



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Neurometabolismo



Tesis

**Generación de un andamiaje tridimensional de matriz
extracelular hepática mediante la técnica de decelularización en
ratas Wistar**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta:

Lic. en Med. Gral. Nelly Angélica Morales Guerrero

Dirigida por:

Dr. en C. Hebert Luis Hernández Montiel

Santiago de Querétaro, Querétaro, diciembre del 2018.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Neurometabolismo



Tesis

Generación de un andamiaje tridimensional de matriz extracelular hepática mediante la técnica de descelularización en ratas Wistar

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta:

Lic. en Med. Gral. Morales Guerrero Nelly Angélica

Dirigida por:

Dr. en C. Hebert Luis Hernández Montiel

Dr. en C. Hebert Luis Hernández Montiel
Presidente

Dra. en C. Nancy Georgina Hernández Chan
Secretario (a)

M. en C. Carlos Lozano Flores
Vocal

Dra. en C. Ana Alicia Sánchez Tusie
Suplente

Dr. en C. Nicolás Camacho Calderón
Suplente

Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Directora de la Facultad de Medicina, UAQ

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado, UAQ

Santiago de Querétaro, Querétaro, diciembre del 2018.

RESUMEN

Introducción. El hígado es el tercer órgano más trasplantado en el mundo, incluyendo México. En nuestro medio, la falla hepática terminal es provocada principalmente por la hepatitis, el hígado graso no alcohólico y el alcoholismo, los cuales conducen a la cirrosis, caracterizada por la pérdida de la anatomía hepática y vascular, con procesos difusos de necrosis, regeneración y fibrosis nodular. A la fecha, la única opción ante un estadio final de la enfermedad es el trasplante, sin embargo, el panorama de la donación de órganos sigue siendo desalentador. Esto ha provocado la búsqueda de nuevas alternativas para prolongar la vida de estos pacientes. Actualmente, la ingeniería tisular desarrolla novedosas técnicas de descelularización/recelularización que faciliten la generación de órganos funcionales basadas en la obtención de la matriz extracelular (MEC). Esta MEC, el andamiaje tridimensional aislado que sostiene las estirpes celulares, es capaz de permitir la aceptación, diferenciación, proliferación y migración de células nuevas, abriendo la posibilidad de ser repoblada, lo que potencialmente podría generar órganos funcionales. **Objetivo:** Obtener una MEC hepática de rata Wistar descelularizada mediante perfusión y evaluar sus componentes. **Material y métodos:** Estudio experimental, en ratas Wistar macho, con peso de 300 gr. Se realizó la extracción del hígado, previa exanguinación, para ser congelado a -80°C . Posteriormente, fueron sometidos al proceso de descelularización vía perfusión portal con una serie de detergentes con Tritón X-100 y SDS. Al finalizar el proceso, se obtuvo una MEC que fue procesada para determinar el contenido celular residual y la preservación de los componentes de la MEC, mediante tinción con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson, yoduro de propidio y calcofluor-blanco y la inmunotinción con isolectina IB4. **Resultados.** Se obtuvo una MEC semitransparente, con una remoción de aproximadamente del 96% de los componentes celulares y nucleares hepáticos. Se comprobó la presencia de colágeno y proteoglicanos en la MEC descelularizada, con una estructura tridimensional preservada. **Conclusiones.** El proceso de descelularización hepática desarrollado en este proyecto incluyó etapas de congelamiento y uso secuencial de los detergentes tritón X-100 y SDS, lo que nos permitió obtener una MEC con un alto nivel de remoción celular y preservación de la arquitectura de sus componentes de colágeno y proteoglicanos. Esta MEC obtenida nos permitirá iniciar los ensayos con técnicas de recelularización de estirpes celulares hepáticas.

Palabras clave: matriz extracelular; descelularización; hígado; andamiaje.

SUMMARY

Introduction. Liver is the third most transplanted organ in the world, even in Mexico. In our country, terminal liver failure is mainly originate by hepatitis, nonalcoholic fatty liver disease and alcoholism, which lead to cirrhosis. It is a diffuse process characterized by loss of hepatic parenchyma, fibrosis formation and regeneration nodules resulting in the distortion of the normal architecture and vascular anatomy. On this moment, the only option in a disease final stage is transplantation, however the organ donation remains discouraging. This has promoted the research for new alternatives to prolong the patient's life. Currently, tissue engineering studies novel decellularization/recellularization techniques that facilitate the generation of functional organs, based on the obtention of the extracellular matrix (ECM). This ECM, the isolated 3D scaffold that supports all cell lines, has evidence that shows its ability to allow the acceptance, differentiation, proliferation and migration of new cells and it is a potential step to the repopulation, which could potentially generate functional organs. **Objective.** The aim on this study was to obtain a decellularized hepatic ECM from Wistar rats by perfusion and to evaluate its components. **Material and methods.** This was an experimental study, it were employed male Wistar rats weighing 300gr. Liver extraction was perform, exsanguination prior, to be frozen at -80 ° C. Subsequently, they were subject to the decellularization process via portal perfusion with Triton X-100 and SDS detergents. At the end, a MEC was obtained and processed to determine the residual cellular content and the preservation of their components using hematoxylin and eosin, Masson's trichrome, propidium iodide and calcofluor-white stains and isolectine IB4 immunostaining. **Results.** A semitransparent MEC was obtain, with a clearance of approximately 96% of the hepatic nuclear and cellular components. The presence of collagen and proteoglycans was identify in the decellularized ECM, with a preserved 3-D structure. **Conclusions** The hepatic decellularization process developed in this project included the freezing and sequential use of the triton X-100 and SDS detergents, which result in a MEC with a high level of cellular removal and the preservation of their architecture components including collagen and proteoglycans. This MEC resulted will facilitate trials in recellularization techniques with hepatic cell lines.

Keywords: extracellular matrix; decellularization; liver; scaffold.

Dedicatoria

A Dios.

A Josefita y Aarón.

Al amor de mi vida, Lia Fer.

A Patty, Noé, Paco, Diana y Memo.

Por su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

En mi formación como médico, uno de los valores más importantes que han sido inculcados fue la búsqueda de la excelencia académica y de la superación constante. Al finalizar mi licenciatura, la inquietud por continuar ese camino me motivó a la realización de un posgrado y fue gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), que pude lograr esta meta, ya que a través de su Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) me fue posible concluir el programa de la Maestría en Ciencias en Neurometabolismo de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Por ello, es muy importante para mí agradecer también al Dr. Hebert Luis Hernández Montiel, mi director, quien me dio la oportunidad de realizar uno de los proyectos más innovadores, que fue para mí una puerta de conocimiento y uno de los más grandes retos profesionales. Gracias por su tiempo, su conocimiento, su paciencia, su perseverancia y sus exigencias desde el principio hasta el final.

Agradezco también a mis sinodales: Doctora Nancy Hernández, Doctor Nicolás Camacho y Doctora Ana Tusie quienes forman parte de este programa, así como al Maestro Carlos Lozano del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, que en cada etapa de esta investigación me apoyaron con un granito de arena, aportando aún más con su experiencia y logrando al final construir una montaña. A la Lic. en Biología Jovanna Pasten, quien con su actitud siempre positiva me inundó de curiosidad y fue de gran ayuda y apoyo de los experimentos que realizamos en el laboratorio y en la preparación de las soluciones, a la QFB Gloria Betzabé Hurtado Ávila quien de igual forma me ayudo en la elaboración de todos los reactivos necesarios para los experimentos y me alentaba en cada mejora que se lograba.

Una parte fundamental fue el Departamento de Histopatología de nuestra Facultad, en especial el Dr. Marco Alonso Gallegos Corona y a la Técnico Evelyn Flores Hernández ya que mediante su apoyo en la realización de las tinciones histológicas fue que pudimos avanzar en cada etapa de los experimentos. También lo fue la Clínica del Sistema Nervioso y todo su personal, quienes apoyaron siempre en todo el proceso administrativo para favorecer el desarrollo de proyectos como este.

Finalmente, agradezco con mucho cariño a los Alumnos del quinto semestre de la Licenciatura en Medicina: Jesús, Andrea y Tonanztin, que nunca perdieron el interés y compromiso en esta investigación y que también aportaron su tiempo, conocimiento y ayuda durante los últimos tres semestres, a quienes deseo que tengan una vida profesional llena de éxitos y que sigan siendo buenos alumnos pero sobre todo buenas personas siempre.

Gracias a todos por hacer este proyecto realidad.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	14
2	MARCO TEÓRICO	15
2.1	Anatomía del hígado y funciones principales.....	15
2.2	Epidemiología de las hepatopatías	18
2.3	Fisiopatología de la insuficiencia hepática y cirrosis.....	19
2.4	Trasplante Hepático	23
2.5	Ingeniería Tisular	24
2.6	Matriz extracelular hepática	26
2.7	Descelularización de órganos.....	28
2.8	Descelularización hepática.....	31
2.9	Recelularización de órganos	34
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo General.....	35
3.2	Objetivos Específicos.....	36
4	HIPÓTESIS	36
5	METODOLOGÍA	36
5.1	Diseño del estudio	36
5.2	Selección de la población estudio	36
5.3	Tamaño de la muestra	37
5.4	Mediciones y análisis	37
5.5	Técnica de Descelularización Hepática.....	37
5.6	Detección de contenido celular	38
5.7	Detección de componentes de la matriz extracelular	38
5.8	Análisis estadístico	39
5.9	Bioética.....	39
6	RESULTADOS	40
6.1	Descelularización hepática.....	40
6.2	Determinación del contenido celular residual.....	41

6.3	Determinación de los componentes de la matriz.....	43
7	DISCUSIÓN.....	43
8	CONCLUSIONES.....	45
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
10	ANEXOS.....	55
10.1	Anexo 1. Abreviaturas.....	55
10.2	Anexo 2. Carta de Aprobación de los Comités de Bioética e Investigación.....	57
10.3	Anexo 3. Videos de reconstrucción hepática confocal.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica del lobulillo hepático	16
Figura 2. Sistema vascular y de conductos intrahepáticos	17
Figura 3. Fibrogénesis hepática.....	22
Figura 4. Matriz extracelular	26
Figura 5. Colágeno tipo IV	28
Figura 6. Descelularización hepática	33
Figura 7. Secuencia del hígado recelularizado	35
Figura 8. Sistema de perfusión diseñado	37
Figura 9. Apariencia macroscópica de hígado control y descelularizado	40
Figura 10. Proceso de descelularización hepática de rata Wistar	41
Figura 11. Hígado teñido con Hematoxilina y Eosina.....	42
Figura 12. Hígado teñido con Tricrómico de Masson	42
Figura 13. Inmunotinción y tinción en hígado control e hígado descelularizado	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de descelularización de tejidos.....	29
Tabla 2. Técnica de descelularización hepática.....	38

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades hepáticas constituyen una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo, siendo un grupo de alteraciones que imposibilitan al hígado llevar a cabo su metabolismo normal, hasta culminar en un estadio final que tiene la única alternativa del trasplante como terapia que permita prolongar la vida del paciente.

La Falla Hepática es una alteración que impide al hígado llevar a cabo sus funciones y se determina principalmente por sus manifestaciones clínicas en aguda y crónica (Laleman et al., 2011; Villalobos Pérez J. et al 2006), que en muchos casos presentan alteraciones bioquímicas e histopatológicas significativas (Lee et al., 2012; Wlodzimirow et al., 2013).

Una hepatopatía en un estadio final hace referencia a una serie de alteraciones histopatológicas que son progresivas y capaces de desencadenar una serie de procesos celulares anormales que culminan en una pérdida de la arquitectura hepática y que además altera su anatomía vascular hasta su microcirculación (García Buey et al., 2012); dicho proceso es también conocido como cirrosis (García Buey et al., 2012; Villalobos Pérez J. et al., 2006). En la cirrosis existen cambios morfológicos dados por un proceso dinámico que implica lo siguiente: lesiones difusas en todo el hígado que incluyen algunas zonas de necrosis y otras zonas de nódulos de regeneración y fibrosis con alteración del parénquima arquitectural y vascular incapaces de restaurar las funciones hepáticas (García Buey et al., 2012). Un aspecto importante a tener en cuenta es que las complicaciones dadas por la cirrosis son las mismas, independientemente de los agentes causales y, una vez establecida es capaz de inducir del desarrollo de hepatocarcinoma (García Buey et al., 2012). Las manifestaciones clínicas que presenta van desde a encefalopatía hepática, la ictericia, las coagulopatías, el síndrome hepato-renal y la falla multiorgánica (Olivari D. et al., 2017).

Contrariamente a lo esperado, los avances médicos y quirúrgicos no han podido resarcir la situación de la insuficiencia de órganos, por lo que recientemente se han explorado nuevas propuestas terapéuticas considerando entre otras cosas los trasplantes con donación parcial, el uso de órganos marginales y de donadores con procesos oncológicos no metastatizados (Mazza et al., 2015). Por ello, a principios del Siglo XXI surge a través de la ingeniería tisular la propuesta de trabajar en la

búsqueda y mejora de alternativas como la Descelularización de Órganos, como el hígado, la cual explora el desarrollo de metodologías que permitan una separación efectiva de los componentes celulares de su tejido nativo (Choudhury et al., 2018) obteniendo así su matriz extracelular (MEC) y que implican la posterior remodelación de esta matriz a nivel vascular, nervioso y funcional (Keane et al., 2015).

En el caso del hígado, los investigadores se han encargado de demostrar mediante distintos modelos animales como la rata, el ratón, el conejo y el cerdo, que esta técnica es factible para obtener una MEC descelularizada, sin embargo existen variables o limitantes de la técnica como la vía de acceso, las soluciones detergentes, el tiempo de obtención, la temperatura y la presión empleadas para la lisis y disociación de los componentes celulares de la MEC (Fu et al., 2014); actualmente no existe un protocolo estandarizado que garantice resultados óptimos en la descelularización para iniciar procesos de recelularización y que permita estudiar la dinámica celular intermedia, por lo que sería de gran utilidad desarrollar esta metodología como una oportunidad que permita profundizar en estos conocimientos y evaluar sus resultados y su alcance.

