



GOBIERNO DE LA  
CIUDAD DE MÉXICO



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SECRETARIA DE SALUD DE LA CIUDAD DE MÉXICO  
DIRECCIÓN DE FORMACIÓN, ACTUALIZACIÓN MÉDICA E INVESTIGACIÓN**

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN  
CIRUGÍA GENERAL

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO CELULAR PROCEDENTE  
DE VÍA BILIAR EXTRAHEPÁTICA PARA FINES DE MEDICINA  
REGENERATIVA Y TRASPLANTE.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PRESENTADO POR JORGE YOLIK RAMÍREZ MARÍN

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN  
CIRUGÍA GENERAL

DIRECTORES DE TESIS

DR DAVID MAURICIO GIRALDO GÓMEZ

DR MIGUEL ÁNGEL MERCADO DÍAZ

DR JOSÉ TREJO SUÁREZ



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.



**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN ANDAMIO CELULAR  
PROCEDENTE DE VÍA BILIAR EXTRAHEPÁTICA PARA FINES DE  
MEDICINA REGENERATIVA Y TRASPLANTE.**

**Autor: Dr. Jorge Yolik Ramírez Marín**

**Vo. Bo.**

**Dr. Francisco Javier Carballo Cruz**

---

**Profesor Titular del Curso de Especialización en Cirugía General**

**Vo. Bo.**

**Dra. Lilia Elena Monroy Ramírez de Arellano.**

---

**Directora de Formación, Actualización Médica e Investigación.  
Secretaría de Salud de la Ciudad de México**



SECRETARÍA DE SALUD DE LA  
CIUDAD DE MÉXICO  
DIRECCIÓN DE FORMACIÓN,  
ACTUALIZACIÓN MÉDICA E  
INVESTIGACIÓN

**Vo. Bo.**

**Dr. David Mauricio Giraldo Gómez**



---

**Profesor Asociado "C" T.C. Departamento de Biología Celular y Tisular.  
Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Vo. Bo.**

**Dr. Miguel Ángel Mercado Díaz**



---

**Director de Cirugía. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición  
Salvador Zubirán. SSA**

**Vo. Bo.**

**Dr. José Trejo Suárez**



---

**Profesor Asociado del Curso de Especialización en Cirugía General de la  
SSACDMX**

## **Dedicatoria:**

**A Dios por guiarme en la vida, por permitirme vivir y exentarme de vivir lo que no era mejor para mí.**

**Para Verónica, mi madre, mi forjadora, mi parte emocional Jorge mi ejemplo de vida, superación y mi parte cuantitativa, Nayely mi cómplice de vida. Sin duda todo lo que soy hoy en todas las perspectivas de mi vida se lo debo a su amor, protección y esfuerzo constante. No tengo palabras para expresar el amor que les tengo.**

**A mi Abuelita Margarita. Haré hasta que dios quiera lo que siempre me pediste que hiciera por mis pacientes. Ayúdame a tener entendimiento para curar a cada uno de ellos. Te llevaré a ti, tus palabras y tu amor en mi corazón hasta el último día de mi vida.**

**Para Bety, el amor de mi vida. Gracias por tu amor, fuerza, apoyo incondicional y por estar conmigo cuando mas lo he necesitado. Te amo.**

**A mi familia única, mis tías y tíos, gracias por su amor, apoyo y fortaleza, no tengo palabras para agradecer su apoyo incondicional.**

**Al Dr. David Giraldo. Por escuchar por primera vez este proyecto, creer en él, potencializarlo y apoyarlo hasta el final.**

**Al Dr. Mercado. Por creer en mi, brindarme su apoyo y creer en el potencial de este proyecto.**

**Dra. Cristina Piña Barba por el apoyo y asesoramiento recibido para todo el desarrollo de la tesis**

**Al Dr. Trejo. Por brindarme el apoyo para poder consolidar este proyecto cuando aún era intangible.**

**Al Dr. Gonzalo Torres Villalobos y el Dr. Carlos Bravo Reyna por las facilidades para las tomas de muestras y el uso de quirófanos.**

**Al Dr. Armando Zepeda, Dr. Francisco Pasos Nájera y Dr. Carlos Flores por el apoyo con la preparación y observación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.**

**Ana Karen Martínez por todo el apoyo y colaboración con todo el proceso de técnica histológica,**

**David Abad por el apoyo en el proceso descelularización y de trabajo en el laboratorio.  
Dra. Norma Pérez Gallardo de la FMVZ-UNAM por el apoyo con la toma de muestras de vías biliares**

**Al proyecto PAPIIT TA 200218 y al PAPIIT IT100117 por el financiamiento recibido.**

**Gracias infinitas a los Residentes, Cirujanos y profesores que conocí durante mi travesía por la residencia, por darme la oportunidad de entrar a sus cirugías, operar con ellos, aprender de ellos y me corrigieron muchas veces sin obligación de hacerlo, sin duda mi formación como cirujano se la debo a ellos.**

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>9</b>
<b>Procedimiento quirúrgico.....</b>	<b>9</b>
<b>Protocolo de descelularización .....</b>	<b>9</b>
<b>Verificación de la descelularización.....</b>	<b>11</b>
<b>Cuantificación de ADN.....</b>	<b>11</b>
<b>Evaluación ECM de matrices descelularizadas.....</b>	<b>12</b>
<b>Evaluación de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....</b>	<b>12</b>
<b>Análisis histológicos.....</b>	<b>12</b>
<b>Análisis inmunohistoquímicos.....</b>	<b>13</b>
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>14</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
<b>Eficacia del protocolo de descelularización.....</b>	<b>14</b>
<b>Evaluación de la Matriz Extracelular.....</b>	<b>15</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>20</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>22</b>

## RESUMEN

La complicación más temida de la colecistectomía es la lesión de vía biliar. La opción quirúrgica más usada para la reparación de la vía biliar en el caso de lesiones complejas es la reconstrucción mediante un hepático yeyuno anastomosis en Y de Roux, sin embargo, este procedimiento no está libre de complicaciones postoperatorias debido a que prevé modificaciones anatómicas y fisiológicas en esta región anatómica. La regeneración de la vía biliar mediante andamios biológicos de origen biliar descelularizado es una opción con potencial para resolver este problema. En este estudio se fabricó un andamio descelularizado a partir de vía biliar extrahepática porcina. Nueve cerdos de raza Landrance fueron sacrificados y sus vías biliares fueron extraídas y puestas bajo un protocolo de descelularización de 8 días a base de SDS y PBS, posteriormente sus características fueron analizadas. Se midió el grado de descelularización cualitativamente con tinciones H y E y Dapi y cuantitativamente al medir concentración de DNA residual, se evaluó la calidad de los componentes de la matriz extracelular mediante tinción Masson, se visualizó la matriz extracelular y su porosidad mediante microscopía electrónica de barrido y se midió la presencia de proteínas clave residuales como MHC -I y CK-7 mediante Inmunohistoquímica. Se obtuvo una adecuada descelularización en la tinción H y E y Dapi, una diferencia significativa de los ng/de ADN residual de las muestras descelularizadas con una  $p < 0,05$ . Las inmunohistoquímicas demostraron ausencia importante de las proteínas clave MHC -I y CK-7 en las muestras descelularizadas. Las tinciones con tricrómico de Masson demostraron conservación de la conformación de los ases de colágena de las muestras descelularizadas, las microfotografías tomadas con microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmaron esto. De esta forma pudimos corroborar que nuestro protocolo de descelularización de vía biliar extrahepática permite descelularizar de manera efectiva dicho tejido y permite preservar la microanatomía de manera satisfactoria. La posibilidad de regenerar la vía biliar extrahepática con andamios descelularizados fabricados a partir de tejido biliar es extremadamente atractiva y prometedora en un contexto de lesión benigna o inclusive maligna de la vía biliar. La idea de poder regenerar órganos y tejidos como una alternativa de reconstrucción quirúrgica mediante tutores de regeneración marca un hito en la cirugía general. Se necesitan más estudios para evaluar el comportamiento de este andamio de vía biliar extrahepática en un modelo animal in-vivo a corto y mediano plazo antes de poderlo emplear en la práctica clínica.

# INTRODUCCIÓN

La vía biliar extrahepática se encarga de almacenar y transportar bilis conjugada desde el parénquima hepático hacia la luz intestinal para la realización in situ de funciones digestivas. Dicha vía biliar extrahepática está conformada por una serie de estructuras tubulares que tienen muchas variantes anatómicas aunque clásicamente se origina a partir del conducto hepático derecho e izquierdo, el primero pasa por debajo del infundíbulo de la vesícula biliar y el segundo, el cual es más largo que el primero, cruza el borde inferior del segmento IV, ambos conductos confluyen formando el conducto hepático común en el cual desemboca el conducto cístico formando así el conducto colédoco. El conducto colédoco discurre anterior y lateral a la vena porta y la arteria hepática respectivamente, consta de una porción supraduodenal, retroduodenal, intrapancreática y finalmente una intramural que puede desembocar unida o de manera separada al conducto pancreático principal en la segunda porción del duodeno. El conducto colédoco mide aproximadamente 8 a 11 cm de longitud y hasta 8 mm de diámetro, en condiciones fisiológicas la presión del sistema biliar es de 5 – 10 mmh<sup>20</sup>. La irrigación arterial del colédoco está a cargo de las arterias coledocianas, las cuales discurren lateralmente al conducto a las 9 pm y 3 pm, en la disposición de la caratula del reloj. Se originan superiormente en la arteria hepática derecha e inferiormente en la arteria gastroduodenal <sup>1,2</sup>. Fig 1

Dentro de la patología biliar se ha reconocido una amplia gama de condiciones desde congénitas hasta adquiridas cuya resolución se encuentra dentro del quehacer del cirujano general y el cirujano hepatopancreatobiliar. Dentro de estas patologías se encuentran procesos oncológicos, congénitos y procesos inflamatorios como la colecistitis aguda que es la patología biliar de mayor incidencia en la población en general y comprende inflamación crónica de la vesícula biliar que

tiene como piedra angular en su fisiopatología la génesis de litos principalmente de colesterol, producto del desequilibrio entre la concentración de colesterol, lecitina y ácidos biliares que vuelve litogénica a la bilis almacenada <sup>3</sup>.

