



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE UN ANDAMIO CELULAR A PARTIR DE VASOS
SANGUÍNEOS HUMANOS DESCELULARIZADOS PARA SU
POTENCIAL APLICACIÓN EN MEDICINA REGENERATIVA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A

MARTÍNEZ ORTIZ ANA KAREN

DIRECTOR DE TESIS

DR. DAVID MAURICIO GIRALDO GÓMEZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Samuel Canizales Quinteros

VOCAL: Javier Axosco Marín

SECRETARIO: David Mauricio Giraldo Gómez




1 er. SUPLENTE: Gerardo Leyva Gómez

2º SUPLENTE: Natalí Nadia Guerrero Vargas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ESTE TRABAJO AL SER MULTIDISCIPLINARIO SE REALIZÓ EN DISTINTOS SITIOS, SIENDO EL LABORATORIO DE BIOMATERIALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES, EL LABORATORIO DE BASE, ADEMÁS SE TRABAJÓ EN LA FACULTAD DE MEDICINA, POSGRADO DE ODONTOLOGÍA, INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA Y EL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.



Dr. Giraldo Gómez David Mauricio
Tutor del proyecto



Biól. García López Sandra Julieta
Supervisor técnico



Martínez Ortiz Ana Karen
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por tenerme aquí, que sin la ayuda de mis padres, **Maura Ortiz Reyes** y **Jesús Martínez Altamirano**, definitivamente no lo estaría logrando, gracias por todo, por las enseñanzas que día a día me dan, y una de ellas es que no es malo caer, pero que debo agarrar fuerza para levantarme y no quedarme sumergida en el piso. Gracias por no rendirse, por los regaños, porque es gracias a ellos, que estamos culminando. A mi hermano, **Edgar**, por esas pláticas que me enseñan nuevas cosas. Sin duda, gran parte de lo que soy, es gracias a ustedes y jamás podré expresar mi agradecimiento.

A la *Universidad Nacional Autónoma de México*, por ser mi segunda casa y que gracias a ésta conocí personas increíbles como al **Dr. David Mauricio Giraldo Gómez**, quien desde el primer día que lo conocí, siempre buscó la manera de ayudarme, por inculcarme esa espinita de la investigación y sentir esa pasión por lo desconocido, por enseñarme diario cosas distintas, el apoyo, no solo en la parte educativa sino también en lo personal. Por sacarme de mi zona de confort y siempre impulsarme a ir más allá. Doctor, aquí están los resultados de nuestro trabajo, desvelos y mucho esfuerzo.

Muchas gracias **Biól. Sandra Julieta García López**, por su paciencia y apoyo.

A la **Dra. María Cristina Piña Barba**, por sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio. A **Gerardo Cedillo**, **Tannia Sandoval**, **Ángela Rangel**, por toda la ayuda en este caminito, la convivencia, y enseñanzas. **David Abad** aun cuando me explotabas, también me enseñaste mucho. **Emilio Querol**, gracias por siempre estar. **Lorena Fernández**, hacías muy ameno el trabajo, y aunque estuviéramos horas, siempre veíamos como le hacíamos y estábamos, riéndonos. Por las charlas, la confianza, la música para el exhaustivo o cuando estábamos de polleras y más, ¡gracias! **Isaac Muñoz**, aun cuando hasta mis nietos están endeudados contigo, te agradezco por todos tus consejos. Por levantarme el ánimo cuando sentía que nunca iba a terminar esta etapa llamada tesis, de verdad, ¡muchas gracias!

Juan Manuel Pérez Osorio†, lamentablemente ya no alcanzaste a leer mi tesis, sin embargo, estuviste durante todo el proceso, ayudándome y espero que desde donde estés, puedas ver que lo logré, ¡muchas gracias **Juan Mi!**, por toda tu ayuda que me brindaste, tanto en lo académico como en lo personal.

Al honorable **jurado** que con sus correcciones hicieron este trabajo mejor.

Agradecimientos a **DGAPA-UNAM** por el financiamiento recibido para el desarrollo de éste proyecto, por medio de los proyectos PAPIIT: TA200520 e IT100719.

A cada una de las personas que han hecho de este proyecto una realidad como al **Dr. Marco Álvarez** (*Posgrado de odontología*), al **Biól. Leonardo Rodríguez** (*Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán*), y a todas aquellas que están detrás de que todo funcione bien. A la **Biól. Ivonne Sánchez** (*Unidad de Microscopía* de la Facultad de Medicina), por aguantar las miles de horas, para sacar el material. A los institutos de *Investigación en Materiales (Laboratorio de Biomateriales)*, *Nacional de Rehabilitación* Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

A mis amigos, **Sarahí Méndez**, **Abril Linares**, **Jess Ortiz**, **Erick Pérez**, que hacían llevaderas las clases. A **Jess Lara** y **Ale García**, por siempre alzarme el ánimo y ayudarme. **Mariana Esperanza**, por esas pláticas motivacionales, las canciones mientras sabías que estaba escribiendo, por escucharme cuando tenía que hacer catarsis y emocionarte siempre que te platicaba de mis pruebas.

Por último, a una persona especial, que desde que nos hicimos amigos, me hizo jugar en el laboratorio, a divertirme y siempre buscó la manera de ayudarme, impulsarme, de que entendiera que jamás es tarde para cumplir mis sueños; hacerlos como propios y ver cómo realizarlos, ayudarme cuando de plano no entendía nada, por retarme, y no dejarme caer en ningún aspecto. Sobre todo, por tolerar mis horarios todos raros y tenerme paciencia, ¡muchas gracias, **Gerardo Rojas López!**

ÍNDICE

Resumen.....	6
Justificación.....	9
Hipótesis.....	10
Objetivo.....	10
Metas.....	10
Capítulo 1. Marco de referencia.....	11
1.1 Vasos sanguíneos.....	11
1.1.1 Histología.....	13
1.2 Patologías asociadas a los vasos sanguíneos.....	16
1.3 Soluciones actuales.....	17
1.4 Ingeniería de tejidos.....	20
1.4.1 Descelularización.....	22
1.4.1.1 Agentes de descelularización.....	25
1.4.2 Caracterización de un andamio descelularizado.....	26
Capítulo 2. Metodología experimental.....	28
2.1 Obtención de la muestra.....	28
2.1.1 Cirugía.....	28
2.2 Descelularización.....	29
2.3 Análisis histoquímico.....	30
2.3.1 Deshidratación e inclusión de la muestra.....	30
2.3.2 Cortes histológicos.....	31
2.3.3 Deshidratación y rehidratación de cortes histológicos.....	32
2.4 Evaluación de la efectividad de la descelularización mediante el marcaje de ADN.....	33
2.4.1 Tinciones específicas a material nuclear.....	33
2.4.1.1 Análisis semicuantitativo.....	34
2.5 Evaluación de la integridad de la MEC.....	35
2.5.1 Colágena.....	35
2.5.2 Elastina.....	35
2.6 Evaluación de la recelularización.....	37
2.6.1 Cultivo celular.....	37
2.6.2 Preparación del andamio.....	39
2.6.3 Cultivo celular en el andamio descelularizado.....	39
2.7 Evaluación de la viabilidad celular.....	40
2.7.1 Análisis semicuantitativo de viabilidad celular.....	40
Capítulo 3. Resultados.....	42

3.1 Descelularización.....	42
3.2 Evaluación de la efectividad del proceso de descelularización.....	42
3.2.1 Análisis semicuantitativo del contenido nuclear.....	43
3.3 Composición de la MEC después del proceso de descelularización.....	44
3.3.1 Colágena.....	44
3.3.2 Elastina.....	45
3.4 Evaluación de la recelularización.....	46
Capítulo 4. Discusión.....	50
Capítulo 5. Conclusión.....	57
Capítulo 6. Perspectivas.....	58
Bibliografía.....	59
Anexo.....	66

Resumen

Aunque las donaciones de órganos se han incrementado de una manera exponencial, aún no es suficiente para satisfacer las necesidades de las personas que están en espera de un órgano o tejido, tan solo, el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA), reporta que a la fecha se encuentran 23,370 personas en lista de espera. Esto sin considerar que hay pacientes que requieren órganos y/o tejidos en los que actualmente no existe un protocolo de trasplante para éstos, por ejemplo, los vasos sanguíneos. Pues de acuerdo con el comunicado de prensa del 31 de octubre de 2018, del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), menciona las enfermedades cardiovasculares como la primera causa de muerte en México y también es una de las principales en el mundo. Es por ello que ante esta problemática existe una alta demanda en la búsqueda de estrategias quirúrgicas para los pacientes que requieren de soluciones a la falta de sustitutos de vasos sanguíneos, recurriendo al alotrasplante, (que consta de un trasplante que proviene de otro ser humano), y en el caso particular de las arterias, al autoinjerto (en el cual, el paciente es el receptor y donador) pero a la fecha no ha mostrado ser una solución holística.

Dentro de las principales enfermedades cardiovasculares se encuentra la aterosclerosis, (oclusión arterial que impide el flujo sanguíneo), afectando cualquier arteria del cuerpo, incluidas las del corazón, cerebro, brazos, piernas, pelvis y los riñones. Las cuales pueden provocar daños como una angina de pecho, o un ataque al corazón, además de un accidente cerebrovascular hasta la pérdida de la función renal. La colocación de injertos vasculares biológicos sintéticos es el procedimiento clínico más recurrente para tratar de solucionar este tipo de problemas.

Referente a los injertos biológicos, los más utilizados son las arterias autólogas o venas como la safena; sin embargo, el 40% de los pacientes no cuentan con los vasos de calidad o longitud adecuada, incluso si se contara con el tejido propio, la remodelación *in vivo*, incluida la hiperplasia de la

íntima y las lesiones mecánicas, conducen a una oclusión. Dentro de las propuestas de materiales sintéticos más usados en la actualidad encontramos el politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) y el Dacrón. Sin embargo, estos presentan problemas por los cuales terminan perdiendo su función como su resistencia a la tensión y alta rigidez por lo que son difíciles de suturar.

Por lo anterior, actualmente se busca conseguir un andamio de vasos sanguíneos que se pueda utilizar para reemplazarlos en los pacientes que así lo requieran y promover la regeneración. Para ello este proyecto busca proponer una técnica de biofabricación de andamios utilizada en ingeniería tisular conocida como descelularización, esta metodología parte del hecho que las proteínas de matriz extracelular son altamente conservadas entre diferentes especies.

En la descelularización a partir de tejidos obtenidos de un modelo biológico se lleva a cabo un proceso mediante el cual se eliminan las células utilizando diferentes agentes de descelularización para promover la eliminación de antígenos que inician la respuesta inmune en los trasplantes eliminando la necesidad de inmunosupresión y disminuyendo la tasa de rechazo de trasplante e incluso abriendo la posibilidad de xenotrasplantes (trasplante entre diferentes especies) manteniendo una matriz extracelular viable que puede servir como andamio celular para ser repoblado con las células del paciente y así promover la regeneración del tejido. En este caso se utilizaron vasos sanguíneos, específicamente arterias, obtenidas de pacientes cadavéricos. Estas se sometieron a un protocolo de descelularización previamente desarrollado por nuestro grupo de investigación aplicado a vías biliares, el cual fue efectivo en su descelularización.

Por lo que este protocolo se aplicará en vasos sanguíneos para obtener un andamio descelularizado así como la evaluación histológica de la matriz extracelular y su uso potencial en medicina regenerativa vascular analizando la viabilidad celular en el andamio obtenido.

El cual resultó también efectivo en vasos sanguíneos, ya que se obtuvo una descelularización del $95.65\% \pm 4.65\%$, además de que no se observa daño en la matriz extracelular y se mantienen las fibras elásticas. Por otro lado en el ensayo de viabilidad celular se muestra que se obtuvo una viabilidad de alrededor del 87%. Lo que indica que se obtienen buenos resultados al utilizar el mismo protocolo que en vías biliares, para tener vasos sanguíneos, en su mayoría, descelularizados y sin daño, aparente, de la matriz extracelular y da el pie a que pueda llegar a ser utilizado este tejido en medicina regenerativa.

JUSTIFICACIÓN

En México, las cardiopatías dejan alrededor de 68,716 fallecimientos al año [11] y en Estados Unidos, el 20% de los procedimientos quirúrgicos que se le realizan a hombres y el 11% a mujeres, involucra al sistema cardiovascular [6]. De estos 700,000 procedimientos al año son cirugías de derivación arterial para restaurar el flujo sanguíneo a una oclusión, esto es principalmente debido a la aterosclerosis [12], además de que se necesitan más de un millón de injertos vasculares cada año [13]. En Inglaterra se realizan 20,000 angioplastias al año, que no son de emergencia [14].

La primera línea de tratamiento de las enfermedades cardiovasculares se centra en fármacos, trasplantes autólogos o materiales sintéticos; sin embargo, no son viables para algunos pacientes y aunque a veces son viables, no siempre se obtienen los resultados esperados.

Existen diversas propuestas para el mejoramiento de este problema, pero no se ha demostrado la eficiencia de alguna que pueda ser una solución adecuada para el reemplazo de los vasos sanguíneos, es por ello que se busca la obtención de un andamio descelularizado, mediante estrategias de ingeniería de tejidos, a través de la técnica de descelularización de arterias, para que puedan ser utilizados como aloinjerto de fácil obtención, conservando la matriz extracelular (MEC) nativa, asegurando que sus propiedades biológicas y mecánicas sean las correctas, para utilizarse en medicina regenerativa vascular.

HIPÓTESIS

Si el proceso de descelularización físico-químico-enzimático es efectivo, entonces se obtendrá un andamio descelularizado, el cual puede promover la adhesión y viabilidad celular.

OBJETIVO

Descelularizar por el método físico-químico-enzimático vasos sanguíneos, para su uso en la ingeniería de tejidos.

METAS

- Evaluar la efectividad de la descelularización, a través de las técnicas histológicas de marcaje de núcleos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y Hematoxilina y Eosina (H&E).
- Evaluación histológica de la matriz extracelular del andamio, por medio de las técnicas de tinción, Tricrómica de Masson, Herovici y Verhoeff.
- Evaluar la viabilidad y citotoxicidad celular de los andamios descelularizados a través del ensayo muerte/vida.

CAPÍTULO 1

Marco de referencia

1.1 Vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos, en conjunto con el corazón y la sangre, forman un circuito hidráulico cerrado, que se denomina el *sistema cardiovascular*. Este sistema se encarga de bombear, transportar y distribuir los 6 litros de sangre que contiene el cuerpo humano [15]. También lleva el oxígeno y los nutrientes necesarios para los procesos metabólicos hacia los tejidos. Así mismo, transporta los productos de desecho proveniente del metabolismo celular de los riñones y de los otros órganos excretores, para su eliminación. Además, circulan los electrolitos y hormonas necesarias para regular la función corporal [16].

Existen cinco tipos de vasos sanguíneos: las *arterias*, *arteriolas*, los *capilares*, las *vénulas* y las *venas*.

Las **arterias**, son las que conducen la sangre desde el corazón hasta los tejidos y pulmones, se han descrito dos principales arterias que son la *tronco pulmonar* y la *aorta* [17]; las *venas* hacen lo contrario, transportan la sangre desde tejidos y pulmones al corazón, estas últimas cuentan con válvulas, las cuales no están presentes en las arterias.

Los vasos sanguíneos de gran calibre (>10 mm de diámetro), también requieren de oxígeno y nutrientes, es por ello que tienen a sus propios vasos sanguíneos, llamados *vasa vasorum* [18], que son pequeños capilares que penetran a través de las paredes de los vasos y se ramifican profusamente para alimentar las células localizadas en la capa más externa de los vasos [17], sus características morfológicas se observan en la **Figura 1**.

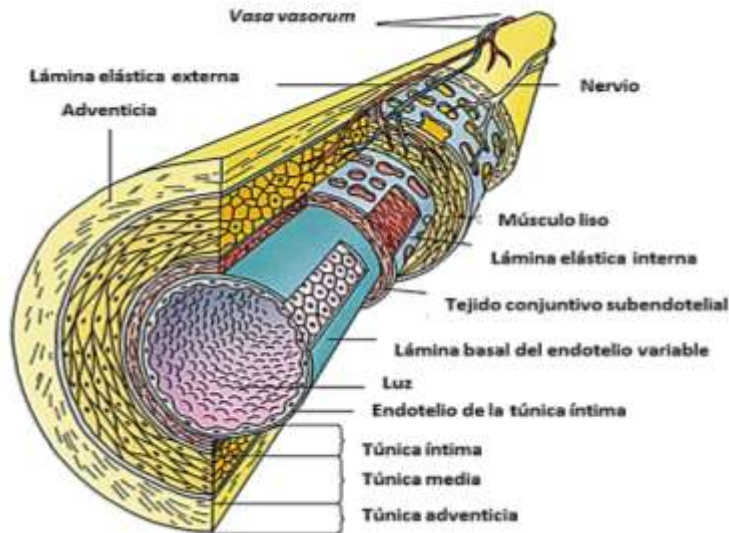


Figura 1. Diagrama de los componentes de una arteria típica, donde se muestra los *vasa vasorum* desde la superficie más externa (adventicia) alimentando las células de las paredes arteriales. (L. Gartner 2017).