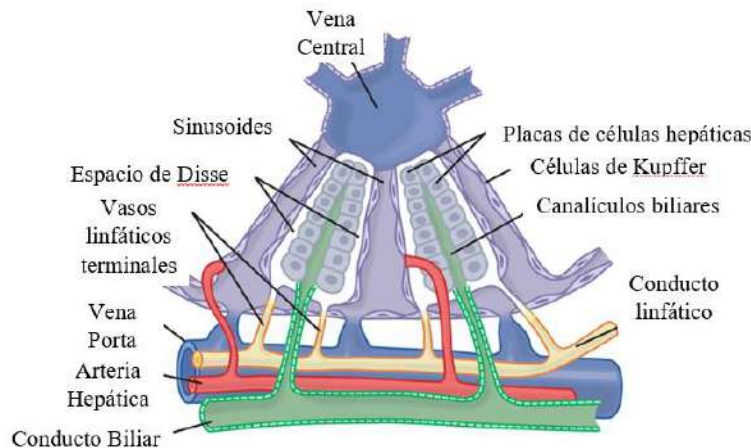
2 MARCO TEÓRICO

2.1 Anatomía del hígado y funciones principales

Se sabe que el hígado es un órgano sólido que tiene un peso aproximado de 1,400 a 1,600 gr en el adulto, delimitado por una cápsula delgada de tejido conjuntivo denominada cápsula de Glisson (Guyton A., 2011). Macroscópicamente se constituye por la triada portal: una vena (porta), una arteria (hepática) y un conducto (biliar). Microscópicamente, se constituye por cordones de hepatocitos separados por sinusoides, espacios porta y venas terminales; su unidad funcional, el lobulillo hepático, se constituye periférico a la vena central y se compone de múltiples placas celulares hepáticas radiadas; cada placa se compone de dos células (hepatocitos) entre las que se localizan pequeños canalículos biliares que drenan en los conductillos biliares y a su vez éstos discurren por los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos (Villalobos Pérez J. et al., 2006). En los tabiques también drenan vénulas portales que reciben sangre venosa del sistema portal, la cual drena a través de los sinusoides hepáticos; los tabiques contienen además arteriolas hepáticas que suministran sangre arterial a los tejidos septales intercalados entre los lobulillos adyacentes. Los sinusoides se encuentran tapizados de dos tipos de células: las células

endoteliales típicas y las células de Kupffer que tienen función fagocítica ante la presencia de bacterias y cuerpos extraños en la sangre. Existen los llamados espacios perisinusoidales, también llamados espacios de Disse, que se encuentran entre las células endoteliales y las células hepáticas y se comunican con los vasos linfáticos de los tabiques interlobulillares y es mediante esta vía, que desaparece el exceso de líquido (véase imagen 1) (Caralt et al., 2014; Guyton A., 2011).

Figura 1. Estructura básica del lobulillo hepático.



Fuente. Guyton, 2011

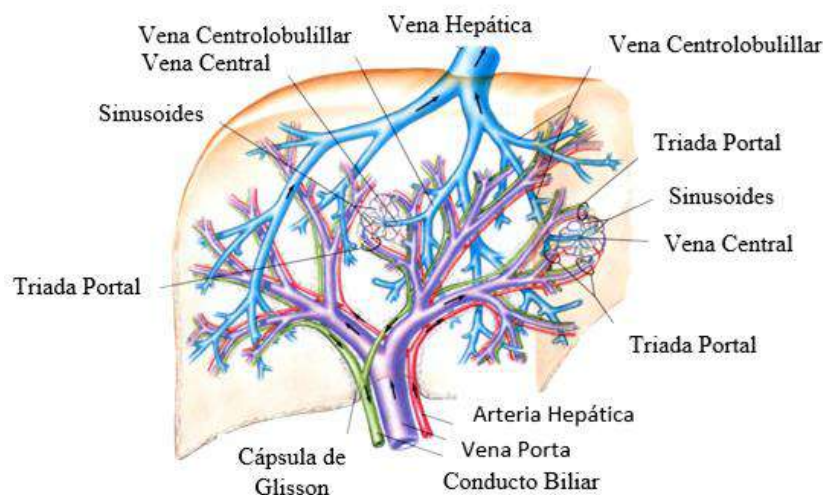
Para fines prácticos, el parénquima hepático ha sido dividido en lóbulos hexagonales en cuya periferia se encuentran los espacios porta y en el centro la vena central; de esta forma, en el lobulillo hay una zona central que rodea a la vena centrolobulillar, una zona periférica o periportal alrededor de los espacios porta y una zona intermedia denominada mediozonal (Guyton A., 2011; Villalobos Pérez J. et al., 2006).

Es importante tener en cuenta que el hígado recibe la circulación de dos sistemas: por un lado, la venosa proviene del territorio esplácnico a través de la Vena Porta (VP) que al penetrar al hígado se divide en venas distribuidoras que se conocen como interlobulares, segmentarias e interlobulillares y son éstas últimas las que se ramifican para formar las venas portales terminales que se ubican en los espacios porta y que son las que se abren a los sinusoides. La otra circulación, sangre arterial, emana a través de la Arteria Hepática (AH), la cual al penetrar al hígado da ramas que acompañan a las ramificaciones venosas hasta llegar a los espacios porta en donde también se abren a los sinusoides hepáticas y ocurre una mezcla de sangre venosa

procedente del sistema porta y de sangre arterial proveniente de la arteria hepática (Guyton A., 2011; Villalobos Pérez J. et al., 2006).

Finalmente, cuando la sangre llega a las venas centrolobulillares, que han sido llamadas venas hepáticas terminales, éstas confluyen para formar primero las venas intercalares que a su vez confluyen para formar las venas suprahepáticas que drenan a la vena cava inferior (VCI). Basados en este tipo de circulación portocentral, el concepto de “Acino” considera a los espacios porta como centro del Acino y a las venas hepáticas terminales como porciones periféricas. Una característica particular del hígado, dado su sistema vascular, es que posee un flujo sanguíneo elevado, se sabe que por parte del sistema portal llegan a los sinusoides hepáticos alrededor de 1.050 ml/min y 300 ml/min más que provienen de la arteria hepática; lo que en conjunto constituye el 27% del gasto cardíaco en reposo aproximadamente. Asimismo, la presión de la vena porta a su llegada al hígado es de aproximadamente 9 mmHg y la presión de la vena hepática que sale del hígado para terminar en la vena cava suele ser de 0 mmHg, lo que habla de sus resistencias vasculares muy disminuidas. Por sus características tisulares, el hígado posee un metabolismo intenso capaz de generar diferentes reacciones bioquímicas, esta propiedad en sí misma le permite participar en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de las grasas. Participa también como depósito de vitaminas, almacenador de hierro, productor de sustancias de la coagulación, detoxificación o eliminación de fármacos y producción de la bilirrubina (véase imagen 2) (Guyton A., 2011).

Figura 2. Sistema vascular y de conductos intrahepáticos



Fuente. Netter, 2015

2.2 Epidemiología de las hepatopatías

La cirrosis hepática es una enfermedad frecuente en el mundo y su prevalencia en cada país varía en función de su etiología (Lefton et al., 2009). Alrededor del 90% de las causas de cirrosis hepáticas en Occidente se deben a alcoholismo, enfermedad por hígado graso no alcohólico (HGNA) y a la hepatitis viral crónica (García Buey et al., 2012; Ramos-Lopez et al., 2015), situación similar a la existente en nuestro país.

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud, en su Informe Mundial sobre las Hepatitis del año 2017, cerca de 325 millones de personas padecen una infección crónica solamente debido al virus de la hepatitis B (VHB) o al virus de la hepatitis C (VHC), considerando entonces a éstos virus como la principal causa de cirrosis a nivel mundial; en dicho informe también se dio a conocer que en los registros obtenidos en el año 2015 la cantidad de nuevos infectados por el VHC fue de 1.75 millones con 71 millones de personas diagnosticadas. Sin embargo una prueba del impacto negativo que tienen estas enfermedades se entiende al saber que tan solo las hepatitis virales en ese mismo año causaron 1.34 millones de muertes, cifra similar a la que se atribuye a las defunciones por tuberculosis (TB) y por infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y que además es una cifra que va en aumento debido al poco acceso a los sistemas de salud y a su desarrollo asintomático (OMS, 2017).

El Informe Sobre la Salud de los Mexicanos, en el que se hace un diagnóstico general del sistema nacional de salud en nuestro país, publicado en el año 2015, se refiere que la cirrosis hepática se mantuvo dentro de las diez principales causas de muerte y, que en el año 2013 más de 23mil personas fallecieron por esta causa, de las cuales casi tres cuartas partes correspondían al sexo masculino, siendo que la cirrosis a causa de alcoholismo predomina en hombres mientras que la cirrosis por infecciones virales es más frecuente en mujeres. Aunque las defunciones se concentran en mayores de 50 años, en el año 2013 una de cada mil personas murió por esta causa (SSA, 2015). Otro informe publicado en el año 2015 por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), informó que México ocupa el segundo lugar en Latinoamérica con mayor número de infectados por VHC, de los cuales el 65% de los pacientes presentan una enfermedad crónica y sólo el 30% es conocedor de su enfermedad, además de que solo el 0.6% recibe tratamiento. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el año 2012 la seroprevalencia de las hepatitis era 0.24% en hombres

y 0.09% en mujeres. Finalmente, en el informe del Día Mundial contra la hepatitis emitido por parte de la Secretaría de Salud en México en el año 2015, se informó que existen en promedio un registro 24 mil casos de hepatitis A, B y C cada año (INSP, 2017; SSA,2015)

Aunque ya se sabe que el alcoholismo es causa de cirrosis, la cantidad de ingesta diaria de alcohol que consume una persona va en relación a la aparición de la enfermedad; un estudio publicado por Lefton H. et al., refiere que el consumo excesivo de alcohol durante dos años puede desarrollar cirrosis, sin embargo ésta se puede manifestar muchos años después. A pesar de ello, el riesgo de muerte cuando se realiza el diagnóstico de cirrosis en un estado compensado es 4.7 veces más con respecto a la población general y 9.7 veces más en un paciente descompensado (Escorcía Charris et al., 2018).

Respecto al HGNA, se encuentra fuertemente asociada a obesidad diabetes mellitus y síndrome metabólico, relacionados también con la resistencia a la insulina; su tasa estimada de desarrollo a 10 años es del 5-20%, sin embargo el incremento en pacientes que desarrollan obesidad es casi una garantía de la incidencia de cirrosis a edades tempranas sobre todo en países como el nuestro (Escorcía Charris et al., 2018; García Buey et al., 2012; Lefton et al., 2009).

Finalmente, en algunos países se considera a la cirrosis como la primera causa de trasplante hepático; en este sentido el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) en México publicó la estadística de los trasplantes realizados al primer semestre de este año, en el cual se informó que el hígado es el tercer órgano más demandado seguido del riñón y la córnea, con 328 pacientes en lista de espera, habiendo realizado a Julio del mismo año únicamente 115 trasplantes, de los cuales 108 fueron donados de paciente en estado de muerte cerebral y sólo 7 a partir de donador vivo, lo que refleja que desafortunadamente no se cubre ni el 50% de la demanda estimada (CENATRA, 2018).

2.3 Fisiopatología de la insuficiencia hepática y cirrosis

El término Insuficiencia Hepática se emplea para el grupo de alteraciones clínicas y bioquímicas que son resultantes de la falla del hígado para llevar a cabo sus funciones normales y denota únicamente alteración de la función del hígado (Laleman et al., 2011; Ramírez-Palma et al., 2016). A diferencia de la insuficiencia, la cirrosis es el

estadio final de todas las enfermedades hepáticas crónicas progresivas (García Buey et al., 2012).

La cirrosis ocurre por la degeneración y necrosis de los hepatocitos y el remplazo del parénquima hepático con tejido fibrótico y nódulos de regeneración así como la pérdida de la función hepática, además de que el daño a la arquitectura hepática induce distorsión de su vasculatura e hipertensión portal. Entonces, la fibrogénesis hepática es el principal factor para la progresión del daño hepático y da lugar a excesivos mecanismos de reparación en un proceso agudo o crónico, caracterizado por la simultánea disminución de la degradación y aumento en la síntesis de MEC, principalmente de colágeno. Esta fibrosis hepática está dirigida por una población de células fibrogénicas activadas conocidas como miofibroblastos (MF), y de éstas, las células estrelladas (CE) en el hígado son las principales que contribuyen a este proceso, incluyendo fibroblastos y células mesenquimales (Figura 3) (Ramos-Lopez et al., 2015).

En el caso de la enfermedad hepática por alcoholismo, se estima que el consumo de más de 40 gr de alcohol por día en el hombre, y de más de 20 gr de alcohol por día en la mujer durante un periodo de 10 años incrementa significativamente el riesgo de padecer cirrosis hepática. La patogénesis involucra las enzimas que metabolizan el alcohol que incrementan los niveles de acetaldehído y especies reactivas de oxígeno (ERO). Los elevados niveles de ROS disminuyen la actividad antioxidante y encabezan el daño oxidativo a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo cual también incrementa las cascadas de señalización del sistema inmune. El efecto de las ERO resulta en un daño mitocondrial e inicio de autofagia, y favorece la traslocación de lipopolisacáridos bacterianos desde el intestino al hígado, lo que a su vez estimula a las células de Kupffer para liberar citocinas proinflamatorias. Por otro lado, el acetaldehído es capaz de favorecer dos procesos importantes: la disminución de la beta-oxidación de ácidos grasos y el aumento de su biosíntesis (lo que se traduce en esteatosis hepática), y se ha visto que está involucrado en la fibrogénesis al estimular la síntesis de colágeno y componentes de la MEC a través del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Finalmente se ha visto que tanto ROS como el Acetaldehído son capaces de formar aductos de ADN que participan en la mutagénesis y carcinogénesis (Ramos-Lopez et al., 2015; Roman et al., 2013).