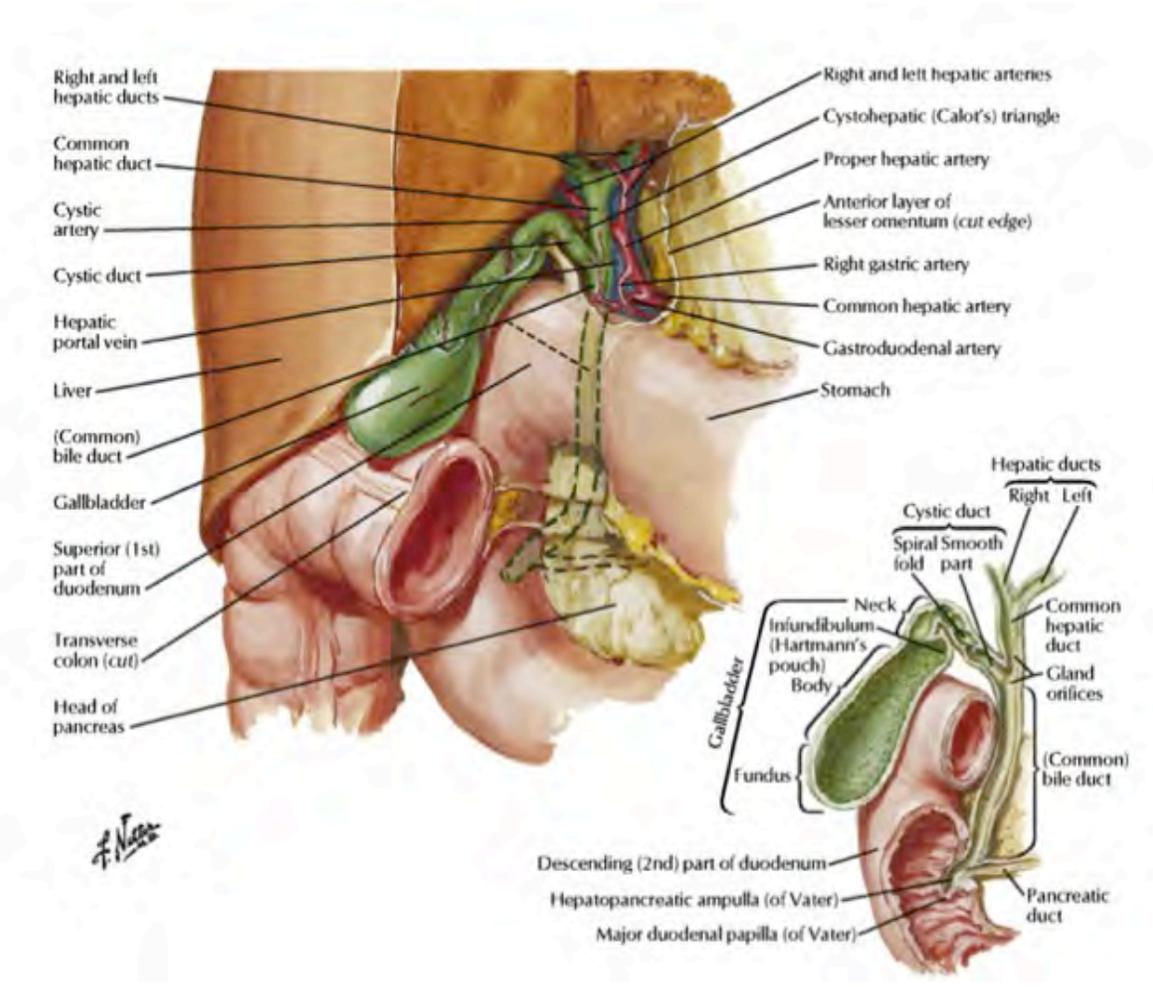


Fig 1. Anatomía clásica de los conductos biliares extrahepáticos. ( Ilustración Netter de [www.netterimages.com](http://www.netterimages.com))

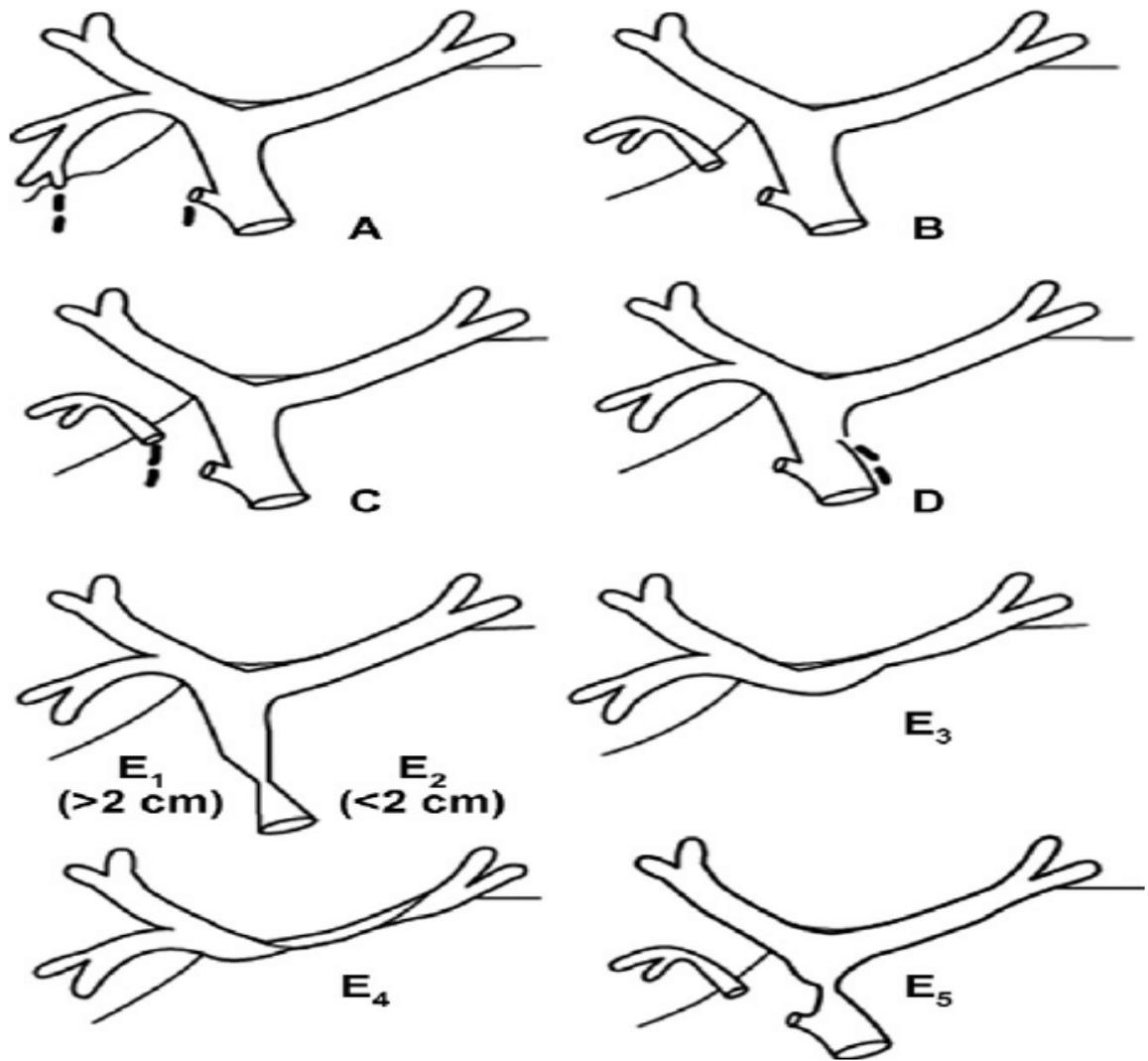
El tratamiento definitivo para la colecistitis aguda y crónica es la colecistectomía, la cual puede realizarse mediante técnica abierta o laparoscópica. La colecistectomía es el procedimiento quirúrgico intrabdominal electivo más realizado en los Estados Unidos con más de 750,000 procedimientos realizados anualmente <sup>4</sup>, el abordaje laparoscópico se ha vuelto la opción más utilizada en la realización de la colecistectomía <sup>5</sup> debido a que representa menor tiempo de recuperación, menor dolor postoperatorio, mejora cosmética y menor tiempo para retomar las

actividades cotidianas. Sin embargo junto con el advenimiento de la colecistectomía laparoscópica ha venido un aumento en la incidencia de las lesiones de la vía biliar en comparación con el abordaje tradicional o abierto independientemente de la curva de aprendizaje del cirujano, esta incidencia tiene un rango de 0.3-0.6% <sup>4, 6, 7, 8,</sup> este problema comprende un gran coste en la reducción de la esperanza de vida de hasta 2.79 veces en los subsecuentes años, en calidad de vida y en las tasas de litigación subsecuente <sup>4,9,</sup>. La mayoría de las personas afectadas por lesión de vía biliar son jóvenes en edad productiva por lo que representa con costo económico importante <sup>10</sup>.