Las *arteriolas* son los vasos arteriales terminales, las que se encargan de regular el flujo sanguíneo hacia los lechos capilares, que están conformados por los *capilares*, haciendo el intercambio de los gases, nutrientes, desechos metabólicos, hormonas y sustancias de señalización entre la sangre y los tejidos, para así mantener la actividad metabólica normal [17]. Las *vénulas*, son venas pequeñas y ramificadas, que se encuentran en contacto con los capilares, donde será el primer sitio por donde pase la sangre de regreso, después de pasar por los capilares [19], [20] (Figura 2).

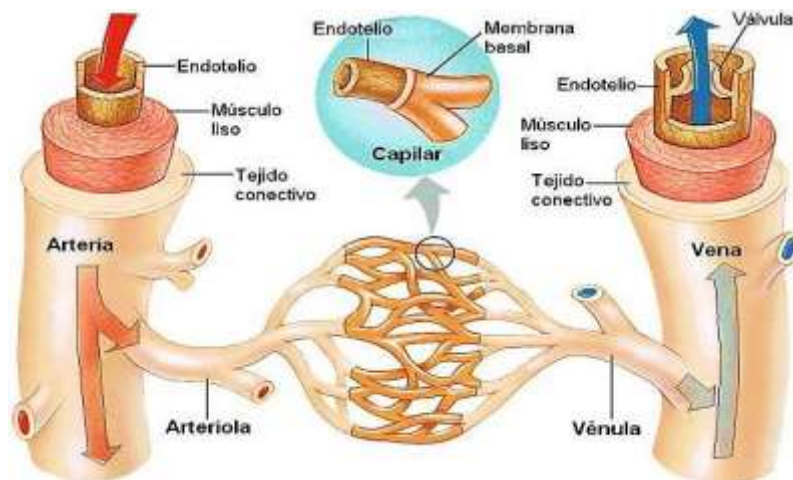


Figura 2. Vasos sanguíneos, donde se muestran las diferentes estructuras histológicas que componen las arterias y las venas. (Genomasur, 2020).

1.1.1 Histología

La mayoría de los vasos sanguíneos tienen características que estructuralmente son similares, sin embargo tienen diferencias que sirven para clasificarlos, como el diámetro y el grosor. Todos los vasos sanguíneos cuentan con tres túnicas (capas), **íntima**, **media** y **adventicia**, descritas de la parte más interna a la más externa, respectivamente. Donde la íntima, está conformada por endotelio, tejido conectivo subendotelial, incluida la lámina elástica interna; la media que es la túnica más gruesa, está compuesta por células de músculo liso y una lámina elástica externa y por último la adventicia, donde hay tejido conectivo [17]. En la **Figura 3**, se observa la composición histológica de los vasos sanguíneos.

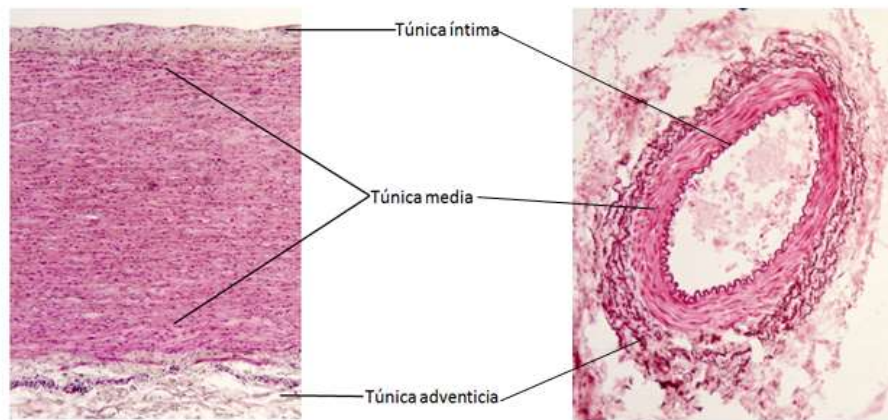


Figura 3. Corte longitudinal (izquierda) y transversal (derecha) de una arteria. (L. Gartner 2017).

Este trabajo se centrará en **arterias**. Éstas se clasifican de la siguiente manera: *arterias elásticas* (de conducción) y *arterias musculares* (de distribución) [21].

Las **arterias elásticas**, tienen un diámetro ≥ 10 mm, la más grande es la aorta [21]. Histológicamente la *túnica íntima*, está compuesta por endotelio que está sustentado por una capa de tejido conjuntivo subendotelial, donde se encuentran algunos fibroblastos, células musculares lisas, y fibras de colágeno. También hay presencia de láminas delgadas de fibras elásticas y lámina elástica interna. Las células endoteliales tienen de 10 a 15 μm de ancho y de 25 a 50 μm de largo [17].

La *túnica media*, está conformada por numerosas láminas porosas de elastina (láminas elásticas fenestradas). El número de láminas va aumentando conforme va avanzando la edad. Esta matriz extracelular, es secretada por los fibroblastos, se compone en su mayoría de condroitín-sulfato, colágeno, y fibras reticulares y elásticas. Además, esta túnica está limitada por la lámina elástica externa [17].

La *túnica adventicia* se compone de tejido conectivo que, en su mayoría está conformada de fibras de colágeno [21], que es donde principalmente se albergan los fibroblastos [17], y se encuentran fibras elásticas [22].

En la **Figura 4, A** se observa la distribución de las túnicas y la división de estas, además de sus componentes celulares. La **Figura 4, B** corresponde una fotomicrografía en donde las líneas negras son las fibras elásticas, las cuales se concentran en la túnica media, en la íntima se ven también fibras, pero más compactas y en la adventicia no hay presencia de éstas.

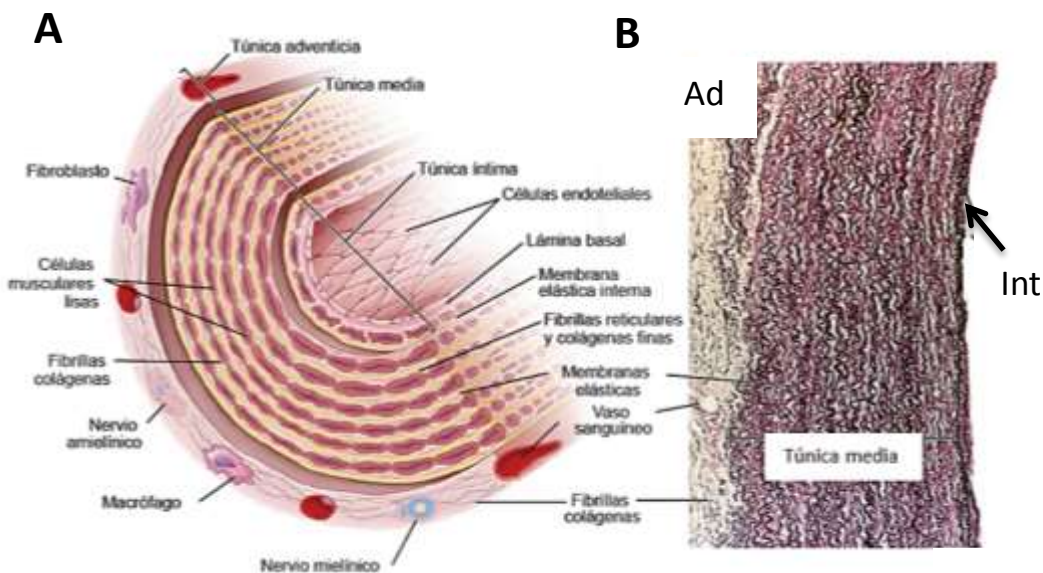


Figura 4. Representación de los componentes de una arteria elástica humana (A). Un corte transversal de la arteria muscular teñida con resorcina-fucsina de Weigert. (Adv) adventicia. (Int) íntima. (M. Ross & W. Pawlina 2016).

Las **arterias musculares** son las que constituyen la mayor parte de las arterias en el organismo (**Figura 5**). Su diámetro varía entre los 2 y 10 mm [21], [22].

Su pared es relativamente más gruesa en comparación con su diámetro vascular, puesto que posee una gran cantidad de músculo liso en su túnica media, de ahí su nombre [21].

Histológicamente, la *túnica íntima* tiene una capa subendotelial que contiene algunas células musculares lisas, su lámina elástica interna es muy evidente, ya que muestra una superficie más ondulante, a la que se adapta el endotelio [17].

La *túnica media*, contiene más de 10 capas de células musculares lisas, entre las células musculares, están presentes fibras elásticas y de colágeno, que están incluidas en su matriz glucoproteica [21].

Y por último, la *túnica adventicia* [21], consta de fibras elásticas de colágeno (de 60-100 nm de diámetro) y sustancia fundamental, que está compuesta por dermatán-sulfato y heparán-sulfato. Su matriz extracelular tiene fibroblastos [17] y algunas fibras elásticas [22]. En su parte más externa, se encuentra el vasa vasorum y algunas terminaciones nerviosas amielínicas [17].

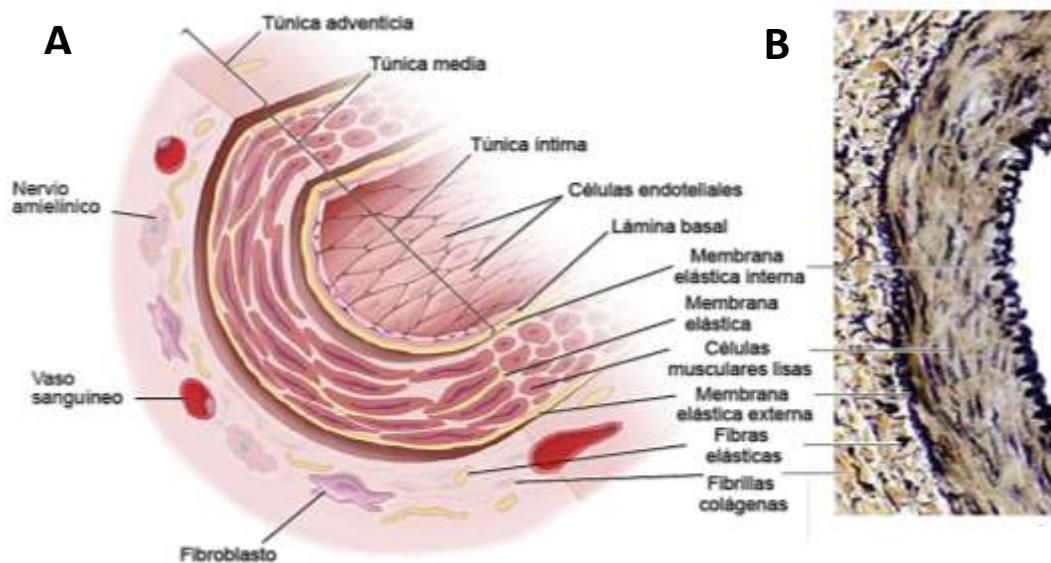


Figura 5. Representación de los componentes de una arteria muscular humana (A). Un corte transversal de la arteria muscular teñida con resorcina-fucsina de Weigert. (M. Ross & W. Pawlina 2016).

1.2 Patologías asociadas a los vasos sanguíneos.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), son la principal causa de muerte alrededor del mundo [23]. Éstas son un trastorno que afecta tanto a las arterias como a las venas. Generalmente, afecta el flujo sanguíneo, ya sea por la obstrucción o el debilitamiento de los vasos o por el daño de las válvulas que tienen las venas. Estos problemas pueden dañar a los órganos o a otras estructuras del cuerpo, por la disminución u obstrucción completa del flujo sanguíneo [24].

En 2015 fueron la causa de 17.7 millones de defunciones; donde el 41.8% fueron a causa de cardiopatías coronarias y el 37.8% por accidentes cerebrovasculares. Algunos de los principales factores de riesgo para estas patologías son la hipertensión arterial, diabetes, dislipidemias, el consumo de alcohol y tabaco, además de dietas insalubres [25]. Más del 75% de las muertes por ECV se presentan en países de ingresos medianos y bajos [23]. En México, las ECV son la primera causa de muerte, con 141,619 defunciones al año [25].

Algunos de los padecimientos son enfermedades de las arterias coronarias, por lo general los depósitos de colesterol (placa) y la inflamación, son los causantes de las enfermedades coronarias [26]. Dentro de éstas, una de las que con mayor frecuencia se presenta es la *arteriosclerosis*, que es el endurecimiento de las arterias, con más exactitud, es un grupo de patologías que tienen en común el engrosamiento y pérdida de la elasticidad de la pared de las arterias [27], las arterias pequeñas como las renales, son el tipo más común de esta condición, muestran engrosamiento hialino, que a menudo se asocia con hipertensión y diabetes [17]. La *ateroesclerosis*, afecta a las arterias. Esto ocurre en la íntima por el depósito de lípidos y elementos celulares como los macrófagos y células lisas [28], las arterias coronarias y carótidas, entre otras, generalmente sufren de esta condición, la cual conlleva al infarto de miocardio y accidentes cerebrovasculares [17].

Otra problemática es el *síndrome aórtico agudo (SAA)*, que consiste en un debilitamiento de la capa media, lo que puede provocar una rotura aórtica y

otras complicaciones [29], dentro de éstos se encuentra la *dissección aórtica clásica (DAo)*, que es el desgarramiento de la íntima, la sangre sale por la rasgadura, provocando que se separen las túnicas íntima y media; si el canal se rompe y llega hasta la túnica adventicia, suele ser mortal [30], la hipertensión arterial, es un factor predisponente [31]. También se ha descrito el *hematoma intramural (HIA)*, que consiste en una hemorragia en la túnica media, que está contenida dentro de la misma, se origina a partir de la ruptura espontánea del *vasa vasorum* o de alguna úlcera arteriosclerótica penetrante [32]. Por último, la *úlcera penetrante de aorta (UPA)*, la cual se caracteriza por la ulceración de una placa aterosclerótica, dañando la lámina elástica y que puede originar hasta una DAo, si existe el paso de la sangre hacia la túnica media o llegar hasta romper la aorta [33].

Otros problemas relacionados con los vasos sanguíneos son los *aneurismas*, el cual consiste en un abultamiento de la pared del paso debilitado en el vaso sanguíneo, provocando una dilatación anormal. Puede producirse en cualquier vaso sanguíneo, pero se presenta con mayor frecuencia en una arteria que en una vena [34].

Por último, la *coartación aórtica* o “*estrechamiento de la aorta*” es una obstrucción de la aorta, lo que provoca que el corazón tenga que bombear con más fuerza. Generalmente, esta enfermedad se presenta al nacimiento (congénita), puede variar de leve a grave y quizá no se detecte hasta la adultez, dependiendo de la luz del estrechamiento [35].

Estas enfermedades, hacen que el reemplazo de los vasos sanguíneos sea una necesidad clínica para asegurar la salud y vida del paciente.

1.3 Soluciones actuales

En la actualidad se cuentan con diversos tratamientos que se centran en la estabilización del paciente con alguna condición vascular, sin embargo son muy pocos los que conllevan a un reemplazo de los vasos sanguíneos.

El *injerto de derivación (bypass) coronaria*, es un procedimiento quirúrgico que consta de injertar un vaso sanguíneo del mismo paciente, en uno que tenga una obstrucción, haciendo un puente, para que el flujo sanguíneo siga sin obstrucciones [18]. Generalmente se utiliza la safena; la arteria mamaria tanto la izquierda como la derecha; la arteria radial; la arteria gastroepiploica, entre otras [36]. Sin embargo, hay ocasiones en que el paciente no cuenta con arterias en buen estado, con el calibre o la longitud para poder hacer este procedimiento.

También existen materiales sintéticos que están hechos para restablecer la circulación, ya sea arterial o venosa. Puede ser por un reemplazo parcial o total, tienen distintos grosores y tamaños, para tomar la forma de un puente de derivación.