Respecto al virus de hepatitis C, su prevalencia es del 3% a nivel mundial y se considera la causa más común de enfermedad hepática crónica. Se le ha clasificado

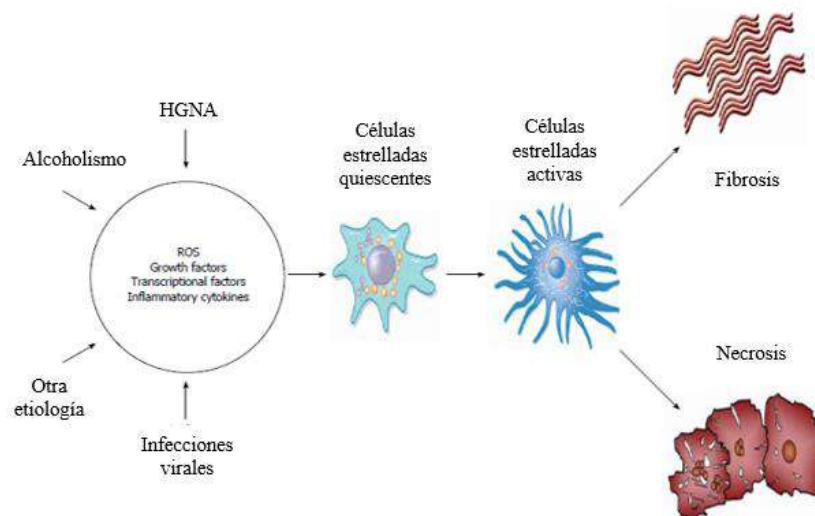
dentro de 6 genotipos principales con distribución global heterogénea, en México prevalecen el genotipo 1a y 1b y su principal factor de riesgo contagioso es a través de las transfusiones sanguíneas. Las células de linfocitos T-CD4 tienen un papel primordial al eliminar el VHC circulante, pero cuando la infección es persistente el virus es capaz de invadir el sistema inmune y esto puede potencializar la progresión de la fibrosis, cirrosis y carcinoma hepatocelular. Aunque se considera un virus no citopático, el daño se relaciona con la respuesta inmune del huésped y sus principales mecanismos incluyen infiltración linfoide portal, necrosis focal y lesiones lobulares degenerativas que pueden incrementar debido a la acumulación de células T específicas, reclutadas por moléculas de adhesión y quimiocinas (Lefton et al., 2009; Ramos-Lopez et al., 2015).

Un estudio realizado en el Oeste de México que evaluó las biomoléculas presentes en el VHC agudo y crónico reveló perfiles de respuesta distintos en cada caso, ya que la infección crónica de hepatitis C del genotipo 1a presenta secreción específica de interleucina 8 (IL-8) y quimiocina-ligando-8 (CCL8), mientras que los pacientes con VHC aguda se presentaron niveles elevados de interleucina-1-alfa (IL1- α), interleucina-13 (IL-13), interleucina-15 (IL-15), factor de crecimiento transformante alfa (TNF- α), TNF- β 1 y quimiocina-ligando-8 (CCL8), lo que refleja que las variaciones en la respuesta inmune están involucradas en la persistencia o rápida eliminación de la enfermedad, la cual además causa numerosos cambios patogénicos en el hígado como esteatosis, resistencia a la insulina, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y alteraciones en el control del crecimiento; otros factores que son asociados con la progresión de fibrosis son el tiempo de la enfermedad, edad avanzada, sexo masculino, abuso del alcohol, co-infección de VIH, diabetes y bajos controles de células T-CD4, así como polimorfismos en el metabolismo de los lípidos como la apolipoproteína-B (APO-B) y el receptor de lípidos de baja densidad (LDLr) (Fierro et al., 2015).

El hígado graso no alcohólico (HGNA) abarca desde la esteatosis simple hasta su manifestación inflamatoria, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) que de igual forma puede evolucionar a fibrosis, cirrosis o carcinoma hepatocelular. La esteatosis hepática se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en macro y microvesículas en más del 5% de los hepatocitos, distribuyéndose principalmente en la región perivenular. Su desarrollo se da a lugar como consecuencia de la disfunción de diversas vías metabólicas y un factor determinante es el incremento de los ácidos grasos libres (AGL). La resistencia a la insulina participa de manera muy activa en

esta patogénesis, ya que en la EHNA se han observado concentraciones elevadas de insulina que ocasionan falla en la supresión de flujo de ácidos grasos en estos pacientes y se ha reportado que este proceso puede estar mediado por alteraciones en la fosforilación del Receptor de Insulina 1 y 2 (IRS-1 e IRS-2) y otras vías de señalización de la insulina como la proteincinasa-B. También se ha visto que en el HGNA existe lipogénesis *de novo* y existe un daño mitocondrial ultraestructural con presencia de inclusiones paracristalinas y niveles de ADN mitocondrial disminuidos, lo que da como resultado el incremento en la β -oxidación mitocondrial. Por último, se debe considerar que la prevalencia del HGNA va en aumento por su relación con el síndrome metabólico y el bajo apego al manejo conservador, siendo esta situación vulnerable ante la aparición de la EHNA (Méndez Sánchez et al., 2010).

Figura 3. Fibrogénesis hepática



Fuente. Ramos-López et al., 2015

Se considera a la ascitis como la principal complicación de la cirrosis, con aparición también de várices esofágicas y encefalopatía hepática. La ascitis es el signo más común en pacientes descompensados por hipertensión portal, y se sabe que el 50% de los pacientes con diagnóstico de cirrosis progresiva desarrollan esta patología dentro de los 10 primeros años. Otras complicaciones que se presentan en esta patología son: hiponatremia, ictericia, peritonitis bacteriana, insuficiencia renal aguda y síndrome hepatorenal, sin embargo es importante considerar que una sola complicación o su tiempo de aparición en un estado compensado o descompensado son factores determinantes para el pronóstico de las personas (KASL, 2018; Torre, 2014).

La Encefalopatía Hepática (EH) es una patología neuropsiquiátrica que se presenta en alrededor del 28% de los pacientes con hepatopatía y se habla de que su tendencia hacia el año 2020 será de 1.5 millones de casos de cirrosis susceptibles a la EH en nuestro país; algunos de los síntomas incluyen déficit de atención, alteraciones en el patrón del sueño, delirios, convulsiones, incoordinación muscular y puede presentarse incluso el estupor o coma (Torre-Delgadillo, 2011). Se sabe que 70 de cada 100 pacientes con cirrosis presenta EH y de ellos el 30% muere por esta causa y aunque su fisiopatología es desconocida, las teorías más aceptadas se centran alrededor del amoniaco capaz de causar neuroinflamación y alteración astrocitaria consistente en edema celular y depósitos de manganeso (Parisi et al., 2007; Ramírez-Palma et al., 2016).

2.4 Trasplante Hepático

A pesar de que existen distintas escalas que permiten determinar el diagnóstico en la insuficiencia hepática aguda o crónica, de tal manera que el abordaje permita el uso de herramientas terapéuticas oportunas para cada caso, el trasplante sigue siendo el único tratamiento definitivo cuando no se demuestra recuperación, es decir, cuando la enfermedad es irreversible y progresiva (Lee et al., 2012). Dentro del espectro de patologías que culminan en la insuficiencia del órgano se considera que el hepatocarcinoma es el quinto cáncer más común a nivel mundial y la tercer causa más común de muertes en hombres, además se estima que en Norte América su incidencia aumentó en más de 2% anual entre un periodo de 1975 a 2006, posicionándolo dentro de las principales patologías que demandan el trasplante. Sin embargo, aunque los trasplantes hepáticos son una realidad, existen estudios epidemiológicos en Norte América que reportan que la tasa de supervivencia no ha sido favorable, ya que los pacientes presentan recidiva temprana y su tasa de supervivencia a 5 años oscila entre el 18 al 40% (Abdelfattah et al., 2018).

El primer trasplante hepático humano fue realizado en 1963 por Thomas E. Stazrl en la Universidad de Colorado y el primero con éxito fue 4 años más tarde. Respecto al trasplante hepático en México, el primer trasplante se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” en el año 1976 y hasta el año 2015 se habían realizado aproximadamente 1,516 trasplantes, cifra que se considera baja considerando el número creciente de personas con falla hepática. Sin embargo, existen distintas variables a considerar, ya que el número de trasplantes realizados es

muy bajo comparado con los pacientes que mueren por alguna insuficiencia de este tipo (Mendoza-Sánchez, 2018).

Al hablar de este contexto, debe mencionarse que el éxito del trasplante va en relación con criterios como la correcta selección del paciente receptor, la compatibilidad del injerto, la cirugía programada frente a la de urgencia, la técnica inmunosupresora adecuada y la detección precoz del fallo del injerto, por mencionar los más relevantes. Aunque en México la Ley General de Salud establece la norma jurídica para la regulación de los donantes y trasplantes, y aunque existen actualmente 369 hospitales autorizados para realizar dichos procedimientos, en solo 74 de ellos se puede realizar el trasplante hepático, no obstante, las principales razones para no llevarlo a cabo se centran en la falta de apoyo financiero, la falta de infraestructura y la escasez de donantes (Mendoza-Sánchez, 2018).

2.5 Ingeniería Tisular

Uno de los avances más significativos en la búsqueda de la terapéutica para enfermedades terminales como el cáncer sin duda fue el desarrollo de los modelos *in vitro* e *in vivo*, los cuales facilitaron el entendimiento de la fisiopatología y la generación de procesos que imitan la dinámica celular anormal en estas patologías y permitieron el avance en los tratamientos para los pacientes. Sin embargo, una de las grandes interrogantes en tecnologías como ésta ha sido comprender el alcance que puede tener la matriz extracelular de un órgano ya que se ha visto que dicha estructura representa el producto de distintas secreciones celulares residentes en su tejido nativo y se ha demostrado que es un andamio que se encuentra en reciprocidad dinámica con la célula en respuesta a cambios del microambiente, además de proporcionar señales que afectan la migración, proliferación y diferenciación celular (Caralt et al., 2014; Shirakigawa et al., 2012; Struecker et al., 2014). Fue entonces cuando su estudio cobra auge en las últimas dos décadas por ramas científicas como la Ingeniería Tisular, la cual surge con el propósito de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales y es de aquí de donde proviene el inicio del desarrollo de procesos de descelularización y recelularización de órganos (INBIB, 2013).

En el caso del hígado, la etiología variada que da lugar a su lesión ha fomentado distintas alternativas que buscan la transferencia de hepatocitos sanos a pacientes enfermos, debido a su gran capacidad para replicarse *in vivo*. A pesar de esto, a

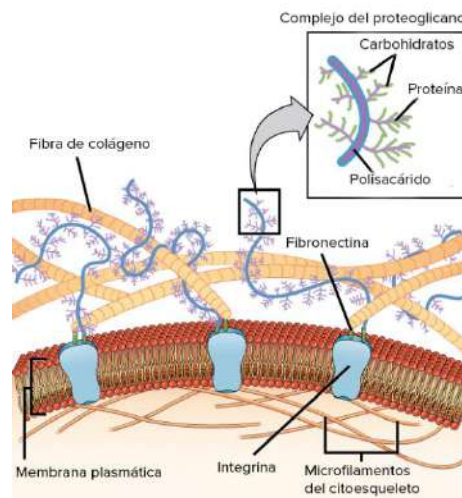
diferencia de otros tipos de células maduras, los hepatocitos han presentado una baja capacidad para su replicación, diferenciación y proliferación en estudios in vitro por lo que no ha sido posible obtenerlos de manera rutinaria para el trasplante o para uso extracorpóreo, y esta situación ha sido la que promueve las investigaciones en ingeniería tisular y medicina regenerativa sobre su microambiente, el rol de la señalización extracelular, célula-célula, y célula-MEC de tal forma que favorezcan la generación de un ambiente replicativo para el hepatocito (Bhatia et al., 2014).

Es necesario tener en cuenta que los organismos multicelulares tienen una organización compleja, con distintos grupos de células progenitoras que determinan su composición, estructura y función en conjunto y, de esta forma contribuyen a realizar las tareas en un tejido u órgano. Para la formación de este sistema complejo de organización celular se necesitan mayores requerimientos de información, energía y tiempo para su desarrollo, sin embargo estas características le permite poseer la capacidad de prosperar en entornos variados y variables (Frantz et al., 2010; Lodish H. et al., 2016).

En este sentido, el ensamble y la organización de los tejidos en los órganos se determinan por interacciones moleculares a nivel celular que están dadas por factores regulados en el tiempo y espacio, así pues, una célula puede adherirse a otra célula a través de proteínas de membrana especializadas llamadas Moléculas de Adhesión Celular (CAM, por sus siglas en inglés) que se agrupan en uniones celulares especializadas y también pueden comunicarse de forma indirecta empleando Receptores de Adhesión (RA) a la MEC que se encuentran en la membrana plasmática y, empleando estos tres elementos (CAM, RA y MEC) es como los tejidos transfieren información de forma bidireccional: entre el interior y el exterior de las células (Figura 4). Dentro de las familias de las CAM's, existen 4 grupos principales: las Cadherinas, la Familia de las Inmunoglobulinas, las Integrinas y las Selectinas que se caracterizan por ser moléculas proteicas con dominios muy particulares que les confieren la especificidad de unión a otras proteínas de membrana. La adherencia entre las células y la MEC se da mediante uniones indirectas por los receptores de superficie celular, que incluyen a las Integrinas y finalmente la MEC presenta tres constituyentes principales: los Proteoglicanos (un tipo único de glicoproteínas), el Colágeno (proteínas que se conforman de fibras) y proteínas de matriz multiadhesivas como la fibronectina (Bosman and Stamenkovic, 2003; Frantz et al., 2010; Lodish H. et al., 2016), por lo que aún queda camino por explorar para satisfacer las necesidades

mínimas de entendimiento de la interacción del microambiente de un órgano, para generar alternativas a la insuficiencia de órganos.

