



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

"Estandarización y evaluación del método para la descelerización de riñón de rata *Wistar*"

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias en Neurometabolismo.

Presenta:

Susan Karen Pérez Salazar.

Dirigido por:

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel.

Co-Director:

M. en C. Carlo Lozano Flores.

Querétaro, Qro., a 09 de septiembre de 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

"Estandarización y evaluación del método para la
descelularización de riñón de rata *Wistar*."

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias en Neurometabolismo.

Presenta:

Susan Karen Pérez Salazar.

Dirigido por:

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel.

Co-Director:

M. en C. Carlos Lozano Flores.

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

Presidente

Dr. Juan Carlos Solís Sainz

Vocal

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga

Suplente

M. en C. Carlos Lozano Flores

Secretario

Dr. Pablo García Solís

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario, México.

Dedicatorias

“El inicio siempre es fácil pero el camino es largo y tortuoso, sin embargo la constancia, la determinación y la perseverancia son la clave para concluir con satisfacción lo propuesto”.

La oportunidad de realizar una maestría me dio otra concepción de la vida, me hizo observar mis deficiencias así como mis capacidades de estudiante y de ser humano.

El presente trabajo está dedicado a todas las personas que creyeron en mí, de las cuales aprendí que siempre es necesario dar un poco más para conseguir los objetivos propuestos y que no importa si uno se desmorona lo importante es volver a surgir.

Alguna vez leí en una de las tesis que me sirvieron de guía, una dedicatoria que mencionaba, lo remarcable y conmemorable del trabajo de tesis, del esfuerzo y amor con el que se realizan, porque de tras de estas existen caídas, frustraciones e impotencias, no solo personales, si no también externas.

Es satisfactorio realizar un proyecto de investigación y generar conocimiento pero lo verdaderamente importante es no claudicar, confiar en nuestros colegas, en nuestros directores, co-directores, técnicos de laboratorio y profesores docentes, porque ellos también forman parte de mis logros.

Dedico esta tesis a mi familia, principalmente a mi padre y madre que me dieron la vida y que siempre me procuraron, a mis hermanos Gerardo y Nataly. También está dedicada a mi madrina Carmen que siempre ha creído en mí y que desde siempre la he querido y admirado mucho, a mi tío Heriberto que está en EUA, al que quiero infinitamente y que me ayudo a salir adelante.

Agradecimientos

Este proyecto se realizó gracias al apoyo brindado por CONACYT, así como también, al Programa de Maestría en Ciencias en Neurometabolismo de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, al fondo mixto de Querétaro Qro-2011-C01-164401 y al Instituto de Neurobiología de la UNAM por parte de la Dra. Dra. Ericka Alejandra de los Ríos Arellano del Área de Histología de la Unidad de Microscopía, el Dr. Alfredo Varela Echavarría y el Dr. Carlos Lozano Flores del Laboratorio A-03.

A mi director de tesis el Dr. Hebert Luis Hernández Montiel agradezco la gran oportunidad, el apoyo, la confianza y disposición que me brindó tras haber formado parte de su grupo de investigación, a Nelly Angélica y Alfonso, integrantes de mi equipo de investigación. Nelly infinitas gracias por haberte preocupado por mí, por tus consejos y por haberme instruido y acompañado en las técnicas quirúrgicas, eres una excelente maestra. Alfonso gracias por apoyarme con las dudas que me surgían respecto a los protocolos utilizados.

Dr. Carlos Lozano Flores, gracias por la disposición de tiempo durante mi estancia en su laboratorio al instruirme con las extracciones del DNA.

Dra. Ericka Alejandra de los Ríos Arellano, siempre le estaré infinitamente agradecida por la oportunidad de estar en su laboratorio y enseñarme a realizar las tinciones histológicas realizadas en este trabajo de tesis, por el conocimiento brindado y los consejos tanto profesionales como personales, gracias a su apoyo el finalizar esta tesis fue posible.

Dra. Carmen Mejía, cuando llegue a Querétaro a realizar mis estudios de maestría su grupo de investigación pasó a ser mi segunda familia, me llevó ese bonito recuerdo, además, agradezco el conocimiento científico, el tiempo, los consejos, la

comprensión y el cariño brindado. Aprendí mucho de usted tanto a nivel profesional como personal. Siempre la tendré muy presente.

Dra. Haydé muchísimas gracias por sus palabras de apoyo y de entusiasmo cuando más las necesitaba. Dra. Gabriela Hernández, gracias por su tiempo y confianza depositada en mí.

Dra. Villagrán, gracias por la confianza, el apoyo académico y personal que me brindo durante la estancia en el laboratorio, por facilitarme los medios para trabajar en los días de desvelo y los buenos deseos para la conclusión de este proyecto.

Dirección General de Bibliotecas de la UAG

Índice

I.	Introducción.....	1
1.1	Trasplante.....	1
1.2	Factores de riesgo asociados al trasplante de órganos.....	2
1.3	Incidencia mundial de trasplante renal.....	3
1.4	Incidencia de trasplante renal en México.....	3
II.	Antecedentes.....	4
2.1	Sistema urinario.....	4
2.2	Histología de la nefrona.....	8
2.3	Vascularización renal.....	13
2.4	Vasos linfáticos del riñón.....	15
2.5	Inervación renal.....	16
2.6	Origen embriológico.....	16
2.7	Fisiología renal.....	17
2.8	Insuficiencia renal crónica.....	21
2.9	Trasplante renal.....	22
2.10	Matriz extracelular.....	25
2.10.1	Composición de la MEC.....	26
2.10.2	Colágenos.....	27
2.10.3	Glucosaminoglicanos.....	28
2.10.4	Proteoglicanos.....	30
2.10.5	Glucoproteínas.....	33
2.10.6	Fibronectinas.....	33
2.10.7	Lamininas.....	34
2.10.8	Integrinas.....	34
2.11	Adhesión celular.....	35
2.12	Composición de la matriz extracelular renal.....	35
2.13	Descelularización.....	36

2.14	Descelularización renal	37
2.15	Recelularización	41
III.	Hipótesis	42
IV.	Objetivos	42
4.1	Objetivo general	42
4.2	Objetivos específicos	42
V.	Materiales y métodos	43
VI.	Resultados y discusión	52
6.1	Descelularización	52
6.2	Tinciones histológicas	56
6.3	Análisis de imagen por ImageJ	62
6.4	Tinción DAPI	66
6.5	Cuantificación de DNA celular	72
6.6	Discusión	73
VII.	Conclusiones	77
VIII.	Bibliografía	78
IX.	Anexos 86	
9.1	Aprobación comité de Bioética.	86
9.2	Registro del protocolo de Investigación	87
9.3	Protocolo de tinción histológica de HE	88
9.4	Protocolo de tinción histológica Tricrómica de Masson	91
9.5	Protocolo de tinción por fluorescencia DAPI	95
9.6	Protocolo de extracción de DNA	98

Índice de cuadros

<i>Cuadro 2. 1 Comparativo de técnicas de descelularización renal.</i>	<i>38</i>
<i>Cuadro 2. 2 Comparación de técnicas de descelularización renal (Continuación).</i>	<i>39</i>
<i>Cuadro 2. 3 Comparación de técnicas de descelularización renal (Continuación).</i>	<i>40</i>
<i>Cuadro 2. 4 Compilación del Time lapse de las descelularizaciones piloto.</i>	<i>53</i>
<i>Cuadro 2. 5 Compilación del Time lapse de las descelularizaciones.</i>	<i>54</i>
<i>Cuadro 2. 6 Compilación del Time lapse de las descelularizaciones (Continuación).</i>	<i>55</i>
<i>Cuadro 2. 7 Cuantificación de núcleos presentes en las tinciones histológicas de HE.</i>	<i>64</i>

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Índice de figuras

<i>Figura 2. 1 Diagrama anatómico del riñón.</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2. 2 Estructura de la nefrona.</i>	<i>7</i>
<i>Figura 2. 3 Estructura de un corpúsculo renal.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2. 4 Estructura de los capilares glomerulares y los podocitos.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 2. 5 Esquema de la disposición espacial de los componentes del glomérulo renal.</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2. 6 Esquemización de la vascularización de la nefrona en la pirámide renal.</i>	<i>13</i>
<i>Figura 2. 7 Irrigación en la médula renal.</i>	<i>15</i>

Dirección General de Bibliotecas de la UAO

Índice de Gráficos

<i>Gráfico 1. Contabilización celular a objetivo de 10X y 40X de los cortes histológicos teñidos con HE.</i>	<i>65</i>
<i>Gráfico 2. Cuantificación de núcleos teñidos por inmunofluorescencia DAPI.</i>	<i>70</i>
<i>Gráfico 3. Cuantificación del DNA celular.....</i>	<i>72</i>

Índice de imágenes

<i>Imagen 1.- Time lapse de la primera descelularización piloto.</i>	<i>53</i>
<i>Imagen 2.- Time lapse de la segunda descelularización piloto.....</i>	<i>53</i>
<i>Imagen 3.- Time lapse de la primera Descelularización.</i>	<i>54</i>
<i>Imagen 4.- Time lapse de la segunda Descelularización.</i>	<i>54</i>
<i>Imagen 5.- Time lapse de la tercera Descelularización.</i>	<i>55</i>
<i>Imagen 6.- Tinción de hematoxilina-eosina riñón del riñón control y del riñón descelularizado. 4X y10X.....</i>	<i>57</i>
<i>Imagen 7.- Glomérulo teñido con HE. 40X.....</i>	<i>58</i>
<i>Imagen 8.- Tinción Tricrómica de Masson riñón control y riñón descelularizado. 4X y 10X.....</i>	<i>59</i>
<i>Imagen 9.- Tinción Tricrómica de Masson 10X.....</i>	<i>60</i>
<i>Imagen 10.- Glomérulo teñido con Tricrómica de Masson acercamiento de 10X a 40.</i>	<i>61</i>
<i>Imagen 11.- Análisis de imagen por ImageJ del riñón control, 40X.....</i>	<i>62</i>
<i>Imagen 12.- Análisis de imagen por ImageJ del riñón descelularizado, 40X.</i>	<i>63</i>
<i>Imagen 13.- Inmunofluorescencia DAPI de la médula renal.....</i>	<i>66</i>
<i>Imagen 14.- Inmunofluorescencia DAPI de la corteza renal.....</i>	<i>67</i>
<i>Imagen 15 Máscara binaria de la imagen de tinción DAPI de los núcleos celulares.....</i>	<i>68</i>
<i>Imagen 16 Filtración por área determinada de núcleos celulares y su cuantificación.....</i>	<i>69</i>

Abreviaturas

Å	Angstrom
ADH	Hormona antidiurética
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DM	Diabetes mellitus
ECT	Enfermedad renal crónica
GAG	Glucosaminoglicanos
HE	Hematoxilina-eosina
HTA	Hipertensión arterial
IRC	Insuficiencia renal crónica
MEC	Matriz Extracelular
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TFG	Tasa de filtración glomerular

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Resumen

El trasplante renal es un procedimiento quirúrgico necesario cuando existe una insuficiencia renal crónica terminal (Crapo, Gilbert, and Badylak, 2011). Este padecimiento impacta de manera sistémica al organismo, ya que en el riñón se lleva a cabo el proceso de filtración sanguínea para la eliminación de los productos metabólicos de desecho, fármacos y sustancias residuales a través de la orina. A su vez, se regula el equilibrio hidroelectrolítico, se mantiene la homeostasis, la presión arterial y la osmolaridad sanguínea. Además, los riñones participan en el metabolismo del calcitriol y la eritropoyetina, hormonas que median el metabolismo de la vitamina D y la eritropoyesis (Levy, Stanton, and Koepfen 2006; Ross et al., 2009).

No obstante, existen dos factores principales que limitan los trasplantes, el primero es la disponibilidad del órgano y el segundo, la incompatibilidad o rechazo inmunológico (Crapo et al., 2011). Por este motivo, se están desarrollando diversas técnicas para este problema, como las técnicas de descélularización y recélularización, cuyo objetivo radica en la obtención de la matriz extracelular (**MEC**) con una arquitectura conservada y completa, para posteriormente, recélularizarla (Ross et al., 2009). Así, las técnicas de descélularización permite la obtención de la MEC de órganos complejos descélularizados, conservando la funcionalidad de la MEC al permitir la adhesión, migración, proliferación, diferenciación y regulación de la señalización celular (Zambon et al., 2014).

En el Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular de la Facultad de Medicina de la UAQ, se han venido desarrollando técnicas para lograr la descélularización de órganos completos, obteniendo a la fecha, MEC acélular de hígado y corazón. El riñón, al constituirse como el órgano con la mayor demanda para trasplantes, justifica el desarrollo del presente proyecto de investigación, pretendiendo estandarizar el proceso de descélularización renal. En el presente trabajo, se utilizaron ratas Wistar macho, con un peso aproximado de 380 g. las cuales fueron anestesiadas y posteriormente, sacrificadas para la extracción de ambos riñones. Posteriormente, y con el fin de descélularizar el órgano completo, se realizaron perfusiones utilizando detergentes iónicos y no iónicos para solubilizar los componentes celulares, a fin de eliminarlos. Para determinar la eficiencia de la técnica, se realizaron las siguientes evaluaciones: tinción con hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson, fluorescencia DAPI y la extracción de DNA. Los resultados mostraron que en la zona de la médula renal la descélularización es eficiente, no obstante para la zona de la corteza renal la descélularización es parcial, por lo que se propone optimizar la técnica con tiempos de perfusión más prolongados.

Abstract

Kidney transplantation is a necessary surgical procedure as a treatment when there is terminal renal failure (Crapo et al., 2011). End-stage renal disease condition impacts systemically to the organism. The kidney is a highly complex organ since in it the blood filtration process is carried out, through which elimination of metabolic waste products, drugs and residual substances in the urine. With this is regulates the hydroelectrolytic equilibrium and keep homeostasis, blood pressure and blood osmolarity. Furthermore, kidney as an endocrine organ metabolisms calcitriol and erythropoietin, hormones that regulates the metabolism to vitamin D and erythropoiesis (Levy et al. 2006; Ross et al., 2009). Nevertheless, there are two factors that limited transplants, first there are insufficient kidneys available and second, the incompatibility (Crapo et al., 2011). For these reasons have been development decellularization and recellularization techniques, that aim is focus to the obtaining of extracellular matrix (**MEC**) complete and conserved architecture so then, it could be recellularized then (Ross et al., 2009). Thereby, could be obtained decellularized whole organs and keep preserving the integrity and bioactivity in the MEC to promotes processes as adhesion, migration, proliferation, differentiation and the regulating of cellular signalization (Zambon et al., 2014).