Un ejemplo de este tipo de materiales es el *dacrón*, que corresponde a un poliéster (fibra textil). Cuenta con dos formas de tejido, uno es el *Woven*, que tiene una baja porosidad, lo cual evita la precoagulación, que al ser implantado evita el sangrado. Está indicado para la sustitución de la aorta, arterias pulmonares y en la coartación de la aorta (padecimientos congénitos). Sin embargo, al ser rígido, cuesta trabajo al maniobrar y suturarlo. Otra desventaja es que cuando se cortan los extremos para la anastomosis, se deshilacha, para ello se recomienda utilizar el electrobisturí [7].

Otra variedad es la malla (*Knitted*), que al contrario del *Woven*, es de alta porosidad, lo que hace que sean más flexibles y elongable; pero por su alta porosidad tienen que pasar por una precoagulación para que pueda ser implantada. Cuenta con un recubrimiento, denominado doble *Velour*, que le confiere un precoagulado más expedito y una mejor incorporación al organismo. Sin embargo, al realizar una reconstrucción femoropoplítea, los resultados no son óptimos [7].

Otro ejemplo de material sintético usado para el reemplazo de vasos sanguíneos es el *politetrafluoroetileno expandido y reforzado (ePTFE)*, por su porosidad, las células sanguíneas se acomodan en su estructura. Pero, en

algunos casos ha presentado celulitis, granuloma a cuerpo extraño, edema, hematoma, que tuvieron que volver a ser reintervenidos [7], [37].

Se opta por la utilización de estos materiales, puesto que mantienen una permeabilidad del 90%, sin embargo a los cinco años disminuye en un 20% por complicaciones trombóticas [6], por ello se han tenido resultados decepcionantes en aquellas reconstrucciones de arterias con un diámetro pequeño, respecto a las derivaciones venosas [12], [38]. Asimismo se cuenta con una tasa de infección del 6% debido a los injertos sintéticos por la cirugía [39], además los vasos pequeños, presentan una alta tasa de falla debido a las fuerzas de tracción de la superficie y la absorción de las proteínas del plasma [40]. Además las propiedades mecánicas son inadecuadas y ha presentado hiperplasia de la íntima y reestenosis [12].

También, la tecnología de impresión 3D, está involucrada en encontrar una solución a esta problemática, Papaioannou et al. [41], recabaron algunos avances sobre esta tecnología donde, Kesari et al., empezaron con los primeros intentos para construir con hidrogel tubulares, donde las células que se colocaban en el hidrogel, tenían un diámetro de 30 a 50 μm , obteniendo una buena evidencia morfológica de la viabilidad celular, y la distribución es muy convincente. Sin embargo, al hacerle pruebas con endotelina-1, los tubos se contrajeron y el lumen se cerraba por completo a las 3 h de ser expuesto [42]; algunos años después Nakamura et al, fabricaron fibras y tubos al expulsar alginato en una solución de CaCl_2 , y de gel fibrina, donde se encontraron que el primero presentaba mejores propiedades mecánicas, pero la peor interacción celular para el crecimiento celular en comparación con el de fibrina, aunque éste cuenta con mejores condiciones, también presenta las fallas mencionadas [43]. En el 2015 Itoh et al., fabricaron tejidos tubulares sin andamios, cultivando las células en pozos no adheribles, permitiendo que las células formaran estructuras esferoidales, promoviendo la formación de la MEC con colágena y elastina, pero aún se necesitan estudios para ver cuál es el mecanismo de endotelización y función a largo plazo [44]. Otro material que es utilizado en la impresión 3D es el poliuretano termoplástico (TPU) junto con hidroxapatita (HA), que se

extruyen para hacer un filamento, el cual es utilizado para la fabricación de los vasos sanguíneos, y aunque estos biomateriales son capaces de presentar beneficios, aún deben de mejorarse en sus propiedades biológicas y mecánicas, además preocupa el uso de la HA, ya que esta podría generar calcificación de los andamios [40].

Por lo anterior se hace evidente que ninguna de las propuestas actuales resulta ser una solución adecuada para el reemplazo de vasos sanguíneos, y se hace necesario seguir investigando una solución integral que cumpla con las características tanto estructurales, como funcionales, para que pueda llevar a cabo las funciones de transporte, reparación, remodelación e incluso defensa que cumple la MEC de los vasos sanguíneos.

1.4 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una ciencia que ha llegado a tener una gran aplicación en los últimos años, al ser interdisciplinaria, están incluidas las disciplinas de biología, medicina, física, química, ingeniería, ciencia de materiales, entre otras, además del desarrollo de tecnología, que son parte del proceso para reparar, reemplazar o regenerar tejidos, e incluso órganos enteros, con la combinación de células, andamios y proteínas de señalización [45]. Donde los andamios funcionan como una matriz de soporte artificial o natural, dando un lugar a que las células puedan adherirse y formar matriz extracelular de *novo* que reemplace al andamio para generar un nuevo tejido, con estructura y función adecuada. Este andamio debe proveer las condiciones y el ambiente, para que pueda ocurrir una regulación celular adecuada, como lo es la adhesión, migración, proliferación y diferenciación, de igual manera debe de tener factores bioactivos que promuevan, el crecimiento y la adhesión de las células [46].

Para conseguir lo anterior, la triada de ingeniería de tejidos, la cual se compone de: células, factores de crecimiento y los andamios (**Figura 6**), se relacionan entre sí para conformar lo que se conoce como “constructo” el

cual posee las características adecuadas para reemplazar algún tejido e incluso órgano en particular [47]. El andamio junto con los factores de crecimiento y factores de señalización, son los que proporcionan las señales estructurales, bioquímicas y biomecánicas para guiar y regular el comportamiento de las células y el desarrollo del tejido [47].

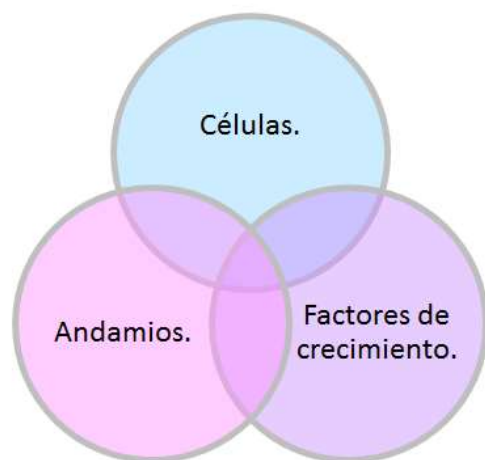


Figura 6. Triada de la ingeniería de tejidos.

Un elemento clave entonces es el **andamio celular**, el cual proporciona un armazón que facilita el anclaje, la migración y diferenciación celular, que sirve como soporte para las células, además de los factores de crecimiento u otras biomoléculas que permiten la difusión de nutrientes celulares, que forman la matriz extracelular [48]; que es una entidad estructuralmente compleja que rodea y soporta a las células que se encuentran en los tejidos [9], además de que interactúan con las células para regular varias funciones, como la proliferación, migración, diferenciación, entre otros [49]. Es una combinación compleja de proteínas, glicosaminoglicanos, glicoproteínas y pequeñas moléculas, que están organizadas de una forma única y específica en cada tejido [9]. Además el andamio es un “material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [50]. Su rigidez, es la que permite que mantenga su forma durante el proceso, pero el tiempo de degradación debe ser tal que garantice el apoyo necesario para la formación del tejido nuevo, una vez trasplantado [45].

Para ello el andamio debe de cumplir ciertos requisitos, como la viabilidad celular, *propiedades mecánicas y, arquitectura adecuadas*, el éxito final para los andamios va a depender de la elección del biomaterial del cual se va a fabricar [50] .

Los biomateriales se clasifican de acuerdo a su origen, en *naturales y sintéticos*, siendo los naturales los que se obtienen de una fuente presente en la naturaleza y los sintéticos, los que son obtenidos por reacciones químicas, como los polímeros [51].

- Sintéticos: Como son los metales, cerámicos, polímeros, etcétera.
- Naturales: como la colágena, hidroxiapatita, ácido hialurónico

Robert Langer junto con el Dr. Joseph Vacanti fue los pioneros de la ingeniería de tejidos que propusieron el concepto de un andamio tridimensional degradable como un sustituto de la matriz extracelular (MEC) [9], que podía ser utilizado como un andamio celular, sin embargo Green WT Jr. fue el primero en utilizar hueso desmineralizado como una matriz extracelular para sembrar condrocitos articulares en conejos en 1977 [52].

La matriz extracelular (MEC), es una estructura tridimensional dinámica, se encuentra en todos los tejidos. Continuamente se somete a una remodelación que es controlada, que están mediados por enzimas específicas para su remodelación, por ejemplo las metaloproteinasas [49].

1.4.1 Descelularización

Este proceso es una novedosa técnica para la fabricación de andamios descelularizados, los cuales son usados para regenerar diversos órganos y/o tejidos. Tiene la ventaja sobre otro tipo de sustituto, ya que éstos contienen la estructura y composición nativa del órgano o tejido a reemplazar. Sin embargo, las matrices descelularizadas aún no han sido ampliamente usadas, debido a que cada órgano o tejido cuenta con una estructura única y

específica, por ende requiere de un proceso particular para obtener una matriz descelularizada [53].

El proceso de descelularización tiene como objetivo eliminar de manera eficiente todo el material celular y nuclear, al mismo tiempo, reduce al mínimo cualquier efecto adverso en la composición, la actividad biológica y la integridad mecánica de la MEC restante [54], [9].

Las células nativas y material genético son aisladas de la matriz extracelular, para dar lugar a un andamio natural descelularizado, éste conserva sus señales inherentes estructurales, bioquímicas y biomecánicas, para cuando sea recelularizado y así tener un tejido u órgano funcional [47].

Ya que las células presentan en sus superficie los *Complejos Principales de Histocompatibilidad*, los cuales pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico [45], es por ello que se buscan distintos métodos, como los físicos, químicos, enzimáticos o combinaciones de los mismos [47] y disoluciones para permitir la lisis celular dejando tan sólo la matriz extracelular, que está compuesta por colágena, elastina y otras proteínas de señalización química, logrando conservar la arquitectura del órgano o tejido [45].

La descelularización tiene muchos beneficios, como minimizar la respuesta inmunológica del órgano o tejido al ser trasplantado, permite el uso de materiales xenogénicos, tiene la capacidad de conservar la integridad mecánica del tejido, la capacidad de retener la composición bioquímica del tejido nativo, la capacidad de retener la microarquitectura tridimensional y la de conservar las propiedades bioinductivas, para facilitar la remodelación de tejidos [9], sin embargo es importante destacar, que los métodos utilizados para la descelularización de un órgano o tejido son específicos para el mismo [9].

Los criterios que se utilizan para la evaluación de la descelularización son: *Eliminación de células, comprobándolo con la ausencia de núcleos en las histologías de Hematoxilina y Eosina (H&E) y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI)*,

tener menos de 50 ng de ADN de doble cadena por mg de peso seco de MEC, conservación del contenido de proteína [47], tener ADN restante menor a 200 pb de longitud [55] y conservación de sus propiedades mecánicas [47]. Recordando que la eficacia de la descelularización depende de la metodología del proceso y la naturaleza del tejido [9].

Actualmente se cuenta en el mercado con productos descelularizados como Artegraft® (arterias carótidas bovinas); Solcografit (arteria carótida bovina); ProCol® (vena mesentérica bovina) y SynerGraft® (uréter bovino), este tipo de productos son de uso clínico para injertos de acceso vascular durante la hemodiálisis o bypass, sin embargo los resultados no son satisfactorios, puesto que ha habido presencia de trombosis, infección y aneurismas [56].

Hasta la fecha, se han realizado diversas investigaciones con respecto a los injertos para regeneración vascular, se ha encontrado que los andamios descelularizados pueden apoyar en la adhesión y el crecimiento de las células endoteliales, por ejemplo *Dahl et al.*, generaron injertos vasculares a partir de células alogénicas (de la misma especie del receptor), para lo cual cultivaron células de músculo liso alogénicas (de la misma especie del receptor) obtenidas de donantes cadavéricos que se colocaron en andamios tubulares de ácido poliglicólico (PGA), que consistía en que en el período de cultivo las SMC (células musculares lisas) secretaran proteínas de la MEC teniendo como predominancia el colágeno, para formar tejido vascular biosintético, una vez obtenido el andamio, se pasaba por un proceso de descelularización con la utilidad de agentes químicos (detergentes) para eliminar las células alogénicas, se implantaron en baubinos (mandriles), en los cuales no presentaron fallas, sin embargo el estudio fue limitado por el acceso a los animales, así que solo se estudió un pequeño número de injertos vasculares en el modelo de derivación coronaria, por lo que se requieren de más estudios para determinar la función a largo plazo [56], [57]. Esta investigación plantea una metodología intrincada al proponer un sembrado de células sobre PGA y luego hacer la descelularización, donde implica tiempos prolongados para obtener los vasos sanguíneos, además de que el tamaño y volumen, son críticos para que puedan ser clínicamente relevantes.

1.4.1.1 Agentes de descelularización

Como se mencionó, cada tejido u órgano necesita de un protocolo propio de descelularización, es por ello que existen diferentes agentes como los físicos, químicos y enzimáticos, en algunas ocasiones solo se necesita uno, dos o la combinación de estos agentes para lograr una descelularización óptima.

En general, un protocolo de descelularización consisten en: (1) lisis de las membranas celulares, con tratamientos físicos o con soluciones iónicas; (2) lograr la separación del componente celular de la MEC, utilizando enzimas; (3) la solubilización de sus componentes celulares, como el citoplasma mediante tratamientos con detergentes y, (4) el enjuague para la eliminación de los restos celulares de la MEC [9].

Todos los agentes de descelularización provocan un efecto adverso sobre las propiedades de la matriz extracelular, el desafío de un protocolo de descelularización exitoso es minimizar estos efectos de manera que se obtenga un andamio de matriz extracelular viable.

Los métodos *físicos* pueden incluir: la congelación y descongelación repetida, agitación, perfusión, entre otros. Pero estos métodos necesitan ser usados en conjunto con tratamientos químicos para aumentar su efectividad [9]. Los *químicos* utilizan disoluciones con agentes químicos como detergentes ya sean iónicos, no iónicos o zwitterionicos. Sin embargo, tienden a ser muy agresivos y pueden inducir cambios estructurales en matriz extracelular. Finalmente, los *enzimáticos*, constituyen principalmente el uso de nucleasas, que provocan, que catalice la hidrólisis de los ribonucleótidos y las cadenas de los desoxirribonucleótidos, su desventaja es que sus restos son difíciles de eliminar de los tejidos, lo que puede provocar una respuesta inmunológica [45].

Los protocolos actuales, son muy variados, por ejemplo Fitriatu et al., utilizó el dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% y por sonicación para un andamio aórtico. Posteriormente se observó una repoblación de células de músculo liso (SMC) [56].

1.4.2 Caracterización de un andamio descelularizado

Para la caracterización de un andamio descelularizado, se evalúa la presencia de núcleos celulares y se cuantifica el ADN, además se evalúa la MEC mediante técnicas de histología y/o por inmunohistoquímica.

Las pruebas histológicas, con distintas tinciones como la de *Hematoxilina y Eosina (H&E)*, que está basada en dos etapas, donde la primera es una tinción nuclear por el colorante básico (hematoxilina), y la segunda tinción la cual es citoplasmática y de MEC por el colorante ácido (eosina) [58], dando color azul-violeta a los núcleos, y los demás componentes de color rosado a rojo. Al marcar los núcleos, esta técnica permite la comparación entre un andamio nativo y uno descelularizado.

Además se utiliza una técnica para evaluar la efectividad del proceso de descelularización, además de las tinciones, como es el marcaje de núcleos con *4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI)* [59], mediante un marcaje nuclear, donde se tiñe preferentemente ADNds; parece asociarse con los grupos AT en el surco menor del ADN y en el ARN se une por una intercalación selectiva de AU [60].

La tinción *tricrómica de Masson*, sirve principalmente para evaluar las características de la MEC pues muestra los núcleos de un color negro, en rojo el músculo y en azul la colágena, su fundamento se basa en poner de manifiesto las fibras de colágeno y el tejido conjuntivo, en general [61].

La *tinción de Herovici*, es una tinción picropolicrómica, que ayuda en valorar las estructuras tisulares, tales como el núcleo, el citoplasma y la colágena extracelular, puesto que se le aplican distintos colorantes en forma secuencial, dando en un color negro los núcleos, de color rojo-azul tiñe la colágena, por último la queratina, músculo y glóbulos rojos se presentan de color amarillo verdoso [62].