Figura 4. Matriz extracelular



Fuente. Clark et al., 2015

Finalmente, la bioingeniería molecular juega un papel clave ya que la matriz extracelular tiene el potencial para ser utilizada no sólo como una alternativa a todo el trasplante de órganos y la medicina regenerativa, sino también para las pruebas de toxicidad durante el desarrollo de fármacos preclínicos y de otras enfermedades hepáticas (Baptista et al., 2011; Fu et al., 2014; Shupe et al., 2010; Struecker et al., 2014; Uygun et al., 2010; Zhou et al., 2015). Dentro de la gama de corrientes que investigan los aspectos que favorecen la transferencia de los hepatocitos a enfermos sin más alternativas terapéuticas, el aspecto de la descelularización y recelularización de órganos para la generación de órganos funcionales tiene su auge en nuestro tiempo, basados en estudios que demuestran las propiedades de la MEC.

2.6 Matriz extracelular hepática

En el caso de la MEC hepática, se sabe que tiene una naturaleza única que se basa en una configuración especial del espacio de Disse, y los lóbulos hepáticos, la cual consiste principalmente en fibronectina, colágeno tipo I, y menores cantidades de colágeno tipo III, IV, V y VI. Esta configuración, junto con las fenestraciones y brechas de las células endoteliales sinusoidales son las que facilitan el rápido intercambio bidireccional de las macromoléculas que tienen lugar entre el plasma y los hepatocitos (Martínez-Hernández y Amenta , 1993). Al ser marco de referencia

estructural a los hepatocitos, esta estructura compleja se puede dividir en dos áreas principales: la región periportal y la región pericentral, definidas por los dominios vasculares de la triada portal y la vena central. De una zona a otra existe un gradiente de moléculas de la matriz que lo divide y permite la preservación de la función metabólica de los hepatocitos; sus diferencias se evidencian claramente en los espacios de Disse, en los que carece de proteínas de membrana como la laminina, enactina y perlecan, pero contiene colágeno I, III y IV y Fibronectina. Existe evidencia, además, de que en los canales de Hering existen nichos de células madre de poblaciones como los angioblastos y precursores de células estrelladas hepáticas y, el microambiente en estos nichos propicia señales parácrinas que dictan la diferenciación celular por etapas (Caralt et al., 2014; Struecker et al., 2014; Vorotnikova et al., 2010).

Se sabe que existen más de 20 tipos distintos de colágeno que participan en la formación de la MEC, son proteínas triméricas que surgen por polipéptidos llamados cadenas alfa, las cuales pueden ser idénticas o no y su estructura es de triple hélice de 400 nm con tres abundantes aminoácidos: glicina, prolina e hidroxiprolina y presenta dos dominios: el C-terminal y el N-terminal, finalmente presenta algunas regiones no helicoidales que proporcionan flexibilidad a la molécula que le permite una formación ramificada (Figura 5). Existen también las proteínas de matriz llamadas “multiadhesivas” mediante las cuales se dan procesos como la migración y adhesión celular, que se encargan de la unión entre varios tipos de Colágeno, la unión de otras proteínas de la matriz, polisacáridos, receptores de superficie celular y señales de moléculas extracelulares; tal es el caso de la Laminina que es la principal proteína multiadhesiva de la matriz. Esta proteína heterotrimética tiene un peso molecular de 820,000 y presenta muchas isoformas, tiene un dominio LG globular y uno C-terminal. Otra proteína multiadhesiva es la fibronectina, que presenta más de 20 isoformas, es esencial para la migración y diferenciación de muchos tipos celulares en la embriogénesis y favorecen la curación de heridas al promover la coagulación sanguínea y la migración de macrófagos en zonas de lesión, se constituye de dímeros que presentan dos polipéptidos similares y presenta una región C-terminal, cada cadena tiene entre 60-70nm de longitud con seis regiones que presentan unión a ligandos específicos. Otro componente de la MEC está dado por los Proteoglicanos, que son un conjunto de glicoproteínas que presentan cadenas covalentes de polisacáridos llamadas glucosaminoglicanos (GAG) los cuales son polímeros lineales largos que presentan un grupo aniónico carboxilo o sulfato y algunos de los

principales GAGs se encuentran como proteínas de superficie celular: Hialuronato, Condrotin Sulfato, Heparan Sulfato y Keratan Sulfato (Lodish H. et al., 2016).

Figura 5. Colágeno tipo IV



Fuente. Lodish et al., 2016

Es por estas características que la ingeniería tisular hepática va encaminada a obtener hepatocitos autólogos o células hepáticas progenitoras y busca combinarlas en un andamio tridimensional aislado de su tejido original lo más intacto posible. Una característica importante que se ha observado es que la MEC favorece la reconstrucción del tejido hepático funcional sin necesidad de inmunosupresión ya que no presenta respuesta antigénica (Nari et al., 2013; Park et al., 2013).

2.7 Descelularización de órganos

Los andamios derivados de tejidos y órganos descelularizados han sido empleados satisfactoriamente en estudios preclínicos con animales y en estudios clínicos en humanos y su importancia radica en la preservación de su arquitectura y la conservación de sus proteínas estructurales (Bhatia et al., 2014).

Actualmente, se sabe que los antígenos xerogénicos y alogénicos son reconocidos por el receptor y presentan respuesta autoinmune inmediata, sin embargo, ya está demostrado que los componentes de la MEC pueden ser conservados y bien tolerados en los trasplantes xerogénicos, por lo que la meta de la ingeniería tisular en los procesos de descelularización consiste en la remoción eficiente de todo el contenido celular habitante y del material nuclear de un órgano, simultáneo a la minimización de los efectos adversos en la composición, actividad biológica y la actividad mecánica de la MEC resultante. Se sabe que cualquier técnica para descelularizar un órgano alterará la arquitectura tridimensional de la MEC, sin embargo la metodología más empleada se basa en una combinación de tratamientos físicos y químicos, (además de

que la mayoría de los estudios agregan antibióticos como penicilina, estreptomina y anfotericina debido al uso de materiales biológicos) (Tabla 1). Los primeros incluyen agitación, sonicación, masaje mecánico o presión y congelación-descongelación, que favorecen el daño a la membrana celular y la liberación de su contenido, pero al ser insuficientes para lograr su eliminación celular completa se combinan con algún producto químico como las soluciones iónicas y los detergentes (Crapo et al., 2011; Gilbert et al., 2006;).

Estos protocolos inician al perfundir a través de los vasos sanguíneos las soluciones o detergentes establecidos para llevar a cabo la lisis celular mediante tratamientos físicos o soluciones iónicas, para luego disociar los componentes intracelulares de la MEC mediante el uso de tratamientos enzimáticos o detergentes que solubilizan los elementos citoplásmicos y nucleares seguidos de su eliminación del tejido con la posterior evaluación de sus componentes restantes y la determinación del ácido desoxirribonucleico (ADN) residual (Baptista et al., 2011; Crapo et al., 2011; Uygun et al., 2010). Diversos estudios que abordan hígado han reportado que existen detergentes como el Tritón X-100 y el Duodecil Sulfato Sódico (SDS) que con capaces de decelularizar tejidos densos preservando en gran medida los elementos de la matriz extracelular (Struecker et al., 2014; Wang et al., 2015; Wu et al., 2015; Zhou et al., 2015).

Tabla 1. Métodos de descelularización de tejidos

MÉTODO	EJEMPLO	MECANISMO DE ACCIÓN
Físico	Congelación	Forma cristales intracelulares que interrumpen la integridad de la membrana celular
	Fuerzas Mecánicas	Agrega presión que puede reventar la célula y eliminarla
	Agitación	Facilita la exposición química y causa lisis celular y su remoción
Químico	Soluciones alcalinas	Solubiliza componentes citoplásmicos de la célula y rompe cadenas de ácidos nucleicos.
	Detergentes no iónicos (Tritón X-100)	Interrumpe las interacciones lípido-proteína y lípido-lípido, pero

		mantiene intactas las uniones proteína-proteína
	Detergentes iónicos (SDS)	Solubiliza la membrana citoplasmática y nuclear y desnaturaliza proteínas
	Detergentes Zwitterionicos	Exhibe propiedades no iónicas y aniónicas de los tejidos
	Soluciones Hiper e hipotónicas (EDTA, EGTA)	Agentes quelantes que se unen a iones metalicos divalentes y rompe la adhesión de la célula con la MEC
Enzimático	Tripsina	Rompe los enlaces peptídicos en el C-terminal de Arginina y Lisina
	Endonucleasas	Cataliza la hidrólisis de las uniones de las cadenas de ARN y ADN
	Exonucleasas	Cataliza la hidrólisis de los sitios terminales de las cadenas de ARN y ADN

Fuente. Modificado de Gilbert et al., 2006

Uno de los aspectos clave a considerar en estas técnicas es la respuesta antigénica, si bien es cierto que el material celular residual en la MEC es capaz de iniciar problemas de histocompatibilidad y reacciones adversas en el huésped, y aunque es imposible eliminar la totalidad del contenido celular, sí es posible llevar a cabo la cuantificación de componentes como el material genético, mitocondrias o moléculas asociadas como los fosfolípidos, para lo cual también es primordial tener en cuenta que dicha respuesta varía en función del tipo de tejido del cual se obtiene la MEC, su densidad, su composición y su función inmune. Al día de hoy no existe una definición estricta o *gold standard* de los criterios con los cuales se considera una MEC descelularizada, para lo cual se han establecido requerimientos lo más precisos posibles basados en estudios de remodelación in vivo que han evitado respuestas adversas en células y huéspedes, los cuales se mencionan a continuación:

1. <50ng de ADN de doble cadena por mg de peso seco (Crapo et al., 2011).
2. <200pb de longitud de un fragmento de ADN (Crapo et al., 2011; Gilbert, 2012).

3. Ausencia de material nucleico visible en las secciones de tejido teñidas con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) o Hematoxilina y Eosina (Crapo et al., 2011).

El objetivo de la búsqueda de material genético se debe a que el ADN tiene una correlación directa con las reacciones de histocompatibilidad, además de que es ubicuo, es decir que se encuentra en todo el tejido, lo que proporciona índices sensibles para comparar con otros tejidos y finalmente es fácil de identificar empleando diversas metodologías, lo mismo que puede realizarse para el segundo criterio. Respecto al tercer criterio, la principal cualidad es que son de fácil realización ya que son métodos de rutina (tinción e inmunotinción), sin embargo proporcionan baja sensibilidad para identificar y analizar ADN en la MEC por lo que son complementarios (Baptista et al., 2011; Gilbert et al., 2006; Uygun et al., 2010;).

Parte del esmero que se procura en esta inventiva va en relación con aspectos propios de un andamio biológico: está demostrado que la arquitectura y topografía de un tejido organizan varias funciones como la morfología celular, la diferenciación, la polarización y la expresión de genes, por lo que al obtener un andamio acelular, una de las necesidades de preservar tejido vascular es debido a que la distancia entre un vaso y una célula está entre los 150-200 μ m, suficientes para permitir la llegada de oxígeno a la célula, ya que de lo contrario no se podría satisfacer su necesidad metabólica (Barakat et al., 2012).

2.8 Descelularización hepática

El primer informe científico que señaló una técnica de descelularización fue en el año de 1948 por William E. Poel quien demostró que es posible obtener homogenados acelulares de tejido muscular al congelarlo a -70°C (Poel, 1948). Mucho tiempo después, entre la búsqueda para el tratamiento de patologías producidas por la pérdida o degeneración celular de tejidos se da a conocer en el año 2008 el trabajo del Dr. Harald Ott, de la Universidad de Harvard, Estados Unidos, quien junto con la Dra. Doris A. Taylor, pionera en ingeniería de tejidos, como una alternativa a la gama de patologías cardíacas que detonan su falla, el cual consistía en la descelularización y recelularización de un corazón de rata mediante perfusión de detergentes a través de sus vasos coronarios, logrando en un periodo de 4 días, posteriores a la recelularización, la contracción miocárdica (Ott et al., 2008).

A partir de esta referencia, inicia el desarrollo de ésta metodología para que pueda ser aplicada en otros órganos; en el caso del hígado fue hasta el año 2010 que se publican los primeros tres trabajos al respecto en Estados Unidos. En primer lugar, Shupe y colaboradores presentaron la descelularización de un hígado de rata empleando Tritón X-100 e introdujeron el uso de SDS, ya que evidenciaron que con este detergente obtenían la mayor remoción del material genético en el tejido. A su vez, Uygun y colaboradores reportaron no sólo la obtención de una MEC descelularizada, sino que fue capaz de ser repoblada por hepatocitos de rata a través de la vena porta, misma que fue mantenida en una cámara de perfusión durante dos semanas, demostrando que los hepatocitos podían crecer en la MEC tridimensional produciendo albúmina y urea, siendo entonces el primer reporte que demuestra la funcionalidad de la MEC hepática. Finalmente, el equipo de Baptista y colaboradores fue el primero en demostrar que una matriz extracelular de cerdo podía ser repoblada con hepatocitos fetales humanos, los dos últimos corroborando la ausencia de respuesta inmune (Baptista et al., 2011; Mazza et al., 2015; Shupe et al., 2010; Uygun et al., 2010).

La preparación del animal para la obtención del hígado consiste en su sedación con la posterior anticoagulación mediante un vaso principal de gran calibre (Vena Porta, Arteria Hepática o Vena Cava) (Nari et al., 2013; Struecker et al., 2014; Tajima et al., 2018); en el caso de los roedores, se coloca en decúbito dorsal, se fijan sus extremidades y se realiza una laparotomía abdominal para la extracción del órgano (Crapo et al., 2011; Jiang et al., 2014) y se canaliza el hígado mediante sus vasos sanguíneos para conectarse a un biorreactor que se comunica con una bomba peristáltica por la cual se perfunde una solución buffer a un pH específico para exanguinar el órgano y a continuación lavarlo con detergentes biológicos como el Tritón x-100 en una serie de ciclos con un tiempo establecido, a una velocidad de perfusión determinada para lograr la eliminación celular y la solubilización de lípidos, seguido de la perfusión de SDS a la misma velocidad con el fin de eliminar los ácidos nucleicos hasta obtener el andamio semitransparente de MEC hepática (Figura 6) (Fu et al., 2014; Yagi et al., 2013).