In the Neurobiology laboratory and Bioengineering of Medicine School of UAQ, it has been developed process to getting the MEC from whole organs decellularized as liver and heart. The kidney being the organ with the highest demand transplanting that justifies the aim of present project, pretending to standardize the process of renal decellularization.

We used Wistar male rats, weight 380 g. Kidneys were obtained of anesthetized animals after to toe-pinch test. Then by an incision was done a thoracotomy and is exposed heart for heparinized systemically, exsanguination, cannulated the kidneys and removals. Thereafter, to begin renal descclularización it washed with ionic and non-ionics detergents. The aim is solubilization of membranes and eliminated cellular components. To determination the efficiently of the technique, it was counted the number of residuals cells by histological staining hematoxylin-eosin, the presence of collagen by Masson's tricromic and the presence of nuclei by DAPI, moreover it was quantified DNA.

I. Introducción.

1.1 Trasplante.

Los trasplantes de órganos son procedimientos quirúrgicos que se realizan cuando otros tratamientos no han funcionado y el órgano o tejido se encuentra en riesgo de perder su funcionalidad total (Yamanaka and Yokoo, 2015).

El procedimiento se lleva a cabo a través de una extirpación quirúrgica de un órgano, tejido o producto sanguíneo perteneciente a un donador y el cual será colocado en un receptor (Brigham, 2009). Sin embargo, existe un impedimento biológico que repercute en el éxito de un trasplante: la reacción de rechazo inmunológico, generada como resultado de las diferencias genéticas entre el donador y el receptor. Cuando son los órganos vitales los que se encuentran afectados, si el trasplante no es realizado a tiempo, provoca un aumento en la tasa de mortalidad, aunado al inherente tiempo de espera por falta de donadores (Way, 1989).

Existen, cuatro tipos de trasplante clasificados con base al origen del órgano, tejido o producto sanguíneo y la relación generada entre el receptor y el donador, entre ellos se encuentran: 1.- Autoinjerto, donde el mismo individuo desempeña ambos roles, es decir, es tanto el donador como el receptor; 2.- Isoinjerto o injerto singénico en el que existe una genética idéntica debido son gemelos; 3.- Aloinjerto u homoinjerto en el cual no existe tal relación genética, sin embargo, ambos individuos son pertenecientes a la misma especie; 4.- Xenoinjerto o heteroinjerto este se realiza entre individuos de diferentes especies, este último ha sido utilizado principalmente en procedimientos experimentales (Brigham, 2009).

Actualmente la obtención de tejidos u órganos para el trasplante ha adquirido gran trascendencia en el campo de la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos;

cuyos objetivos radican en disminuir o eliminar la inmunosupresión y recuperar la funcionalidad sistémica que el órgano aporta, por lo que se ha impulsado el desarrollo de técnicas innovadoras para la reconstrucción y el restablecimiento funcional (Ramalingam et al., 2013).

Por una parte, la medicina regenerativa depende de los procesos naturales del cuerpo para la formación de nuevos tejidos después de haber suministrado células, andamios o biomoléculas exógenas y por otra, la ingeniería de tejidos se basa en el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de un tejido, por lo que, combina el uso de células, andamios y factores bioactivos con estrategias dirigidas hacia la formación *in vitro* de nuevos tejidos y órganos (Cassidy 2015; Deng and Kuiper 2018; Ramalingam et al., 2013).

Sin embargo, aún existen ciertas limitaciones que distan el uso de órganos bioartificiales completos en la práctica clínica (Cuenca Tudela, Lucea Aznar, and García-Sánchez, 2015).

Por lo tanto, los trasplantes así como las técnicas para la reconstrucción de órganos siguen siendo un reto para prolongar la supervivencia de los pacientes e inherentemente, mejorar su calidad de vida (Way, 1989).

1.2 Factores de riesgo asociados al trasplante de órganos.

El paciente que amerita un trasplante, es aquel cuyo órgano o tejido se encuentra comprometido, debido a una insuficiencia funcional. Entre los factores de riesgo se encuentran las complicaciones asociadas a ciertas enfermedades, entre las cuales se encuentran: la diabetes mellitus, la obesidad, la hipertensión arterial, los tumores, etc.; estas generan paulatinamente lesiones en el órgano o tejido dando lugar a sus complicaciones (Way, 1989).

1. 3 Incidencia mundial de trasplante renal.

A nivel mundial el trasplante es un procedimiento quirúrgico de alta demanda, que tiene un incremento constante de aproximadamente 7.25% anual. Entre los órganos más demandados se encuentran los riñones, seguido por el hígado, el corazón, los pulmones, el páncreas, las corneas y el intestino delgado (Pippias et al. 2017; WHO and ONT, 2016).

En el año 2017 se realizaron aproximadamente 51,193 trasplantes de los cuales 33,908 fueron de riñón (CO&ONT, 2019), no obstante la demanda total sólo para riñón, asciende anualmente a 800,000 (WHO, 2018). Por lo que, representa un problema de salud pública, considerando además el tratamiento postquirúrgico y el monitoreo periódico del paciente.

1. 4 Incidencia de trasplante renal en México.

Actualmente, en México existe una demanda creciente del trasplante de órganos. Anualmente, para poder cubrir la demanda, se requerirían de aproximadamente 15,939 riñones, 37 corazones, 5,988 córneas, 311 hígados y 2 pulmones (Secretaría de Salud, 2019). Sin embargo, el número de donantes es reducido, lo que provoca que los tiempos de espera sean considerablemente largos.

En el año 2018, de los 15,072 pacientes en lista de espera, sólo se realizaron 3,116 trasplantes de riñón. Es decir sólo el 20.7% fue candidato a un trasplante (Secretaría de Salud, 2018). Para el año 2019, se realizaron 2,939 trasplantes de riñón de un total de 17,069 riñones del cual solo se cubrió el 17.2% de la demanda (CENATRA, 2019). Al realizar una comparativa entre el año 2018 y 2019, se obtiene un aumento en la demanda de trasplante renal del 13.2% respecto al año 2018 con una disminución del 5.8% de la tasa de donación.

II. Antecedentes.

2.1 Sistema urinario.

Los riñones forman parte del sistema urinario y tienen una función endocrina relevante (Porth, 2011), que junto con los sistemas cardiovascular y nervioso regulan el volumen y la composición de los líquidos corporales (Levy et al., 2006). Los riñones contribuyen a mantener la homeostasis, regulando el equilibrio hidroelectrolítico, la presión y osmolaridad sanguínea, a través de la producción de orina, donde se excretan los productos metabólicos de desecho, fármacos y sustancias residuales que podrían resultar tóxicas si no fueran eliminadas del organismo (Levy et al. 2006; Porth 2011; Tresguerres, 1992).

En promedio, los riñones filtran al día, alrededor de 200 L de sangre y producen 1.5 L de orina (Tortora and Derrickson, 2018). Además, sintetizan calcitriol y eritropoyetina, hormonas que median el metabolismo de la vitamina D y la eritropoyesis, respectivamente (Fink, Pfaff, and Levine 2012; Levy et al., 2006).

El sistema urinario está constituido por dos riñones, dos uréteres, la vejiga y la uretra; en los primeros se filtra la sangre y se forma la orina, la cual se transporta por los uréteres y se almacena en la vejiga para finalmente ser evacuada mediante la micción, a través de la uretra (Tortora and Derrickson, 2018).

Los riñones son un órgano par, cada uno mide aproximadamente de 10-12 cm de longitud, de 5-6 cm de ancho y 2.5 cm de profundidad, con un peso que varía entre 113-170 g. (Avendaño *et al.*, 2003; Levy, Stanton y Koeppen, 2006; Seldin and Giebisch, 1985; Tortora and Derrickson, 2018). Anatómicamente, tienen una ubicación paravertebral retroperitoneal a nivel de D12 a L3 (Porth, 2011) y están parcialmente protegidos por las costillas 11 y 12 (Tortora and Derrickson, 2018).

El riñón está compuesto por una estructura lobulada de aproximadamente 18 lóbulos, éstos están conformados por su unidad funcional, la nefrona (Tresguerres, 1992; Le Vay and Robson, 2018). Cada riñón cuenta con un polo superior y otro

inferior, una cara anterior y otra posterior; además, al interior, cuenta con dos regiones principales: una externa y la región interna, en las que se encuentran las estructuras funcionales (Tortora and Derrickson, 2018), la configuración del riñón se puede observar en el diagrama de la figura 2.1.

La región externa está formada por tres capas que se encargan de dar forma, proteger y sostener al órgano:

1. Cápsula renal. Es la capa profunda, una lámina lisa transparente de tejido conectivo denso irregular que se continúa hacia la cubierta externa del uretero. Cumple con la función de proteger a los riñones de traumatismos y de darle su forma.
2. Cápsula adiposa. Es una masa de tejido graso que rodea la cápsula renal, protege de traumatismos y da sujeción en la cavidad abdominal a los riñones.
3. Fascia renal. Es la capa superficial y delgada de tejido conectivo denso irregular, que sujeta a los riñones a las estructuras vecinas y a la pared abdominal.

La región interna está formada por dos áreas identificables por su intensidad de color y su apariencia.

1. Médula renal. Formada por varias estructuras en forma de cono llamadas pirámides renales, que son de un color rojo oscuro.
2. Corteza renal. Rodea a la médula renal, es lisa y de un color rojo claro. Está subdividida en dos zonas: la zona cortical externa y la zona yuxtamedular interna, las cuales se extienden entre las pirámides renales y forman columnas renales.

Así, un lóbulo renal está formado por una pirámide renal, la parte de la corteza que la rodea y la mitad de cada columna renal por ambos laterales (Tortora and Derrickson, 2018). La pirámide renal se comunica a través de su base con la corteza renal y el borde del vértice, llamada papila renal, orientada hacia una fisura que el riñón presenta en el borde medio llamado *hilio* renal (Porth, 2011; Tortora and Derrickson, 2018). En el hilio renal, se abre una cavidad hacia interior

del riñón llamada seno renal, en la cual hay tejido adiposo, ésta funciona como soporte para mantener la posición de los conductos que entran y salen por el *hilio* renal: vasos sanguíneos, nervios y los uréteres. Tanto la corteza renal como las pirámides de la médula, constituyen el parénquima, porción funcional del riñón en la cual se encuentran las nefronas.

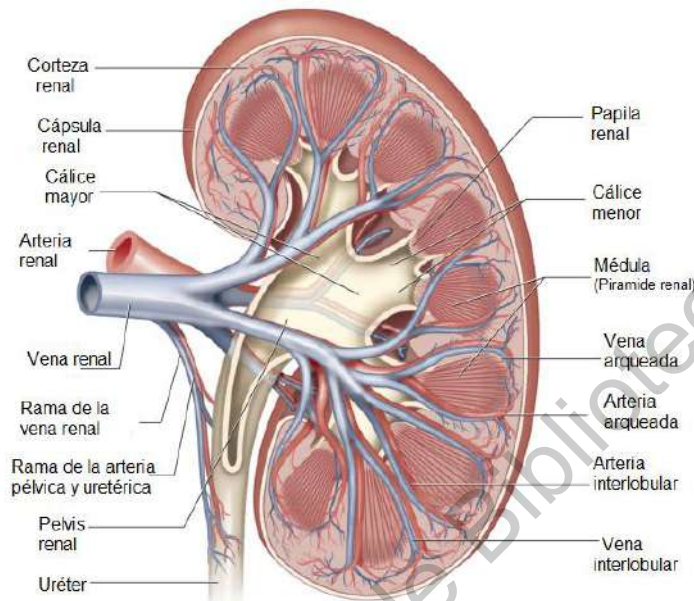


Figura 2. 1 Diagrama anatómico del riñón.

Modificado de Enciclopedia Británica, 2018.

La sangre se filtra en las nefronas y el filtrado resultante, se drena a través de los conductos papilares que se extienden a través de la papila renal de las pirámides, hasta los cálices menores y mayores. Los cálices, al recibir la orina de los conductos papilares, la drenan hacia la pelvis renal, cavidad que conecta con los uréteres hacia la vejiga urinaria (Netter, 2011; Sepúlveda-Saavedra, 2012; Young et al., 2011).

La nefrona es la unidad funcional básica del riñón y está conformada por dos estructuras: el corpúsculo renal, donde se filtra el plasma sanguíneo y el túbulo renal, conducto por el cual drena el líquido filtrado (Netter, 2011; Tortora and Derrickson, 2018). La estructura de la nefrona se puede observar en la figura 2.2.

- a. Corpúsculo renal. Está compuesto por dos estructuras, la primera es una red capilar llamada *glomérulo* y la segunda, es un epitelio doble que rodea a los capilares glomerulares llamado *cápsula glomerular* o de *Bowman*. La función del glomérulo es filtrar el plasma sanguíneo.
- b. Túbulo renal. Está constituido por tres secciones por las cuales se drena el líquido filtrado: El túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, con una rama descendente y otra ascendente y el túbulo contorneado distal.

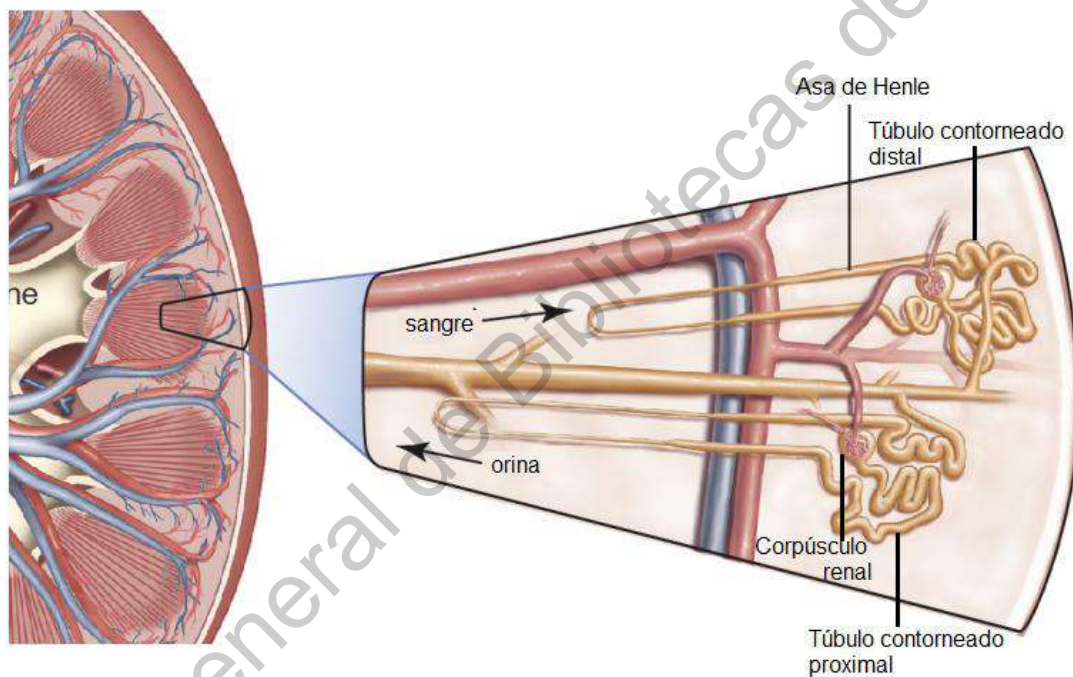


Figura 2. 2 Estructura de la nefrona.