Otra técnica histológica importante para la caracterización de la descelularización de arteria es la tinción de *Verhoeff*, puesto que tiñe de

color negro a café las fibras elásticas y los núcleos; y el colágeno en color rojo-café.

Una caracterización importante para cualquier tipo de andamio celular es su biocompatibilidad, precisamente para establecer la capacidad del mismo para ser repoblado por células, una forma de evaluar es mediante un ensayo de *viabilidad y citotoxicidad*, con el fin de establecer si el andamio descelularizado promueve la adhesión y viabilidad celular y si contiene algún elemento tóxico producto del proceso de obtención del mismo. Éste se basa en la determinación simultánea de células vivas y muertas, donde se evalúa la actividad ubicua de esterasa intracelular, la cual tiene una conversión enzimática de Calceína AM, prácticamente no fluorescente a una calceína intensamente fluorescente; y la integridad de la membrana plasmática, puesto que si está dañada, el homodímero de etidio (EthD-1) ingresa y se une a los ácidos nucleicos, produciendo una fluorescencia rojo brillante [63].

CAPÍTULO 2

Metodología experimental

2.1 Obtención de la muestra

2.1.1 Cirugía

Se extrajeron 10 arterias, de donadores humanos cadavéricos jóvenes, sin enfermedades cardiovasculares evidentes y sin padecimientos crónicos, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Posteriormente se trasladaron, en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 1X, al Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigación en Materiales, donde se les retiró el exceso de grasa (**Figura 7, A**) y se midieron sus longitudes, aproximadamente de 7 cm, (**Figura 7, B**) al terminar se tomó como muestra control nativa una sección del tejido que se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% (MACRON FINE CHEMICALS™) durante 24 h, pasado el tiempo, se le realizaron 3 lavados con PBS 1X (SIGMA life Science®). Por otro lado, la mayor sección del tejido se usó para el proceso de descelularización (**Figura 8**) y el resto de la muestra se congeló para posteriormente liofilizarse (**Figura 9**).

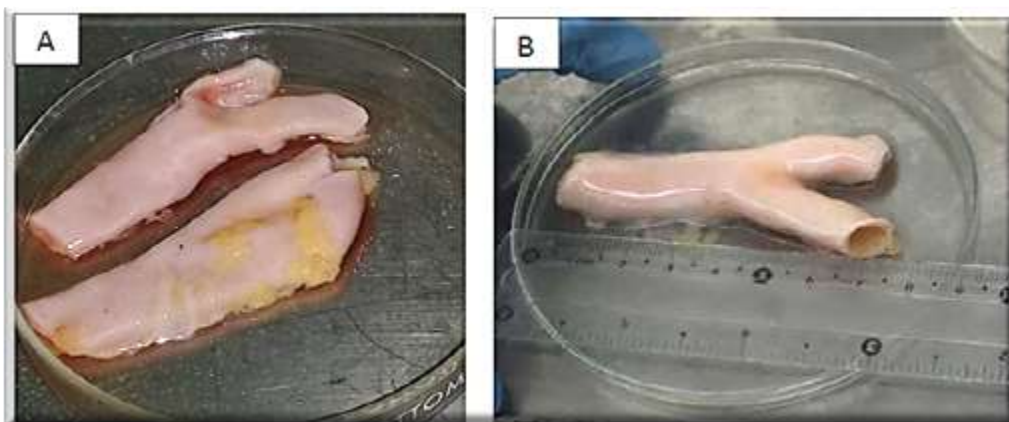


Figura 7. (A) Limpieza del exceso de grasa y (B) medición de los vasos

2.2 Descelularización

La metodología de descelularización usada en este proyecto parte de un proceso previamente desarrollado en el Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigación en Materiales de la UNAM, el cual fue con agentes de descelularización físico-químico-enzimáticos. Este proceso fue previamente usado para descelularizar vías biliares extrahepáticas de cerdo, donde se mostró una mínima cantidad de núcleos en las tinciones H&E y DAPI y en la inmunotinción de MHC-I y CK-7 presentó escasa señal residual de Complejo de Histocompatibilidad Mayor (MHC-I) [10]. Sin embargo, no ha sido probado en otros tejidos, es por ello que se quiere utilizar para ver si el mismo proceso puede funcionar para vasos sanguíneos humanos. El proceso se describe a continuación.

La muestra se conectó a un flujo de 46.0 mL/min controlado por una bomba peristáltica (easy-load®, Masterflex), la sección del tejido se mantuvo en 200 mL de la solución de descelularización (**Tabla 1**) como se muestra en la **Figura 8**, la cual duró ocho días.



Figura 8. Conexión de la arteria, para el proceso de descelularización.

TABLA 1: Proceso de descelularización

Proceso	Tiempo
Dodecil sulfato de sodio (SDS) 1%, en agua desionizada estéril	96 h, cambio cada 24 h
Buffer fosfato salino (PBS) 1X, en agua desionizada estéril	24 h
DNasa-1 [0.01 mg/mL] en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS)	24 h
Agua desionizada estéril	48 h, cambio cada 24 h

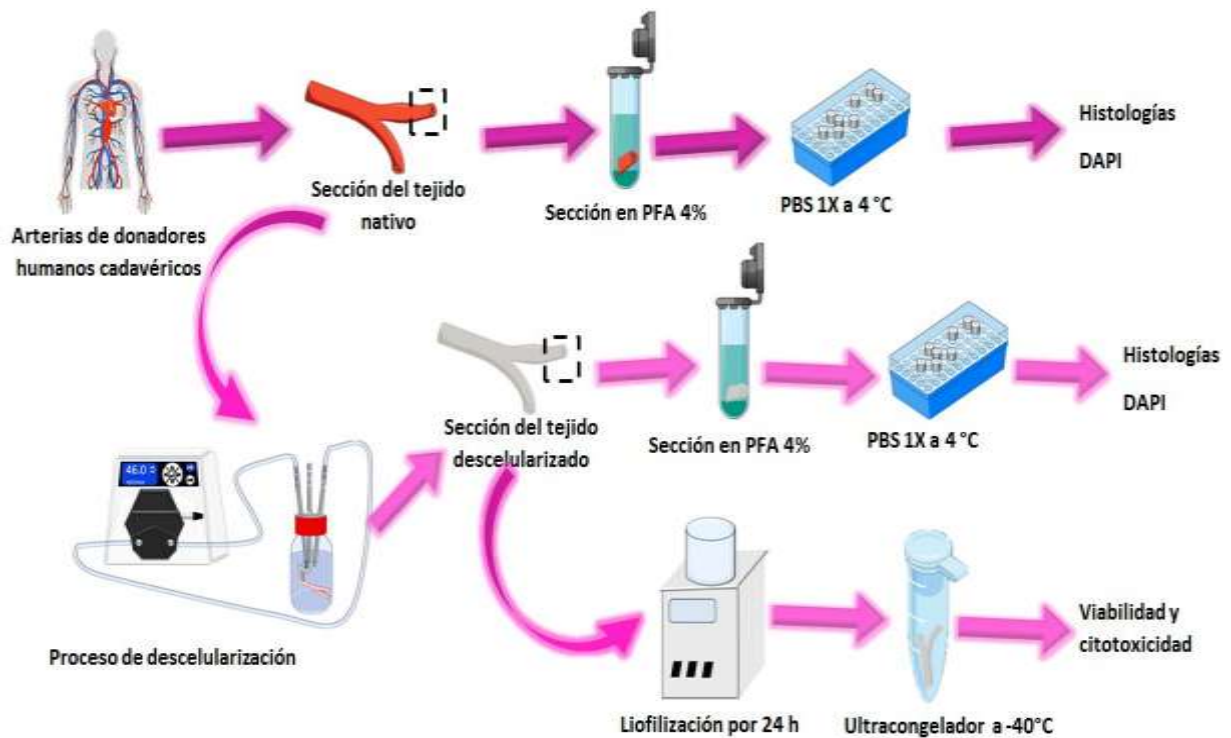


Figura 9. Diagrama del proceso desde que se obtienen las arterias hasta cuando se lleva a cabo el proceso de descelularización.

2.3 Análisis histoquímico

2.3.1 Deshidratación e inclusión de la muestra

Después del proceso de descelularización se diseccionó una parte y se fijó con PFA 4% durante 24 h y se lavaron con PBS 1X para seguir con el proceso de deshidratación de tejidos e inclusión en para fina (Paraplast® sigma) (Tabla 2) para cada una de las muestras: la muestra control (nativa), y la

muestra descelularizada, esto se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

TABLA 2: Proceso de deshidratación de tejidos e inclusión en parafina

Solución	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

2.3.2 Cortes histológicos

Las muestras se incluyeron en casetes, posteriormente se realizaron los cortes histológicos con un grosor de 3 μm en un micrótopo RM2135 Leica® los cortes se montaron en laminillas tratadas con una solución de tespa (3-aminopropiltriethoxisilano), para evitar que el tejido se desprendiera, se realizaron cinco cortes de cada muestra, tanto nativa como descelularizada) (Figura 10).

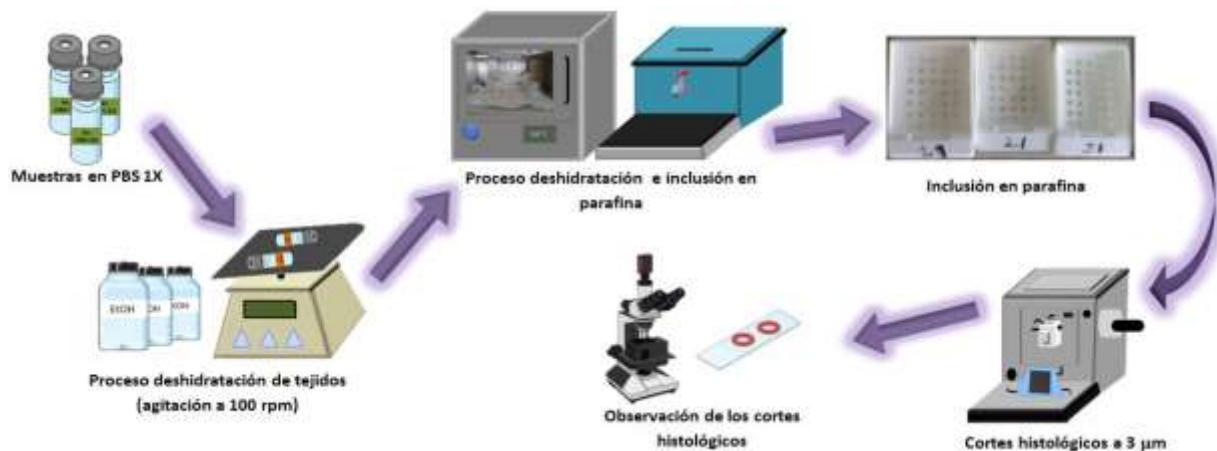


Figura 10. Proceso de deshidratación, inclusión en parafina y cortes histológicos.

2.3.3 Deshidratación y rehidratación de cortes histológicos

Una vez obtenidos los cortes histológicos se rehidratan para llevar a cabo las tinciones. Primero, se desparafinaron a 58°C durante 30 minutos. Después, se rehidrataron en alcoholes graduales de mayor a menor concentración y finalmente en agua de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Tabla 3**. Este proceso fue común para todas las tinciones.

TABLA 3: Proceso de rehidratación de cortes histológicos

Solución	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

Una vez teñidos los cortes histológicos se deshidrataron en alcoholes graduales de menor a mayor concentración como se indica en la **Tabla 4** para finalmente ser montados en resina para su conservación.

TABLA 4: Proceso de deshidratación de cortes histológicos

Solución	Tiempo
Etanol 96% (1)	30 s
Etanol 96% (2)	30 s
Etanol 100% (1)	3 min
Etanol 100% (2)	5 min
Xilol (1)	5 min

2.4 Evaluación de la efectividad de la descelerización mediante el marcaje de ADN

2.4.1 Tinciones específicas a material nuclear

Se evaluó el material nuclear para validar el proceso de descelerización de los vasos sanguíneos mediante las tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E) (**Tabla 5**) y el marcaje del ADN con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI).

Los cortes histológicos, tanto de tejido nativo como descelerizado, son rehidratados y teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) donde se tiñe núcleos con la hematoxilina por medio de cargas.

TABLA 5: Tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E)

Solución	Tiempo
Hematoxilina de Harris	6 min
Agua de la llave a flujo constante	5 min
Etanol ácido 1% para diferenciar	2 inmersiones
Agua de la llave a flujo constante	1 min
Solución saturada de carbonato de litio	2 inmersiones
Agua de la llave 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

Mientras que el marcaje con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (abcam®), la cual es una marca fluorescente nuclear, donde se tiñe preferentemente el ADNds, que consistió en colocar 3-4 gotas encima de la muestra, y mover el portaobjetos de abajo hacia arriba, para que cubra toda la zona de la muestra, esperar 5 minutos y coloca un cubreobjetos, cuando se secó, se selló con barniz para tomar microfotografías (**Figura 12**) en un microscopio Axio Zoom .V16 con Apotome .2 (Zeiss®).

2.4.1.1 Análisis semicuantitativo

Se realizó un análisis semicuantitativo de la presencia de núcleos celulares teñidos en azul con DAPI, con la ayuda de 25 microfotografías de las muestras nativas y otras 25 de las muestras descelularizadas, tomadas a 20X, en el microscopio Axio Zoom .V16 con Apotome .2 (Zeiss®). El análisis se realizó con la ayuda del programa Image J 1.52p (Java 1.8.0_172), donde las imágenes adquiridas se cambiaron a 8-bit, y se les restó el fondo con 5 píxeles y se marcó un umbral con límite inferior de 20 y superior de 255, para delimitar los núcleos. Por último se hizo el análisis de partículas a partir de 104.23 a infinito en píxeles al cuadrado (**Figura 11**).

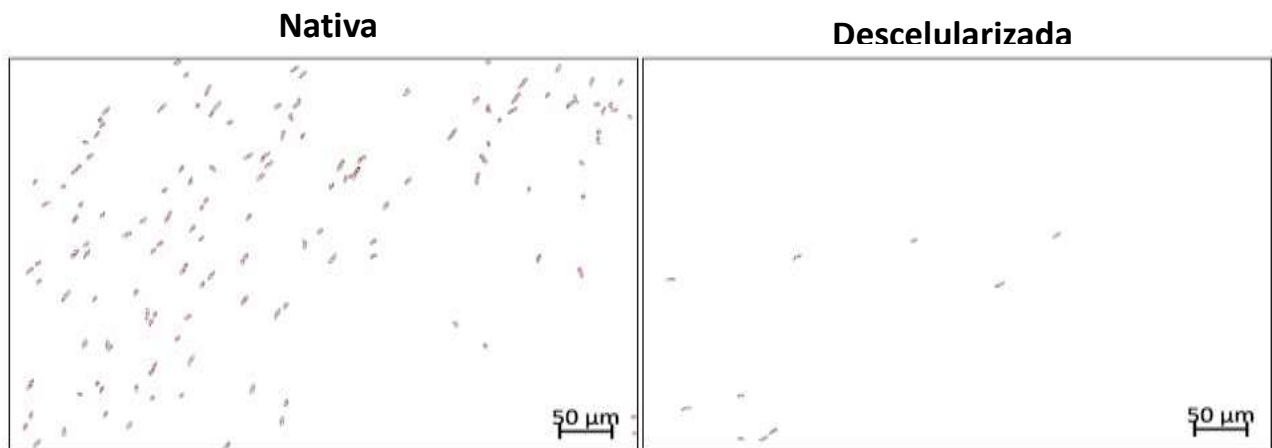


Figura 11. Proceso para análisis semicuantitativo, por Image J. Siendo los puntos los núcleos contados.

Teniendo ya los valores se realizó un análisis estadístico en el programa GraphPad Prism6, utilizando la prueba t-student, comparando los grupos experimentales contra su control (nivel de confianza del 95%).



Figura 12. Proceso de la tinción DAPI.

2.5 Evaluación de la integridad de la MEC

2.5.1 Colágena

Los cortes histológicos tanto de tejido nativo como descelularizado son rehidratados y teñidos (**Figura 13**) con tricrómica de Masson, la cual pone en manifiesto las fibras colágeno y tejido conjuntivo; y Herovici ayuda a valorar las estructuras tisulares.