Actualmente la opción quirúrgica más usada para la reparación de la vía biliar en el caso de lesiones complejas (Strassberg D y E), que son definidas como aquellas que requieren una reparación circunferencial definitiva, (Fig.2) es la reconstrucción mediante una hepático yeyuno anastomosis en Y de Roux <sup>6,11,12</sup> con o sin resección de los segmentos 4 y 5 <sup>13</sup>. Se ha demostrado que esta intervención quirúrgica representa una importante mejoría en la calidad de vida de los pacientes postoperados sin embargo dicha calidad de vida nunca vuelve a asimilarse a calidad de vida antes de la lesión de vía biliar (Fig 3). Dichas diferencias en la calidad de vida se deben en parte a que la Hepático Yeyuno anastomosis en Y de Roux, puede tener complicaciones tardías como formación de estenosis, enfermedad maligna, colangitis recurrente, cirrosis biliar secundaria <sup>14</sup> entre otras explicadas en parte por la unión antinatural de un epitelio y mucosa y por la alteración de la anatomía de esta región que promueve el reflujo hacia el árbol biliar. Todo esto secundario a la ausencia del esfínter de Oddi que habitualmente impide el paso del contenido intestinal <sup>15</sup>(Fig 4).

Se han reportado en la literatura intentos para la reparación parcial o total mediante sustitución de la vía biliar utilizando materiales sintéticos o biológicos, sin embargo, estos han mostrado importantes limitaciones como reparación parcial, falta de integración, estenosis, entre otras <sup>16, 17, 18, 19</sup>. Una respuesta a la generación de tratamientos alternativos que podría responder de manera adecuada a los requerimientos de preservación fisiológica de esta región puede ser dada por la medicina regenerativa.

En 1999 el término medicina regenerativa, muchas veces definido también como ingeniería de tejidos, fue usado por primera vez para describir el uso de sustancias tales como genes, proteínas, células y biomateriales para regenerar tejidos dañados o enfermos y restaurar su normal funcionamiento <sup>21-23</sup>. Dentro de la medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos es la encargada de la manufactura de tejidos biológicos con la combinación de las células y andamios adecuados <sup>24</sup> los cuales pueden ser sintéticos como el ácido poliglicólico (PGA) <sup>25,26</sup>, o de origen natural como los derivados de colágena o de tejidos descelularizados <sup>27,28</sup>. La ingeniería de tejidos ha sido aplicada con éxito en la clínica para la producción de estructuras huecas que permiten almacenamiento tales como vejiga <sup>25</sup>, y de paso tales como uretra <sup>26</sup> y la tráquea <sup>29,30</sup>.



Type	Definition
Type A	Bile leak from cystic duct or liver bed without injury
Type B	Partial occlusion of the biliary tree, most frequently from an aberrant right hepatic duct
Type C	Bile leak from duct (aberrant right hepatic duct) that is not communicating with the common bile duct
Type D	Lateral injury of the biliary system, without loss of continuity
Type E	Circumferential injury of the biliary tree with loss of continuity

Fig. 2 Clasificación de Strassberg para Lesiones de Vía Biliar. (Tomado de Fatima, et.al. Is There a Role for Endoscopic Therapy as a Definitive Treatment for Post-Laparoscopic Bile Duct Injuries? . *Journal of the American College of Surgeons* .2010.(Vol. 211).

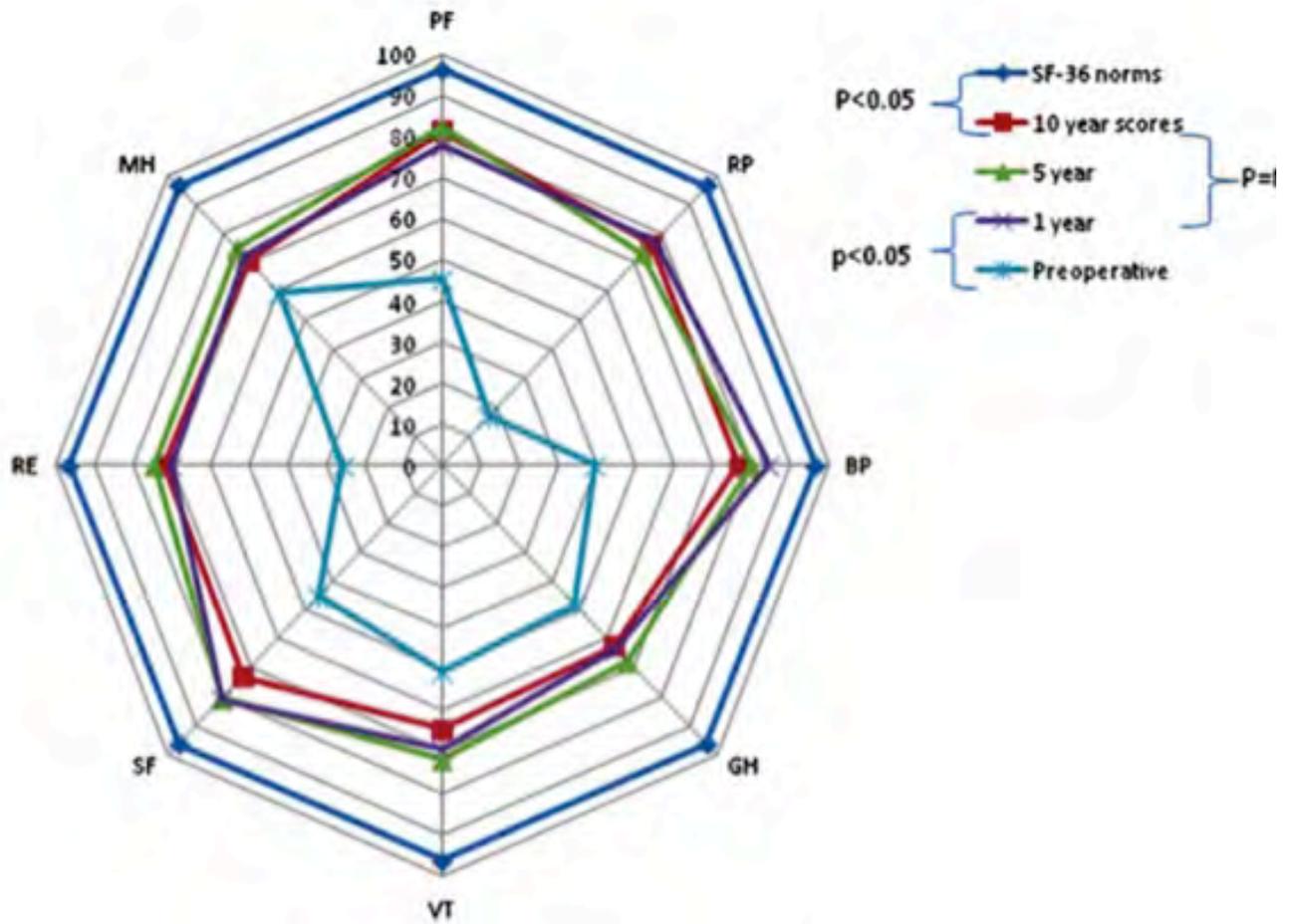


Fig. 3 Gráfica Polar. Comparando la puntuación de SF36QOL en diferentes puntos de tiempo después de la reparación quirúrgica. Función física PF , función social SF , función física de RP, dolor físico PP, salud mental de MH, función emocional ER, vitalidad VT, percepción de la salud general de la GH, NS no significativa (Tomado de Domínguez-Rosado I et. al.: Quality of life in bile duct injury: 1-, 5-, and 10-year outcomes after surgical repair. J Gastrointest Surg 2014; 18: 2089–2094)

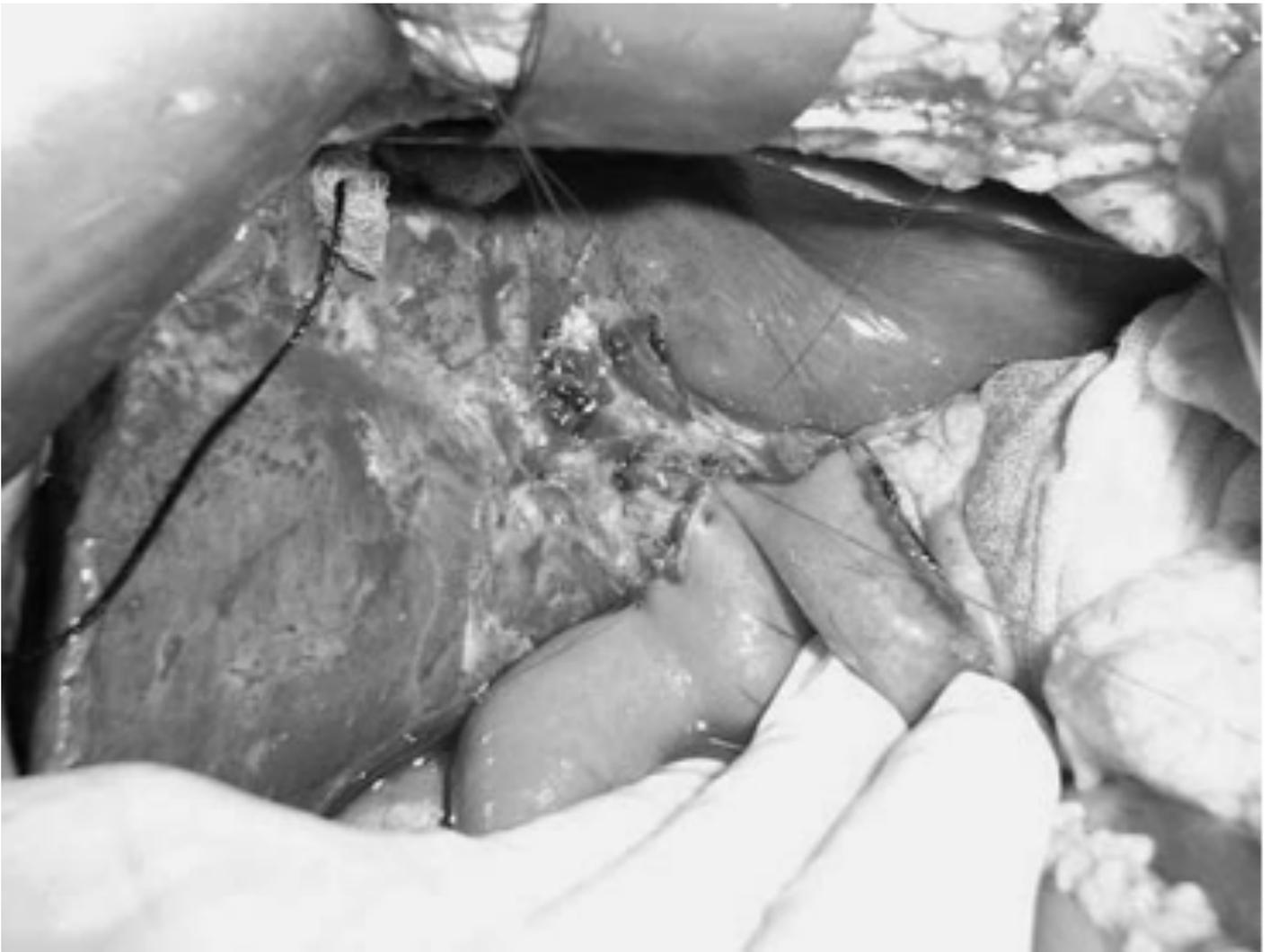


Fig 4 . Hepático yeyuno anastomosis en Y de Roux. (Tomada de Mercado MA. ,Early versus late repair of bile duct injuries, Surg Endosc (2006) 20: 1644–1647)