Modificado de Enciclopedia Británica, 2018.

Los túbulos contorneados distales de diversas nefronas convergen en un solo túbulo colector, para después unirse en los conductores papilares que drenan a los cálices menores y después es transportado hacia los cálices mayores. Una vez que el filtrado se encuentra en los cálices, se convierte en orina debido a que ya no hay más reabsorción. Los túbulos colectores y los conductos papilares se extienden desde la corteza a través de la médula, conectando con los cálices para

después, drenar la orina hacia la pelvis renal, que conecta con el uretero y posteriormente, con la vejiga (Porth, 2011; Tortora and Derrickson, 2018).

Tanto el corpúsculo renal como ambos túbulos contorneados, se encuentran en la corteza renal, mientras que el asa de Henle, que conecta a ambos túbulos, se extiende hacia la medula renal. Conecta al túbulo contorneado proximal con la rama descendente y forma una “U” con la rama ascendente, que después se conecta con el túbulo contorneado distal. Quedando entonces, inserta el asa de Henle en la medula renal, se pueden identificar dos tipos de nefronas con respecto a su tamaño, las nefronas corticales y las nefronas yuxtamedulares, las primeras más cortas que las segundas (Johnson, 1991; Gartner and Hiatt, 2015).

2.2 Histología de la nefrona.

La pared de la cápsula glomerular, el túbulo renal y los conductos, presentan una capa laminar de células epiteliales cuyas características constituyen su funcionalidad. La cápsula glomerular envuelve al glomérulo y presenta un epitelio doble compuesto por dos capas, la capa visceral y la capa parietal (Gartner and Hiatt, 2015). La estructura del glomérulo se puede observar en la figura 2.3.

1. Capa visceral, se encuentra al interior, constituida por podocitos, células epiteliales estrelladas con prolongaciones primarias dirigidas hacia las asas capilares, que a su vez, originan prolongaciones secundarias llamadas pedicelos, que rodean y se adosan a los capilares glomerulares.
2. Capa parietal, se encuentra hacia el exterior y la compone un epitelio plano de células endoteliales poligonales, ricas en organelos, que asientan sobre una membrana basal.

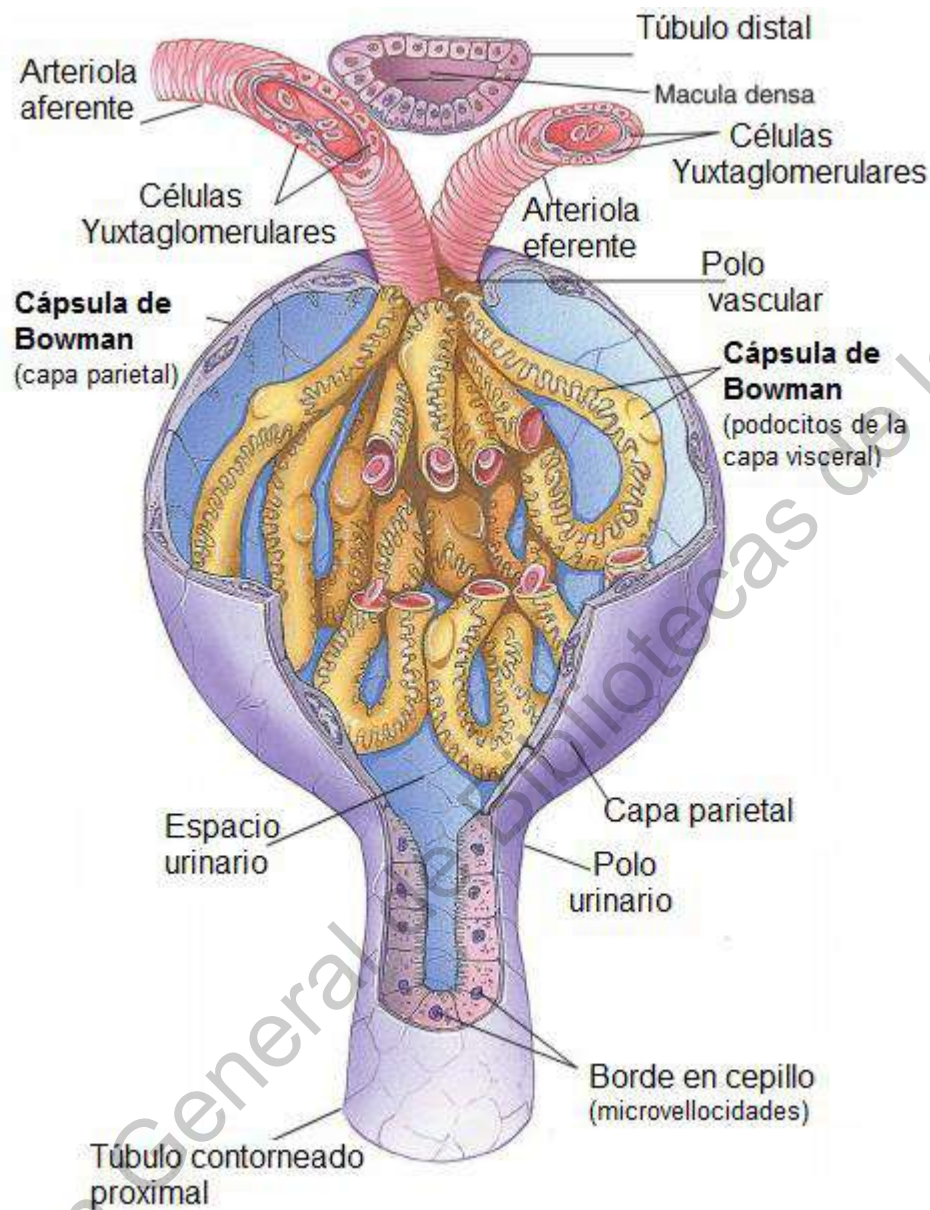


Figura 2. 3 Estructura de un corpúsculo renal.

Conformada por la capa parietal que rodea a la capa visceral. Modificado de Cell Biology and Histology, 7th edition, 2015.

Entre ambas capas parietal y visceral de la cápsula glomerular, se forma una cavidad estrecha denominada espacio urinario de *Bowman*, que está en continuidad y abierta a la luz del túbulo proximal. Los pedicelos se interdigitan con los de las células vecinas, dejando entre ellos, hendiduras de filtración de 25-35 nm, ocupadas por un diafragma de filtración de 4-6 nm que se extiende desde la

membrana de un pedicelo a la del otro, en su porción más distal (Gartner and Hiatt, 2015; Seldin and Giebisch, 1985).

Morfológicamente, los podocitos presentan un núcleo grande y plegado, en el citoplasma se puede observar un aparato de Golgi desarrollado, abundante retículo endoplásmico rugoso así como de ribosomas libres. El citoesqueleto es prominente, compuesto por filamentos y microtúbulos que se extienden hasta las prolongaciones. La membrana plasmática posee una matriz extracelular (MEC) rica en sialoglucoproteína, glucoproteína unida a un ácido siálico, forma parte de los carbohidratos no colágeno (Avendaño et al., 2003).

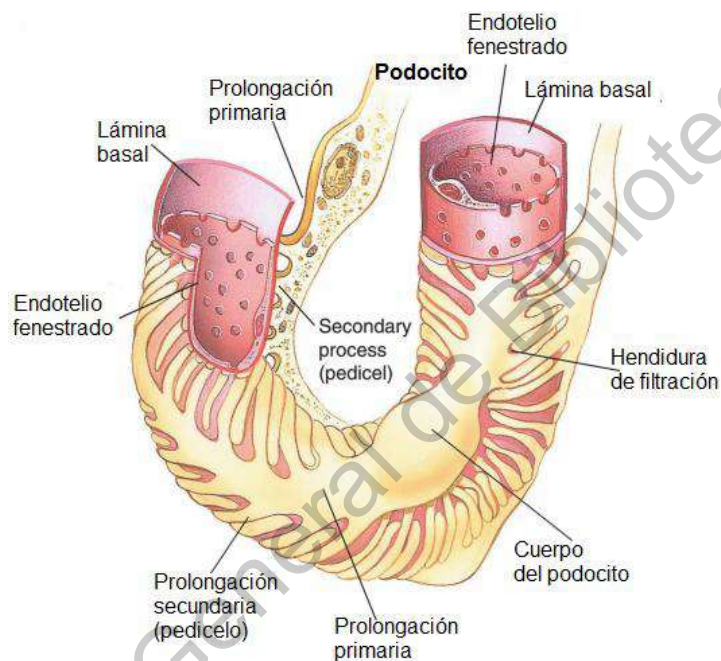


Figura 2. 4 Estructura de los capilares glomerulares y los podocitos.

Capa visceral. Modificado de Cell Biology and Histology, 7th edition, 2015.

Los capilares glomerulares como se puede observar en la figura 2.4, están formados por un endotelio de 40 nm de espesor, compuesto por células planas que presentan en su pared poros o fenestraciones de aproximadamente 40 a 100 nm de diámetro (Avendaño et al., 2003; Tortora and Derrickson, 2018). Los núcleos de las células endoteliales protruyen hacia la luz vascular y están localizados a un lado del área de contacto del capilar con los podocitos. El

citoplasma contiene pocos organelos, escasas vesículas de pinocitosis, y una matriz extracelular de 12 nm de espesor (Gartner and Hiatt, 2015).

Tanto los podocitos y el endotelio, sintetizan su membrana basal, la cual adopta una disposición especial por fusión embrionaria de ambas, originando la membrana basal glomerular que tiene un grosor de 240 a 340 nm, esencial para filtrado glomerular correcto (Young et al., 2011).

La membrana basal glomerular está constituida por colágenos de tipo IV, glucoproteínas como laminina $\alpha 5$, fibronectina y entactina, y proteoglicanos, como el heparán sulfato (Geneser, 2003; Laurie et al., 1989; Orlando et al., 2013; Ross et al., 2009; Sepúlveda-Saavedra, 2012).

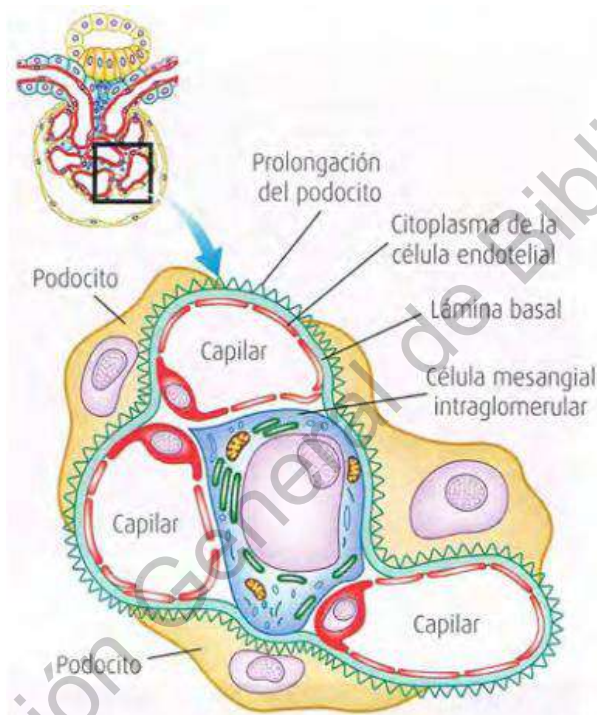


Figura 2. 5 Esquema de la disposición espacial de los componentes del glomérulo renal.

Tomado de Texto Atlas de Histología. Biología Celular y Tisular.

Mediante técnicas de depuración de microscopía electrónica, en la ultraestructura de la membrana basal glomerular, se pueden distinguir claramente tres bandas: una lámina clara interna, en íntimo contacto con la pared endotelial, una lámina central densa y una lámina clara externa, situada por debajo de los pedicelos. Mientras que en las láminas claras presenta componentes polianiónicos, en la lámina media tiene carga neutra. Los radicales del heparán-sulfato, cargados negativamente, son los responsables de la barrera

electrostática del filtro glomerular (Nagao et al., 2016). Así, la barrera de filtración se completa con el diafragma de la hendidura, situado entre los pedicelos de las células epiteliales podocitarias (Netter, 2011). Esta estructura posee una constitución morfológica compleja formada por subunidades laminares, dispuestas

de forma paralela y conectadas a un filamento central, dejando entre ellas poros rectangulares (Hossler, 2014).

La membrana basal glomerular no rodea como tal, toda la superficie del capilar glomerular, ya que el espacio que aparece entre las dos asas capilares está ocupado por un tejido conectivo llamado mesangio (Sepúlveda-Saavedra, 2012).

El mesangio sirve como soporte del entramado vascular y está constituido por células mesangiales y por una matriz mesangial, similar en apariencia a la membrana basal glomerular (Gartner and Hiatt, 2015).

Las células mesangiales constituyen el 25% del total de las células glomerulares, presentan contornos irregulares que proyectan numerosos pseudópodos, constituidos por filamentos de actina y miosina anclados a la membrana, estableciendo numerosas uniones comunicantes entre ellas para así proveer al glomérulo del soporte vascular (Sepúlveda-Saavedra, 2012).

El núcleo de las células mesangiales, en comparación con el de los podocitos, es de mayor tamaño; el citoplasma posee un retículo endoplásmico rugoso voluminoso, con abundantes ribosomas y lisosomas, lo que le permite tener la capacidad fagocítica y pinocítica, que le permite depurar el material de desecho de la membrana basal glomerular y del espacio subendotelial. Además de contribuir en el proceso de filtración glomerular, el mesangio tiene la capacidad para regular el flujo sanguíneo dentro del glomérulo, ya que posee receptores de angiotensina II y un aparato contráctil intrínseco.