Figura 6. Descelularización hepática



Fuente. Mazza et al., 2017

Desde entonces existen estudios en los que se aplican variantes de la técnica, por ejemplo, un estudio realizado por Saenz Guillen en España en el 2011 comparó los protocolos empleados por los equipos de Baptista y Uygun, ya que el primero empleó Cloruro de amonio para provocar daño a la membrana celular y Tritón X-100 para la remoción de contenido nuclear y el segundo empleó Tritón para interrumpir la membrana plasmática y SDS para eliminar el ADN celular, y concluyó que la segunda técnica supera la remoción de contenido celular y nuclear y se comprobó que el material genético residual era menos del 3% (Saenz Guillen C. et al., 2011; Uygun et al., 2010).

Un año después, el Dr. Omar Barakat del Departamento de Cirugía Hepatobiliar y de Trasplantes del Hospital de Houston, Texas, realizó una técnica de perfusión de SDS a través de la VP de un hígado porcino en la que empleó congelación a 4°C y además ya en el proceso de recelularización describe por primera vez el uso de células estrelladas fetales humanas con resultados favorecedores en los que detectan producción de lactato y urea (Barakat et al., 2012).

Hasta el año 2014 Struecker y Colaboradores llevaron a cabo una técnica de decelularización de hígado de rata mediante la perfusión de Tritón X100 y SDS por la vía de la arteria hepática, reproduciendo por primera vez la circulación anterógrada hepática por vía arterial, mediante ambientes de presión de perfusión oscilatorias que imitan las condiciones intraabdominales empleando una bomba peristáltica. De esta manera, el hígado fue perfundido con presiones distintas para mejorar la penetración de los detergentes en los espacios hepáticos y recurrieron a una solución

amortiguadora para su exanguinación. Sus resultados reportaron una decelularización más homogénea con una matriz extracelular más íntegra (Struecker et al., 2014).

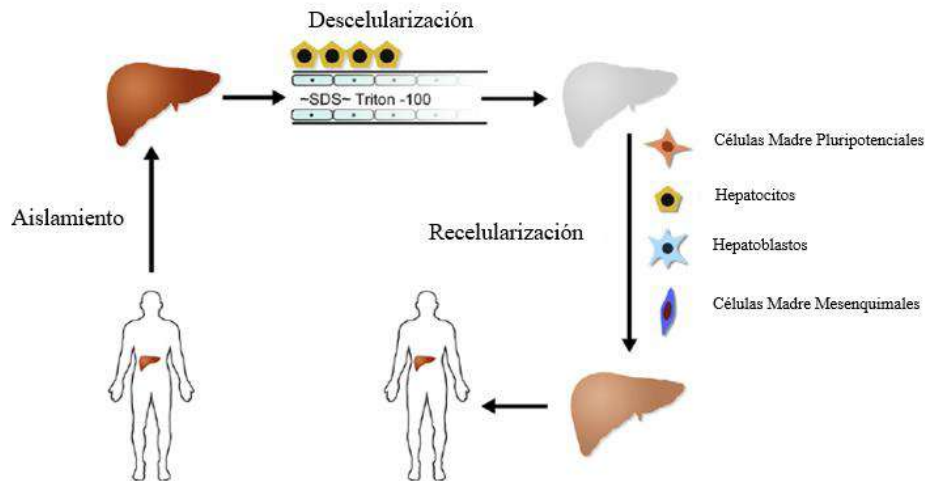
A pesar de los avances, la decelularización y repoblación de la matriz extracelular de hígado humano con células homologas aún no ha sido reportada (Mazza et al., 2015), por lo que la meta para la obtención de un andamio acelular biocompatible aún no se ha obtenido, y es imperativo que cumpla una remoción del material genético del 97% o más y la preservación de la membrana extracelular hepática (presencia de colágeno y fibronectina, una triada portal completa, preservación de los conductos biliares y del árbol vascular) (Baptista et al., 2011; Shupe et al., 2010; Uygun et al., 2010).

2.9 Recelularización de órganos

Desde la publicación de Ott y colaboradores, existe el objetivo que crear órganos trasplantables específicos para un paciente. La tarea de la recelularización requiere células de fuentes apropiadas, un método óptimo de cultivo y un método de repoblación de un andamio que sea fisiológico. Así mismo, la regeneración del tejido implica el restablecimiento de la vasculatura, el parénquima y sus componentes de soporte por las mismas necesidades metabólicas del tejido (Ott et al., 2008; Scarritt et al., 2015; Stracciari et al., 2008).

Los estudios realizados en recelularización hepática han empleado distintas rutas para repoblar un órgano: Vena Porta, Vena Cava Inferior o Arteria Hepática, encontrando que el anclaje de éstas células por perfusión de VCI se daba en las zonas pericentrales, mientras que el anclaje de las células a través de la VP se daba en las zonas periportales, sin embargo autores como Baptista mencionan que este fenómeno va en relación a la dirección y presión de flujo durante la perfusión (Figura 7) (Stracciari et al., 2008).

Figura 7. Secuencia del hígado recelularizado



Fuente. Wang et al., 2015

Se sabe que son dos técnicas principales las que favorecen la perfusión de las líneas celulares a una MEC (hepatocitos primarios de rata, hepatocitos porcinos, células mesenquimales, células madre pluripotenciales, células endoteliales, hepatocitos fetales humanos, etc.); la primera consiste en la perfusión del linaje celular en un solo tiempo a través de un bioreactor y la segunda es una técnica que consiste en determinar la cantidad de células que se desea perfundir en distintos ciclos o tiempos y los resultados apuestan a un mejor anclaje de las células por esta segunda técnica (Hussey et al., 2018; Kojima et al., 2018).

Por último, existen muchas barreras no sólo económicas sino también técnicas para determinar un método de recelularización óptimo, ya que existen variables como la presión de perfusión (capaz de causar daño mecánico a la matriz), el tipo de tejido, el tiempo de perfusión, el gradiente de oxigenación y la inocuidad del tejido, que permitan la integración mural, estromal, inmune e intersticial en las células en un andamio acelular para que sea capaz de recobrar sus propiedades y funciones y que esté preparado de responder ante algún daño (Gilbert, 2012; Mazza et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Desarrollar una técnica de decelularización hepática óptima mediante perfusión en ratas Wistar macho que permita la obtención de su matriz extracelular.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la presión de perfusión y el número de lavados del órgano necesarios para la decelularización.
2. Cuantificar el porcentaje residual celular posterior al procedimiento por medio de tinción.
3. Caracterizar los componentes de la matriz extracelular obtenida por medio de tinción e inmunohistoquímica.

4 HIPÓTESIS

La implementación de una técnica de decelularización por perfusión en el hígado de rata Wistar nos permitirá la obtención de un andamiaje tridimensional de matriz extracelular.

5 METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio

El presente estudio fue experimental, longitudinal, que incluía ratas macho cepa Wistar, a las cuales se les extrajo el hígado para llevar a cabo esta experimentación basados en los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), NOM-062-ZOO-1999, la cual establece las medidas de cuidado y uso de animales de laboratorio con propósitos de investigación o enseñanza. Se establecieron dos grupos para su estudio, el primero conformado por un hígado control y el segundo conformado por los hígados intervenidos con la técnica de descclularización. Este proyecto fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biomedicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.2 Selección de la población estudio

Dentro de los criterios de inclusión se consideraron a 4 ratas macho de la cepa Wistar con peso aproximado de 300gr, que tuvieran ingesta de dieta normal. Para los criterios de exclusión se descartaban que presentaran signos de lesión anatómica en el proceso

de selección y como criterios de eliminación se descartaron los hígados que durante el procedimiento presentaran daño estructural debido al proceso de lavado y también lo que se infecten o contaminen.

5.3 Tamaño de la muestra

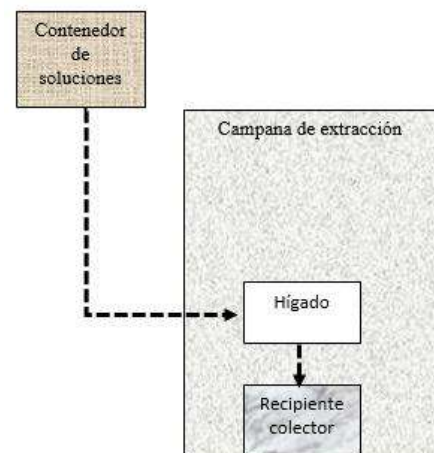
Este estudio es de contenido no probabilístico por conveniencia, en el que se incluyeron 3 hígados que fueron sometidos a la técnica de descclularización y un hígado sin intervención como control.

5.4 Mediciones y análisis

5.5 Técnica de Descclularización Hepática

Para llevar a cabo la descclularización de los hígados se llevó a cabo combinando la metodología ya formulada y realizando algunas modificaciones (Shupe et al., 2010; Uygun et al., 2010), la cual consta de dos tiempos: la exanguinación y la descclularización. Previo a la exanguinación, las ratas fueron sometidas a sedación profunda con Pentobarbital (1500UI/Kg) vía intraperitoneal (IP) para disuadir cualquier tipo de sufrimiento o dolor al animal durante el procedimiento. Posteriormente, se preparó el material quirúrgico esterilizado para la técnica en una campana de extracción, que permite trabajar en medio aséptico. Se inició la exanguinación realizando la toracotomía para la administración de Heparina Sódica (1000UI/kg) vía transcardíaca (que favoreciera un estado de anticoagulación para garantizar la nula formación de coágulos) seguida de la administración de 150 ml Solución Salina 0.9% (5ml/min) (que permitiera el vaciamiento de los glóbulos rojos y el plasma del sistema vascular del animal). Luego de la exanguinación, se llevó a cabo la canulación del hígado a través de la Vena Porta (VP) utilizando un catéter 24Gr que fue ligado mediante Nylon 4-0 y

Figura 8. Sistema de perfusión diseñado



también se ligó la VC con Seda 0. Una vez canulada la VP, se diseccionó el órgano y se congeló a -80°C durante 20 minutos (Uygun et al., 2010), para posteriormente descongelar a temperatura ambiente y ser conectado a un sistema de perfusión (SP) que fue diseñado para basarse en la gravedad como fuerza impulsar la perfusión de las soluciones a través del órgano, el cual estaba regulado por válvulas que permitían controlar la velocidad de flujo (7ml/min) (Figura 8). Una vez descongelado el órgano y estando conectado al SP, se iniciaron los lavados con los detergentes Tritón X-100 (3 ciclos de 3hrs) y SDS (un ciclo de 3hrs), finalizando con un lavado de PBS (30 min) (Tabla 2).

Tabla 2. Técnica de descelerización hepática

Solución	Tiempo de lavado
Tritón X-100 1%	3 horas
Tritón X-100 2%	3 horas
Tritón X-100 3%	3 horas
SDS 0.1%	3 horas
PBS	30 minutos

5.6 Detección de contenido celular

Una vez obtenido el andamiaje descelerizado, dos hígados fueron fijados con una solución de Formol en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) a Ph de 7.4 durante 12 horas e inmediatamente después se obtuvieron muestras de tejido de cada uno en cortes sagitales de los lóbulos hepáticos que fueron teñidas con la tinción de H y E (que permite identificar en coloración azul las zonas basófilas de la célula como el núcleo y también las zonas acidófilas de la célula que tiñen de rosa, como el citoplasma). El otro hígado fue teñido con tinción de Tricrómico de Masson (TM, que permite identificar las fibras de colágeno); una vez obtenidos, los lóbulos se cortaron con un micrótopo y se obtuvieron muestras de $5\mu\text{m}$ de grosor colocadas en portaobjetos para ser analizados en un microscopio electrónico (Olympus BX51, Image Pro Plus 3.0).

5.7 Detección de componentes de la matriz extracelular

En el caso de la evaluación de los componentes de la matriz, otros dos hígados fueron procesados con la misma metodología hasta obtener la MEC semitransparente, dichos órganos fueron extraídos e incubados en Paraformaldehído (PFA) 4% por 24 horas para posteriormente combinarlos en una solución con sacarosa al 15% por 12 horas, continuados con sacarosa al 30% durante 12 horas más. Una vez finalizado, se obtuvieron cortes de 0.5cm^3 que fueron tratados con Tissue Teck (Thermo Fisher) más

sacarosa al 30% en una solución combinada para finalmente tratarlos únicamente con Tissue Teck ya que serían congelados a -20°C para poder cortarlos en criostato a $50\mu\text{m}$ de grosor y así colocarlos en portaobjetos. Para identificar las células endoteliales se usó la tinción Isolectina IB4-CY5 (Invitrogen I21411) ya que es una proteína con alta afinidad a los carbohidratos evaluada con una emisión/excitación de 650nm/668nm (Laviña et al., 2018; Neto et al.); para la detección de componentes nucleares se empleó el Ioduro de propidio que es una tinción que identifica principalmente cromatina nuclear al evaluarla con una emisión/excitación de 535nm/617nm (Zhang et al., 2018). Finalmente, la identificación de proteoglicanos como componente estructural de la matriz corrió a cargo del Calcofluor Blanco que es una tinción que identifica los grupos β -glicano de las glicoproteínas con una emisión/excitación de 355nm/433nm (Bates et al., 2006). Luego de obtener los cortes, la metodología se dividió en dos unidades: el primer día se hidrataron las preparaciones durante 5 minutos con PBS y a continuación se cubrieron 3 veces durante 5 min cada vez con PBST (Tritón 0.5%, Tween20 0.01%) seguidas de dos lavados con PBS y posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4°C con el Isolectina GS-IB4-CY5 (diluido 5:100 del stock madre de 1 mg/ml) y Calcofluor Blanco 100 μl (100 $\mu\text{g/ml}$). En el segundo día se realizó un lavado de 5 min con PBS, seguido de 3 lavados con PBST de 5 min cada uno y nuevamente con 2 lavados de PBS. Finalmente se incubaron cortes con con Ioduro de Propidio (diluido 1:1000) durante 1hr que luego se lavó con PBS y se montaron con 50 μl de Vectashied (Vector), para luego barnizar la orilla del cubreobjetos y realizar su estudio en microscopía confocal (LSM 780 zeiss), en el que se obtuvieron imágenes que representan cortes confocales individuales en plano Z.