TABLA 6: Tinción Tricrómica de Masson

Solución	Tiempo
Solución de Bouin	1 h a 56°C
Agua de la llave a flujo constante	Hasta aclarar
Agua destilada	30 s
Hematoxilina de hierro de Weigert	10 min
Agua de la llave a flujo constante	10 min
Agua destilada	30 s
Fucsina ácida-escarlata de Brebich	15 min
Agua destilada	10 inmersiones
Solución ácido fosfotúngstico-fosmolíbico	10 min
Solución azul de anilina	5 min
Agua destilada	10 inmersiones
Ácido acético al 1%	3 min
Etanol 96% (1) tinción	30 s
Etanol 96% (2) tinción	30 s

TABLA 7: Tinción de Herovici

Solución	Tiempo
Azul de celestino	5 min
Agua de la llave a flujo constante	5 min
Hematoxilina Herovici	5 min
Agua de la llave a flujo constante	30 s
Amarillo de metanilo	2 min
Ácido acético al 0.5%	2 min
Carbonato de litio	2 min
Agua de la llave a flujo constante	2 min
Solución picropolicrómica	2 min
Ácido acético al 1%	2 min
Etanol 96% (1) tinción	30 s
Etanol 96% (2) tinción	30 s

2.5.2 Elastina

Los cortes histológicos, tanto de tejido nativo como descelularizado son rehidratados y teñidos con tinción de Verhoeff, que pone en manifiesto las fibras elásticas.

TABLA 8: Tinción de Verhoeff

Solución	Tiempo
Sol. Colorante diaria de fibras elásticas de Verhoeff	15 min
Agua de la llave a flujo constante	20 min
Agua destilada	30 s
Cloruro férrico al 2%	1 min
Tiosulfato de sodio al 5%	5 min
Agua destilada	30 s
Solución Van Gienson	1 min
Etanol 96% (1) tinción	30 s
Etanol 96% (2) tinción	30 s

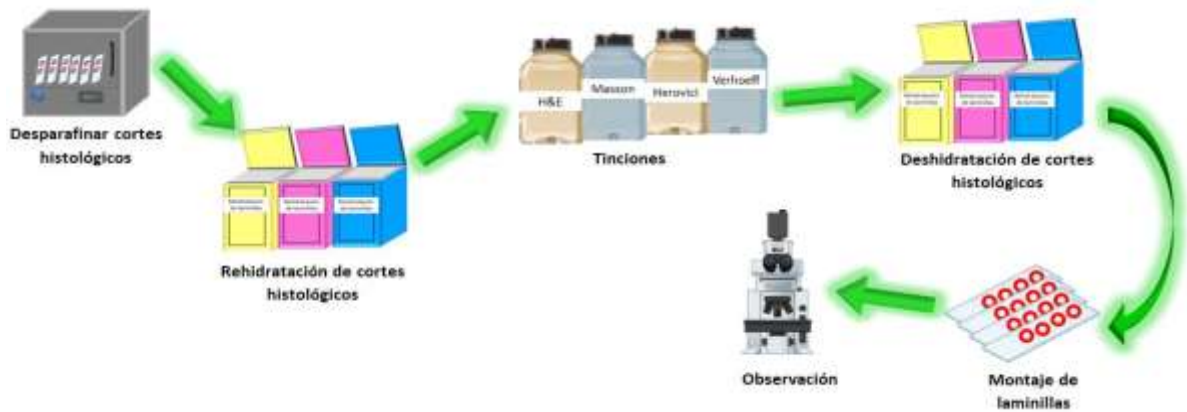


Figura 13. Procedimiento de tinción de cortes histológicos

2.6 Evaluación de la recelularización

Este ensayo se realizó para evaluar si el tejido descelularizado (andamio) promueve la adhesión celular y mantiene la viabilidad celular.

2.6.1 Cultivo celular

Se obtuvieron células mesenquimales de tejido adiposo humano, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Posteriormente se trasladaron al Instituto de Investigación en Materiales, para hacer el sembrado de las células y así tener el cultivo primario que se dejó en incubadora (Thermo Scientific®), con 5% de CO₂ y 37°C, hasta obtener una confluencia del 90% (**Figura 14**) se llevó a cabo el proceso de tripsinización para despegar las células de las cinco cajas de cultivo (T75), para sembrarlas en los andamios, para ello se les retiró el medio de cultivo y añadió 5 mL de tripsina sin EDTA y se incubó por 5 minutos, posteriormente se le adicionaron 5 mL de suero fetal bovino. Todo se colocó en un tubo cónico tipo Falcón de 15 mL y se centrifugó por 5 minutos a 3,000 rpm (**Figura 17**), posteriormente el botón se resuspendió en 6 mL, y se tomaron 10µL de ésta y se añadieron 10µL de azul tripano para hacer la cuantificación (**Figura 15**) en el Cell Counter (Corning®), arrojando los datos que se muestran en la **Tabla 10**.



Figura 14. Cultivo de células mesenquimales de tejido adiposo.

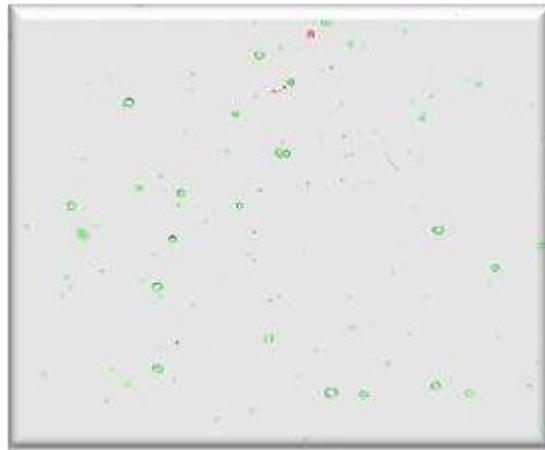


Figura 15. Cuantificación del número de células, con el Cell Counter. Los círculos verdes indican las células vivas y los círculos rojos las muertas.

TABLA 10. Conteo celular del día de siembra.

Células vivas $\left(\frac{\text{Células}}{\text{mL}}\right)$	$9.09 \times 10^5 \pm 1.46 \times 10^5$
Células muertas $\left(\frac{\text{Células}}{\text{mL}}\right)$	$2.58 \times 10^4 \pm 2.24 \times 10^4$
Total $\left(\frac{\text{Células}}{\text{mL}}\right)$	$9.35 \times 10^5 \pm 1.46 \times 10^5$
Viabilidad (%)	$97.2\% \pm 2.28\%$

2.6.2 Preparación del andamio

Una arteria descelularizada, previamente liofilizada, se seccionó por la mitad, para exponer la íntima, se tomaron algunos fragmentos que se colocaron en Tissue-Tek (SAKURA®) para realizar cortes en el criostato (SLEE MEV). Los cortes se realizaron a 70 μm (Figura 15), y se colocaron en un cubreobjetos, posteriormente se le hicieron 3 lavados con PBS 1X, luego los cortes se colocaron en una caja de 48 pozos, dejándose en PBS 1X por una hora, se le retiró el PBS 1X y se les colocó antibiótico-antimicótico al 10% en PBS 1% estéril y se dejó toda la noche en campana de flujo laminar. Posteriormente se le realizaron 3 lavados con PBS 1X estéril y se cambiaron a cajas de 48 pozos dejando tres muestras por caja. Finalmente las muestras se irradiaron con UV por 15 minutos para asegurar la esterilidad.

2.6.3 Cultivo celular en el andamio descelularizado

Se sembró una densidad celular de 48,346 células/cm² para el andamio y cultivo en monocapa (controles) en cajas de 48 pozos, por triplicado. Las células se sembraron mediante goteos sucesivos abarcando toda la superficie del andamio. Se realizó cambios de medio dos veces por semana con medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco™) suplementado con 10% suero bovino fetal (Gibco™) y 1% antibiótico-antimicótico (Gibco™). Los tiempos de cultivo fueron 10 y 22 días (Figura 16).

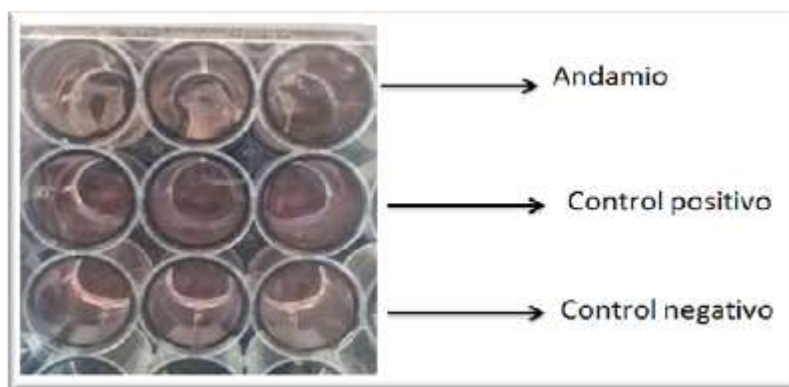


Figura 16. Distribución de células en caja de 48 pozos. En total fueron dos cajas de 48 pozos.

2.7 Evaluación de la viabilidad celular

Se evalúa la viabilidad celular, mediante la actividad de la esterasa intracelular, que conlleva una conversión enzimática de calceína AM, no fluorescente a una calceína intensamente fluorescente, marcando a las células vivas y el homodímero de etidio (EthD-1) ingresa y se une a los ácidos nucleicos de las células muertas, produciendo una fluorescencia roja. A los 10 y 22 días post cultivo, se realiza el ensayo de viabilidad y citotoxicidad Live/Dead (Invitrogen®) (Figura 15), donde se preparó un mix de los reactivos Calceína AM y homodímero de etidio (EthD-1) de la siguiente manera:

DPBS: 898.65 μ L

EthD-1: 0.9 μ L

Calceína AM: 0.45 μ L

Se retira el medio al control negativo y se le adicionó EtOH 70% por 15 min, para validar la muerte celular, pasado el tiempo se retira el medio a las muestras control, a los andamios cultivados con células (constructo) y el EtOH 70% al control negativo. Posteriormente se realizaron 3 lavados con DPBS estéril y colocaron 100 μ L del mix por pozo, se incubó (Thermo scientific) por 40 min, con 5% CO₂ a 37°C. Transcurrido el tiempo, se retiró el mix y realizaron 3 lavados con PBS estéril y adicionaron 100 μ L de medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco™), para posteriormente tomar las microfotografías en el microscopio confocal de barrido LSM 880 (Zeiss®).

2.7.1 Análisis semicuantitativo de viabilidad celular

Para realizarlo se utilizó el software Zen blue, a una velocidad de 5 y una ganancia en rojo con 800 y en verde 700, para el constructo; y para el control positivo y negativo con una ganancia en rojo de 800 y en verde de 600 (**Figura 17**), arrojando valores de intensidad, los cuales se convirtieron a porcentaje de viabilidad, para graficarlo y con ayuda del programa estadístico

GraphPad Prism6, en el cual se realizó una prueba t-student, del número de células vivas y muertas, comparándose los grupos experimentales contra su respectivo control (nivel de confianza del 95%).



Figura 17. Proceso para el ensayo de viabilidad y citotoxicidad

CAPÍTULO 3

Resultados

3.1 Descelularización

A lo largo del proceso de descelularización se observaron cambios sobre las arterias, por ejemplo al segundo día con tratamiento de SDS 1% se observó un cambio de coloración de rojo hacia blanco (**Figura 18**). Transcurrido el tiempo del tratamiento (96 h) se apreció una leve rigidización de las paredes arteriales. Por otro lado el tamaño y grosor de la arteria y sus paredes se mantuvieron sin cambios apreciables a lo largo de todo el proceso.

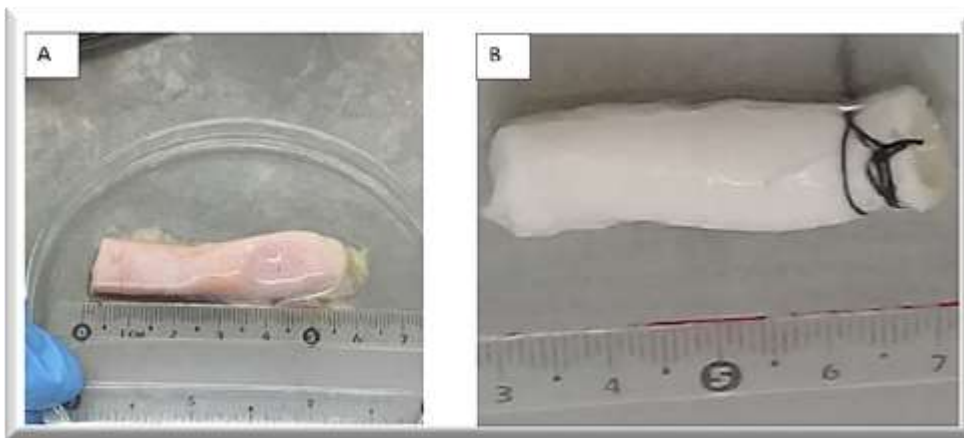


Figura 18. Proceso de descelularización. En esta figura se puede observar cómo se ve el cambio macroscópico, después del paso de los tratamientos, puesto que de un color rosado (A) pasa a uno blanco (B), el cual indica que el órgano está siendo descelularizado.

3.2 Evaluación de la efectividad del proceso de descelularización

Para hacer esta evaluación se realizaron las tinciones de Hematoxilina y Eosina (H&E) y marcaje de ADNds con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), donde ambas muestran los núcleos, en H&E de color negro y en DAPI en azul fluorescente. En la **Figura 19**, se puede ver que en las muestras descelularizadas se perdieron los núcleos, los cuales se observan en las muestras nativas. La fluorescencia observada en las muestras

descelularizadas del ensayo con DAPI, es un efecto proveniente de la autofluorescencia que presenta la colágena de la MEC.

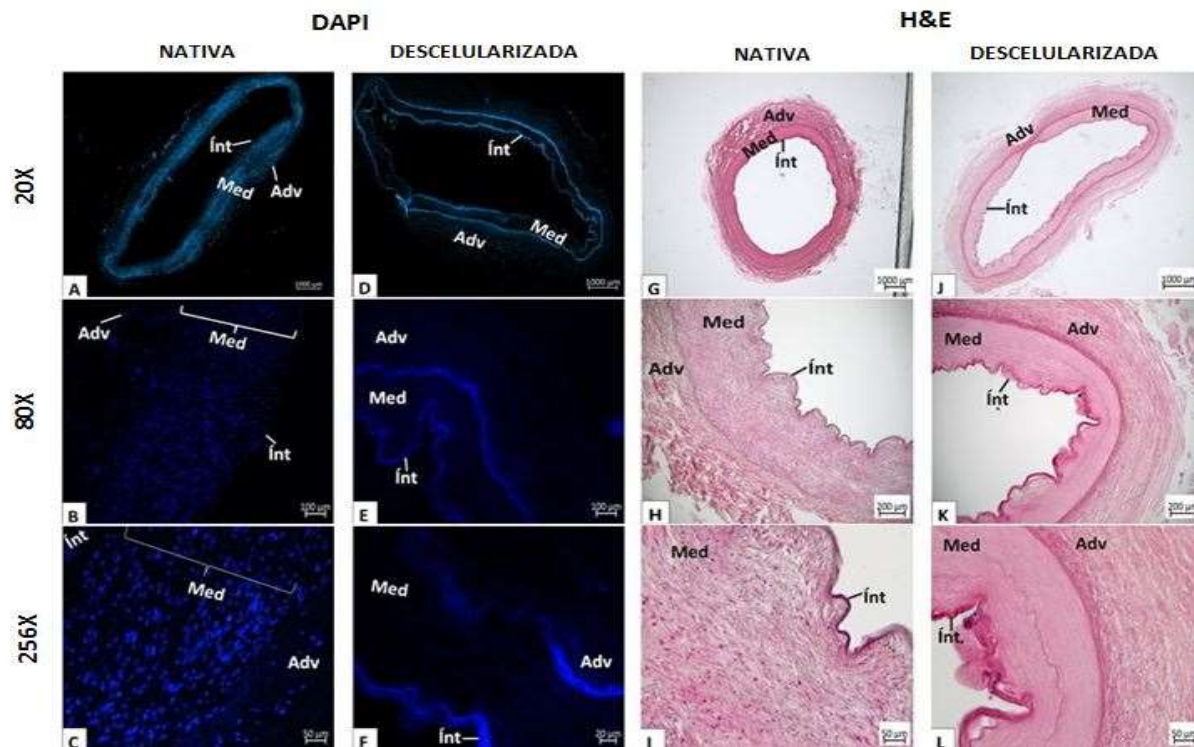


Figura 19. Fotografías de la evaluación de la descellularización de arterias. (Adv) túnica adventicia, (Med) túnica media e (Int) túnica íntima. Barras de 1000, 200 y 50 μm .