La descelularización, por otro lado, es una técnica atractiva para la obtención de andamios acelulares para su uso en regeneración de órganos y tejidos, debido a la posibilidad de retener la arquitectura del tejido nativo, incluyendo la conservación de vasos sanguíneos y los biofactores presentes en la matriz extracelular (MEC), los cuales son necesarios para la proliferación celular<sup>31</sup>. En investigaciones previas dentro del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), se han propuesto protocolos mejorados de descelularización de estructuras tubulares como la tráquea<sup>32</sup>. Por otro lado, recientemente varios

grupos han tenido éxito descelularizando otros órganos como el corazón <sup>33</sup>, pulmón <sup>34</sup>, hígado <sup>35</sup>, riñón <sup>36</sup> y páncreas <sup>37</sup>. Algunos intentos se han hecho para descelularizar intestino de rata <sup>38</sup>, sin embargo, este tipo de modelo es difícil llevarlo a un plano clínico, ya que los protocolos de descelularización son altamente dependientes y sensibles de las características del tejido nativo <sup>39,40</sup>, por lo que los resultados obtenidos en modelos de ratas pueden no replicarse en modelos de especies animales más grandes o en humanos. Otros grupos han propuesto métodos de descelularización en modelos de intestino porcino, los cuales resultarían mucho más adecuados para aplicaciones en humanos, sin embargo, las evaluaciones se han centrado solamente en la parte biológica y bioquímica y no hay resultados de cómo el proceso pudo haber afectado la parte estructural del andamio <sup>41,42,43</sup>, lo cual es de vital importancia para el comportamiento clínico del andamio.

Existen antecedentes de generación de andamios para la regeneración de la vía biliar <sup>44</sup> sin embargo a partir de tejidos tubulares de naturaleza diferente a la vía biliar, por lo que la generación de andamios acelulares a partir de vía biliar extrahepática supondría mejores cualidades para la repoblación y viabilidad de los colangiocitos.

Una respuesta a la generación de tratamientos alternativos que podría responder de manera adecuada a la preservación de la anatomía y fisiología de esta región es la regeneración de la vía biliar. Uno de los antecedentes más interesantes de la regeneración de vía biliar extrahepática en un modelo experimental de lesión de vía biliar porcino con andamios descelularizados a partir de uréteres con repoblación in-situ exitosa es el descrito por Yao Cheng et.al. en 2016, sin embargo, este estudio generó andamios acelulares a partir de tejidos que tienen fisiología e histología distinta a la vía biliar. Hasta este momento no se ha reportado en la literatura el uso de andamios acelulares procedentes de vía biliar extrahepática como tutores de regeneración de vía biliar.

Nosotros proponemos en esta tesis que un andamio generado a partir de vía biliar extrahepática de cerdo tendría optimas cualidades biológicas, bioquímicas y biofísicas para ser repoblado por colangiocitos del huésped in situ o in-vitro, es por tal razón que proponemos la obtención de vía biliar extrahepática porcina y posteriormente su descelularización para el fin de poder caracterizar sus cualidades para la recelularización.

## **METODOLOGÍA**

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con la ley de bienestar animal, siguiendo la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y las directrices de la Directiva de la UE 2010/63 / UE para experimentos con animales <sup>45, 46</sup> y observando los requisitos del Comité de Ética de La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). (Cuadro 1)

### **Procedimiento quirúrgico.**

La fuente utilizada para obtener los conductos biliares fueron 9 cerdos machos de raza Landrace que se obtuvieron durante practicas clínicas en los en los quirófanos de cirugía experimental del INCMNSZ con un peso de los ejemplares que osciló entre 25-30 kg. En condiciones estériles en una sala de cirugía experimental, se accedió a la cavidad abdominal mediante laparotomía, se realizó una exposición del conducto biliar mediante el rechazo del hígado y la referencia de la vesícula biliar y la vía biliar , se realizó una enterotomía en la segunda parte del duodeno y la ámpula de Vater se canuló con un catéter 8 fr. hasta su entrada al hígado. El tejido conjuntivo periférico se extrajo mecánicamente. Se obtuvieron tractos biliares de aproximadamente 5-8 cm, estos se utilizaron para la posterior descelularización.(Fig. 5)

### **Protocolo de descelularización.**

El protocolo de descelularización se llevó a cabo mediante perfusión de todas las soluciones

detergentes a través del lumen del conducto biliar utilizando una bomba peristáltica; se formó un circuito cerrado con el conducto biliar embebido en estas soluciones a un flujo de 46,0 ml / min y temperatura ambiente. La selección de los agentes de descelularización se propuso en función de las modificaciones de los protocolos utilizados previamente por Giraldo et al. Y Cheng et al.<sup>32 44</sup>

El protocolo de descelularización comenzó con la perfusión de una solución de SDS al 1% en agua Milli-Q, la solución se recirculó durante 96 horas y se cambió cada 24 horas. Luego se perfundió una solución de PBS (1X) a través de los conductos biliares durante 24 horas para enjuagar el tejido de la solución de detergente SDS. Después de esto, las muestras se perfundieron con una solución de Dnasa-I (10 mg / ml) durante 24 horas. Se llevó a cabo una perfusión final con agua Milli-Q durante 24 horas como enjuague final. (Fig. 6)

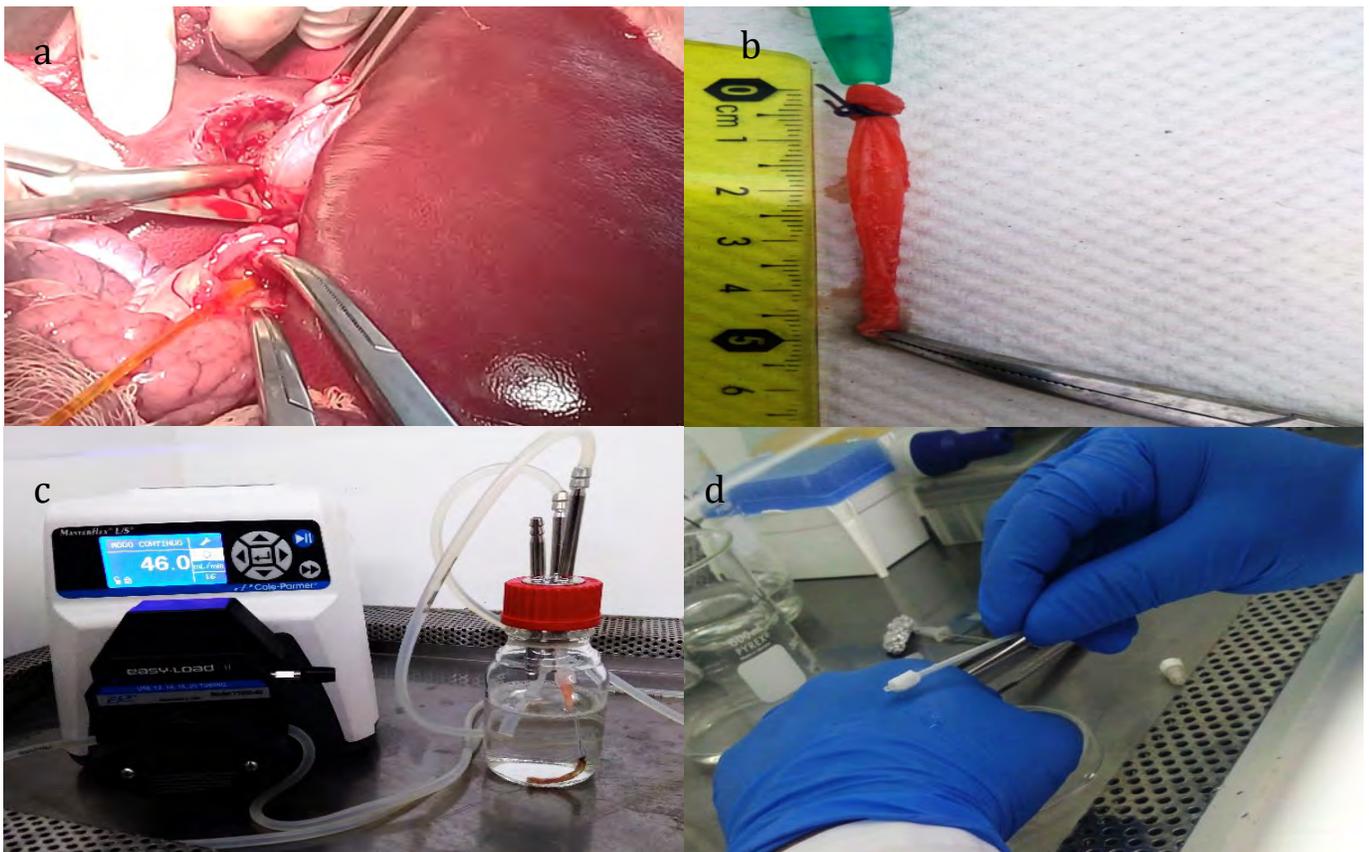


Figura 5. Proceso quirúrgico y proceso de descelularización. a. Tracción del fondo de la vesícula biliar con pinzas Allis y referencia del tracto biliar, se observa enterotomía de la segunda porción del duodeno y la ferullización de la ampolla de Vater y tracto biliar extrahepático. b. Tracto biliar extrahepático disecado c. Perfusión del conducto biliar en circuito cerrado mediante bomba peristáltica. d. Corte del conducto biliar extrahepático descelularizado en fragmentos de 2 cm.