5.8 Análisis estadístico

Se empleó estadística descriptiva y los resultados fueron expresados como medias. El análisis de los datos se llevó a cabo con los softwares de Image-Pro Plus e Image J, los cuales permiten el procesamiento y análisis de imágenes de laboratorio.

5.9 Bioética

Este proyecto fue aprobado en Junio del 2017 por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, y se apega a las normas de investigación establecidas por la Norma Oficial Mexicana de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, la cual establece las medidas de cuidado y uso de animales de laboratorio con propósitos de investigación o enseñanza. De igual forma, este proyecto fue aprobado en Mayo del 2018 por la Dirección de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina de nuestra universidad, con el número de registro de proyecto 9702, el cual se apega a la Norma Técnica No. 313 para la Presentación de Proyectos e Informes Técnicos de Investigación en las Instituciones de Atención a la Salud.

6 RESULTADOS

6.1 Descelularización hepática

La perfusión fue pareja realizando los lavados a través de la vena porta y a nivel macroscópico fue evidente el cambio de coloración, que inició en las zonas más delgadas de tejido y finalizó en las más gruesas, conforme transcurrió el tiempo de lavado se obtuvo un andamiaje semitransparente en el cual era visible la red vascular, por lo que el protocolo permitió eliminar de manera eficiente el contenido celular y nuclear, lo que concuerda con estudios previos (Shupe et al., 2010; Sabetkish et al., 2015) (Figura 9 y Figura 10).



Figura 9. Apariencia macroscópica de hígado control y descelularizado. Se observa el hígado control en el lado izquierdo y el hígado descelularizado en el lado derecho, la cual evidencia macroscópicamente los cambios obtenidos posteriores a los lavados: red vascular y apariencia semitransparente.

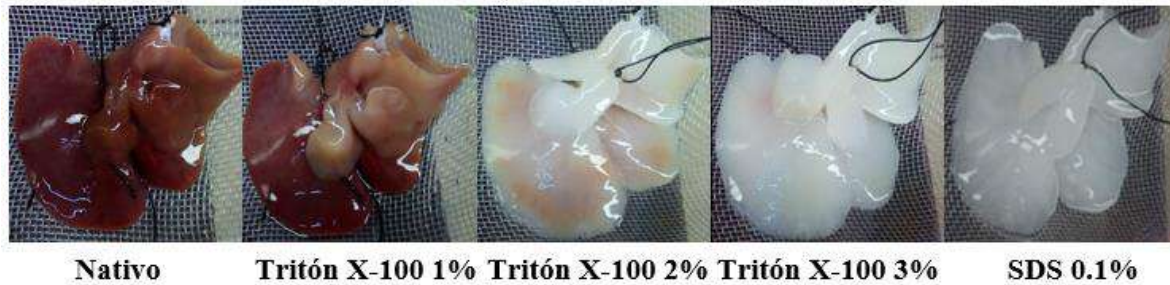


Figura 10. Proceso de descelularización hepática de rata Wistar. Observación macroscópica del proceso de perfusión hepática empleando Tritón X-100 y SDS de izquierda a derecha con duración de doce horas y media con evidencia del aclaramiento progresivo del órgano, lo que evidencia la remoción celular y nuclear así como la red vascular del órgano final.

6.2 Determinación del contenido celular residual

Se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina mediante la técnica estándar para evaluar la morfología y arquitectura tisular, que facilitaba determinar si la perfusión mediante el árbol vascular era homogénea (Pan et al., 2014; Shupe et al., 2010). Esta tinción permitió una comparación histológica que mostró la ausencia de componentes tanto nucleares como citoplásmicos en los cortes realizados en distintos lóbulos hepáticos descelularizados en comparación con los controles, por lo que se infiere que la perfusión anterógrada por vía portal fue eficiente para la entrega de detergentes en todo el árbol vascular hepático tal como lo reportan estudios con perfusión similar (Struecker et al., 2014) (Figura 11). También se realizó la tinción de TM en la que fue evidente la marca de las fibras de Colágeno en tonalidad morada, incluso periférico a las estructuras que denotan vasos sanguíneos, lo que demuestra que aunque el material celular y nuclear fue removido ésta proteína se preserva en la MEC (Zhou et al., 2015) (Figura 12).

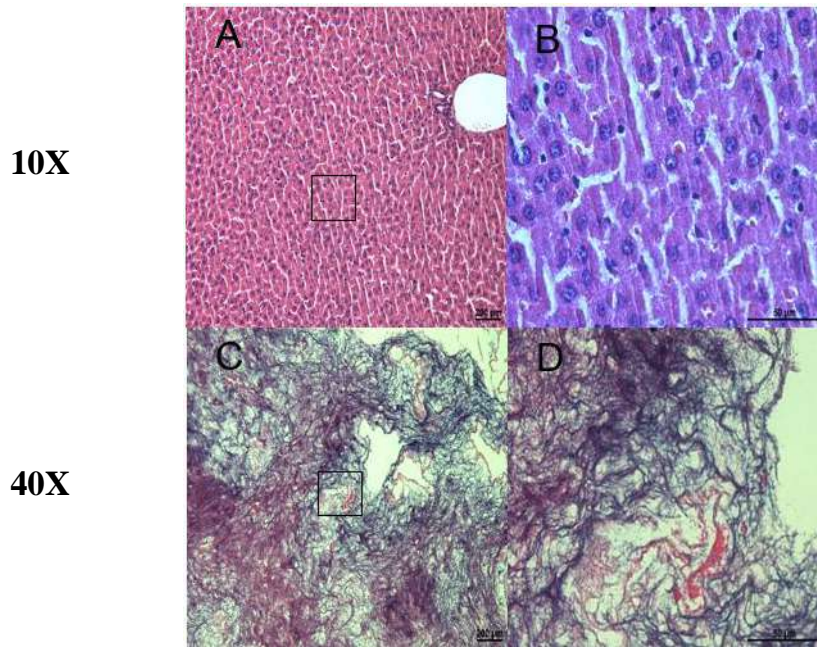


Figura 11. Hígado teñido con Hematoxilina y Eosina. A y B corresponden al hígado control, que presenta marcas circulares delimitadas en coloración azul para núcleos y en rosa marcas para los citoplasmas, C y D corresponden al hígado descelularizado sin marcas para identificar núcleos o citoplasmas.

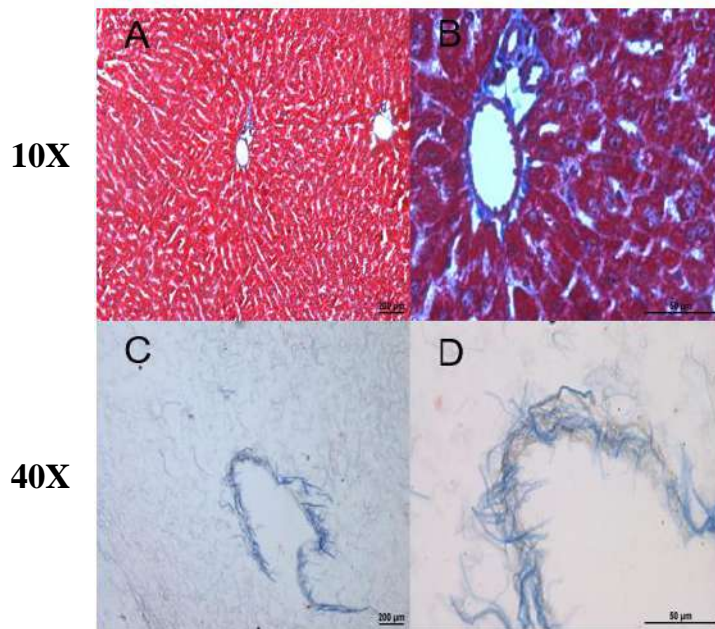


Figura 12. Hígado teñido con Tricrómico de Masson. A y B corresponden al hígado control, que presenta marcas coloración morada para identificar Colágeno, C y D corresponden al hígado descelularizado con las mismas marcas en coloración morada que identifican Colágeno posterior a los lavados.

6.3 Determinación de los componentes de la matriz

En el caso de la evaluación de los componentes de la matriz, era necesario demostrar que la técnica de lavado y los detergentes empleados para la descelularización permitían conservar los elementos de la MEC simultáneo a la eliminación de todos los materiales celulares/nucleares. Para ello se realizó simultáneamente la tinción con Isolectina IB4, Ioduro de propidio y Calcofluor Blanco en las que la observación cualitativa resultó con diferencias favorables, notables y totalmente opuestas en los marcadores de interés: en primer lugar fue posible observar el mismo patrón de marcador (azul) para la búsqueda de Glicoproteínas de la matriz tanto en los cortes de hígado descelularizado (HD) como en el control (HC), lo mismo para el marcador de células endoteliales, aunque disminuido en el hígado descelularizado, lo que denota la persistencia de los elementos proteicos tras los lavados; sin embargo en el caso el marcador para la búsqueda de ácidos nucleicos en el hígado control fue intenso, lo que cambio en el caso del hígado descelularizado al ser casi nulo y disperso, por lo que en la reconstrucción de los tres elementos en hígado control predomina la presencia de marcador de núcleos (rojo) sobre las otras dos variables, cosa que se invierte en el caso del hígado descelularizado en el cual predomina el componente proteico de las glicoproteínas (azul). Dichos resultados evidencian la eficacia en la metodología empleada en este estudio para la descelularización hepática (véase Figura 13).

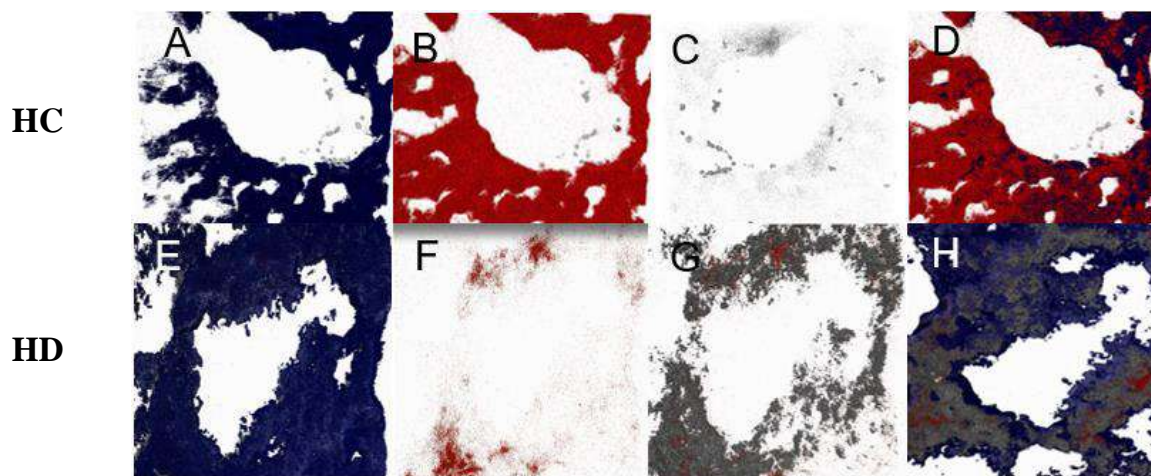


Figura 13. Microscopía confocal con tinción en hígado control e hígado descelularizado. A, B y C corresponden al hígado control tratado con marcador para glicoproteínas, ácidos nucleicos, células endoteliales respectivamente, D corresponde a una reconstrucción simultánea de dichos marcadores; E, F y G corresponden al hígado descelularizado tratado con los mismos marcadores, y H a la reconstrucción simultánea.

DISCUSIÓN

La generación de andamios acelulares surge con el objetivo que regenerar órganos debido a la escasez de donantes para los trasplantes de órganos y evaluar los efectos de algunos fármacos en patologías como el cáncer empleando en ellos algunos linajes de células madre, dadas sus propiedades de adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular ya que también proporcionan el espacio con los componentes necesarios para que estos procesos (incluso de señalización celular) se lleven a cabo al preservar, en principio, su microarquitectura (Caralt et al., 2014; Pan et al., 2014). Así, existe la posibilidad de obtener a mediano o largo plazo órganos bioartificiales capaces de llevar a cabo funciones complejas que hayan sido producidos con las células propias del paciente receptor.

Existen variables muy importantes a considerar para el desarrollo de la técnica de descellularización hepática como son la vía de perfusión, ya sea retrógrada (Baptista et al., 2011; Wang et al., 2015) o anterógrada (Baptista et al., 2011; Struecker et al., 2014; Versteegen et al., 2017), así como los agentes empleados para la eliminación del material celular y nuclear del órgano: congelación (Uygun et al., 2010), EDTA (Zhou et al., 2015), Tritón X-100 (Sabetkish et al., 2015), SDS (Nari et al., 2013) , etc., los cuales son determinantes en las características que presenta la MEC hepática obtenida. En este estudio se empleó una perfusión a través de la Vena Porta, anterógrada, simultáneo a la oclusión por ligadura de la Vena Cava Inferior, lo que favoreció la distribución de los detergentes en todo el hígado en una circulación fisiológica y la obtención de un andamio acelular y semitransparente en un tiempo de 12 y media horas y dicho periodo para la obtención de la MEC es menor en comparación con otros protocolos.