3.2.1 Análisis semicuantitativo del contenido nuclear

El promedio de las 25 fotomicrografías de las muestras nativas fue de 117 núcleos y el promedio de las 25 fotomicrografías de las muestras descelularizadas fue de 3, lo cual se traduce en un $95.65\% \pm 4.65\%$ de descellularización, que se puede observar en la **Figura 20**.

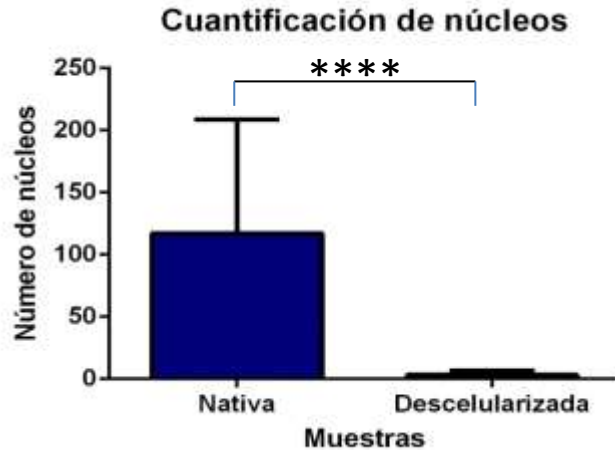


Figura 20. Cuantificación de núcleos, de las muestras nativas (n=25) y descelularizadas (n=25). ($p < 0.0001$)

3.3 Composición de la MEC después del proceso de descelularización

3.3.1 Colágena

En la tinción Tricrómica de Masson (**Figura 21**), se observa que está presente la colágena, la cual se tiñe de color azul, (**B**) siendo que en las túnica media y adventicia se encuentra presente y también en la muestra descelularizada (**E**), aún después del tratamiento se mantiene la colágena aunque disminuye su cantidad (nivel), la matriz extracelular se ve algo laxa, pero no se separan las túnica.

La tinción de Herovici, también pone en manifiesto el grado de empaquetamiento de la colágena, se observa que en la túnica media (**H**) hay una cantidad mayor de colágena menos empaquetada (color azul), y en la túnica adventicia, colágena empaquetada (color rojo), las cuales se mantienen en la muestra descelularizada (**K**), aunque también se pierde un poco de colágena y la matriz extracelular se ve más laxa, sin embargo no se están separando las túnica.

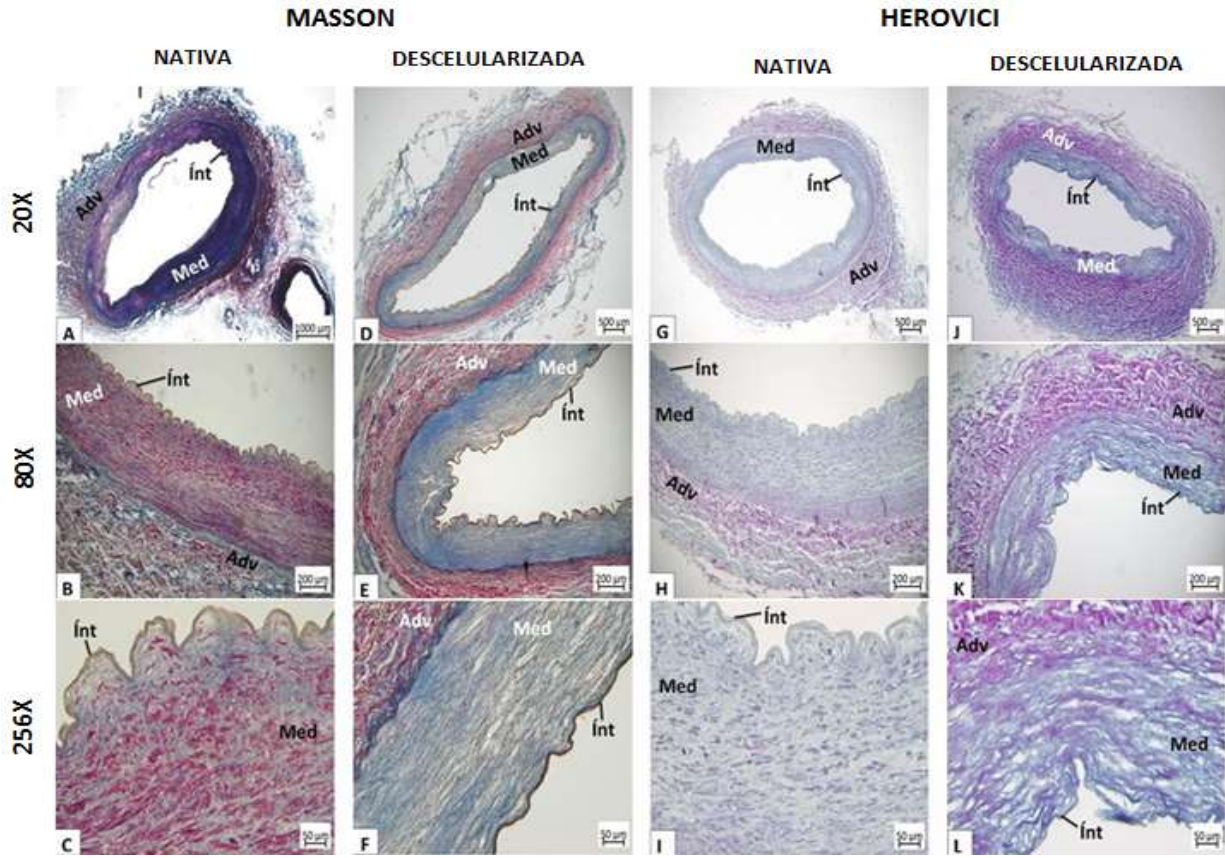


Figura 21. Evaluación de la integridad de la matriz extracelular (colágena). (Adv) túnica adventicia, (Med) túnica media e (Int) túnica íntima. Barras de 1000, 200 y 50 μm .

3.3.2 Elastina

Para la evaluación de la elastina se realizó la tinción de Verhoeff (**Figura 22**), donde se manifiestan las fibras elásticas, siendo que tanto en la nativa como en la descelsularizada se mantienen, sólo que en la descelsularizada se aprecian más onduladas (**F**).

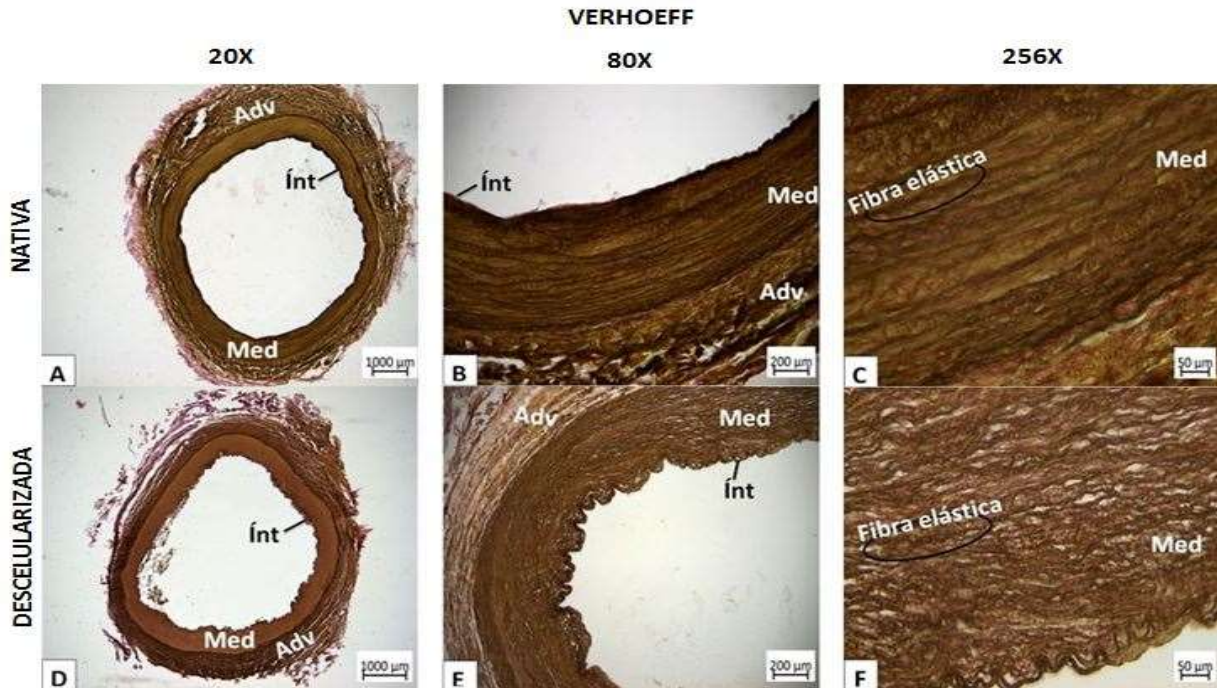


Figura 22. Evaluación de las fibras elásticas. (Adv) túnica adventicia, (Med) túnica media e (Ínt) túnica íntima. . Barras de 1000, 200 y 50 μm .

3.4 Evaluación de la recelularización

Para iniciarlo se realizó una cuantificación celular en el cell counter (Corning®), que es la que se graficó como el día cero (**Figura 23**), donde se observa que hay una buena viabilidad celular, ya que hay un 97.2% de células vivas y un 2.8% de células muertas.

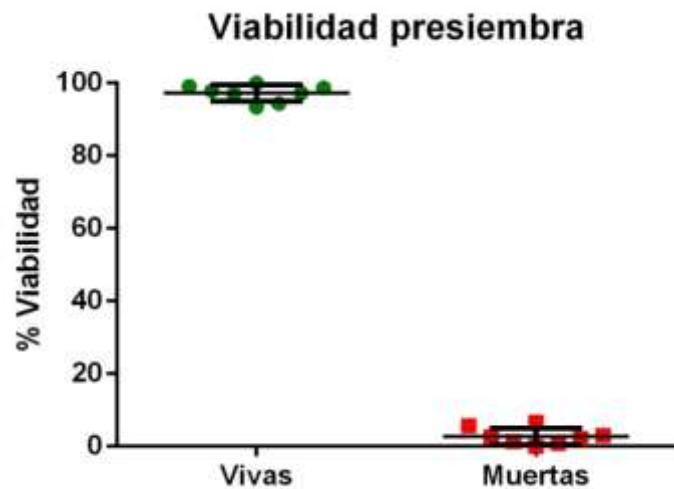


Figura 23. Cuantificación celular previa a sembrar las células con el andamio.

A los 10 días de estar las células con el andamio, se realizó el primer ensayo, donde se tomaron las fotomicrografías del control positivo, negativo y del constructo, donde se aprecia que en el constructo se tiene gran cantidad de células vivas (**Figura 24**).

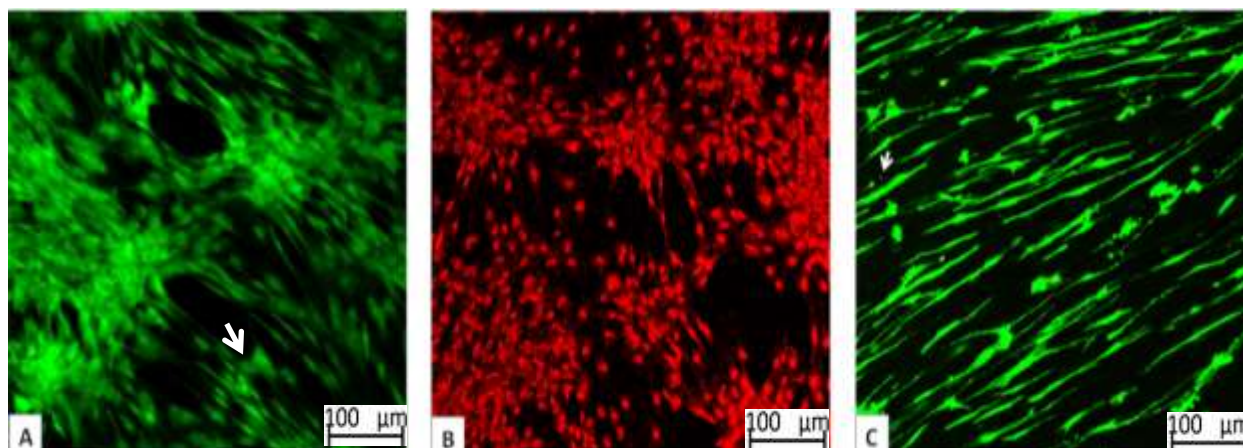


Figura 24. Microfotografías del ensayo de viabilidad y citotoxicidad, (A) control positivo, (B) negativo y (C) constructo, la fecha blanca indica una célula (A) viva y (C) muerta.

En la **Figura 24, (A)** se encuentra el control positivo, por ello la tonalidad verde; la morfología de las células mesenquimales una vez adheridas es fibroblastoide, por ello se observan de manera alargada, sus núcleos están juntos en cúmulos (agregados), En la **Figura 24, (B)** el control negativo, el cual se realizó para indicar como se observan las células muertas, la muerte celular fue inducida con EtOH al 70%, puesto que el EthD-1 se une al material genético se ve solamente de color rojo donde se encuentra su núcleo; por último en la **Figura 24, (C)**, se ven las células en el constructo de manera fibroblastoide indicando que hay una adherencia y mantenimiento de la viabilidad celular.

Pasados *22 días*, se realizó el último ensayo, y se tomaron las fotomicrografías que se observan en la **Figura 25**.

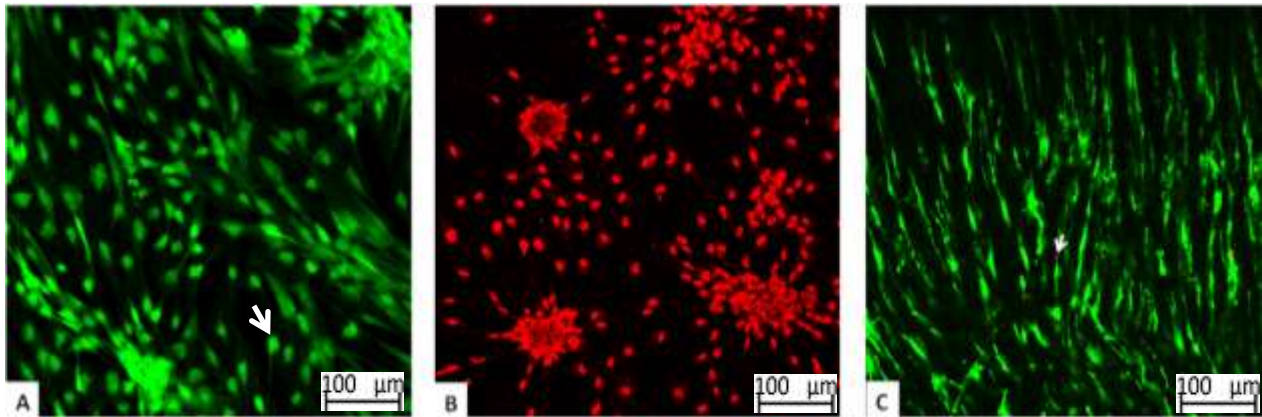


Figura 25. Microfotografías del ensayo de viabilidad y citotoxicidad, (A) es el control positivo, (B) el negativo y en (C) es el andamio, la flecha blanca indica una célula muerta.

En la **Figura 25**, **(A)** se encuentra el control positivo, éste corresponde al cultivo en monocapa de las células mesenquimales de tejido adiposo humano, al igual que en el día 10, su morfología es fibroblastoide, y algunas están en cúmulos (agregados), sin embargo hay otras que ya no lo hacen; **(B)** es el control negativo, donde se induce la muerte celular con EtOH al 70% y solo se está marcando su material genético de color rojo; por último **(C)** está el constructo con las células, la morfología de las células es fibroblastoide a lo largo del constructo y de nuevo sólo se aprecia una célula muerta que se marcó con una flecha blanca.

Se realizó un análisis semicuantitativo para la obtención del porcentaje de viabilidad a lo largo de los días de cultivo del constructo y se comparó contra las células en monocapa (control positivo) (**Figura 26**).