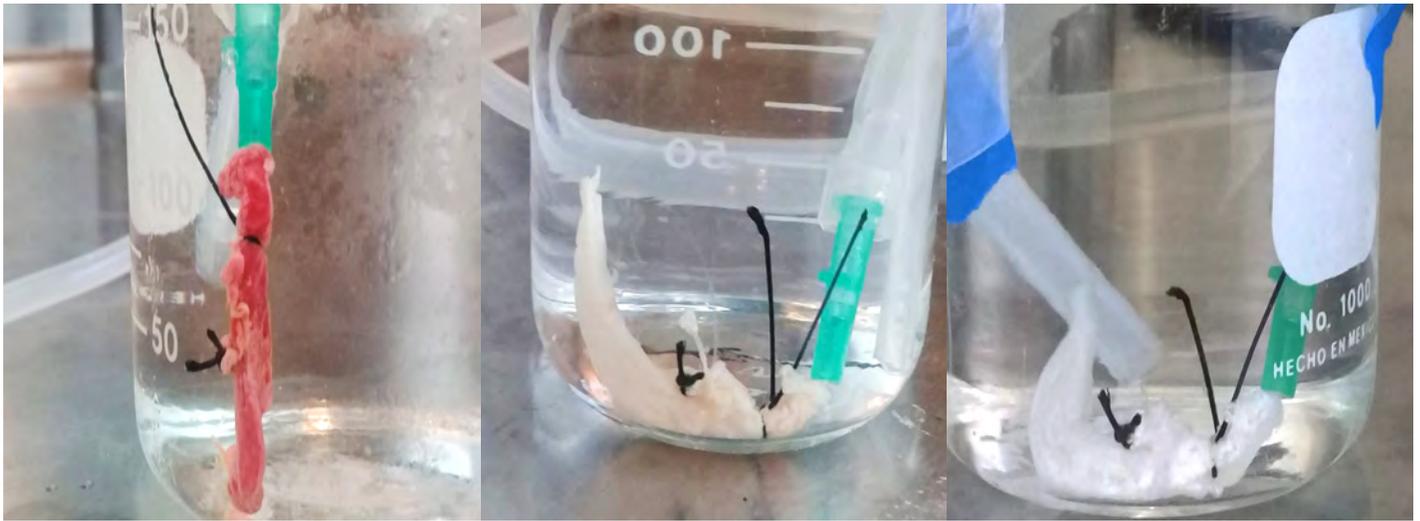


Figura 6. Proceso de descelularización. Proceso cronológico de descelularización donde se visualiza macroscópicamente la pérdida celular y la exposición de la matriz extracelular.

### **Verificación de la descelularización.**

La efectividad del proceso de descelularización se evaluó mediante la cuantificación del contenido residual de ADN, la tinción de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para los ácidos nucleicos, la hematoxilina y la eosina (H&E) y el ensayo de inmunohistoquímica (EIH) para determinar la Eliminación del complejo de histocompatibilidad principal tipo I (MHC-I) y (CK-7 ) en los tejidos del conducto biliar. Las muestras descelularizadas se compararon con muestras nativas.

### **Cuantificación de ADN.**

Para evaluar el contenido total de ADN de las muestras nativas y los andamios, se homogeneizaron muestras de 15 mg en 1 ml de solución desnaturizante utilizando un TISSUE LYSER (Qiagen Inc.) (4 ciclos a velocidad máxima durante 2 minutos). El contenido de ADN se aisló con TRIzol (Invitrogen) y la concentración se midió mediante un espectrofotómetro de absorbancia (GeneQuant) a una longitud de onda de 260 nm. Se usó una relación de longitudes de onda de 260/280 nm para determinar la pureza de la muestra.

## **Evaluación ECM de matrices descelularizadas.**

Para evaluar cualquier modificación en la ECM generada por el proceso de descelularización, se observaron muestras a través de la tinción con tricrómico de Masson, microscopía electrónica de barrido (SEM) e inmunohistoquímica (IHC) en el ensayo de marcaje de citoqueratina 7.

## **Evaluación de la morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).**

La microarquitectura de las muestras nativas y los andamios de bioingeniería se observó por SEM. Todas las muestras se fijaron con glutaraldehído al 3% (v / v) en una solución tampón de cacodilato sódico 0,1 M (pH 7,2). Luego se deshidrataron con etanol (de 30% a 100%) y, finalmente, se secaron utilizando una cámara de CO<sub>2</sub> de secador de punto crítico, como se informó anteriormente por Rivera et al. y Rodríguez-Fuentes et al.<sup>47,48</sup> Las imágenes de las matrices descelularizadas se obtuvieron utilizando un SEM DSM-950 (Zeiss) a 15 kV.

## **Análisis histológicos.**

Los análisis histológicos se realizaron en muestras de tejidos nativos y matrices descelularizadas. Las secciones de cada muestra se sometieron a una deshidratación gradual desde alcohol etílico al 70% hasta alcohol absoluto en los tejidos. Luego, las muestras se fijaron en xileno (Merck) y se incrustaron en parafina (Sigma). Posteriormente, se obtuvieron secciones de 5 µm de cada muestra utilizando un microtomo rotatorio (Leica). Finalmente, la mitad de las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina (Merck), y la otra mitad se tiñó con tricrómico de Masson.

## **Análisis inmunohistoquímicos.**

Los análisis se realizaron en muestras de tejidos nativos y matrices descelularizadas. Se procesaron secciones de muestras para inmunohistoquímica convencional para analizar la expresión de citoqueratina 7 y HLA-A. Para esto previamente, los cortes se montaron en portaobjetos con carga positiva (Shandon Inc., Pittsburgh, PA), desparafinado con xileno, se rehidrataron con PBS y luego se transfirieron a recipientes de plástico Coplin que contenían Diva Decloaker (DV2004, Biocare, Concord CA), para antígeno recuperación. Los portaobjetos en el recipiente de Coplin se calentaron en una olla a presión durante 20 min a ~200 ° C seguido de 10 min a ~100 ° C. Los portaobjetos se enfriaron en el recipiente a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se transfirieron a 0,15 mol de PBS. La peroxidasa endógena se bloqueó con un 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con PBS. Luego, las secciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución lista para usar con Sniper de fondo (bloqueador de proteínas) (BS966 Biocare, Concord CA), y se drenó el bloqueador de proteínas. Las secciones se incubaron durante la noche a -4 ° C con una dilución 1: 100 de PBS anti-citoqueratina 7 (sc-23876, Santa Cruz Biotechnology, INC. Oregon, EE. UU.) En una cámara humidificada. Otras secciones se incubaron durante la noche a -4 ° C con una dilución 1: 100 de solución anti-HLA A (ab52922, Abcam, Cambridge MA) (en PBS) en una cámara humidificada. Al día siguiente, todas las secciones se enjuagaron tres veces con PBS y luego se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo biotinilado secundario. Se utilizó el complejo avidina-biotina-HRP y la reacción se desarrolló con 3'3 'diaminobenzidina de acuerdo con las instrucciones del proveedor (todos los reactivos fueron del Sistema de detección de HRP universal Starr Trek, 901-STUHRP700, Biocare, Concord CA). Los portaobjetos se cubrieron con resina de montaje sintética y se observaron en un microscopio ligero (Leica).

## Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software estadístico GraphPad Prism 6.05 (San Diego). El grupo descelularizado se comparó con un grupo de muestra nativa como control. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo.

VARIABLE (Índice/Indicador)	TIPO	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	CALIFICACIÓN
Grado de Descelularización	Independiente	Tinción con Hematoxilina y Eosina, DAPI. Presencia de núcleos	Cualitativa continua	Con cambios Sin cambios
Calidad de los componentes de la matriz extracelular.	dependiente	Tinción con tricrómica de Masson . Conservación de la arquitectura original	Cualitativa nominal	Presencia ausencia
Concentración de ADN	dependiente	Espectrofotometría. Longitud de onda a 280 nanómetros	Cuantitativa continua	Microgramos
Porosidad de la matriz extracelular	dependiente	Microscopía electrónica de barrido. Medición en micrometros de los poros de la matriz del andamio	Cuantitativa continua	Micrometros
Topología de la matriz extracelular	dependiente	Microscopía electrónica de barrido. Arquitectura de la matriz	Cualitativa continua	Con cambios Sin cambios
Presencia de moléculas clave en la descelularización	dependiente	Tinción inmunohistoquímica de MHC I Y CK7	Cuantitativa nominal	Presencia ausencia

Cuadro 1 Definición de Variables.