La matriz mesangial presenta una ultraestructura similar a la de la lámina clara interna de la membrana basal glomerular con la que se continúa a nivel de la zona de unión del mesangio con la pared del capilar (Gartner and Hiatt, 2015; Johnson, 1991). La configuración de la disposición espacial de todos los componentes del glomérulo renal se pueden observar en la figura 2.5.

2.3 Vascularización renal.

Previo a su ingreso al riñón, a nivel del hilio, la arteria renal se divide en varias arterias segmentarias para posteriormente, ya en el seno renal, ramificarse en una rama anterior y una posterior (Sepúlveda-Saavedra, 2012).

Una vez en el parénquima renal, se originan las arterias interlobulares, que recorren las columnas de Bertin hasta la base de las pirámides, dando lugar a las arterias arciformes, que se incurvan para disponerse entre la base de las pirámides y la corteza renal, siguiendo un trayecto lateral (Gartner and Hiatt, 2015; Netter, 2011; Young et al., 2011). En la figura 2.6 se observa red vascular.

Las arterias arciformes emiten las ramas interlobulillares, que ascienden de forma perpendicular a la superficie renal, donde originan vasos colaterales en su trayecto

hacia la superficie.

A partir de las arterias interlobulillares, se originan las arteriolas aferentes que irrigan un solo glomérulo.

Generalmente, las arteriolas que llegan a los corpúsculos renales surgen directamente desde las arterias interlobulillares, pero pueden formarse desde una arteriola intralobulillar intermedia.

Antes de que la arteriola aferente entre en contacto con el corpúsculo renal, se

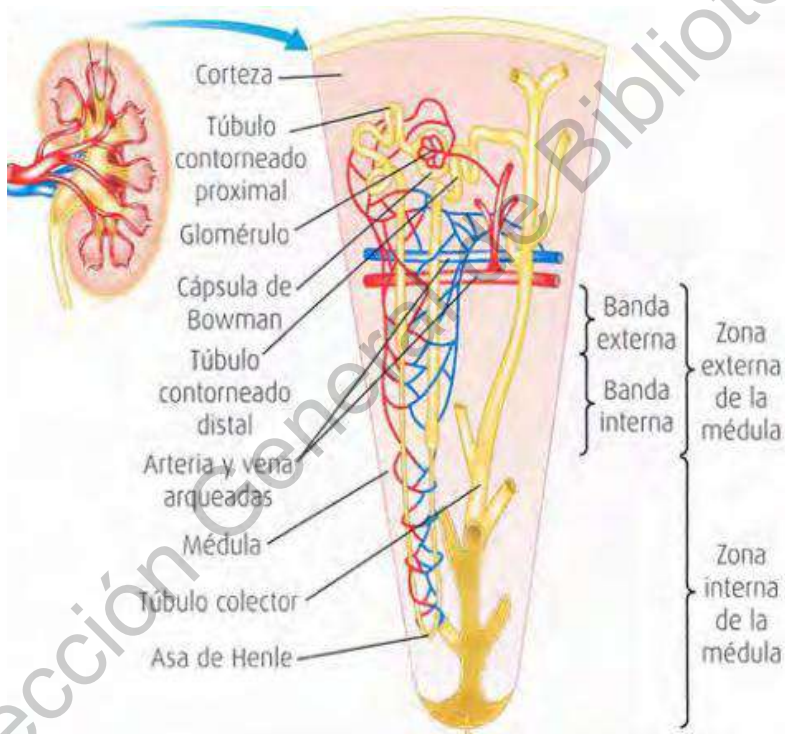


Figura 2. 6 Esquematación de la vascularización de la nefrona en la pirámide renal.

Tomado de Texto Atlas de Histología. Biología Celular y Tisular.

divide de cinco a ocho ramas cortas, cada una de las cuales origina un segmento capilar independiente.

En conjunto, la red capilar constituye el ovillo o penacho glomerular, que es el tramado vascular de alta especialización, ya que es la zona donde se realiza el ultrafiltrado del plasma sanguíneo (Sepúlveda-Saavedra, 2012).

Los capilares glomerulares drenan hacia la arteriola aferente a través de la cual la sangre abandona el glomérulo. La mayor parte de las veces, esta arteriola eferente, al abandonar el corpúsculo renal, se ramifica en otra red de capilares que atraviesa el intersticio en íntimo contacto con los túbulos renales, circunstancia que permite que se desarrolle el proceso de reabsorción mediado por las células tubulares (Wolfgang, 2003).

En la circulación cortical renal existen dos redes capilares, una glomerular y otra peritubular, consecutivas y unidas entre sí por una arteriola. De las arteriolas eferentes, que proceden de los corpúsculos yuxtamedulares, emergen de 12 a 15 capilares que descienden hacia la médula, denominados vasos rectos descendentes. Éstos se ramifican radialmente en forma de malla, alrededor del asa de Henle y los túbulos colectores, contribuyendo al intercambio de iones y líquidos, que tiene lugar en la médula. Las terminaciones capilares convergen hacia los vasos rectos ascendentes, que siguen un trayecto paralelo y opuesto a los descendentes, hasta desembocar en el sistema venoso. El retorno venoso renal, sigue un trayecto opuesto a la circulación arterial (Tortora and Derrickson, 2018).

Los plexos capilares subcapsulares drenan hacia un plexo de venas estrelladas que desemboca en las venas interlobulillares, desde aquí, descienden perpendicularmente a la superficie renal, recibiendo sangre procedente de las venas tributarias de la red capilar peritubular y de las venas tributarias procedentes de los vasos rectos. Sin embargo, muchos de los vasos medulares desembocan directamente en las venas arciformes, paralelas a sus homónimas arteriales, en las que desembocan las venas interlobulillares. Las venas arciformes drenan las venas interlobulares, situadas entre las paredes medulares y luego en

las venas tributarias mayores del hilio renal, para formar finalmente, la vena renal que drena a la vena cava inferior (Sepúlveda-Saavedra, 2012). La configuración de la irrigación en la medula renal se representa en la figura 2.7.

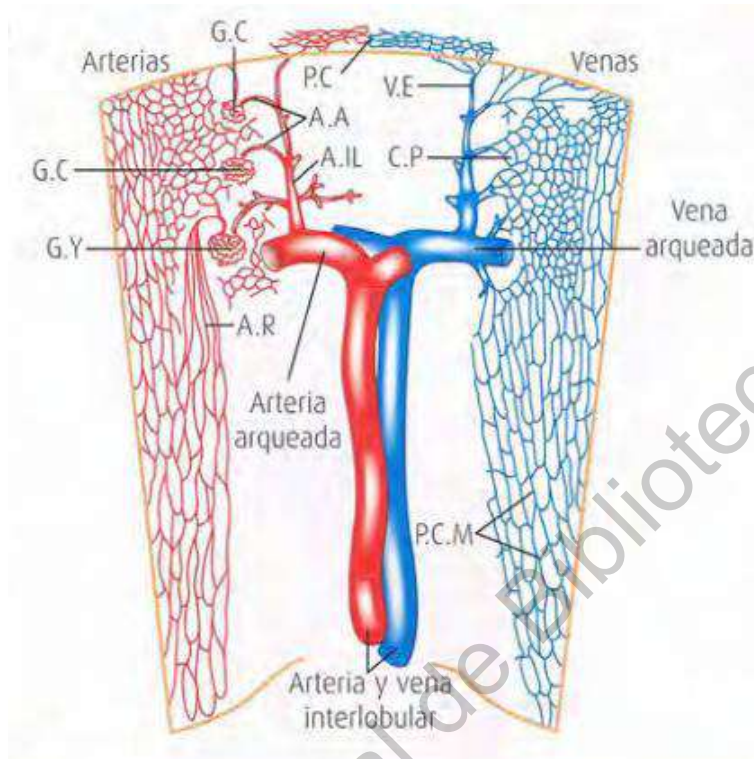


Figura 2. 7 Irrigación en la médula renal.

Arteria interlobulillar (AIL), arteriolas aferentes (AA), glomérulos corticales (GC), glomérulos yuxtamedulares (GY), plexos capsulares (PC), arteriolas rectas (AR), capilares peritubulares (CP), venas estrelladas (VE), plexo capilar medular (PCM). Tomado de Texto Atlas de Histología. Biología Celular y Tisular.

2.4 Vasos linfáticos del riñón.

Al parecer en la medula renal no existe una circulación linfática propiamente dicha, sin embargo, existe una red de capilares linfáticos distribuidos por la cápsula renal que recibe el drenaje de la parte externa de la corteza (Porth, 2011; Tortora and Derrickson, 2018). Los vasos linfáticos aparecen en el intersticio cortical, paralelos al trayecto de los vasos sanguíneos y abandonan el riñón por el hilio (Netter, 2011).

2.5 Inervación renal.

Procede del plexo celíaco y se compone de ramas adrenérgicas y colinérgicas que pueden ser mielínicas o amielínicas. Sin embargo, no está totalmente clara la distribución de las ramas nerviosas al interior del riñón. Parece que las paredes vasculares, el aparato yuxtaglomerular y los túbulos son los principales destinatarios de las fibras nerviosas. Dicha inervación consiste solo en fibras nerviosas simpáticas no existe inervación parasimpática (Levy et al., 2006).

La trascendencia de los nervios y vasos linfáticos renales puede considerarse de carácter secundario, ya que tras resultar destruidos o dañados, como en el caso de un trasplante no parece afectar la viabilidad del riñón trasplantado (Way ,1989).

2.6 Origen embriológico.

El sistema urinario se desarrolla a partir de un doble engrosamiento del mesodermo, denominado crestas urogenitales. Durante el desarrollo embrionario en los mamíferos se produce una diferenciación de tres fases: el *pronefros*, el *mesonefros* y el *metanefros*, este último es el que da lugar al riñón adulto (Saxén, 1987).

El desarrollo comienza a partir de la cuarta semana después de la fecundación, sin embargo el metanefros inicia su desarrollo al final de la quinta semana. Una señal del ectodermo induce la diferenciación del mesodermo intermedio, que se compacta y ahueca, dando lugar al conducto de Wolf y a nefronas primitivas, constituyendo el pronefros, que pronto se degenera para dar lugar al mesonefros.

El mesonefros se desarrolla siendo funcional durante la embriogénesis, durante esta fase se diferencia en el mesénquima metanéfrico, que dará lugar al metanefros o riñón definitivo (Avendaño et al., 2003; Saxén and Sariola, 1987; Way, 1989).

Histológicamente, la morfogénesis renal implica la formación de un gran número de estructuras tubulares ramificadas, parte de estas estructuras derivan del mesénquima metanéfrico. Durante el proceso de epitelización de las células mesenquimáticas, da lugar a la mayor parte de la nefrona, mientras que otras derivan directamente de la yema uretral que se ramifica sucesivamente, dando lugar a los túbulos colectores (Brunicardi et al., 2005; Saxén, Sariola, and Lehtonen, 1986).

2.7 Fisiología renal.

En la formación de la orina intervienen tres procesos básicos (Levy et al., 2006; Porth, 2011; Rennke and Denker, 2007):

- La ultrafiltración sanguínea, el cual se lleva a cabo en el glomérulo.
- La reabsorción del agua y solutos desde el ultrafiltrado.
- La secreción de los solutos de desecho hacia el túbulo renal.

En los glomérulos se filtra el 99% de agua de la cual se secreta aproximadamente 1% y solutos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , creatinina, urea, fosfato inorgánico, amonio, entre otros. Mediante los procesos de reabsorción y secreción, los túbulos renales regulan el volumen, la composición, la osmolaridad y el pH de la orina (Levy et al., 2006; Tortora and Derrickson, 2018).

Ultrafiltración

La ultrafiltración del plasma se lleva a cabo del glomérulo hacia el espacio urinario mientras se mantenga una tensión arterial superior a 60 mm Hg., produciendo una “orina primitiva”. Sí la tensión disminuye, el ultrafiltrado cesa y por lo tanto la producción de la orina primitiva también (Danzinge and Hoenig, 2016), este mecanismo se rige por la *ley de Starling*, que se encuentra determinada por la permeabilidad neta de la pared capilar glomerular y los gradientes de presión hidrostática y osmótica (Pachec- Leal, 2006; Rennke and Denker, 2007). Así, se

genera una diferencia de presión en el extremo aferente del capilar glomerular de 17 mmHg y el extremo eferente de 5 mmHg, esta presión eficaz o presión neta de filtración en la red capilar impulsa el movimiento del líquido filtrado hacia el exterior, el cual va desde la luz de los capilares glomerulares, atraviesa la barrera de filtración, hasta el espacio de Bowman (Levy et al., 2006).

La tasa de filtración glomerular (TFG) es entonces, el flujo neto de ultrafiltrado que pasa a través de la membrana por unidad de tiempo (Boffa and Carter, 2015). La TFG promedio en mujeres es de 130 a 145 L/día (90-100 ml/min) y en hombres del 165-180 L/día (115-125 ml/min) (Rennke and Denker, 2007).

El proceso de ultrafiltración se puede llevar a cabo debido a la constitución de una barrera de filtración glomerular conformada por las células endoteliales de los capilares glomerulares, la membrana basal y los podocitos (Levy et al., 2006). Todos los componentes de la barrera de filtración glomerular expresan en su superficie glucoproteínas con carga negativas lo que le confiere selectividad limitando el paso de moléculas en función al tamaño y carga eléctrica; tiene permeabilidad absoluta para el agua, glucosa, urea, Na^+ , Cl^- , K^+ y pequeños solutos como aminoácidos y polipéptidos. Sin embargo, es impermeable para los hematíes, los leucocitos o las plaquetas. Además, el diafragma de las hendiduras de filtración está constituido por proteínas como la nefrina, NEPH1 y podocina (Levy et al., 2006).

Respecto al tamaño molecular, las proteínas con un radio mayor a los 42 Å no son filtradas, aquellas que tienen un radio menor a 20 Å con carga neutra son filtradas fácilmente, sin embargo, la filtración se restringe a proteínas con un radio molecular determinado entre los 20 y 42 Å, es entonces que, por la selectividad de carga de la barrera de filtración glomerular se filtran con mayor facilidad las proteínas catiónicas que las aniónicas (Levy et al., 2006; Gartner and Hiatt, 2015). Debido a esto y a que la mayor parte de las proteínas plasmáticas son aniónicas y de radio molecular determinado, su tasa de filtración se ve retrasada y su velocidad disminuida.