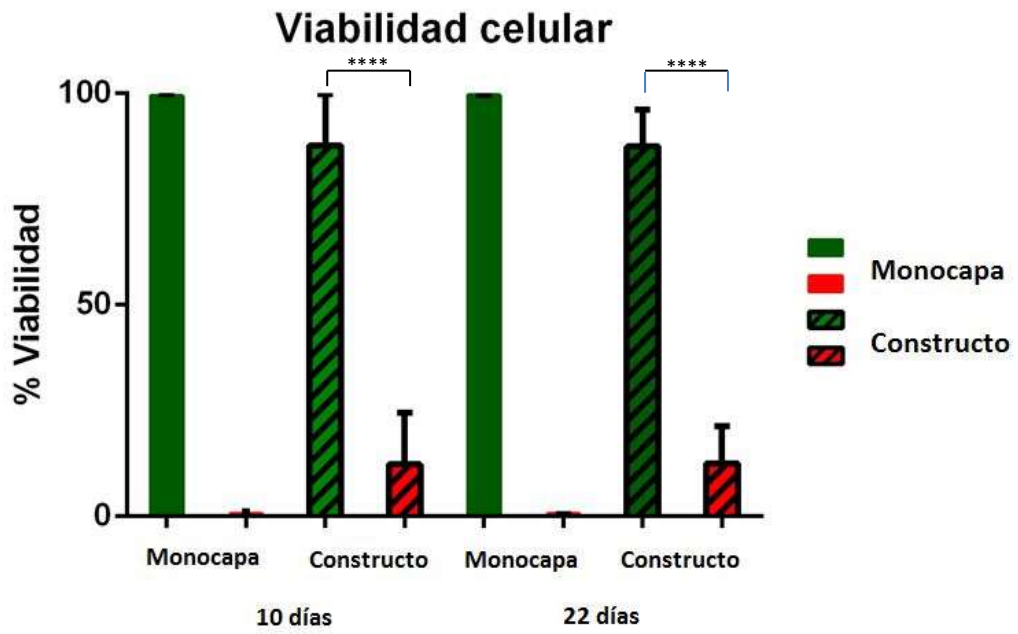


Figura 26. Viabilidad de las células en el andamio que se descelularizó, en los distintos ensayos. ($p < 0.0001$)

CAPÍTULO 4

Discusión

Se usó una técnica de descelularización desarrollada en nuestro laboratorio para descelularizar vías biliares y se aplicó la misma técnica para remover los antígenos celulares de la arteria sin afectar a la matriz, dentro de este protocolo se emplearon agentes físicos, químicos y enzimáticos, dando como resultado una arteria descelularizada y sin afectaciones mayores sobre la estructura de la matriz extracelular.

Se utilizó una bomba peristáltica para perfundir por la luz de la arteria, ya que facilita la exposición química, promueve la lisis celular y la eliminación de restos celulares [9]. El dodecil sulfato de sodio (SDS) 1X, promovió la descelularización formando micelas con los fosfolípidos que son parte de la membrana celular. El SDS actúa provocando que la membrana celular se rompa y exponga el contenido intracelular y el material genético. La solución buffer de fosfato salino (PBS) 1X retira los restos del SDS y también ayuda a mantener en un estado fisiológico, puesto que es una solución isotónica, además de que mantiene un pH cercano a 7.3 que es el de la sangre; para retirar todo el contenido de material genético, se usó la DNasa-I [0.01 mg/mL] con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS). Al hidrolizar las secuencias del ácido nucleico, se eliminan los nucleótidos después de la lisis celular [55]. Para terminar, se realizaron lavados con agua desionizada estéril, para retirar los residuos de las soluciones que se utilizaron y los restos celulares.

Macroscópicamente se observó un cambio de tonalidad rojo a blanco, debido a la pérdida de eritrocitos debido al proceso, como se aprecia en la **Figura 18**.

Se realizaron distintas tinciones para la evaluación de las matrices, en las **Figuras 19, 21 y 22** se muestran las tinciones y los distintos acercamientos de las muestras nativas y descelularizadas, respectivamente.

En el marcaje de núcleos con *DAPI*, la **Figura 19 (A)**, se pueden observar los núcleos, en cambio en la imagen correspondiente a la muestra descelularizada sólo se observan fibras de colágena debido a la autofluorescencia de la misma, lo que evidencia la pérdida de los núcleos por el proceso de descelularización; en los siguientes acercamientos **Figura 19 (B) y (C)**, es más notoria la presencia de los núcleos, en cambio en la descelularizada, sólo se aprecia la división de las tunicas, pero no hay rastro de células; todo esto es la primera evidencia de que el protocolo de descelularización empleado fue el adecuado para obtener un andamio acelular.

La tinción de hematoxilina y eosina (*H&E*) (**Figura 19, G**), en la cual también se tiñen los núcleos además de los componentes de la MEC, como se ve en la **Figura 19 (H)** donde la estructura de la arteria se ve completa, y en la **Figura 19 (I)**, se ve la presencia de los núcleos en la muestra nativa y en la descelularizada ya no están presentes, sólo se aprecian las distintas tunicas y se logra ver una fibra en el centro de la túnica media.

En el trabajo realizado por *Kajbafzadeh et al.*, también utilizan *H&E* para la evaluación del andamio de arteria mamaria humana que obtuvieron realizando tres protocolos distintos de descelularización, dando los mejores resultados cuando se usa Triton al 1% por 24 h, seguido del SDS 1% por otras 24 h. Sin embargo, con la tinción de *H&E*, se muestra aún la presencia de núcleos y se separan las tunicas, mostrando una alteración importante debido al proceso sometido. Esto no se aprecia en nuestros resultados en las muestras descelularizadas donde se mantuvo la integridad y la unión entre las tunicas de las matrices descelularizadas. Por otro lado, *Aldrige et al.*, hicieron la descelularización de aortas humanas con la combinación de agentes químicos y enzimáticos durante 14 días, en sus resultados se observa la presencia de núcleos y separación entre las tunicas íntima y media. Así

mismo, en la descélularización de arteria umbilical humana llevada a cabo por *Mallis et al.*, utilizando del buffer CHAPS y el detergente SDS, dejando por 22 h a las arterias permanecer en cada solución, se observan núcleos en su muestra descélularizada. También los resultados de la descélularización de vena safena humana llevada a cabo por *Kuna et al.*, quienes usaron agentes químicos y enzimáticos, hay evidencia de núcleos. Si bien hay varios reportes de protocolos de descélularización de este tipo de tejidos, se puede observar que el protocolo que se presenta aquí tiene muchas ventajas, ya que no hay presencia de núcleos en las muestras descélularizadas y la ultraestructura del andamio se conservó después del proceso manteniendo sus tunicas definidas, como se muestra en la **Figura 19**. Debido a que se utilizaron bajas concentraciones del detergente (SDS 1%) y a los cortos tiempos de exposición de la DNasa a la matriz.

Uno de los criterios para decir que se tuvo una descélularización exitosa, es que no haya presencia de núcleos en los resultados de marcaje de con DAPI ni con la tinción de *H&E*, lo cual se puede confirmar con la cuantificación realizada a partir de las fotomicrografías (**Figura 19, B**). Esto se confirmó con la cuantificación de núcleos, dónde se obtuvo un porcentaje de descélularización de $95.65\% \pm 4.65\%$ (**Figura 20**), con la ayuda del programa Image J. Lo cual indica una descélularización efectiva con una reducción significativa del número de células después del proceso.

Al comparar la cuantificación realizada con otros procesos de descélularización, encontramos la propuesta llevada a cabo por *Schneider et al.*, en corion de placenta humana quienes utilizaron como protocolo de descélularización la congelación-descongelación a -80°C , durante 18 h, además del uso de soluciones hipo e hipertónicas por 30 minutos cada una y perfusión de Triton 1% con EDTA durante 24 h y se finalizó con DNasa donde se dejó toda la noche. Realizan una cuantificación de ADN por mg de peso seco, dando valores de la nativa de $5.74 \pm 0.31 \mu\text{g}$ y la descélularizada de $0.34 \pm 0.01 \mu\text{g}$, lo cual se traduce en un porcentaje de descélularización de 94.08%. Aunque no fue la misma técnica para cuantificar la descélularización representa un porcentaje menor a lo obtenido con el protocolo que se está

mostrando en este trabajo ($95.65\% \pm 4.65\%$), además se observa un mayor daño en la MEC con su proceso.

La tinción *Tricrómica de Masson*, la cual pone en manifiesto las fibras de colágena mostró que en la muestra nativa (**Figura 21, B**), se observa la presencia de núcleos y de la colágena que está de color azul y en la descelularizada (**Figura 21, E**), se aprecia que sólo están presentes las fibras de colágena. Las tunicas se mantienen íntegras y definidas, la estructura del andamio se mantiene puesto que las fibras de colágena no se ven laxas. En el trabajo de *Mallis et al.*, donde descelularizaron la arteria umbilical humana, las fibras de la MEC se ven separadas sugiriendo una gran modificación por efecto del proceso de descelularización; al igual que en el andamio de arteria mamaria humana llevada a cabo por *Kajbafzadeh et al.*, donde además la MEC se ve muy laxa. Lo cual no pasó con el protocolo que se presenta en este trabajo, donde no hay separación de las fibras de colágena, lo cual es adecuado para mantener las características estructurales de la MEC, indicando que el protocolo de descelularización resultó no ser agresivo hacia el tejido.

Con la *tinción de Herovici*, se logran ver la colágena menos entrecruzada o tipo III en la túnica media (teñida de color azul) y en la túnica adventicia hay mayor presencia de colágena entrecruzada o tipo I (**Figura 21, H**) y en la adventicia está la colágena empaquetada (teñida de color rojo), y estas mismas se ven en la descelularizada (**Figura 21, L**), salvo que se ve observa más laxa la matriz extracelular, sin embargo no se separan las tunicas y la íntima se ve íntegra, haciéndose notar que el tratamiento utilizado permite la descelularización sin tener demasiados daños estructurales de las tunicas.

Por último, la *tinción de Verhoeff*, se realizó para la identificación de fibras elásticas característica de estas arterias [64] y con ello determinar si el proceso de descelularización afectó a las fibras elásticas y la función mecánica la cuál es de vital importancia para este tipo de andamio, en la **Figura 22 (C y F)**, no se ven grandes cambios, en cambio en la **Figura 22 (B)**, se observan las fibras elásticas, sobre todo en la túnica media, comparándola

con la descelularizada (**Figura 22, E**) se logra ver aún la presencia de las mismas. En la **Figura 22 (F)** se puede ver la presencia de las fibras elásticas bien definidas, hay que resaltar que la íntima se encuentra bien definida, y aunque en la descelularización de arteria mamaria humana de *Kajbafzadeh et al.*, no se realizó esta tinción sino la de Movat, (que también marca las fibras elásticas), tanto la nativa como la descelularizada hay presencia de fibras elásticas, en la nativa se ve en la túnica media, en la descelularizada solamente se observan en la parte de la íntima. Además, se observa ligeramente un daño sobre la MEC, puesto que presenta una separación de las túnicas; y en la descelularización de arterias carótidas porcinas de *Cheng et al.*, el cual utilizó un protocolo donde se realizaba la congelación-descongelación con detergentes, se pierden considerablemente las fibras elásticas, algo que no se muestra con este protocolo, debido a lo ya mencionado anteriormente.

Las técnicas histológicas sirvieron para comprobar que el proceso de descelularización propuesto al que fueron sometidas las arterias resultó adecuado, puesto que no hay presencia de núcleos y no presenta alteraciones sobre la matriz extracelular del andamio y conserva las fibras elásticas que se muestra en la técnica de Verhoeff, lo cual sugiere que el proceso de descelularización propuesto no solamente resultó efectivo para remover las células sino que además generó un andamio con una MEC conservada.

Estos estudios, no sólo se quedan en injertos humanos, también *Katsimpoulas et al.*, lo ha realizado en animales, en la aorta alogénica de rata, donde se separaron dos grupos con diferentes protocolos, donde estuvieron alrededor de 14 días en el proceso; sin embargo, la matriz extracelular se ve dañada, y aún hay presencia de núcleos.

Para confirmar que el andamio obtenido es viable y no tóxico para las células, se realizó el ensayo de viabilidad y toxicidad Live/Dead[®], poniendo en contacto a las células mesenquimales en el andamio durante 22 días, realizando dos ensayos uno a los 10 días y el otro a los 22 días.

Como se muestra en la **Tabla 10**, al día cero (antes de proceder a la siembra de las células sobre el andamio) se contaba con una viabilidad del $97.2 \pm 2.28\%$ como se muestra en la **Figura 23**, la cuantificación se realizó con una $n=8$, a partir de esta información, se sembraron $36,260 \text{ células/pozo}$ (densidad celular de $48,346 \text{ células/cm}^2$), ver **Figura 17**.

La primera lectura se realizó a los 10 días, obteniéndose una viabilidad del $87.71 \pm 12.17\%$, en los andamios ($n=3$), en comparación con el cultivo en monocapa se ve una disminución del 9.52% y esta diferencia resultó no ser estadísticamente significativa.

En la **Figura 24**, se muestran las fotomicrografías del ensayo de viabilidad y citotoxicidad, en la **Figura 24, C** se encuentra el constructo, donde la morfología de las células mesenquimales es de aspecto fibroblastoide, debido a que se extienden los filopodios sobre el material, lo que sugiere que las células se están adhiriendo a la superficie del andamio, este es un paso fundamental para el desarrollo de procesos metabólicos normales de una célula adherente como son las mesenquimales.

Pasados los 22 días, se obtuvo una viabilidad de $87.44 \pm 8.75\%$ en los andamios ($n=3$), la cual también se puede deber a los cambios poblacionales que han sufrido las células a lo largo del tiempo.

En la **Figura 26**, se aprecia la gráfica donde se ve la viabilidad a lo largo de los días, donde a los diez días se contaba con $87.71 \pm 12.17\%$ y a los veintidós días $87.44 \pm 8.75\%$, con estos valores se puede visualizar que hubo una disminución en la viabilidad, sin embargo las diferencias obtenidas no fueron significativas, ya que las células se están adhiriendo a los andamios, indicando que no es tóxico y que es adecuado para su adhesión y metabolismo celular.

Simsa, et al., realizaron la comparación sistemática *in vitro* de protocolos de descélularización de vasos sanguíneos, donde utilizaron cinco protocolos distintos utilizando detergentes como SDS, desoxicolato de sodio, CHAPS y TritonX-100, junto con agentes enzimáticos para la eliminación de ADN, en

vena cava porcina, donde funcionaron, sin embargo el de TritonX-100, se le tuvo que añadir DNasa para que fuera efectivo, respecto a la prueba de citotoxicidad se realizó la de MTT, donde se observó que no es tóxico el andamio, sin embargo las células que utilizaron fueron de riñón, la cuales no son propias del tejido, y no se comprobó la adherencia de éstas al andamio, lo cual si se realizó en los andamios de arteria a lo largo de los distintos ensayos que se llevaron a cabo, además de que las células fueron mesenquimales que tienen la capacidad de diferenciarse hacia otros tipos celulares de los tejidos provenientes del mesenquima, lo cual se traduce en que se pondrá una celularidad propia a las del tejido de las arterias [65].

Después de todas las pruebas que se realizaron, se verifica que el protocolo de descelularización al que fueron sometidas las 10 arterias humanas es adecuado para obtener un andamio descelularizado, aunque el tiempo que se propone es de ocho días no se muestra daño en la matriz extracelular, lo cual se verifica con las tinciones y que si se obtiene un alto porcentaje de descelularización comprobándose con la cuantificación de núcleos de DAPI. No es citotóxico y es viable para que las células mesenquimales proliferen. Además, estas células se fijaron y proliferaron en el andamio, no solo en la parte exterior, sino que lograron penetrar el andamio, lo que da pie a que al momento de ponerlo en un crecimiento celular continuo, se puede tener un andamio recelularizado y funcional.

CAPÍTULO 5

Conclusión

Los resultados obtenidos demostraron que el proceso de descelularización por el método físico-químico-enzimático para vías biliares resultó exitoso también para descelularizar arterias humanas. Esto es un resultado importante ya que a la fecha no se ha reportado un mismo protocolo de descelularización para diferentes tejidos fuente. Algo que generalmente se plantea como un desafío a resolver en este tipo de proceso de biofabricación de andamios. El protocolo también permitió la obtención de un andamio celular, para ser repoblado por células y así ser utilizado como reemplazo de arterias, esto se confirmó a través de las técnicas histológicas, de marcaje de núcleos con DAPI y la de Hematoxilina y Eosina (H&E), donde se muestra la pérdida de los núcleos y con esto los antígenos celulares; así mismo con las tinciones tricrómica de Masson, Herovici y Verhoeff se evaluaron las características morfológicas de la matriz extracelular, donde se apreció que la colágena y las fibras elásticas se mantienen intactas. Y por último, se comprobó que el andamio es viable para el crecimiento celular.