## RESULTADOS

### Eficacia del protocolo de descelularización.

Macroscópicamente, se observó un cambio gradual de color durante el proceso de descelularización de la perfusión. El proceso continuó hasta que todos los conductos biliares se volvieron completamente blancos como se muestra en (Fig. 6). Esto generó un andamio de

conducto biliar acelular que retuvo su estructura anatómica macroscópica. El examen de tinción con DAPI mostró mínimo número de células con fluorescencia después de la descelularización, y las imágenes histológicas de H&E confirmaron este resultado. (Fig. 7) La inmunotinción de MHC-I y CK-7 en el andamio del conducto presentó escasa señal residual de Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC-I) y nula señal residual de la proteína epitelial CK-7 en las muestras descelularizadas (Fig. 8). Para evaluar más a fondo la eficacia de la descelularización, se realizó la cuantificación del ADN. Observamos una disminución significativa en el contenido de ADN en las matrices descelularizadas (Fig. 9)

### **Evaluación de la Matriz Extracelular ( MEC).**

Para evaluar cualquier posible alteración en la matriz descelularizada, se realizó la tinción de Tricrómico de Masson. En dicha prueba se valoró el estado microscópico de los principales componentes de la MEC en relación con el tejido nativo. (Fig. 10) En los conductos biliares nativos, la MEC se compone principalmente de colágeno. Después del proceso de descelularización, la colágena preservó la disposición de sus ases muy similar al de las muestras control.

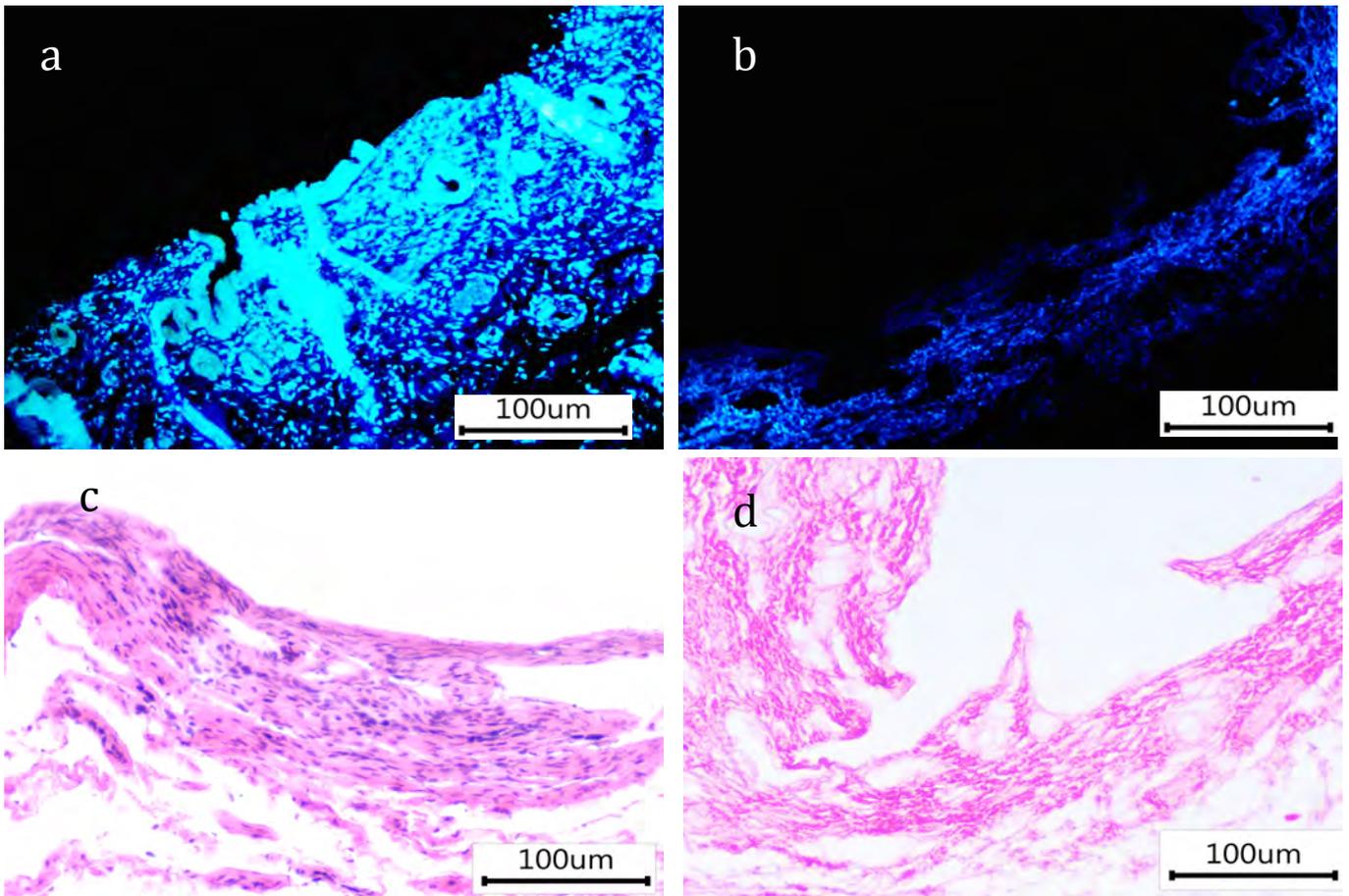


Figura 7. Tinción 3 DAPI e histología H&E. a. Tejido teñido con DAPI donde se pueden observar los núcleos del epitelio biliar. b. Se observa ausencia de gran cantidad de núcleos con tinción DAPI en muestras descelularizadas, también se observa autofluorescencia de colágeno. c. Tinción H y E de la muestra núcleos teñidos de morado. d. Muestra descelularizada donde se observa ausencia de núcleos.

Para documentar cualquier cambio microarquitectónico en los andamios descelularizados, se procedió a observar dichas muestras y sus controles mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM por sus siglas en inglés). Las microfotos muestran las superficies apicales de los colangiocitos con numerosos microcilios, así como los poros de la matriz extracelular con células en las muestras control, sin embargo en las muestras descelularizadas hay ausencia de células y microcilios. Los poros de la matriz extracelular y las fibras de colágeno en las muestras descelularizadas se conservan similares a las de sus controles. (Fig 11).

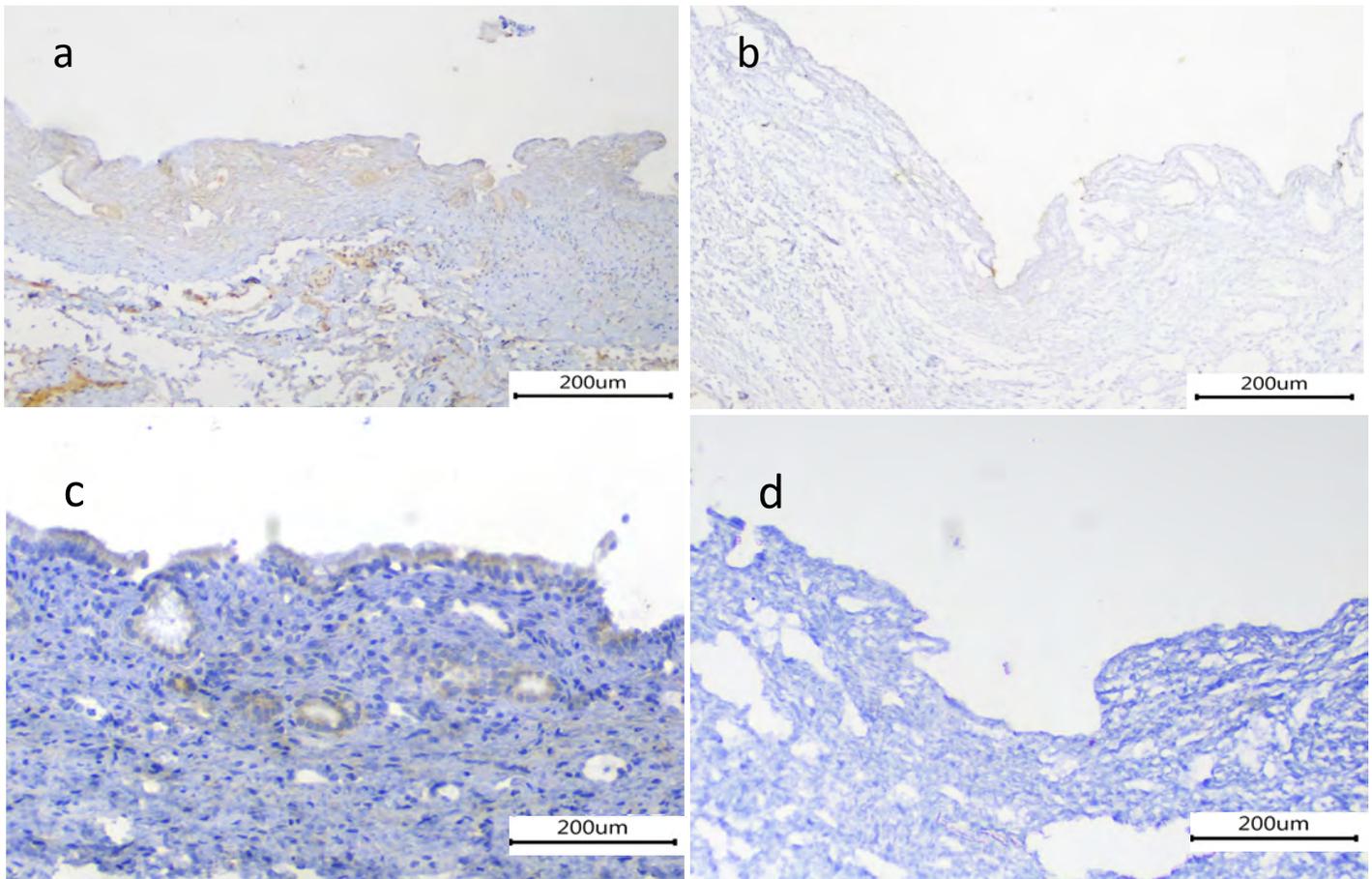


Figura 8. Determinación inmunohistoquímica del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC-I) y citoqueratina 7 CK-7 .a. La tinción de los complejos MHC I en las muestras de control se observa en marrón. b. La muestra descelularizada con trazas mínimas de MHC I. c. Muestras con tinción de CK-7 de color marrón en la periferia epitelial d. Muestra descelularizada sin evidencia de señal CK-7.