Reabsorción

El ultrafiltrado glomerular pasa del espacio de Bowman hacia la serie de segmentos tubulares que conforman a la nefrona, en túbulo proximal se origina en polo urinario donde el epitelio escamoso simple de la capa parietal de la cápsula de Bowman se continúa con un epitelio cúbico simple propio del túbulo contorneado proximal. En los túbulos renales se controla con precisión el volumen, la osmolaridad, la composición y el pH, debido a los procesos de absorción y secreción (Tortora and Derrickson, 2018).

En el túbulo contorneado proximal se absorbe casi el 70% de H₂O filtrada, la glucosa, Na⁺, Cl⁻, K⁺ y solutos como aminoácidos y polipéptidos, que se transportan al estroma del tejido conectivo (Sepúlveda-Saavedra, 2012).

La reabsorción se lleva a cabo a través de la bomba Na⁺- K⁺ -ATPasa que se encuentra en la membrana basolateral y de proteínas transportadoras de aminoácidos y glucosa expresadas en la membrana de las células basales, estos transportadores son además blancos farmacéuticos (Gartner and Hiatt, 2015; Levy et al., 2006). A su vez las fibras nerviosas que inervan el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el conducto colector, estimulan la reabsorción de Na⁺ (Levy et al., 2006).

En el asa de Henle se reabsorbe aproximadamente el 25% de NaCl, el 15% de agua, Ca²⁺ y HCO₃⁻ (Levy et al., 2006). En la rama delgada descendente se reabsorbe H₂O de forma exclusiva a través de canales de agua de tipo AQP1, sin embargo, no se reabsorbe NaCl, por lo que su concentración será alta al llegar a la rama ascendente delgada (Gartner and Hiatt, 2015; Levy et al., 2006).

En la rama ascendente delgada el NaCl se reabsorbe pasivamente a favor de su gradiente de concentración pero es impermeable al H₂O. No obstante, al llegar a la rama gruesa ascendente en la membrana basolateral, la actividad de la bomba Na⁺- K⁺ -ATPasa es fundamental para la reabsorción de solutos, ya que se encuentra relacionada con los cotransportadores y antiportadores presentes en la

membrana apical. El cotransportador NKCC1 acopla el desplazamiento de 1Na^+ - 1K^+ - 2Cl^- hacia el citoplasma celular; el antiportador de Na^+ - H^- impulsa la reabsorción de Na^+ y la secreción de H^- (reabsorción de HCO_3^-). La presencia de estas proteínas en la rama gruesa ascendente le confiere una carga positiva respecto al de la sangre por lo que además el voltaje presente proporciona energía para la reabsorción de cationes como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} por vía paracelular (Levy et al., 2006).

En el túbulo distal y el conducto colector se reabsorbe aproximadamente el 7% NaCl , entre el 8 y 17% de agua, y se segregan cantidades variables de K^+ y H^- . En el túbulo distal inicial se reabsorbe principalmente Na^+ , Cl^- y Ca^{2+} a través del cotransportador Na^+ - Cl^- y es movilizada hacia el exterior por la bomba Na^+ - K^+ -ATPasa, además esta sección también es impermeable al agua, sin embargo en la última sección del túbulo distal se reabsorbe Na^+ , H_2O y se segrega K^+ por la presencia de células llamadas “células principales”. Posteriormente, el K^+ se reabsorbe a través de la bomba H^- - K^+ -ATPasa, localizada en la membrana apical de las células llamadas “células intercaladas”, las cuales también segregan H^+ o HCO_3^- , fundamentales para el equilibrio ácido-base (Levy et al., 2006).

Secreción de solutos

Los principales solutos son las sales de sodio, entre la más abundante el NaCl , la cual se encuentra regulada para mantener un volumen de líquido extracelular constante. Los sensores de volumen generan señales que actúan sobre los riñones para modular la excreción de NaCl y se han identificado señales tanto nerviosas como hormonales (Levy et al., 2006).

La angiotensina II, la aldosterona, la urodilatina, la epinefrina y la norepinefrina son liberadas por los nervios simpáticos, son hormonas fundamentales que regulan la reabsorción del NaCl y de la secreción urinaria. Así también la hormona antidiurética (ADH) o vasopresina secretada por la neurohipófisis, regula la absorción del agua a nivel renal, debido a que incrementa la permeabilidad del

conducto colector con el fin de regular el volumen y la osmolaridad de la orina. Por lo que cuando existen concentraciones plasmáticas bajas se excreta un gran volumen de orina cuyos solutos están diluidos (diuresis acuosa), por el contrario cuando existen concentraciones altas de ADH se secreta una cantidad menor de orina la cual estará concentrada (antidiuresis) (Fink et al., 2012; Levy et al., 2006).

2.8 Insuficiencia renal crónica.

La enfermedad renal crónica (ERC) o insuficiencia renal crónica (IRC) se clasifica en cinco estadios; se diagnostica por la presencia de lesiones renales y el descenso de la tasa de filtración glomerular (TFG) de más de tres meses de evolución (Boffa and Cartery, 2015).

La IRC se diagnostica cuando la TFG es inferior a $60 \text{ ml/min/1.73m}^2$, además cuando la TFG es inferior a $20 \text{ ml/min/1.73m}^2$ deben considerarse como tratamientos el trasplante renal, la diálisis peritoneal y la hemodiálisis, no obstante, el tratamiento dependerá de la etiología de la nefropatía y de su evolución; la mayoría de los tratamientos ayudan a controlar el volumen sanguíneo, la concentración de los iones como el K^+ y el Ca^{2+} (Boffa and Cartery, 2015). En estadios más avanzados, la hemodiálisis, ayuda a eliminar las toxinas y el exceso de líquido mediante el uso de una máquina que bombea la sangre fuera del cuerpo hacia un dializador que después de filtrar la sangre, la regresa al cuerpo del paciente, y en última instancia el trasplante de riñón (Henry-Bernard, 2005; Way, 1989).

Las principales enfermedades que son consideradas como factor de riesgo para desarrollar insuficiencia renal crónica o enfermedad renal crónica se encuentran: la Diabetes mellitus (DM), la hipertensión arterial (HTA), las enfermedades cardiacas y los antecedentes familiares de falla renal como lo son la nefropatía diabética, la cardiopatía congénita, la cirrosis hepática, algunas leucemias, el

leucoma corneal y algunos tipos de cáncer como el hepatocarcinoma o el adenocarcinoma de riñón. Para poder diagnosticar IRC se tiene que demostrar la presencia de anomalías morfológicas, histológicas o biológicas presentes en el riñón y las cuales pueden ir evolucionando (Boffa and Cartery, 2015).

Las anomalías morfológicas se pueden observar a través de de estudios de gabinete como la ecografía renal, en la cual se puede identificar la asimetría renal, contornos irregulares, hipotrofia renal, riñones grandes poliquísticos, hidronefrosis, nefrocalcinosis. Los estudios de laboratorio como la biopsia renal se pueden detectar anomalías histológicas, y las anomalías biológicas se determinan por proteinuria y/o albuminuria (mg/d) por determinación de orina de 24 horas o a través de la relación entre proteinuria y/o albumina y creatininuria (mg/mmol) o (mg/g), la hematuria o leucocituria. Además, los signos biológicos de conicidad son la condición de hipocalcemia, anemia arregenerativa normocítica y ceatinina anterior anormal (Boffa and Cartery, 2015).

Entre los marcadores para la detección oportuna de la IRC además de la TFG se encuentra la determinación de creatinina y la micro albuminuria, sin embargo se ha generado controversia el considerar la determinación de creatinina como factor fiable para la determinación del filtrado glomerular debido a que difiere entre jóvenes y personas geriátricas sanas (Boffa and Cartery, 2015; Joaquín and Juan, 2014).

2.9 Trasplante renal.

El gran desarrollo de las técnicas quirúrgicas del siglo XX tuvo un gran impacto cuando Alexis Carrel realizó las primeras anastomosis vasculares. Los primeros trasplantes de riñón entre seres humanos fueron realizados por Yu Voronoy en la década de los 30's, y los modelos de trasplante de piel en animales por Sir Peter Medawar en la década de 1940.

El modelo de trasplante de piel proporcionó pruebas suficientes para comprender que el sistema inmunitario es determinante en el fracaso de los aloinjertos, ya que el cuerpo no lo reconoce como propio y se produce el rechazo, en conjunto, estas observaciones sentaron las bases de la inmunobiología del trasplante (Brunicardi et al., 2005).

El primer trasplante de riñón exitoso a largo plazo lo llevó a cabo Joseph Murray en Boston en 1954. Y debido a que fue realizado entre hermanos gemelos idénticos y el donador estaba vivo, el receptor no requirió inmunosupresión, vivió durante más de 20 años, y al final murió de una cardiopatía coronaria (Brunicardi et al., 2005).

El trasplante de riñón está definido por la transferencia del riñón de un donante a un receptor cuyos riñones han dejado de funcionar (Avendaño et al., 2003). Durante el procedimiento quirúrgico, se realiza una incisión abdominal y el riñón del donante es colocado a la altura de la pelvis del receptor. La arteria renal y la vena del riñón trasplantado se anastomosan a la arteria y venas renales del receptor y el uréter del riñón trasplantado se anastomosa a la vejiga urinaria (Brunicardi et al., 2005; Way, 1989).

Al finalizar el trasplante, el receptor debe tener un seguimiento médico y recibir tratamiento con fármacos inmunosupresores por el resto de su vida con el fin de evitar el rechazo del órgano trasplantado (Tortora and Derrickson, 2018).

El donador puede ser una persona fallecida o con muerte cerebral o un donante vivo, ya que una persona puede sobrevivir con sólo un riñón funcional (CO&ONT, 2019).

Existen dos factores primordiales que limitan el trasplante, el primero es la disponibilidad del órgano a trasplantar; el segundo, es el desarrollo de rechazo inmunológico, mediado por el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), que desempeña un papel fundamental (Avendaño et al., 2003; Brunicardi et al., 2005),

postquirúrgicamente. Debido a estas problemáticas, la ingeniería tisular ha impulsado el desarrollo de métodos alternativos para la posible obtención de órganos artificiales, que cumplan con la función original del órgano, ya sea a través del uso de biomateriales o de células madre, con el fin de reducir la tasa de rechazo.

Sin embargo, a la fecha, esto aún no se ha logrado completamente debido a que la configuración para las interacciones entre composición y configuración de la red tridimensional de un órgano completo no es 100% compatible para poder generar el microambiente necesario capaz de biomimetizar el soporte estructural, promover y mantener el fenotipo celular específico en el que se llevan a cabo las funciones metabólicas, los procesos celulares de adhesión y proliferación; además de la reacción de inmunocompatibilidad que puede desencadenar ciertos biomateriales. Es por ello que se han desarrollado diversas técnicas de descelularización con el fin de aprovechar la matriz extracelular (MEC) y posteriormente, recelularizar el órgano con las células del receptor (Zambon et al., 2014).

La base de este fundamento radica en la transmisión de señales hacia las interacciones morfogenéticas (Saxén et al., 1986):

1. Interacciones célula-célula
2. Interacciones célula-matriz extracelular
3. Interacciones cercanas de matriz extracelular-matriz extracelular entre los componentes de dos matrices.
4. Interacciones lejanas o de largo alcance medidas por moléculas transmisoras de señal.

Estas interacciones dirigen la formación, crecimiento y ramificación del epitelio hacia la formación del uréter y el desarrollo de los túbulos a partir de células mesenquimales (Vainio and Müller, 1997).

2.10 Matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC) es una estructura acelular, tridimensional (3-D) y altamente dinámica, que es secretada por las células residentes en tejidos sólidos y los encapsula (Karsdal et al., 2013; Londono and Badylak, 2014).

La MEC es considerada como el maestro regulador del comportamiento y el fenotipo celular, debido a que su organización tridimensional parecida a la de una red y su composición bioquímica determinan las propiedades bioquímicas y biofísicas de la MEC específicas para cada tejido (Filipe, Chitty, and Cox, 2018). Por lo que, tanto la composición bioquímica como la organización 3-D es específica para cada tipo de tejido y órgano (Dzobo, Motaung, and Adesida, 2019).

Por una parte, la organización en 3D permite la interacción con proteínas de anclaje celular, le provee el soporte para la integridad y elasticidad de los tejidos. Además, se encuentra en constante remodelación para el control de la homeostasis (Bonnans, Chou, and Werb, 2014). Por otra parte, bioquímicamente se encuentra compuesta por un conjunto macromolecular hidratado, formado por colágeno, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos, y la presencia de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas (Bonnans et al., 2014; Costa et al., 2017; Muncie and Weaver, 2018; Swinehart and Badylak, 2016), cuya finalidad es proveer el microambiente adecuado para:

- 1.- Promover el mantenimiento y la reparación de los tejidos.
- 2.- Modular la expresión genética y facilitar los procesos de adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular (Edgar et al. 2018; Goodman 2009; Karsdal et al. 2013).

El microambiente de la MEC está compuesto por un grupo grande y variado de macromoléculas dinámicas las cuales se clasifican en las familias de la fibrina, la

laminina, el colágeno, los glicosaminoglicanos y los proteoglicanos, que en conjunto proporcionan el soporte estructural así como también una barrera física. Esta compleja composición promueve respuestas celulares y sus interacciones se encuentran involucradas en el desarrollo y la formación de órganos, por lo tanto la MEC es más que un soporte estructural (Alberts et al., 2010; Godfrey, 2014; Karp, 2013; Londono and Badylak, 2014).

2.10.1 Composición de la MEC

Existen dos tipos de MEC: El primer tipo se encuentra formando las membranas basales, e interactúa directamente con el epitelio y el endotelio, está compuesta principalmente de colágeno tipo IV, lamininas, entactina/nidogen y proteoglicanos como el heparán sulfato. El segundo tipo se encuentra formando la matriz intersticial en la cual las células se encuentran inmersas y que constituye la mayor parte de la MEC del cuerpo, está constituida principalmente por colágeno tipo I y III, que junto con fibronectina, tenascina y proteoglicanos le proporcionan hidratación a los tejidos y permiten la unión de factores de crecimiento y citocinas al tejido y su unión a la MEC.

Las alteraciones en la composición, estructura, rigidez y abundancia de la MEC, contribuyen al desarrollo de diversas condiciones patológicas como la fibrosis, el cáncer invasivo, desordenes neurodegenerativos (Bonnans et al., 2014; Bonneh-Barkay and Wiley, 2008), así como también de la remodelaciones que puede sufrir la MEC bajo ciertas enfermedades, como en la obesidad y síndrome metabólico, donde la MEC del tejido adiposo sufre de una constante remodelación (Ruiz-Ojeda et al., 2019).