También hay que mencionar que la adición de la congelación como agente físico para interrumpir la integridad de la membrana celular fue un paso determinante en esta metodología, tal como lo menciona Saenz-Guillen y colaboradores, ya que se logró vulnerar toda estirpe tisular independientemente de sus propiedades, y esto continuado con la perfusión de Tritón X-100 y SDS que son los detergentes con los cuales se han preservado mejor los componentes de la MEC, sugiere que fue clave para obtener mejores resultados (Wu et al., 2015; Zhou et al., 2015)

Otros estudios además se basan en el uso de bombas peristálticas o de biorreactores para condicionar el medio en el que se llevaran a cabo los lavados del órgano (Mazza

et al., 2015; Shupe et al., 2010) y en este caso no solo se combinaron metodologías para mejorar la técnica, sino que también se desarrolló un sistema de perfusión a base de gravedad con la peculiaridad de que permite realizar la descelularización de manera continua de inicio a fin, con poca manipulación del órgano y en un medio lo más aséptico posible, lo que finalmente favoreció los resultados obtenidos y que fueron comprobados mediante la aplicación de la tinción de H y E, Tricrómico de Masson, Calcofluor Blanco, Isolectina IB4 y Ioduro de propidio, obteniendo un resultado de 95.97% de remoción celular y nuclear, así como persistencia de la estructura vascular y presencia de colágeno y proteoglicanos en la MEC hepática, con lo que se establece una base teórica para la generación de andamios hepáticos en la cual es posible emplear métodos más convencionales ya que dichos andamios son capaces de preservar su estructura tisular y vascular, así como la composición proteica del tejido nativo; resaltando también que en la búsqueda bibliográfica realizada no se encontraron protocolos que hayan empleado esta metodología como sistema de perfusión y en conjunto, estos resultados son la base para establecer una re- endotelización en la MEC obtenida con alta probabilidad de diferenciación y adhesión celular.

Por otra parte, es de fundamental comprender que aún quedan obstáculos por abordar, como el hecho de replicar este proceso en especies más grandes y de mayor similitud, en las cuales se puede considerar también la evaluación del sistema biliar y el estudio profundo de la integridad de la red vascular del hígado, los factores de crecimiento, las células de Kupffer y las células de Ito, entre otras. También es necesario comparar la metodología con sistemas bioartificiales, tal es el caso de un biorreactor por ser el equipo que permite la mayor similitud de un sistema natural y mediante el cual es posible limitar variables como la oxigenación y la temperatura y finalmente lo que se mencionó previamente: una vez establecidas las condiciones para la descelularización será primordial llevar a cabo una recelularización en la que habrá que definir la ruta a seguir respecto al tipo celular para tal experimento y su cantidad a emplear, la forma de perfusión de las mismas, etc., ya que solo este último paso reflejara la eficiencia y el enriquecimiento de estudios como este.

7 CONCLUSIONES

- a) La descelularización llevada a cabo por perfusión con Tritón X-100 al 1%, 2% y 3% seguido de SDS al 0.1% a través de la Vena Porta a una velocidad de

7ml/min es capaz de lograr la obtención de una MEC acelular de hígado de rata Wistar.

- b) En este estudio, la combinación de un agente físico (la congelación) con uno químico (los detergentes Tritón X-100 y SDS), permitieron la remoción del contenido celular en un 95.97%, comprobado por la tinción de Hematoxilina y Eosina así como por la tinción de Ioduro de propidio, y mejoran notablemente los tiempos de obtención de la MEC hepática.
- c) Los resultados demuestran que con esta técnica se preserva el Colágeno en la matriz extracelular descelularizada de rata Wistar, realizados mediante el uso de la tinción de Tricrómico de Masson y también se preservan los Proteoglicanos, determinados con la tinción de Calcofluor Blanco.
- d) La inmunotinción empleando Isolectina IB4 permitió elementos de células perivasculares, lo que sugiere que la triada portal conserva su estructura y es posible llevar a cabo procesos de recelularización.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdelfattah, M. R., H. Elsiesy, H. Al-Manea, and D. C. Broering. 2018. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma within the Milan criteria versus the University of California San Francisco criteria: a comparative study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 30:398. doi:10.1097/MEG.0000000000001044.
2. Baptista, P. M., M. M. Siddiqui, G. Lozier, S. R. Rodriguez, A. Atala, and S. Soker. 2011. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatol. Baltim. Md.* 53:604–617. doi:10.1002/hep.24067.
3. Barakat, O., S. Abbasi, G. Rodriguez, J. Rios, R. P. Wood, C. Ozaki, L. S. Holley, and P. K. Gauthier. 2012. Use of Decellularized Porcine Liver for Engineering Humanized Liver Organ. *J. Surg. Res.* 173:e11–e25. doi:10.1016/j.jss.2011.09.033.
4. Bates, S., H. B. Hughes, C. A. Munro, W. P. H. Thomas, D. M. MacCallum, G. Bertram, A. Atrih, M. A. J. Ferguson, A. J. P. Brown, F. C. Odds, and N. A. R. Gow. 2006. Outer Chain N-Glycans Are Required for Cell Wall Integrity

- and Virulence of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 281:90–98. doi:10.1074/jbc.M510360200.
5. Bhatia, S. N., G. H. Underhill, K. S. Zaret, and I. J. Fox. 2014. Cell and Tissue Engineering for Liver Disease. *Sci. Transl. Med.* 6:245sr2. doi:10.1126/scitranslmed.3005975.
 6. Bosman, F. T., and I. Stamenkovic. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J. Pathol.* 200:423–428. doi:10.1002/path.1437.
 7. Caralt, M., E. Velasco, A. Lanas, and P. M. Baptista. 2014. Liver bioengineering: from the stage of liver decellularized matrix to the multiple cellular actors and bioreactor special effects. *Organogenesis.* 10:250–259. doi:10.4161/org.29892.
 8. CENATRA. 2018. Estadística sobre donación y trasplantes en México. gov.mx. Available from: <http://www.gob.mx/cenatra/documentos/estadisticas-50060>
 9. Choudhury, D., H. W. Tun, T. Wang, and M. W. Naing. 2018. Organ-Derived Decellularized Extracellular Matrix: A Game Changer for Bioink Manufacturing? *Trends Biotechnol.* 36:787–805. doi:10.1016/j.tibtech.2018.03.003.
 10. Clark M. A., Jung C., and Douglas M. 2018. Reading: Cell Junctions, Biology. 2 da. Rice University. Available from: <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@10.8>.
 11. Crapo, P. M., T. W. Gilbert, and S. F. Badylak. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 32:3233–3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
 12. Escorcia Charris, E., E. J. E. Charris, and W. R. M. Balceiro. 2018. Caracterización epidemiológica y clínica de la cirrosis hepática en un centro regional del Caribe colombiano: clínica general del norte. Enero 2012 a marzo 2017. *Biociencias.* 13. doi:10.18041/2390-0512/bioc..1.2242. Available from: <http://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/2242>
 13. Fierro, N. A., K. González-Aldaco, R. Torres-Valadez, M. E. Trujillo-Trujillo, S. Roman, J. L. Trujillo-Ochoa, and A. Panduro. 2015. Spontaneous hepatitis C viral clearance and hepatitis C chronic infection are associated with distinct

- cytokine profiles in Mexican patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110:267–271. doi:10.1590/0074-02760140377.
14. Frantz, C., K. M. Stewart, and V. M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 123:4195–4200. doi:10.1242/jcs.023820.
 15. Fu, R.-H., Y.-C. Wang, S.-P. Liu, T.-R. Shih, H.-L. Lin, Y.-M. Chen, J.-H. Sung, C.-H. Lu, J.-R. Wei, Z.-W. Wang, S.-J. Huang, C.-H. Tsai, W.-C. Shyu, and S.-Z. Lin. 2014. Decellularization and Recellularization Technologies in Tissue Engineering. *Cell Transplant.* 23:621–630. doi:10.3727/096368914X678382.
 16. García Buey, L., F. González Mateos, and R. Moreno-Otero. 2012. Cirrosis hepática. *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado.* 11:625–633. doi:10.1016/S0304-5412(12)70359-1.
 17. Gilbert, T. W. 2012. Strategies for tissue and organ decellularization. *J. Cell. Biochem.* 113:2217–2222. doi:10.1002/jcb.24130.
 18. Gilbert, T. W., T. L. Sellaro, and S. F. Badylak. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 27:3675–3683. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
 19. Guyton A. 2011. *Tratado de fisiología médica.* 12a Edición. Elsevier, Barcelona, España.
 20. Hussey, G. S., J. L. Dziki, and S. F. Badylak. 2018. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat. Rev. Mater.* 3:159–173. doi:10.1038/s41578-018-0023-x.
 21. INSP. 2017. Hepatitis C: problema de salud pública y enfermedad generadora de gastos catastróficos. Available from: <https://www.insp.mx/avisos/4503-dia-mundial-hepatitis-2017.html>
 22. Jiang, W.-C., Y.-H. Cheng, M.-H. Yen, Y. Chang, V. W. Yang, and O. K. Lee. 2014. Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. *Biomaterials.* 35:3607–3617. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.01.024.
 23. KASL. 2018. KASL clinical practice guidelines for liver cirrhosis: Ascites and related complications. *Clin. Mol. Hepatol.* 24:230–277. doi:2018.24.3.230.

24. Keane, T. J., I. T. Swinehart, and S. F. Badylak. 2015. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 84:25–34. doi:10.1016/j.ymeth.2015.03.005.
25. Kojima, H., K. Yasuchika, K. Fukumitsu, T. Ishii, S. Ogiso, Y. Miyauchi, R. Yamaoka, T. Kawai, H. Katayama, E. Y. Yoshitoshi-Uebayashi, S. Kita, K. Yasuda, N. Sasaki, J. Komori, and S. Uemoto. 2018. Establishment of practical recellularized liver graft for blood perfusion using primary rat hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells. *Am. J. Transplant.* 18:1351–1359. doi:10.1111/ajt.14666.
26. Laleman, W., L. Verbeke, P. Meersseman, J. Wauters, J. van Pelt, D. Cassiman, A. Wilmer, C. Verslype, and F. Nevens. 2011. Acute-on-chronic liver failure: current concepts on definition, pathogenesis, clinical manifestations and potential therapeutic interventions. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 5:523–537; quiz 537. doi:10.1586/egh.11.47.
27. Laviña, B., M. Castro, C. Niaudet, B. Cruys, A. Álvarez-Aznar, P. Carmeliet, K. Bentley, C. Brakebusch, C. Betsholtz, and K. Gaengel. 2018. Defective endothelial cell migration in the absence of Cdc42 leads to capillary-venous malformations. *Dev. Camb. Engl.* 145. doi:10.1242/dev.161182.
28. Lee, W. M., R. T. Stravitz, and A. M. Larson. 2012. Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases position paper on acute liver failure 2011. *Hepatology.* 55:965–967. doi:10.1002/hep.25551.
29. Lefton, H. B., A. Rosa, and M. Cohen. 2009. Diagnosis and Epidemiology of Cirrhosis. *Med. Clin. North Am.* 93:787–799. doi:10.1016/j.mcna.2009.03.002.
30. Lodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscher A., Ploegh H., Amon A., and Scott M. P. 2016. *Biología Celular y Molecular*. Available from: <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/5505/Biologia-Celular-y-Molecular.html>
31. Martínez-Hernández A., and Amenta P.S. 1993. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 423:1–11.
32. Mazza, G., W. Al-Akkad, K. Rombouts, and M. Pinzani. 2018. Liver tissue engineering: From implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatol. Commun.* 2:131–141. doi:10.1002/hep4.1136.

33. Mazza, G., K. Rombouts, A. R. Hall, L. Urbani, T. V. Luong, W. Al-Akkad, L. Longato, D. Brown, P. Maghsoudlou, A. P. Dhillon, B. Fuller, B. Davidson, K. Moore, D. Dhar, P. D. Coppi, M. Malago, and M. Pinzani. 2015. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci. Rep.* 5:13079. doi:10.1038/srep13079.
34. Méndez Sánchez, N., Y. Gutiérrez Grobe, C. Tapia, N. Carlos, K. Margain, R. Arturo, and M. Uribe. 2010. Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales. *Rev. Gastroenterol. México.* 75:143–148.
35. Mendoza-Sánchez, F. 2018. Trasplante hepático en México. *Revista Mexicana de Trasplantes.* 7:6.
36. Mirmalek-Sani, S.-H., D. C. Sullivan, C. Zimmerman, T. D. Shupe, and B. E. Petersen. 2013. Immunogenicity of decellularized porcine liver for bioengineered hepatic tissue. *Am. J. Pathol.* 183:558–565. doi:10.1016/j.ajpath.2013.05.002.
37. Nari, G. A., M. Cid, R. Comín, L. Reyna, G. Juri, R. Taborda, and N. A. Salvatierra. 2013. Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers. *Rev. Espanola Enfermedades Dig. Organo Of. Soc. Espanola Patol. Dig.* 105:138–143.
38. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. 2013. *Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa.* 3.
39. Netter F. 2015. *Atlas de anatomía humana.* 6ta ed. Elsevier Masson.
40. NOM-062-ZOO-1999. Available from: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf>
41. Olivari D., Valverde M., and Gerona S. 2017. Sistema de Soporte Hepático Artificial: ¿Cuándo, a quien y por qué? Mayo 2017. 1:113:20.
42. OMS. 2017. Los datos más recientes ponen de relieve la necesidad de actuar urgentemente a nivel mundial contra las hepatitis. *World Health Organ.* Available from: <http://www.who.int/es/news-room/detail/21-04-2017-new-hepatitis-data-highlight-need-for-urgent-global-response>
43. Ott, H. C., T. S. Matthiesen, S.-K. Goh, L. D. Black, S. M. Kren, T. I. Netoff, and D. A. Taylor. 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.* 14:213–221. doi:10.1038/nm1684.