## DISCUSIÓN

Se utilizó un protocolo de descelularización detergente-enzimática para evaluar su efectividad en tejidos del conducto biliar extrahepático de origen porcino, la efectividad de la descelularización y la preservación de la estructura del andamio después del proceso fueron evaluados. El protocolo utilizado permite la descelularización del conducto biliar con un daño mínimo en la estructura del andamio.

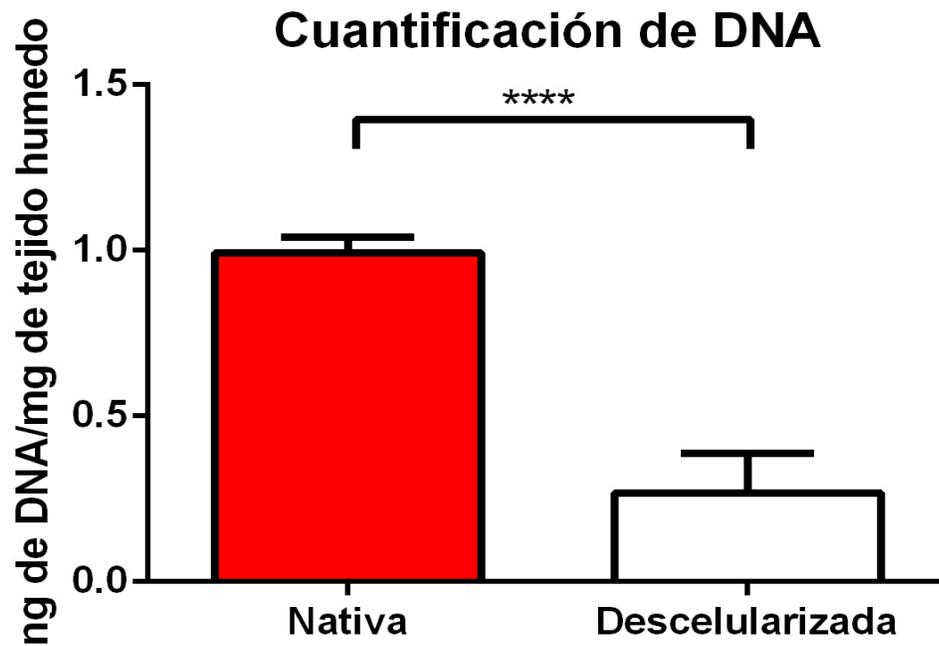


Figura 9. Cuantificación de ADN residual. Grupo control frente al grupo descelularizado. utilizando el análisis de varianza de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Un valor de  $p < 0,05$  se considera significativo. Se muestran los resultados medios. Barras de error: desviación estándar (SD).

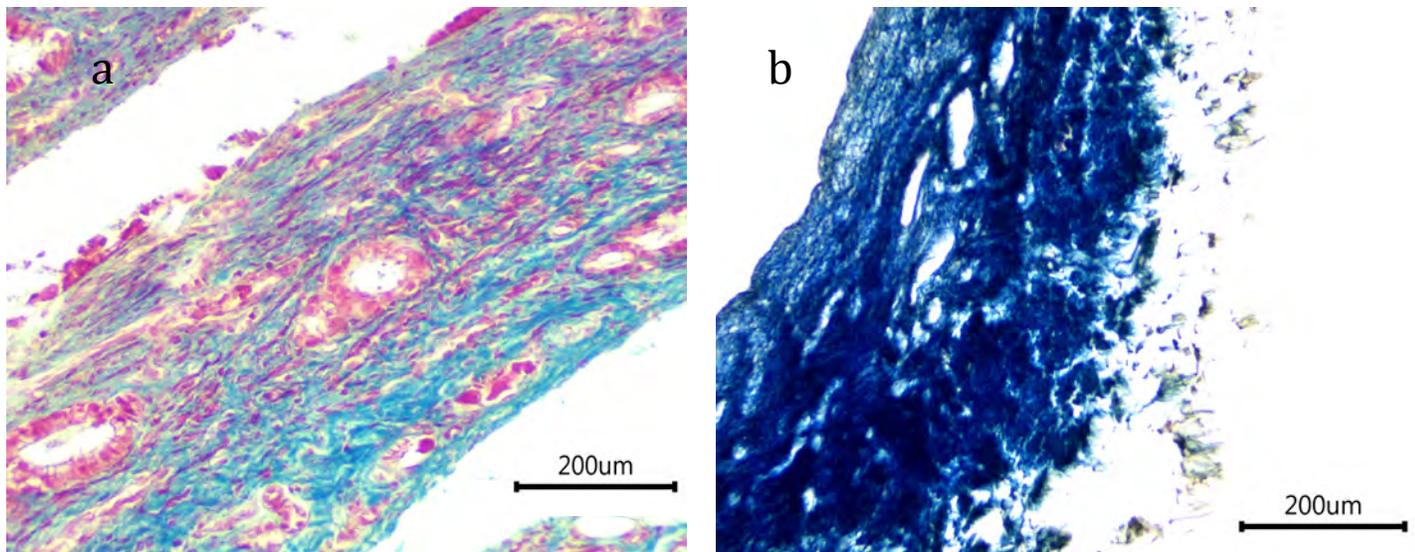


Figura 10. Tinción con Tricrómico de Masson. a. Se observa material celular y disposición longitudinal de las fibras de colágena en la muestra control. b. Presencia de colágena conservada en disposición longitudinal y espesor.

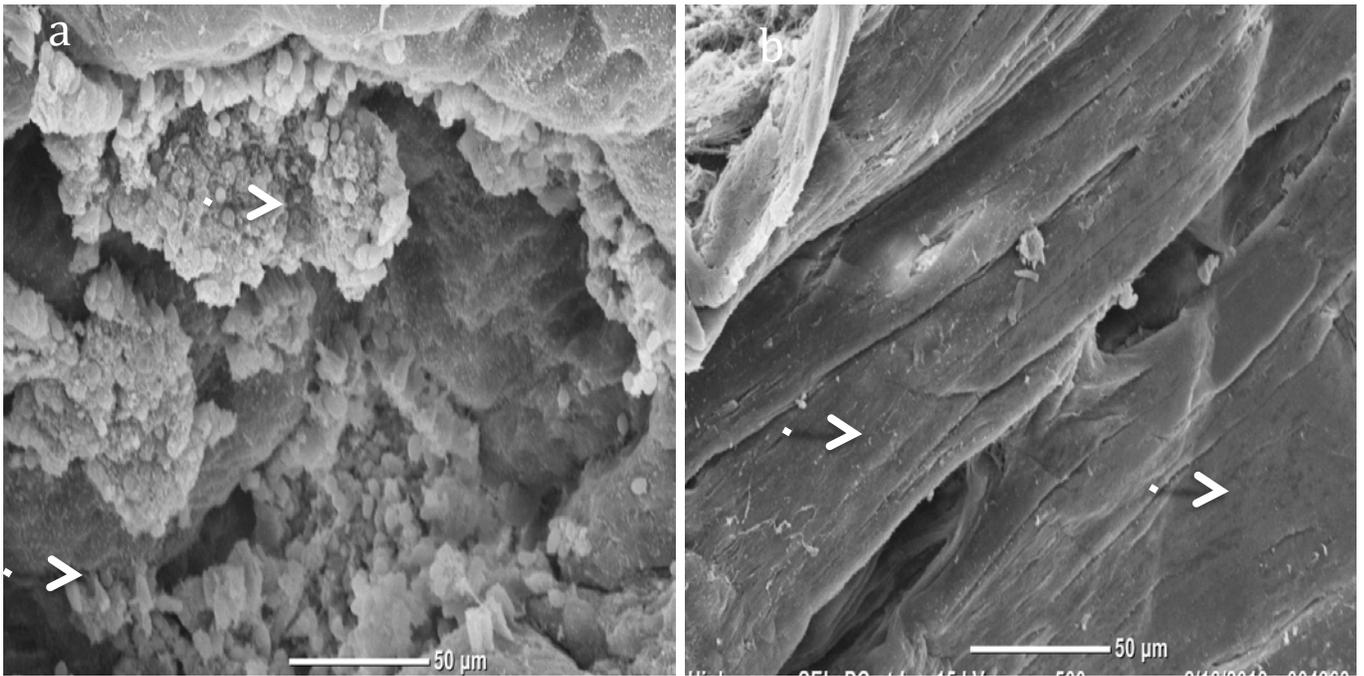


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido SEM con microfotografías de muestras descelularizadas y control. a. El epitelio se observa en las muestras de luz del conducto biliar con abundantes microcilios indicados por las flechas blancas. segundo. b. Muestra descelularizada en la que hay ausencia de material celular en microporos y microcilios, con evidencia de matriz extracelular conservada indicada por flechas blancas.

El duodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente iónico que se usa ampliamente en muchos protocolos de descelularización de diferentes tejidos como, corazón , córnea, pulmón, etc. El SDS solubiliza las membranas celulares y nucleares con un alto índice de efectividad, así como las proteínas desnaturalizadas <sup>39</sup>, sin embargo, se ha informado que el detergente aniónico puede conducir a una mayor tasa de daño de las fibras de colágeno de la matriz extracelular, y requiere que se elimine mediante varios ciclos de lavado del tejido descelularizado. Por esta razón, aproximadamente 1/3 del tiempo del protocolo de descelularización se usó para lavar el tejido en un circuito cerrado. En nuestro protocolo se encontró un equilibrio entre el poder detergente del SDS, la cantidad de descelularización y la preservación de la matriz extracelular, si bien encontramos trazas residuales mínimas de DNA y proteínas clave, estas fueron las mínimas que permitieron conservar las mejores condiciones la MEC en relación al numero de ciclos de lavado.

La matriz extracelular se analizó mediante tinción histológica (H&E y Masson) y SEM sin encontrar un daño estructural significativo ( Fig 10 y Fig. 11). La DNAasa-I prevista dentro del protocolo de descelularización trabajó hidrolizando las cadenas de ADN presente en el tejido celular de manera que no generó daño en las proteínas de colágena.