CAPÍTULO 6

Perspectivas

Lo que se consiguió con este trabajo fue plantear las bases de lo que aún falta por hacer, se demostró que el proceso de descelularización fue efectivo, y ahora vienen las pruebas para ver si es funcional mecánicamente, factible de repoblar, así como la evaluación de matriz generada por las células, si promueve la diferenciación celular por ejemplo utilizando un biorreactor para verificar si la recelularización es efectiva en todo el volumen de una longitud crítica. Se vio que las células proliferaron en un cultivo estático, así que se espera que en uno dinámico pueda tener una repoblación total. También se tendrían que hacer pruebas para ver si no hay un rechazo inmunológico.

Se deben hacer estudios para que se puedan hacer ensayos clínicos, y por ende utilizar estos andamios en pacientes que requieran y cumplan con las características para un reemplazo de arterias o venas.

Bibliografía

- [1] C. N. de Trasplantes, “Bienvenido a Datos Abiertos IMSS | Datos Abiertos IMSS,” 2019. [Online]. Available: http://cenatra.salud.gob.mx/transparencia/datos_abiertos.html. [Accessed: 30-May-2020].
- [2] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, “Principales causas de muerte en México,” *Estadísticas Mortal.*, p. 1, 2017.
- [3] S. Baiguera, C. Del Gaudio, A. Bianco, and P. Macchiarini, *The Bio-Artificial Trachea*. Elsevier Inc., 2015.
- [4] “Atherosclerosis,” *NIH, NHLBI*. [Online]. Available: <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/espanol/atherosclerosis>. [Accessed: 12-Jan-2021].
- [5] D. Sarre-Álvarez, R. Cabrera-Jardines, F. Rodríguez-Weber, and E. Díaz-Greene, “Atherosclerotic cardiovascular disease. Review of risk scales and cardiovascular age.,” *Med. Interna Mex.*, vol. 34, no. 6, pp. 910–923, 2018, doi: 10.24245/mim.v34i6.2136.
- [6] F. Moroni and T. Mirabella, “Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering,” *American Journal of Stem Cells*, vol. 3, no. 1. E-Century Publishing Corporation, pp. 1–20, 2014.
- [7] J. O. Marín, “Prótesis vasculares,” no. 3, 1994.
- [8] “Andamio natural para reemplazar y regenerar tráquea,” *Gaceta FM, UNAM*, 30-Oct-2019. [Online]. Available: <http://gaceta.facmed.unam.mx/index.php/2019/10/30/andamio-natural-para-reemplazar-y-regenerar-traquea/>. [Accessed: 26-Jul-2020].
- [9] E. M. Srokowski and K. A. Woodhouse, “Decellularized Scaffolds,” in *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, 2011, pp. 369–386.
- [10] J. Y. Ramírez Marín, “Generación y caracterización de un andamio celular procedente de vía biliar extrahepática para fines de medicina

regenerativa y trasplante.,” UNAM, 2019.

- [11] R. Chávez Domínguez, J. A. Ramírez Hernández, and J. M. Casanova Garcés, “La cardiopatía coronaria en México y su importancia clínica, epidemiológica y preventiva,” *Arch. Cardiol. Mex.*, vol. 73, no. 2, pp. 105–114, 2003.
- [12] A. M. Kajbafzadeh, R. Khorramirouz, S. M. Kameli, J. Hashemi, and A. Bagheri, “Decellularization of Human Internal Mammary Artery: Biomechanical Properties and Histopathological Evaluation,” *Biores. Open Access*, vol. 6, no. 1, pp. 74–84, Jun. 2017, doi: 10.1089/biores.2016.0040.
- [13] K. H. Schneider *et al.*, “Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts,” *Acta Biomater.*, vol. 29, pp. 125–134, 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.038.
- [14] G. Moscelli, L. Siciliani, and R. Gutacker, “Are Angioplasty Waiting Time Inequalities Growing Again?,” *Equipol Res. Gr.*, pp. 1–4, 2018.
- [15] J. Sepulveda and A. Soto, *Atlas de Histología. Biología celular y tisular.*, 2nd ed. México: MCGRAW-HILL, 2014.
- [16] T. Norris, *Porth. Fisiopatología. Alteraciones de la salud, conceptos básicos.*, 10th ed. México: WOLTERS KLUWER, 2019.
- [17] L. Gartner, *Libro de histología. Atlas a color.*, 4th ed. España: Elsevier, 2017.
- [18] G. Tortora and B. Derrickson, *Principios de anatomía y Fisiología*, 15th ed. México: Panamericana, 2018.
- [19] Genomasur, “Sistema Circulatorio.” [Online]. Available: http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_13.htm. [Accessed: 13-Jan-2021].
- [20] “Tipos de vasos sanguíneos y sus principales funciones,” *Sistema circulatorio*. [Online]. Available: <https://sistema-circulatorio.com/vasos-sanguineos/>. [Accessed: 13-Jan-2021].
- [21] F. Geneser, *Geneser. Histología.*, 4th ed. México: Panamericana, 2015.
- [22] M. Ross and W. Pawlina, *Histología. Texto y Atlas.*, 7th ed. España:

WOLTERS KLUWER, 2016.

- [23] J. R. Narro Robles, *Enfermedades No Transmisibles. Situación y Propuestas de Acción: Una Perspectiva desde la Experiencia de México*. 2018.
- [24] “Overview of the Vascular System,” *Lucile Packard Children’s Hospital Stanford*. [Online]. Available: <https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=overview-of-the-vascular-system-85-P08283>. [Accessed: 10-Jun-2020].
- [25] S. de Salud, “Panorama epidemiológico. Enfermedades no transmisibles. Observatorio mexicano de enfermedades no transmisibles (OMENT).” México, p. 94, 2018.
- [26] “Enfermedad de las arterias coronarias,” *Mayo clinic*. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/coronary-artery-disease/symptoms-causes/syc-20350613>.
- [27] V. Kumar, *Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional.*, 9 a. Elsevier, 2015.
- [28] L. Badimon, J. Marrugat, B. G. Extremera, and R. E. Riba, “Aterosclerosis coronaria,” in *Farreras Rozman. Medicina Interna*, 18th ed., no. L, España: Elsevier, 2018, pp. 475–482.
- [29] A. Evangelista Masip, “Avances en el síndrome aórtico agudo,” *Rev. Española Cardiol.*, vol. 60, no. 4, pp. 428–439, Apr. 2007, doi: 10.1157/13101646.
- [30] “Diseción aórtica,” *Mayo clinic*. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/aortic-dissection/symptoms-causes/syc-20369496>.
- [31] O. Gil Albarova, “Diseción de aorta tipo A. Fisiopatología, clínica, estrategias diagnósticas y terapéuticas,” *Cir. Cardiovasc.*, vol. 22, no. 6, pp. 325–329, 2015, doi: 10.1016/j.circv.2015.01.006.
- [32] G. Pérez-Bazarrica, F. Salvaggio, S. Villecco, and R. Porcile, “Hematoma aórtico intramural tipo B: Imágenes de una entidad con diferentes caminos evolutivos,” *Arch. Cardiol. Mex.*, vol. 82, no. 1, pp. 31–33, 2012.

- [33] R. González Lagos *et al.*, “Tratamiento quirúrgico de la úlcera penetrante de aorta ascendente. Casos clínicos,” *Rev. Med. Chil.*, vol. 145, no. 11, pp. 1490–1494, 2017, doi: 10.4067/s0034-98872017001101490.
- [34] “Aneurismas,” *Miami Cardiac & Vascular Institute*. [Online]. Available: <https://baptisthealth.net/sp/servicios-de-salud/servicios-cardiovasculares/paginas/servicios-de-salud-vascular/aneurismas.aspx>. [Accessed: 10-Jun-2020].
- [35] “Coartación aórtica,” *Mayo clinic*. [Online]. Available: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/coarctation-of-the-aorta/symptoms-causes/syc-20352529>. [Accessed: 10-Jun-2020].
- [36] G. Cuminetti, S. Gelsomino, S. Curello, R. Lorusso, J. G. Maessen, and J. C. A. Hoorntje, “Contemporary use of arterial and venous conduits in coronary artery bypass grafting: anatomical, functional and clinical aspects,” *Neth. Heart J.*, vol. 25, no. 1, pp. 4–13, Jan. 2017, doi: 10.1007/s12471-016-0919-2.
- [37] E. Mencía-Gutiérrez, A. Clariana-Martín, E. Gutiérrez-Díaz, J. Monsalve-Córdova, and C. Izquierdo-Rodríguez, “Resultados y complicaciones del politetrafluoroetileno expandido en la cirugía de ptosis palpebral por suspensión al frontal: Estudio de 59 casos,” *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.*, vol. 80, no. 8, Aug. 2005, doi: 10.4321/S0365-66912005000800004.
- [38] K. H. Schneider *et al.*, “Decellularized human placenta chorion matrix as a favorable source of small-diameter vascular grafts,” *Acta Biomater.*, vol. 29, pp. 125–134, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2015.09.038.
- [39] A. Aldridge *et al.*, “Development and characterisation of a large diameter decellularised vascular allograft,” *Cell Tissue Bank.*, vol. 19, no. 3, pp. 287–300, Sep. 2018, doi: 10.1007/s10561-017-9673-y.
- [40] S. Esmaili *et al.*, “An artificial blood vessel fabricated by 3D printing for pharmaceutical application,” *Nanomedicine J.*, vol. 6, no. 3, pp. 183–194, 2019, doi: 10.22038/nmj.2019.06.00005.
- [41] T. G. Papaioannou, D. Manolesou, E. Dimakakos, G. Tsoucalas, M. Vavuranakis, and D. Tousoulis, “3D Bioprinting Methods and Techniques: Applications on Artificial Blood Vessel Fabrication,” *Acta*

Cardiol. Sin., vol. 35, no. 3, pp. 284–289, May 2019, doi: 10.6515/ACS.201905_35(3).20181115A.

- [42] T. Kesari, Priya.; Xu, Tao.; Boland, “Layer-by-layer printing of cells and its application to tissue engineering,” *Mater. Res. Soc.*, vol. 845, pp. 1–7, 2005.
- [43] M. Nakamura, S. Iwanaga, C. Henmi, K. Arai, and Y. Nishiyama, “Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication,” *Biofabrication*, vol. 2, no. 1, 2010, doi: 10.1088/1758-5082/2/1/014110.
- [44] M. Itoh *et al.*, “Scaffold-free tubular tissues created by a bio-3D printer undergo remodeling and endothelialization when implanted in rat aortae,” *PLoS One*, vol. 10, no. 9, pp. 1–15, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0136681.
- [45] H. Martínez Hernández, “Descelularización de órganos: Diseño y construcción de un dispositivo para la obtención de andamios 3D. El inicio de los órganos bioartificiales en México,” UNAM, México, 2015.
- [46] V. Cecilia Fabres, “Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva,” *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 21, no. 3, pp. 488–493, 2010, doi: 10.1016/s0716-8640(10)70562-9.
- [47] A. Gilpin and Y. Yang, “Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1155/2017/9831534.
- [48] S. Roldán, C. A. Vargas, M. L. Mejía, J. Zapata, and M. E. Moncada, *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*, 1st ed. Medellín: Fondo Editorial, 2016.
- [49] C. Bonnans, J. Chou, and Z. Werb, “Remodelling the extracellular matrix in development and disease.,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 12, pp. 786–801, Dec. 2014, doi: 10.1038/nrm3904.
- [50] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, Mar. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.

- [51] M. A. Osorio-Delgado *et al.*, “Aplicaciones biomédicas de biomateriales poliméricos,” *DYNA*, vol. 84, no. 201, p. 241, Jun. 2017, doi: 10.15446/dyna.v84n201.60466.
- [52] J. GREEN, WILLIAM, T., “Articular Cartilage Repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 124, pp. 237–250, 1977.
- [53] D. M. Giraldo Gómez, “Obtención de un andamio acelular para sustitución de tráquea.” UNAM, México, 2011.
- [54] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak, “Decellularization of tissues and organs,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3675–3683, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
- [55] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, “An overview of tissue and whole organ decellularization processes,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- [56] C. H. Lin, K. Hsia, H. Ma, H. Lee, and J. H. Lu, “In vivo performance of decellularized vascular grafts: A review article,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 7, 2018, doi: 10.3390/ijms19072101.
- [57] S. L. M. Dahl *et al.*, “Readily available tissue-engineered vascular grafts,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 68, 2011, doi: 10.1126/scitranslmed.3001426.
- [58] B. Castellar, “Tincion Hematoxilina-Eosina,” *Panreac Applichem*, vol. 2, pp. 1–4, 2009.
- [59] Abcam, “Medio de montaje Fluoroshield con DAPI.” [Online]. Available: <https://www.abcam.com/mounting-medium-with-dapi-aqueous-fluoroshield-ab104139.html#top-500>. [Accessed: 31-May-2020].
- [60] “DAPI,” *Beckman Coulter Life science*. [Online]. Available: <https://www.beckman.es/reagents/coulter-flow-cytometry/qc-and-support-reagents/viability-dyes/dapi>. [Accessed: 20-Jun-2020].
- [61] B. Castellar, “Tinción Tricrómica De Masson (Con Azul De Anilina),” *Panreac Applichem*, vol. 2, pp. 1–3, 2017.
- [62] M. R. Curiel-Salgado, “Fundamentos de una técnica policrómica :

Tinción de Herovici,” *Investig. en Discapac.*, vol. 1, no. 1, pp. 35–36, 2012.

- [63] Invitrogen Molecular Probes, “LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit *for mammalian cells*,” 2005. [Online]. Available: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp03224.pdf>. [Accessed: 07-Jun-2020].
- [64] M. L. Del Prado-Audelo *et al.*, “Recent advances in elastin-based biomaterials,” *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 23, pp. 314–332, 2020, doi: 10.18433/JPPS31254.
- [65] B. Castro, “Aplicaciones clínicas de las células madre del tejido adiposo,” *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, vol. 39, pp. s29–s32, Dec. 2013, doi: 10.4321/S0376-78922013000500009.

Anexo

Autorización del proyecto.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



CIUDAD DE MÉXICO, A 12 DE SEPTIEMBRE DE 2019
NO. OFICIO MCONTROL-1284/1019
REG. CONBIOÉTICA-09-CEI-011-2014/627

DR. CARLOS ARTURO HINOJOSA BECERRIL
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DIRECCIÓN DE CIRUGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN
VASCO DE QUIROGA NO. 15
COL. BELISARIO DOMÍNGUEZ SECCIÓN XVI, DEL. TLALPAN
CIUDAD DE MÉXICO, C.P. 14080
P R E S E N T E

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


"Bioandamiaje 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 injertos vasculares biológicos"


REF. 2473

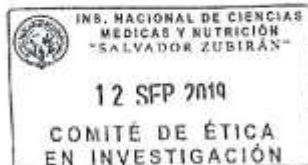
Le informamos que se toma conocimiento del estado actual del estudio, así mismo se autoriza la re-aprobación anual con vigencia hasta el 12 de septiembre de 2020.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.

ATENTAMENTE,


DR. CARLOS A. AGUILAR SALINAS
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN
CAAS/AGF/MRG


DR. ARTURO GALINDO FRAGA
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Dominguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México, México
Tel. (52) 54 87 09 00
www.incmnsz.mx



COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

OFICIO NO. FMED/CI/RGG/157/2019

ASUNTO: Registro Proyecto FM/DI/108/SR/2019

Dr. David Mauricio Giraldo Gómez
Profesor Asociado "C" T.C.
Departamento de Biología Celular y Tisular

Presente.

Estimado doctor Giraldo Gómez:

Me complace informarle que su proyecto FM/DI/108/SR/2019 de título "Bioandamiaje 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 injertos vasculares biológicos" ha sido **REGISTRADO** por la Comisión de Investigación y por el Comité de Ética de la Investigación en sesión ordinaria de fecha **05 de noviembre de 2019** teniendo como base el dictamen **APROBATORIO** de los Comités de Investigación y de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con una vigencia de 3 años a partir de la fecha de la sesión.

Para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual, en la División de Investigación de esta Facultad, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen. Asimismo, le solicitamos atentamente nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 05 de noviembre de 2019.

LA PRESIDENTA


DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
RGG/ET