44. Pan, M. X., P. Y. Hu, Y. Cheng, L. Q. Cai, X. H. Rao, Y. Wang, and Y. Gao. 2014. An efficient method for decellularization of the rat liver. *J. Formos. Med. Assoc.* 113:680–687. doi:10.1016/j.jfma.2013.05.003.
45. Parisi, V., G. Persi, G. Pariso, C. A. Rugilo, and E. M. Gatto. 2007. Degeneración hepaticocerebral adquirida. *Med. B. Aires.* 67:62–62.
46. Park, K.-M., S.-M. Park, S.-R. Yang, S.-H. Hong, and H.-M. Woo. 2013. Preparation of immunogen-reduced and biocompatible extracellular matrices from porcine liver. *J. Biosci. Bioeng.* 115:207–215. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.08.023.
47. Poel, W. E. 1948. Preparation of Acellular Homogenates From Muscle Samples. *Science.* 108:390–391. doi:10.1126/science.108.2806.390-a.
48. Ramírez-Palma, A., E. Muñoz-Hernández, and A. Melchor-López. 2016. Comparación de la administración de lactulosa y metronidazol vs lactulosa o metronidazol en el tratamiento de la encefalopatía hepática aguda. *Med. Interna México.* 32:420–425.
49. Ramos-Lopez, O., E. Martinez-Lopez, S. Roman, N. A. Fierro, and A. Panduro. 2015. Genetic, metabolic and environmental factors involved in the development of liver cirrhosis in Mexico. *World J. Gastroenterol.* 21:11552–11566. doi:10.3748/wjg.v21.i41.11552.
50. Roman, S., E. A. Zepeda-Carrillo, L. E. Moreno-Luna, and A. Panduro. 2013. Alcoholism and liver disease in Mexico: Genetic and environmental factors. *World J. Gastroenterol. WJG.* 19:7972–7982. doi:10.3748/wjg.v19.i44.7972.
51. Sabetkish, S., A.-M. Kajbafzadeh, N. Sabetkish, R. Khorramirouz, A. Akbarzadeh, S. L. Seyedian, P. Pasalar, S. Orangian, R. S. H. Beigi, Z. Aryan, H. Akbari, and S. M. Tavangar. 2015. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 103:1498–1508. doi:10.1002/jbm.a.35291.
52. Saenz Guillen C., Martín Duque M. P., and Martínez de la Fuente J. 2011. Funcionalización de matriz hepática para su recellularización en un biorreactor y su trasplante in vivo. Zaragoza, Madrid, España. Available from: <https://zaguan.unizar.es/record/6129>

53. Scarritt, M. E., N. C. Pashos, and B. A. Bunnell. 2015. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:43. doi:10.3389/fbioe.2015.00043.
54. Shirakigawa, N., H. Ijima, and T. Takei. 2012. Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 114:546–551. doi:10.1016/j.jbiosc.2012.05.022.
55. Shupe, T., M. Williams, A. Brown, B. Willenberg, and B. E. Petersen. 2010. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis.* 6:134–136.
56. SSA, 2015. Informe sobre la Salud de los Mexicanos 2015. gov.mx. Available from: <http://www.gob.mx/salud/documentos/informe-sobre-la-salud-de-los-mexicanos-2015>
57. Stracciari, A., K. Mattarozzi, R. D'Alessandro, E. Baldin, and M. Guarino. 2008. Cognitive functioning in chronic acquired hepatocerebral degeneration. *Metab. Brain Dis.* 23:155. doi:10.1007/s11011-008-9088-3.
58. Struecker, B., A. Butter, K. Hillebrandt, D. Polenz, A. Reutzel-Selke, P. Tang, S. Lippert, A. Leder, S. Rohn, D. Geisel, T. Denecke, K. Aliyev, K. Jöhrens, N. Raschzok, P. Neuhaus, J. Pratschke, and I. M. Sauer. 2014. Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* doi:10.1002/term.1948.
59. Tajima, K., H. Yagi, and Y. Kitagawa. 2018. Human-Scale Liver Harvest and Decellularization for Preclinical Research. SpringerLink. 1–9. doi:10.1007/7651_2018_195.
60. Torre, A. 2014. Complicaciones de la cirrosis hepática: ascitis, encefalopatía, síndrome hepatorenal y estado nutricional. *Rev Gastroenterol Mex.* 79:5–7.
61. Torre-Delgadillo, A. 2011. Encefalopatía hepática. *Rev. Gastroenterol. México.* 76. Available from: <http://www.revistagastroenterologiamexico.org/es/encefalopatia-hepatica/articulo/X0375090611252985/>
62. Uygun, B. E., A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M.-L. Izamis, M. A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, M. L. Yarmush, and K. Uygun. 2010. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med.* 16:814–820. doi:10.1038/nm.2170.

63. Verstegen, M. M. A., J. Willemse, S. van den Hoek, G.-J. Kremers, T. M. Luidier, N. A. van Huizen, F. E. J. A. Willemsen, H. J. Metselaar, J. N. M. IJzermans, L. J. W. van der Laan, and J. de Jonge. 2017. Decellularization of Whole Human Liver Grafts Using Controlled Perfusion for Transplantable Organ Bioscaffolds. *Stem Cells Dev.* 26:1304–1315. doi:10.1089/scd.2017.0095.
64. Villalobos Pérez J., Olivera Martínez M., and Valdovinos Díaz M. 2006. *Gastroenterología. Quinta Edición.* Mendez Editores., Mexico, D. F.
65. Vorotnikova, E., D. McIntosh, A. Dewilde, J. Zhang, J. E. Reing, L. Zhang, K. Cordero, K. Bedelbaeva, D. Gourevitch, E. Heber-Katz, S. F. Badylak, and S. J. Braunhut. 2010. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 29:690–700. doi:10.1016/j.matbio.2010.08.007.
66. Wang, Y., J. Bao, Q. Wu, Y. Zhou, Y. Li, X. Wu, Y. Shi, L. Li, and H. Bu. 2015. Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation.* 22:48–61. doi:10.1111/xen.12141.
67. Wlodzimirow, K. A., S. Eslami, A. Abu-Hanna, M. Nieuwoudt, and R. A. F. M. Chamuleau. 2013. A systematic review on prognostic indicators of acute on chronic liver failure and their predictive value for mortality. *Liver Int.* 33:40–52. doi:10.1111/j.1478-3231.2012.02790.x.
68. Wu, Q., J. Bao, Y. Zhou, Y. Wang, Z. Du, Y. Shi, L. Li, and H. Bu. 2015. Optimizing Perfusion-Decellularization Methods of Porcine Livers for Clinical-Scale Whole-Organ Bioengineering. *BioMed Res. Int.* 2015. doi:10.1155/2015/785474. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4396818/>
69. Yagi, H., K. Fukumitsu, K. Fukuda, M. Kitago, M. Shinoda, H. Obara, O. Itano, S. Kawachi, M. Tanabe, G. M. Coudriet, J. D. Piganelli, T. W. Gilbert, A. Soto-Gutierrez, and Y. Kitagawa. 2013. Human-Scale Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation: A Regenerative Medicine Approach. *Cell Transplant.* 22:231–242. doi:10.3727/096368912X654939.
70. Zhang, N., Y. Fan, C. Li, Q. Wang, N. Leksawasdi, F. Li, and S. Wang. 2018. Cell permeability and nuclear DNA staining by propidium iodide in

basidiomycetous yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102:4183–4191. doi:10.1007/s00253-018-8906-8.

71. Zhou, P., N. Lessa, D. C. Estrada, E. B. Severson, S. Lingala, M. A. Zern, J. A. Nolte, and J. Wu. 2011. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transpl.* 17:418–427. doi:10.1002/lt.22270.
72. Zhou, Q., L. Li, and J. Li. 2015. Stem cells with decellularized liver scaffolds in liver regeneration and their potential clinical applications. *Liver Int.* 35:687–694. doi:10.1111/liv.12581.

9 ANEXOS

9.1 Anexo 1. Abreviaturas

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ARN. Ácido ribonucleico

AGL. Ácidos grasos libres

AH. Arteria hepática

APO-B. Apolipoproteína b.

CAM. Moléculas de adhesión celular

CCL8. Quimiocina-ligando-8

CE. Células estrelladas

CE. Células de ito

CENATRA. Centro Nacional de Trasplantes

CONACYT. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DAPI. 4',6-Diamino-2-fenilindol

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA. Ácido agtazic

EH. Encefalopatía hepática

EHNA. Esteatohepatitis no alcohólica

ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

ERO. Especies reactivas de oxígeno

gr. Gramos

GAG. Glucosaminoglicanos

HC. Hígado control

HD. Hígado descelularizado

HGNA. Hígado graso no alcohólico

H y E. Hematoxilina y Eosina

IRS-1. Receptor de insulina 1

IRS-2. Receptor de insulina 2

IL1- α . Interleucina 1-alfa

IL-8. Interleucina 8

IL-13. Interleucina 13

IL-15. Interleucina 15

INBIB. Instituto Nacional de Biomedicina e Imagen Biomédica

INSP. Instituto Nacional de Salud Pública

IP. Intraperitoneal

KASL. Asociación Coreana para el Estudio del Hígado
LDLr. Receptor de lípidos de baja densidad
LSM. Microscopio de escaneo laser
MEC. Matriz extracelular
MF. Miofibroblastos
OMS. Organización Mundial de la Salud
PFA. Paraformaldehído
PBS. Solución salina amortiguada por fosfatos
PBST. Solución salina amortiguada con fosfatos y Tween
PNPC. Programa Nacional de Posgrados de Calidad
RA. Receptores de adhesión
SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS. Duodecilsulfato de sodio
SSA. Secretaría de Salud
SP. Sistema de perfusión
TB. Tuberculosis
TGF- α . Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- β . Factor de crecimiento transformante beta
TGF- β 1. Factor de crecimiento transformante beta-1
TM. Tricrómico de Masson
UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México
VP. Vena porta
VCI. Vena cava inferior
VHB. Virus de hepatitis B
VHC. Virus de hepatitis C
VIH. Virus de inmunodeficiencia humana
mg. Miligramos
ml. Mililitros
nm. Nanómetro
 μ g. Microgramos
 μ l. Microlitros
 μ m. Micrómetro
%. Porcentaje

9.2 Anexo 2. Carta de Aprobación de los Comités de Bioética e Investigación



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA COMITÉ DE BIOÉTICA
FACULTAD DE MEDICINA
CONBIOETICA22CEI00620140930

Santiago de Querétaro 08 junio de 2017.

LIC. MED. GRAL. NELLY ANGELICA MORALES GUERRERO
MAESTRIA EN CIENCIAS EN NEUROMETABILISMO
DR. EN C. HEBERT LUIS HERNÁNDEZ MONTIEL
PROFESOR
PRESENTE

Por este conducto le informamos que su protocolo de investigación titulado "GENERACIÓN DE UN ANDAMIAJE TRIDIMENSIONAL DE MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DECELULARIZACIÓN PULSÁTIL EN RATAS WISTAR", Numero de registro: 03-06/04/2017, fue revisado y discutido en la sesión del 1 de junio de 2017 del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UAQ. El dictamen del protocolo fue de APROBADO.

El dictamen se realizó estrictamente considerando los principios éticos de autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia. Por tratarse de un protocolo en animales de experimentación se veló por el bienestar animal. La evaluación de la viabilidad y calidad técnica y científica del protocolo de investigación no son responsabilidad del Comité de Bioética.

Sin otro particular enviamos un cordial saludo.

"POR LA VIDA Y LA SALUD"

ATENTAMENTE



Dr. Pablo García Solís
Presidente CBFMUAQ

Dra. Carmen Aburto Fernández
Secretaria CBFMUAQ

Ccp Archive

Clave! No. 200 Prados de la Capilla, Santiago de Querétaro, México C.P. 76170
Tels. 01 (442) 192-12 00 Ext. 6706 y 192-12 73



Universidad Autónoma de Querétaro
 Dirección de Investigación y Posgrado
 Registro del Protocolo de Investigación del Estudiante de Posgrado

Espacio exclusivo para la Dirección

No. Registro de Proyecto*: 9702
 Fecha de Registro*: 14 JUNIO 2018
 Fecha de inicio de proyecto: 25/Julio/2018
 Fecha de termino de proyecto: Julio/2018

1. Datos del solicitante:

No. de expediente: 127892
 Nombre: Morales Guerrero Nelly Angélica
 Apellido Paterno: Guerrero Apellido Materno: Nombre(s): Nelly Angélica
 Dirección: Playa Cortes 130 Desarrollo San Pablo 76800
 Calle y número: Colonia: C.P.:
 Querétaro (045) 44 2155 38 70
 Estado: Teléfono (incluír lada)



2. Datos del proyecto:

Facultad: Facultad de Medicina

(Escribir el nombre completo del posgrado en el que está inscrito)

Especialidad en: _____

Maestría en: Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

Doctorado en: _____

Tema específico del proyecto: _____

Generación de un andamiaje tridimensional de matriz extracelular hepática
 mediante la técnica de descelularización en ratas Wistar

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel
 Director de Tesis¹

Dr. Juan Carlos Solís Sáinz
 Jefe de Investigación y Posgrado de la Facultad¹

Lic. Med. Gral. Morales Guerrero Nelly Angélica
 Alumno¹

Dra. Guadalupe Zaldivar Lelo de Larrea
 Director de Facultad¹

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
 Director de Investigación y Posgrado¹

9.3 Anexo 3. Videos de reconstrucción hepática confocal

1. Tinción e inmunotinción de lóbulo hepático descelularizado

Imágenes de un corte de lóbulo hepático descelularizado teñido con Isolectin IB4 (gris) con afinidad para las células endoteliales perivasculares, Calcofluor White (azul) que identifica glicoproteínas y Ioduro de propidio (rojo) para marcar la cromatina nuclear, las cuales fueron se obtuvieron mediante microscopia confocal que fueron en primer lugar representadas en cortes individuales en plano Z, para luego mezclarlas y procesadas en una representación tridimensional. Se observa claramente el predominio del componente proteico de la MEC acelular, identificado en los Proteoglicanos.

[Video 1, Microscopía confocal hígado descelularizado.mp4](#)

2. Tinción e inmunotinción de lóbulo hepático control

Imágenes de un corte de lóbulo hepático control teñido con Isolectin IB4 (gris) con afinidad para las células endoteliales perivasculares, Calcofluor White (azul) que identifica glicoproteínas y Ioduro de propidio (rojo) para marcar la cromatina nuclear, que se obtuvieron mediante microscopia confocal y fueron en primer lugar representadas en cortes individuales en plano Z, para luego ser mezcladas y procesadas en una representación tridimensional. Se observa claramente el predominio del componente celular que marca los núcleos sobre el proteico de la matriz.

[Video 2, Microscopía confocal hígado control.mp4](#)