2.10.2 Colágenos

Los colágenos representan aproximadamente el 85% del peso en seco de la MEC y existen más de 20 tipos diferentes de colágeno, cada uno con su función específica (Godfrey, 2014), en la MEC el colágeno es la proteína estructural principal y se pueden clasificar en dos grupos:

Los colágenos fibrilares (colágenos I – III, V y XI) y no fibrilares (Bonnans et al., 2014).

Los colágenos son una familia de proteínas, cuya estructura en triple hélice está formada por 3 cadenas α superenrolladas entre sí, total o parcialmente; son sintetizados como pro-colágenos con repeticiones características de aminoácidos $[\text{Gly-X-Y}]_n$, cerca del 20% de los aminoácidos en las posiciones X y Y son: Prolina (Pro) o lisina (Lys) estos residuos pueden ser hidroxilados intracelularmente por enzimas específicas como la lisil oxidasa (LOX) (Bonnans et al., 2014; Costa et al., 2017; Godfrey, 2014; Muncie and Weaver, 2018).

Las hidroxilaciones permite que las fibras puedan unirse y formar una estructura sólida y estable, a través de uniones covalentes entre sus fibras llamadas reticulaciones o “crosslinking” (enlaces cruzados), los cuales pueden ser intra- e intermoleculares, contribuyéndole una resistencia de tracción alta y una mínima extensibilidad característico del colágeno (Karsdal et al., 2013)

Los residuos hidroxilados también pueden sufrir modificaciones postraduccionales de glicosilación por la enzima mediadora de la glicosilación agregando unidades de galactosa o glucosa. Por lo que, tanto las glicosilaciones como los crosslinks en el colágeno son factores que alteran las interacciones célula-colágeno. Por lo tanto, afectan las propiedades mecánicas y bioquímicas de las fibras de colágeno, que a su vez influye ampliamente en la capacidad del colágeno para dirigir hacia la angiogénesis o mineralización ósea (Muncie and Weaver, 2018).

Los colágenos tipo I, II, III y V, pertenecen al grupo más abundante en el cuerpo, además del dominio de triple hélice, también contienen dominios de pro-péptido N- y C-terminales que son escindidos por N- y C-procolagenasas, antes del ensamblaje de fibrillas (Karsdal et al., 2013).

El colágeno tipo I es la proteína estructural más abundante, proporciona la fuerza y la capacidad de carga de la mayoría de los tejidos; además colágeno se puede unir con otras proteínas como la laminina proporcionando sitios de anclaje y de barrera para las células. El colágeno tipo IV y VII y la laminina son los mayores componentes de las membranas basales de los vasos sanguíneos y la epidermis además aseguran el anclaje endotelial (Costa et al., 2017).

2.10.3 Glucosaminoglicanos

Los glucosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos lineales no ramificados cargados negativamente y están formados por aminoazúcares acetilados, es decir, la cadena del polímero está formada por unidades repetidas de disacáridos compuestos por un azúcar ácido (D-glucurónico ó L-idurónico) y un aminoazúcar (N-acetilglucosamina ó N-Acetilgalactosamina) (Aquino and Park, 2016; Costa et al., 2017; Gade Malmos et al., 2016; Pacheco-Leal, 2006). La base del sacárido del aminoazúcar es una hexosamina que puede ser glucosa o galactosa, en su estructura tiene una amina la cual está carboxilada por la presencia del grupo carboxilo, además puede presentar diferentes niveles de sulfatación (Gade Malmos et al., 2016).

La función de los glucosaminoglicanos es atraer y retener H₂O incluidos los iones con carga (+), mantener la homeostasis en los tejidos, mantener la señalización celular en procesos de diferenciación, proliferación, así como su regulación (Aquino and Park, 2016; Costa et al., 2017; Muncie and Weaver, 2018).

Los GAGs encuentran expresados de forma ubicua, tanto en compartimentos intracelulares como extracelulares, y en la superficie celular; a su vez, se

promueven interacciones de los glucosaminoglicanos de la MEC de otras células y se regula el nivel de expresión de las uniones tipo GAP que forman parte esencial en la comunicación intercelular.

Se clasifican principalmente en cuatro grandes grupos: 1) Hialurano o ácido hialurónico (HA). 2) Cornitín sulfato (CS) y dermatan sulfato (DS). 3) Heparina y heparan sulfato (HS), 4) queratan sulfato (KS) (Kovensky, 1992; Zulueta et al., 2016), sin embargo, pueden ser clasificados respecto a su función y al grado de sulfatación (Kovensky, 1992; Pacheco-Leal, 2006).

Respecto a su función se clasifican en dos grupos:

- Estructurales formando tejido conjuntivo, la MEC, y tejido conectivo, los cuales tienen como característica el enlace glucosídico $\beta(1-4)$ y $\beta(1-3)$ entre los cuales se encuentran el CS, HA, DS y KS (Kovensky, 1992).
- De secreción con enlaces $\alpha(1-4)$ y $\alpha(1-3)$ como la heparina y sus derivados y el mucotín sulfato (Kovensky, 1992).

Y con base a su nivel de sulfatación: como no sulfatados y sulfatados. El nivel de sulfatación se encuentra relacionado con la capacidad de unión a proteínas centrales y formar los proteoglicanos (Aquino and Park, 2016; Pacheco Leal, 2006).

El ácido hialurónico no presenta sulfataciones, es constitutivo del tejido conjuntivo, cordón umbilical, humor vítreo, vasos sanguíneos y cartílago. Es empleado en terapia regenerativa como andamio para la regeneración de cartílago, hueso, en la reparación del sistema nervioso central en accidentes cerebrovasculares y angiogénesis (Costa et al., 2017).

El heparán sulfato es constitutivo de órganos como el hígado, pulmón, piel e intestino, su interacción con laminina parece ser esencial durante el desarrollo humano y en la ramificación de los bronquios pulmonares (Goodman, 2009). El cornitín sulfato está presente en tejido óseo y cartilaginoso (Pacheco-Leal, 2006).

2.10.4 Proteoglicanos

Los proteoglicanos son un grupo de glucoproteínas altamente glicosiladas de la MEC, están formados por una proteína central multidominio a la que se unen covalentemente GAGs y a través de proteínas de enlace se unen al esqueleto central de hialuronato o ácido hialurónico (Godfrey, 2014). Al estar compuestos de GAGs, heredan sus funciones primordiales, como la retención de H₂O, y contribuyen a la resistencia y compresión de los tejidos. Son importantes para la interacción con factores de crecimiento, ya que están involucrados en la unión y señalización de TGFβ y su receptor (Costa et al., 2017; Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018). Los proteoglicanos pueden interactuar con una gran variedad de macromoléculas y promover la producción de otros constituyentes de la MEC o actuar como receptores para la MEC (Godfrey, 2014). El agrecano y versicano son ejemplos de proteoglicanos que son expresados ubicuamente en todos los tejidos, por ejemplo: en el sistema nervioso central proveen el soporte para las redes perineurales condensadas (PNNs), este soporte está conformado por uniones de HA con proteoglicanos como el versicano y glicoproteínas como la tenascina. Sin embargo, la formación de PNNs endurecen el microambiente neuronal lo que puede provocar afecciones en el crecimiento y desarrollo del cerebro (Muncie and Weaver, 2018).

Están divididos en familias de acuerdo a las propiedades estructurales de su proteína nuclear: Agrecano, versicano, perlecan y la SLRP.

La pequeña familia de proteoglicanos ricos en leucina (SLRP) está formada por proteoglicanos que se unen específicamente a otros constituyentes de la MEC y contribuyen a la estructura de los tejidos conectivos.

La proteína nuclear pesa 40kDa y posee de 6 a 10 residuos de leucina ubicadas en regiones conservadas entre los dominios flanqueados por enlaces disulfuro ricos en cisteína en los extremos N- y C-terminal, que participan en interacciones proteína-proteína con los colágenos, glicoproteínas de matriz y componentes de

membrana celular. A su vez, se pueden dividir en cinco clases respecto a la organización génica y homología aminoácidica (Costa et al., 2017; Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018):

- Clase I Decorina, biglycan y asporin
- Clase II Fibromodulina, lumican, queratocan, proteína repetida rica en prolina, rica en arginina y rica en leucina (PRELP), y osteoadherina.
- Clase III Epifican, mimecan y opticin.
- Clase IV Condroadherina y nictalopin.
- Clase V Podocan.

Entre los proteoglicanos más importantes expresados en la MEC se encuentran el agrecano, versicano, perlecan, decorina, biglycan, mimecan, fibromodulina y luminican (Muncie and Weaver, 2018).

Agrecano es el principal proteoglicano del cartílago, se encuentra altamente glicosilado y está formado por 150 GAG de sulfato de condroitina y queratán sulfato unidos a una proteína central grande.

Versicano es uno de los principales proteoglicanos intersticial de sulfato de cornitina de la MEC de los vasos sanguíneos, es sintetizado por las células vasculares del músculo liso, células endoteliales, miofibroblastos y macrófagos.

Perlecan está formado por heparán sulfato altamente distribuido en las membranas basales (BMs) y tiene la proteína central más grande que se puede encontrar en todos los proteoglicanos, es capaz de auto asociarse o interactuar con laminina y colágeno tipo IV.

Decorina es el SLRP más abundante en el cartílago, contiene una cadena de GAG de dermatán sulfato, puede adoptar estructuras secundarias complejas y formar interacciones específicas con otros componentes de la MEC. La función principal de la decorina es regular la fibrilogénesis del colágeno al inhibir al TGF β y

mantener la integridad del tejido al unirse a fibronectina y trombopondina, regula la síntesis y recambio de la MEC, participa en la regulación de la muerte celular, la adhesión y la migración favoreciendo las interacciones célula-MEC influyendo en el fenotipo celular.

Biglycan es un SLRP que se encuentra en tejido conectivo, como en piel, hueso, vasos sanguíneos. En el cartílago hialino el biglycan se localiza principalmente en la periferia. El biglycan en conjunto con la decorina es un regulador clave para el ensamblaje lateral de las fibras de colágeno principalmente con el colágeno tipo IV, también es capaz de unirse al proteoglicano distroglican que se encuentra unido a la membrana y a una variedad de proteínas que se encuentran relacionadas en la transducción de señales.

Mimecan es un proteoglicano de queretán sulfato que pertenece a la familia SLRP, producto de un gen que codifica para osteoglicina, su función es regular el diámetro de la fibrilla de colágeno.

Fibromodulina es una SLRP predominante en el cartílago está formada hasta por cuatro cadenas de queretán sulfato, influye en la formación de fibrillas de colágeno y en la interacción sostenida con las fibrillas formadas.

Lumican es un SLRP puede estar como proteoglicano o como glucoproteína con cadenas de mono o polisacárido, es altamente activo y participa en el control de la polimerización del colágeno en fibrillas de diámetro pequeño tejidos como la cornea, regula el ensamblaje y diámetro de las fibras de colágeno así como su espaciado interfibrilar, mejorando la estabilidad de las fibrillas de colágeno también se encuentra presente en el músculo esquelético, los riñones, la placenta, el corazón, los discos intervertebrales, vasos sanguíneos.

2.10.5 Glucoproteínas

Las glicoproteínas están compuestas por una proteína central que une a cadenas de polisacáridos; las unidades peptídicas unen covalentemente a cadenas de carbohidratos que pueden ser ramificados, con o sin pocas estructuras repetidas (Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018). Estas estructuras funcionan como conectores de otros compuestos de la MEC ya que contienen grupos funcionales que se unen y reconocen a otras moléculas de la MEC, así como a las moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento secretados. Tal es el caso de la fibronectina y la tenascina, glicoproteínas que modulan la adhesión celular mediada por la integrina hacia otros componentes de la MEC, como el colágeno (Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018). Las dos glicoproteínas más importantes y predominantes de la MEC son la fibronectina y la laminina.

2.10.6 Fibronectinas

La fibronectina es una glicoproteína secretada en el microambiente extracelular que forma fibrillas polimerizadas con otras moléculas de fibronectina o con colágeno mediante un proceso dependiente de células denominado fibrillogénesis y tiene la función de promover la adhesión celular (Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018). Es la segunda proteína más abundante en la MEC, es una molécula dimérica con 250,000 MW de subunidades que contienen dominios de unión para muchas otras proteínas de la MEC como el colágeno (Costa et al., 2017). En ejemplo: la reticulación del colágeno por LOX depende de fibronectina, es por eso que las interacciones entre las proteínas de la MEC son importantes en la regulación de su función y estructura (Muncie and Weaver, 2018).

Además la fibronectina en su estructura tiene una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), que es el motivo de unión a través del cual puede unirse a proteínas de membrana celular llamadas integrinas, específicamente con la integrina $\alpha 5\beta 1$, lo cual es

particularmente importante para la adhesión celular (Costa et al., 2017; Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018).

2.10.7 Lamininas

Las lamininas son glicoproteínas triméricas compuestas por cadenas heterodiméticas α , β , γ , se unen a través de dominios centrales para formar una sola estructura en forma de "Y" (Godfrey, 2014; Costa et al., 2017; Muncie and Weaver, 2018). Se localizan en la membrana basal de los tejidos y su función principal es la de conectar varios componentes de la MEC y facilita la interacción célula-MEC (Costa et al., 2017; Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018). Las lamininas se clasifican según su subunidad, de modo a que la laminina 111, es un trímero de cadenas α_1 , β_1 , γ_1 , la laminina 332 es un trímero de cadenas α_3 , β_3 , γ_3 (Costa et al., 2017; Godfrey, 2014; Karsdal et al., 2013; Muncie and Weaver, 2018).

2.10.8 Integrinas

Las integrinas son glicoproteínas de superficie celular, es una superfamilia de 22 receptores de membrana (Hogg, 1998), compuestos de heterodímeros asociados no covalentemente de subunidades α , β , de las cuales se han identificado 16 α y 8 β (Godfrey, 2014; Hogg, 1998).

Por lo que están clasificadas en tres grandes grupos:

- 1) Subunidades α de muy lenta activación o de activación tardía (VLA).
- 2) Integrinas leucocíticas (CD11/familia CD18).
- 3) Citoadhesinas.

Las integrinas promueven la adhesión celular y la comunicación a través de vinculación de las actividades intracelulares célula-célula o célula-MEC.

