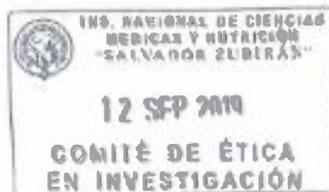
Sin más por el momento, quedamos de Usted.

ATENTAMENTE,


DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

CAAS/AGF/MRS


DR. ARTURO GALINDO FRAGA
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpán
Código Postal 14080
Ciudad de México, México
Tel. (52) 56 67 04 00
www.incmnsz.mx