La inmunohistoquímica con CK7 mostró que no se encontraron proteínas CK-7 del epitelio biliar en las muestras descelularizadas en comparación con las muestras de control , dato que confirma la efectividad del proceso de descelularización. La determinación del MHC I es fundamental ya que esta molécula es la causa principal para iniciar una respuesta de rechazo del injerto , por esta razón se buscó la presencia de esta molécula en los tejidos descelularizados y en las muestras nativas. La presencia de trazas mínimas de esta molécula en el tejido descelularizado valida que el proceso de descelularización fue altamente efectivo para eliminar las moléculas que pueden conducir a un rechazo del injerto. El hecho de que se encuentren trazas mínimas de señal de MHC I en un contexto en el que se encuentra casi la totalidad de células eliminadas nos da la pauta para poder pensar que en un contexto in vivo puede verse atenuada la respuesta inflamatoria contra este injerto, indicándonos que este protocolo de descelularización puede traspolarse a un modelo experimental in vivo de manera efectiva.

No se encontraron daños en la arquitectura de la matriz extracelular importantes como resultado del proceso de descelularización, ni en las tinciones de Masson ni en las micrografías por SEM.

## **CONCLUSIÓN**

En resumen, la técnica quirúrgica propuesta para la extracción extrahepática del conducto biliar permite la identificación, disección y preservación efectivas del conducto biliar en el modelo porcino. El proceso de descelularización propuesto por nuestro grupo permite la eliminación del material celular y la preservación de la arquitectura del tejido de manera altamente efectiva. La

posibilidad de regenerar tejidos como el conducto biliar con andamios descelularizados específicos de órganos 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. La estandarización de esta técnica de descelularización de tejido biliar nos permite poder plantearnos la posibilidad de realizar futuros estudios en modelos in- vivo porcinos de lesión benigna y maligna de vía biliar y poder así evaluar el potencial de este andamio para guiar la regeneración tisular.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Kune GA. Surgical anatomy of common bile duct. Arch Surg 1964;89:995–1004
- 2.- Kara M. Keplinger et.al Anatomy and Embryology of the Biliary Tract. Surg Clin North Am. 2014 Apr;94(2):203-
- 3.- Admirand WH, Small DM. The physico-chemical basis of cholesterol gallstone formation in man. J Clin Invest 1968;47:104.
- 4.- Flum DR et.al. Intraoperative cholangiography and risk of common bile duct injury during cholecystectomy, JAMA. 2003 Apr 2;289(13):1639-44.
- 5.- D. R. Fletcher, M. S. T. Hobbs, P. Tan, L. J. Valinsky, R. L. Hockey, T. J. Pikora, M. W. Knuiman, H. J. Sheiner, and A. Edis, “Complications of cholecystectomy: risks of the laparoscopic approach and protective effects of operative cholangiography: a population-based study,” Ann. Surg. 229(4), 449–457 (1999).
- 6.- Walsh RM, Vogt DP, Ponsky JL, Brown N, Mascha E, Henderson JM (2004) Management of failed biliary repairs for major bile duct injuries after laparoscopic cholecystectomy. J Am Coll Surg 199: 192–197
- 7.- S. A. Ahrendt and H. A. Pitt, Surgical therapy of iatrogenic lesions of biliary tract, World J. Surg. 25(10), 1360–1365 (2001).
- 8.- Mercado MA. ,Early versus late repair of bile duct injuries, Surg Endosc (2006) 20: 1644–1647
- 9.- B. J. Carroll, M. Birth, and E. H. Phillips, Common bile duct injuries during laparoscopic cholecystectomy that result in litigation, Surg. Endosc. 12(4), 310–314 (1998).
- 10.- M.P. Landman, I.D. Feurer, D.E. Moore, et al., The long-term effect of bile duct injury on health-related quality of life: a meta-analysis study, HPB (Oxford) 15 (4) (2013)
- 11.- S.M. Strasberg, D.D. Picus, J.A. Drebin, Results of a new strategy for reconstruction of biliary

- injuries having an isolated right-sided component, *J. Gastrointest. Surg.* 5 (3) (2001)
- 12.- Strasberg SM, Hertl M, Soper NJ (1995) An analysis of the problem of biliary injury during laparoscopic cholecystectomy. *J Am Coll Surg* 180: 101–125
- 13.- Mercado MA, Chan C, Orozco H et al: Longterm evaluation of biliary reconstruction after partial resection of segments IV and V in iatrogenic injuries. *J Gastrointest Surg*, 2006; 10: 77–82
- 14.- J. Lubikowski, T. Chmurowicz, M. Post, et al., Liver transplantation as an ultimate step in the management of iatrogenic bile duct injury complicated by secondary cirrhosis, *Ann. Transpl.* 17 (2) (2012) 38e44.
- 15.-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;
- 16.- Q. Li, L. Tao, B. Chen, H. Ren, X. Hou, S. Zhou, J. Zhou, X. Sun, J. Dai, and Y. Ding, “Extrahepatic bile duct regeneration in pigs using collagen scaffolds loaded with human collagen-binding bFGF,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 17, pp. 4298–4308, 2012.
- 17.- G. Wittrin, M. Clemens, M. Arndt, and D. Rühland, “Replacement of the common bile duct by an autologous vein (author’s transl),” *Res. Exp. Med. (Berl)*., vol. 173, no. 1, pp. 95–103, 1978.
- 18.- M. Rosen, J. Ponsky, R. Petras, A. Fanning, F. Brody, and F. Duperier, “Small intestinal submucosa as a bioscaffold for biliary tract regeneration,” *Surgery*, vol. 132, no. 3, pp. 480–486, 2002.
- 19.- A. J. P. Alonso, C. D. O. Rivas, I. M. Romero, F. J. C. Garcia, and P. T. Poyatos, “Tissue-engineering repair of extrahepatic bile ducts,” *J. Surg. Res.*, vol. 179, no. 1, pp. 18–21, 2013.
- 20.- P. Nau, J. Liu, E. C. Ellison, J. W. Hazey, M. Henn, P. Muscarella, V. K. Narula, and W. S. Melvin, “Novel reconstruction of the extrahepatic biliary tree with a biosynthetic absorbable graft,” *HPB*, vol. 13, no. 8, pp. 573–578, 2011.
- 21.-Kemp P. History of regenerative medicine: looking backwards to move forwards. *Regen Med* 2006; 1: 653-69.

- 22.- Atala A. Engineering organs. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20: 575-92.
- 23.-Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3: 1-5.
- 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.- Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006; 367: 1241-6.
- 26.- Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet* 2011; 377: 1175-82.
- 27.- Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, Mavilia C, Haag J, De Coppi P, et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. *Biomaterials* 2010; 31: 8931-8.
- 28.- Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 2008; 372: 2023-30.
- 29.- Fishman JM, De Coppi P, Elliott MJ, Atala A, Birchall MA, Macchiarini P. Airway tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*; 2011.
- 30.- Choi RS, Vacanti JP. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds *Transplant Proc* 1997; 29: 848-51.
- 31.- Wang Y, Cui CB, Yamauchi M, Miguez P, Roach M, Malavarca R, et al. Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* 2011; 53: 293-305.
- 32.- Giraldo-Gomez DM, Leon-Mancilla B, Del Prado-Audelo ML, Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Garciadiego-Cazares D, Pina-Barba MC, Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: *Materials Science and Engineering C* 2016; 59: 930-37.
- 33.- Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusiondecellularized

matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008; 14: 213-21.

34.- Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* 2010; 16: 927-33.

35.- Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 2010; 16: 814-20.

36.- Nakayama KH, Batchelder CA, Lee CI, Tarantal AF. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2010 Jul; 16(7): 2207-16.

37.- Baptista PM, Orlando G, Mirmalek-Sani SH, Siddiqui M, Atala A, Soker S, et al. Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2009; 2009: 6526-9.

38.- Totonelli G, Maghsoudlou P, Garriboli M, Riegler J, Orlando G, Burns AJ, Neil J, et al. A rat decellularized small bowel scaffold that preserves villus-crypt architecture for intestinal regeneration. *Biomaterials* 2012; 33: 3401-10.

39.-Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF, An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 2011; 32: 3233-43.

40.- Srokowski E, Woodhouse K, Decellularized Scaffolds, in *Comprehensive Biomaterials*, P. B. T. C. B. Ducheyne, Ed. Oxford: Elsevier, 2011: 369-86.

41.- Finkbeiner SR, Freeman JJ, Wieck MM, El-Nachef W, Altheim CH, Tsai YH, et al. Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids. *Biology Open*, 2015; 00: 1-11.

42.- Nowocin AK, Southgate A, Gabe SM, Ansari T, Biocompatibility and potential of decellularized porcine small intestine to support cellular attachment and growth. *J Tissue Eng Regen Med* 2016; 10: E23–E33.

- 43.- León Mancilla B, Piña Barba C, Martínez Hernández H. Informe Técnico: Procuración De Órganos Con Fines De Ingeniería De Tejidos Y Medicina Regenerativa. Universidad Nacional Autónoma De México, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones en Materiales.
- 44.- Yao Cheng, Xian-Ze Xiong, Repair of a common bile duct defect with a decellularized ureteral graft, *World J Gastroenterol* 2016 December 28; 22(48): 10575-10583
- 45.- Uso CY, Laboratorio DELOSADE. Nom-062-Zoo-1999. *Secr Agric Ganad Desarro Rural Pesca y Aliment.* 1999.
- 46.- European Union. Directive 2010/63/EU. *Off J Eur Union.* 2010.
47. Rodríguez-Fuentes N, Rodríguez-Hernández AG, Enríquez-Jiménez J, et al. Nukbone® promotes proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013.
48. Rivera N, Romero SE, Menchaca Á, et al. Blackwater fever like in murine malaria. *Parasitol Res.* 2013.