2.11 Adhesión celular

Existen otro tipo de interacciones que permiten la conexión de la MEC con las células y entre las células mismas, a través de proteínas mediadoras de la adhesión celular, como las cadherinas, proteínas similares a inmunoglobulina (ICAM-1), integrinas, P-selectinas y mucinas. Estas proteínas establecen interacciones que les permite mantenerse unidas y organizadas para generar tejidos y órganos funcionales, las interacciones pueden ser directas célula-célula o célula-MEC, así los mecanismos de cohesión pueden controlar la arquitectura del organismo: la forma, la resistencia y la disposición de sus diferentes tipos celulares (Alberts et al., 2010). Por lo que al generarse o destruirse las diversas uniones adherentes tipo GAP, desmosomales y ocluyentes, se generan señales que coordinan el comportamiento y regulan los patrones de expresión genética, así como las transiciones mesénquima-epitelio (Gumbiner, 1996; Slavkin and Greulich, 1975). De modo que la adhesión celular también se encuentra relacionada, tanto con la remodelación de la MEC como el tipo de interacciones celulares, manteniendo una comunicación bidireccional que en conjunto pueden controlar la manera en que las células se desplazan en el organismo, guiándolas en los procesos celulares de proliferación, migración y diferenciación, presentes en el desarrollo, reparación y mantenimiento de los tejidos y órganos (Alberts et al., 2010; Karp, 2013; Sean, Kim, and Lee, 2016).

2.12 Composición de la matriz extracelular renal.

Entre los investigadores que fueron pioneros en el desarrollo de técnicas como la organogénesis, destacó Cliff Grobstein, quien en 1954 tras haber evaluado las etapas del desarrollo embrionario, sugirió que la MEC participa considerablemente como un factor de la inducción del desarrollo embrionario (Salvatori et al., 2014; Slavkin and Greulich, 1975).

Grobstein evaluó las interacciones heterotípicas de los tejidos durante el desarrollo embrionario así como la posibilidad de que estuvieran siendo mediadas por

interacciones directas, largas y con la matriz extracelular. Como resultado se reconoció que la MEC tiene un rol crucial en el desarrollo y reparación del riñón (Slavkin and Greulich, 1975). A través de sus trabajos, Grobstein caracterizó la composición de la MEC renal, en la que los constituyentes principales de la membrana basal es la colágena tipo IV y la laminina $\alpha 5$ (Geneser, 2003; Laurie et al., 1989; Orlando et al., 2013; Ross et al., 2009; Salvatori et al., 2014), seguida de colágena tipo I (Wang et al., 2018), entre los proteoglicanos presentes se encuentran el heparán sulfato y la agrina; además de fibronectina, vitronectina, nefronectina y glucoproteínas como la tenascina y la entactina, actualmente conocida como nidógeno-1 (NID-1) (Nagao et al., 2016; Orlando et al., 2013; Skorecki et al., 2018).

Es interesante señalar que en el glomérulo se encuentra más expresada la integrina $\alpha 3/\beta 1$, receptor transmembranal que media las interacciones entre las células y la MEC (Orlando et al., 2013).

2.13 Descelularización.

El proceso de descelularización es una técnica que busca desproveer a un órgano o tejido de las células que lo conforman y al mismo tiempo conservar la compleja arquitectura de la MEC para posteriormente, recelularizar mediante la siembra de células madre o pluripotenciales del paciente y obtener un órgano funcional, con el objetivo de que éste pueda ser trasplantado, aboliendo el rechazo inmunológico (Welman et al., 2015).

La técnica de descelularización se realiza por medio de la perfusión de soluciones de lavado utilizando detergentes orgánicos los cuáles pueden ser iónicos como el Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) o no iónicos como el Tritón X-100. La base del fundamento es que los detergentes son compuestos de cadena hidrocarbonada hidrofóbica que actúan en la superficie celular rompiendo las membranas, lo que genera lisis celular y en consecuencia el contenido intracelular se libera. La lisis

celular es generada ya que se rompen las interacciones de la membrana celular: lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína. Entonces una descelularización satisfactoria podría estar definida por la falta de células, núcleos celulares y su contenido intracelular.

Así, órganos complejos podrían descelularizarse conservando los componentes de la MEC necesarios para promover una nueva adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y regulación de la señalización intercelular (Crapo et al., 2011; Ross et al., 2009).

2.14 Descelularización renal.

El proceso de perfusión con detergentes puede producir riñones carentes de células que en apariencia se observarían casi transparentes conservando de igual forma en apariencia podrían mantener su estructura. Los riñones son órganos que inherentemente tienen un mecanismo similar a una esponja, pueden comprimirse y expandirse fácilmente (Ross et al., 2009). Esto permite que la presión ejercida por la velocidad del flujo de perfusión de los detergentes contribuya a la desestabilización mecánica de las membranas celulares.

Desde el año 2009 hasta el 2017 se han generado diversas técnicas para la descelularización renal las cuales se han resumido en el cuadro 2.1.

Cuadro 2. 1 Comparativo de técnicas de descelularización renal.

ÓRGANO	PRE-TRATAMIENTO	SOLUCIONES DESCELULARIZANTES	RESULTADO	AUTORES
Riñón Sprague-Dawley 100 mmHg 5 días	Solución salina Nitroprusiato	Triton X-100 3 % SDS 4 % MgSO ₄ 5 mM NaCl 1 mM Desoxirribonucleasa 0.0025% Azida sódica 0.05 %	Remoción celular MEC con vasculatura y una estructura de colágena intactas. Preservación de laminina y colágeno IV.	(Ross et al. 2009)
Riñón Rata Wistar 100 cmH ₂ O	PBS heparinizado	Triton X-100 1 % PBS SDS 1% Antibiótico	Sin residuos celulares	(Liu et al. 2009)
Riñón Cerdo	N/A	Triton X-100 1 % NH ₄ OH 0.1%	Descelularización completa y preservación de la red vascular	(Baptista et al. 2009)
Riñón Rhesus Monkey	Solución salina PBS	Triton X-100 1% SDS 1% PBS Temperatura 4°	Ausencia de núcleos celulares. Se conserva la organización de la MEC.	(Nakayama et al. 2010)
Riñón Cerdo 100 ml/min	PBS Heparinizado	SDS 1 % PBS 1 %	Descelularización 91 %	(Park and Woo 2012)
Riñón Sprague-Dawley	Heparina Solución salina Nitroprusiato	Triton X-100 SDS CaCl ₂ 5 mM MgSO ₄ 5 mM NaCl 1mM Desoxyrribonucleasa 0.0025%	Obtención de la MEC viable.	(Ross et al. 2012)
Riñón Cerdo Yorkshire Biorreactor	10 unidades USP/ml heparina de sodio	Triton X-100 1 % SDS 0.5 % NH ₄ OH 0.1% MgCl ₂ 10 mM DNAsa 0.0025%	Después de 26 h se observa descelularización viable.	(Sullivan et al. 2012)

Cuadro 2. 2 Comparación de técnicas de descelularización renal (Continuación).

ÓRGANO	PRE-TRATAMIENTO	SOLUCIONES DESCELULARIZANTES	RESULTADO	AUTORES
Riñón Sprague-Dawley 40 mmHg	PBS Heparinizado	Triton X-100 1 % SDS 1 % PBS Penicilina G 10000 U/ml Estreptomycin 10 mg/ml	Sin residuos celulares	(Song et al. 2013)
Riñón Sprague-Dawley	Nitroprusiato 10 ⁻⁴ M Solución salina	SDS 1 % PBS 0.4 ml/min	Total ausencia de núcleos celulares	(Bonandrini et al. 2014)
Riñón Sprague-Dawley	Heparina 50 U/ml PBS pH 7.4	Triton X-100 0.1 % SDS 0.8 % Penicilina 100 U/ml Estreptomycin 100 µg/ml	Descelularización completa	(Yu et al. 2014)
Sprague-Dawley 100 mmHg	N/A	Agua desionizada SDS 0.25 %, 0.5%, 0.66%, 1% Penicilina 200 U/ml Estreptomycin 200 µg/ml	Descelularización y conservación de la MEC	(Burgkart et al. 2014)
Riñón Rata Lewis 1.2 ml/min	Solución salina Heparina	Triton X-100 1 % PBS 1 % SDS 1 %	Sin presencia de núcleos celulares.	(Peloso, Ferrario, et al. 2015)
Riñón Rata 5 ml/min	N/A	Triton X-100 1 % Agua destilada 1 % SDS 0.1 % Tripsina 0.02 % EGTA 0.05 %	La tripsina causa deterioro estructural y pérdida de factores de crecimiento.	(Caralt et al. 2015)
Riñón Cerdo 40 – 70 mmHg	PBS Heparinizado 1X	Ciclos de congelación y descongelación SDS 0.1 %	Remoción del 98 % de células.	(Pooornejad et al. 2015)

Cuadro 2. 3 Comparación de técnicas de descelularización renal (Continuación).

ÓRGANO	PRE-TRATAMIENTO	SOLUCIONES DESCELULARIZANTES	RESULTADO	AUTORES
Riñón Rhesus Monkey				(Peloso, Petrosyan, et al. 2015)
Riñón Humano	Solución salina fría 0.9%	PBS 12 h SDS 0.05 % 48 h DNasa 6 h	Obtención de MEC viable.	(Peloso, Petrosyan, et al. 2015)
Riñón Humano 12 ml/min	N/A	H2O destilada 12 h SDS 0.5 % 48 h PBS 5 días	Obtención de MEC viable 95 %.	Orlando, 2015
Riñón Cerdo	PBS Heparinizado	Triton X-100 1 % SDS 1 % PBS 4 días, 10 ml/min	DNA residual < 50 ng DNA/mg tejido	(Guan et al. 2015)
Riñón Sprague-Dawley 8 ml/min 37°	PBS Heparinizado pH 7.4	Bomba peristáltica SDS 0.8 % Triton X-100 0.1 % Penicilina/Estreptomicina	Descelularización del 97%.	(Wang et al. 2015)
Riñón 1x1x1 Humano	N/A	SDS 1 % 5 días; pH 7.4 Agitación constante		(Nagao et al. 2016)
Riñón Cerdo 80 mmHg	PBS Heparinizado 1X Toda la noche 4°	Biorreactor SDS 0.5 % 10 ml/min; 35 ml/min	MEC descelularizada con andamio de colágeno intacta.	(Pornejad et al. 2017)
Riñón Sprague-Dawley 100 mmHg	Congelación - 80° en PBS	SDS 0.66%; 1%; 120 min	Presenta integridad Laminina y Fibronectina.	(Schmitt et al. 2017)

2.15 Recelularización

La finalidad de obtener una MEC que conserve todos sus componentes es la recelularización, esto implica preservar la funcionalidad tanto estructural como bioquímica del andamio, debido a que la composición le confiere propiedades biofísicas específicas (Hillebrandt et al., 2019; Moser and Ott, 2014).

La reconstitución del tejido u órgano por recelularización se basa en el anclaje de células madre o tipos celulares órgano-específicos al andamio de la MEC (Al-Awqati and Oliver, 2002; Garreta et al., 2017; Hillebrandt et al., 2019), desde la microanatomía hasta el restablecimiento de la función específica.

Las células utilizadas para la recelularización requieren de una señal guía para su reordenamiento y maduración. La transducción de ésta señal se encuentra mediada por la composición específica de la MEC, factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, factores de crecimiento, proteínas estructurales y parámetros como pH, pO₂, pCO₂, temperatura, niveles electrolíticos y concentraciones de glucosa o lactato, así como la presión de perfusión y la tasa de flujo (Hillebrandt et al., 2019; Wilm et al., 2016). Para monitorear y controlar estos parámetros es imperativo el uso de biorreactores (Garreta et al., 2017).

Así, la recelularización definida como el proceso de repoblar un andamio de MEC acelular de un tejido u órgano que se divide en dos fases:

- 1.- Cultivo celular estático.
- 2.- Proceso dinámico de recelularización.

Los cultivos celulares primarios no son efectivos para la recelularización de las matrices celulares de órganos completos, debido a la incapacidad que tienen para expandirse.

III. Hipótesis

El método de descelularización renal utilizando un sistema de perfusión por gravedad con detergentes orgánicos, permitirá obtener una MEC renal acelular de riñón de rata Wistar.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Estandarizar y evaluar el método de perfusión por gravedad para la descelularización de riñón de rata Wistar que permita la obtención de una MEC renal acelular.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar los tiempos de lavado y la velocidad de perfusión para obtener una MEC acelular.
2. Analizar la MEC renal obtenida a través de tinciones histológicas para determinar la eficiencia del proceso de descelularización.
3. Demostrar que la cantidad de DNA nuclear residual <50 ng de DNA/mg de tejido a través de la cuantificación de DNA y por tinción con DAPI.

V. Materiales y métodos

Para este proyecto se utilizaron diversos materiales y equipos, los cuales fueron provistos por el Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular de la Facultad de Medicina y por el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Materiales biológicos: Ratas macho de la cepa Wistar de aproximadamente 380 gramos de peso corporal.

Sustancias farmacéuticas: pentobarbital sódico, heparina, antibiotic-antimycotic (100X) Gibco™ Thermo Fisher Scientific.

Reactivos: Solución salina grado inyectable de PiSA™, PBS de J.T. Baker™, detergentes orgánicos tritón X-100 de Sigma Aldrich™, SDS de J.T. Baker™, paraformaldehído al 4% de Merck™, parafina Leica de Metrix Laboratorios™, etanol de Sigma Aldrich™, xilol de J.T. Baker™, tren de colorantes para las tinciones, DAPI Millipore™, solución entellan, kit Wizard Genomic DNA purification Promega™.

Materiales diversos: Agua bidestilada, instrumental quirúrgico, piseta, punzocat o cánula 24G 3/4", sedas s/ag30, sutura nailon, gasas, caja de petri, portaobjetos, cubreobjetos, tubos falcón de 50 ml, histocasets y bolsas para los diversos desechos generados.

Equipos: Entre los equipos utilizados se encuentran: el sistema de perfusión por gravedad que fue diseñado por el equipo de trabajo de descelularización de la Clínica del Sistema Nervioso, lámpara de cirugía, campanas de flujo laminar, deshidratador de muestras automatizado Leica TP1020, incluidor de muestras Leica EG1160, Nanodrop 1000, Thermo Scientific, micrótopo Leica RM2135, estufa quirúrgica de baño maría Chicago, microscopio óptico y de fluorescencia, refrigerador y computadora.

Rata macho Wistar: El espécimen murino lo proporcionó la Unidad del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, la cual se rige bajo la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 y garantiza que el animal se encuentra en

condiciones saludables, con condiciones de macro ambiente controlado con sistemas de ventilación y libres de patógenos.

Las ratas recibieron alimentación *ad libitum* y fueron seleccionadas respecto a un peso aproximadamente de 390 g (+/-10g).

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UAQ, el 13 de noviembre de 2019, apegándose a las normas de investigación establecidas por la Norma Oficial de la Secretaria 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. El presente proyecto fue aprobado para su registro por la Dirección de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina de la UAQ, el 26 de febrero de 2020; con número de registro 11456, que 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.

Condiciones generales.

Para la obtención de los riñones y su descélularización primero se realizó un procedimiento quirúrgico, el cual consistió la administración del anestésico general y la comprobación del estado de inconsciencia, la realización posterior de una toracotomía, la heparinización sistémica y la exanguinación. Posteriormente, fueron removidas las vísceras para poder acceder al espacio retroperitoneal, se identificaron los riñones y se ligaron las venas y arterias renales. Después se realizó la canulación de la vena renal, se comprobó la adecuada canulación y entonces los riñones fueron extraídos de la cavidad abdominal.

Posteriormente, los riñones fueron colocados en una malla donde se llevó a cabo todo el proceso de descélularización. Esto, a una velocidad de flujo constante de 2.5 ml/min durante 3 horas por cada solución de lavado.

Los lavados se realizaron a concentración creciente del detergente no iónico Tritón X-100 al 1%, 2% y 3%, seguido del detergente iónico SDS al 0.1% y finalmente con PBS.

Finalmente, para determinar la eficiencia de la técnica, se realizó una tinción con Hematoxilina-eosina (HE) y la tinción Tricrómica de Masson para determinar las características del tejido así obtenido, principalmente la presencia de colágena. También, se contabilizó el número de células residuales, así como la presencia de núcleos íntegros a través de las tinciones con DAPI y se cuantificó el ADN.

Procedimiento quirúrgico.

Se utilizaron 10 ratas Wistar macho con un peso aproximado de 380 g (+/-10g), las cuales, fueron anestesiadas a través de una administración vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (1U/100 g), de acción rápida, utilizando la dosis adecuada. Posteriormente, se verificó que el animal estuviera completamente sedado, al no mostrar reacción alguna a estímulos en las extremidades traseras y/o en la cola.

Para evitar la obstrucción del sistema vascular por coagulación en los riñones, se heparinizó sistémicamente mediante la administración intracardiaca de heparina (1000 IU/kg). Posteriormente, se realizó la exanguinación con un corte a nivel de la aurícula derecha y la administración de solución salina grado inyectable al nivel del ventrículo izquierdo.

Para canular y extraer los riñones fue necesario remover las vísceras y retiradas con una gasa húmeda, se expusieron los vasos sanguíneos renales y el uretero para ser ligados con seda s/ag30. Así, los riñones fueron canulados por la vena renal con un catéter 24G 3/4" y se diseccionaron de la cavidad abdominal.

Técnica de descelularización.

Para este proceso se utilizó el sistema de perfusión por gravedad diseñado en el año 2017 por el equipo de trabajo de descelularización del Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular.

La configuración del sistema consta de un contenedor de solución de lavado que se encuentra en una zona elevada, a 1 metro de altura. Este se encuentra conectado hacia una malla que reposa en un depósito cóncavo de lavado que reside al interior de una campana de flujo laminar. Finalmente, una vez que la perfusión ha abandonado el órgano, el líquido es recolectado en un colector de soluciones de desecho, el cual está comunicado con el depósito cóncavo.

El riñón fue canulado y diseccionado, se montó sobre la malla del depósito cóncavo de lavado y para el inicio de su lavado se conectó con el contenedor de solución de lavado. Los lavados se iniciaron a concentraciones crecientes de tritón X-100 al 1%, 2% y 3%, finalizando con el SDS al 0.1%, dando un tiempo de 3 horas de lavado para cada detergente. Durante todo el proceso de lavado se mantuvo una velocidad con flujo constante a 2.5 ml/min, el proceso de lavado duró aproximadamente 12 horas.

La descelularización satisfactoria está definida a través tres criterios (Costa et al. 2017; Crapo et al. 2011): la evidente falta de núcleos celulares, una presencia <50ng DNA/ g tejido (Dzobo et al. 2019) y longitud menor a 200 pb de fragmentos del DNA remanente. Estos parámetros se evalúan a través de las tinciones histológicas (HE, DAPI) como método semicuantitativo para identificar ausencia de células y de núcleos celulares, y la extracción de DNA como método cuantitativo.

Tinciones histológicas

Para determinar el grado de la eliminación celular provocada por el método de descelularización, se evaluó por microscopía óptica, mediante la obtención y el procesamiento de las imágenes de las tinciones histológicas de HE, la presencia de núcleos celulares íntegros a través de la tinción de fluorescencia DAPI, además se realizó la identificación de colágena la cual también fue evaluada por microscopía óptica a través de la tinción histológica tricrómica de Masson. Para estas determinaciones se utilizaron un riñón no descelularizado como control y un riñón descelularizado como el caso experimental.

Procesamiento de la muestras para las tinciones histológicas:

Los riñones se mantuvieron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4C, y la preparación de la muestra para la inclusión en parafina, se realizó en el deshidratador de muestras automatizado Leica TP1020, una vez deshidratada la muestra se fijo en parafina. Posteriormente el riñón se acomodó en un molde de inclusión en el cual se vertió parafina líquida utilizando el incluidor Leica EG1160, el riñón se orientó de forma adecuada y se cubrió con un histocasete y se le volvió a verter parafina líquida para formar el bloque de parafina, que una vez solidificado fue montado en el micrótopo Leica RM2135, en el cual se realizaron cortes histológicos de 7µm a un ángulo de 5°. El corte se montó en un portaobjetos con ayuda de una estufa de baño maría.

Para las tinciones, la muestra se desparafinó durante 4 horas en una incubadora a 45°C. Finalmente en la campana de flujo laminar se realizó la hidratación de las muestras a través del tren de alcoholes y posteriormente en el tren de tinciones para hematoxilina-eosina (HE) y Tricrómica de Masson, respectivamente (ver anexos).

Al terminar las tinciones, la muestra se fijó con dos gotas del medio de montaje para microscopía solución entellan, se le colocó un cubreobjetos largo evitando la formación de burbujas y se dejó secar.

Las tinciones histológicas se observaron al microscopio con un aumento 10X, contabilizándose 3 campos por región: el hilio, polo superior y polo inferior correspondiente a la medula renal.

Las imágenes fueron obtenidas a través del software Image-Pro® Plus 6.2.2 para Windows y para el conteo celular las imágenes se procesaron con el programa ImageJ 2018 versión 1.25d desarrollado en lenguaje Java por el National Institutes of Health que es de dominio público.

Fluorescencia DAPI:

El 4',6diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI), se usa para teñir DNA nuclear, para su lectura se utilizó un microscopio de fluorescencia.

Para la tinción DAPI fue necesaria una previa preparación del tejido descelularizado por lo que se mantuvo en PFA al 4% durante 24h. Posteriormente para la fijación, se realizó un tratamiento con PBS y sacarosa al 20% manteniéndolo a 4°C hasta su precipitación. Una vez precipitada, la MEC renal se cambio a una concentración sacarosa al 30% y PBS nuevamente se mantuvo a 4°C hasta que precipitara. Finalizado el tratamiento se incluyo en parafina, se realizaron cortes de 7 μ m, los cuales se colocaron en un portaobjetos, para proceder entonces a su desparafinación durante 4h a 45°C y posteriormente a su rehidratación.

La rehidratación se siguió en un tren de alcoholes y posteriormente se incubó con solución de permeabilización durante 8 min. Se realizaron dos lavados con PBS filtrado al 1X con una duración de 5 minutos por lavado. Para el desenmascaramiento se colocaron las laminillas en buffer de citratos y se calentó 1.5 min en horno de microondas abriéndolo cada 20 seg. Al finalizar, se enfrió con agua destilada, se dejo secar y se marco con plumón hidrofóbico. Se incubó con solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente y se realizaron 2 lavados con PBS, cada lavado duró 5 min.

Finalizados los lavados se colocó solución DAPI a 1:4000 durante 10 min., y se le agregó 70 µl de vectachelf con el fin de proteger la fluorescencia. Se limpió la laminilla y se almacenó a -4°C en oscuridad. La contabilización de núcleos presentes se realizó por microscopia de fluorescencia.

Extracción y cuantificación de DNA.

Para determinar la eficacia del método de descelularización usado, se realizó la extracción y cuantificación de DNA del riñón control y del descelularizado. Ambos órganos siguieron el mismo proceso descrito a continuación;

La extracción de DNA se realizó utilizando el kit Wizard Genomic DNA purification Promega. Se obtuvo una muestra de tejido del polo inferior de la corteza renal, la cual colocada y pesada en un tubo de 1.5 µl previamente tarado.

El tejido fue triturado en fresco con una navaja estéril y se le adicionó 600 µl solución de lisis nuclear, se homogenizó durante 10 segundos. Posteriormente, se le adicionó 10 µl de proteína K y se incubó con agitación constante durante 15 min a 65 °C. Para la lisis y precipitación de proteínas se agregaron 3 µl de RNAsa y se incubó a 37 °C durante 30 min. Después se le adicionaron 200 µl de la solución de precipitación de proteína y se agitó en vórtex y se mantuvo en hielo durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 16,000 rpm durante 4 min.

Para la precipitación del DNA y su rehidratación, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le adicionaron 600 µl de isopropanol, se mezcló por inversión para después precipitar por centrifugación a 16,000 rpm durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante fue removido y se le agregó 600 µl de etanol al 70% y se mezcló por inversión, se procedió a centrifugar nuevamente a 16,000 rpm durante 10 min. Después, se retiró con cuidado el etanol con la precaución de no aspirar la pastilla formada, una vez que fue absorbido todo el etanol se procedió a hidratar al DNA por lo que a la pastilla formada se le adicionaron 100 µl de H₂O y se dejó toda la noche a 4°C.

El DNA se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop) a una densidad óptica de absorbancia a 260 nm y 280 nm.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de la contabilización celular y del DNA de las muestras descelularizadas así como de sus controles ambos por triplicado. Se obtuvieron los estadísticos descriptivos, se realizó el análisis de normalidad Shapiro-Wilk y el análisis T-Student para muestras independientes para determinar si existía diferencia significativa entre grupos. Para análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics® versión 19.

Consideraciones éticas

En el presente proyecto se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar por lo que las consideraciones éticas fueron las siguientes:

El espécimen lo proporcionó la Unidad del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, la cual se rige bajo la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 y garantiza que el animal se encuentra en condiciones saludables, con condiciones de macro ambiente controlado con sistemas de ventilación y libres de patógenos.

Se evitó que el animal experimentará sufrimiento innecesario a través de la administración vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (10U/100g), ya que éste es un anestésico general que actúa a nivel del SNC, es considerado de efecto rápido y la dosis que utilizada fue para eutanasia. Una vez finalizada la administración del analgésico se verificó a través de la prueba del pellizco de la pata o cola, que el animal estuviera completamente sedado ya que no mostró reacción alguna.

Manejo de los residuos

El cadáver de los animales sacrificados así como los restos de tejido fueron tratados a través del sistema de residuos peligroso biológico infeccioso (RPBI), a través del depósito de residuos biológicos del anfiteatro de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro (FMUAQ).

La sangre obtenida de la exanguinación se recolectó en un recipiente y se le adicionó cloro, posteriormente se vertieron en un galón especial para recolectar los desechos líquidos obtenidos de los lavados con los detergentes usados en la descelularización.

VI. Resultados y discusión

6.1 Descelularización

Inicialmente, para la canulación se identificaron la vena y la arteria renal. Se realizó la primera prueba piloto canulando la arteria renal y el tiempo de perfusión para cada detergente fue de 2 horas, sin embargo, al finalizar el proceso, los riñones no presentaron la coloración leuca característica una descelularización, en la descelularización piloto 2h (imagen 1e del cuadro 2.4) se puede evidenciar aún una coloración rosacea.

Por lo que, para la segunda prueba piloto se decidió aumentar el tiempo de cada perfusión a 3 horas, y por practicidad se canuló la vena renal; en esta segunda prueba piloto se obtuvo un órgano prácticamente transparente, el cual se puede observar en la descelularización de 3h (imagen 2e del cuadro 2.4). A partir de este experimento, se realizaron los triplicados (imagen 3, 4 y 5, del cuadro 2.5 y su continuación) para la verificación de los parámetros de la técnica, la repetitividad de la metodología y en consecuencia, su estandarización. Todos los experimentos fueron realizados bajo condiciones de esterilidad y en la campana de flujo laminar.

Cuadro 2. 4 Compilación del Time lapse de las descelularizaciones piloto.

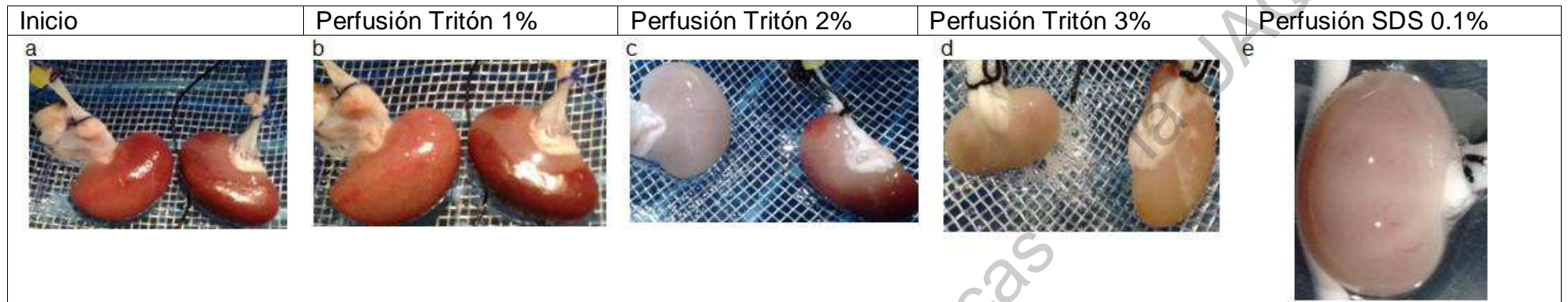


Imagen 1.- Time lapse de la primera descelularización piloto.

La canulación se realizó vía arteria renal. El tiempo de permanencia de los detergentes fue de 2 h con una duración total del proceso de descelularización de 8 h. Se observa la decoloración paulatina del órgano.

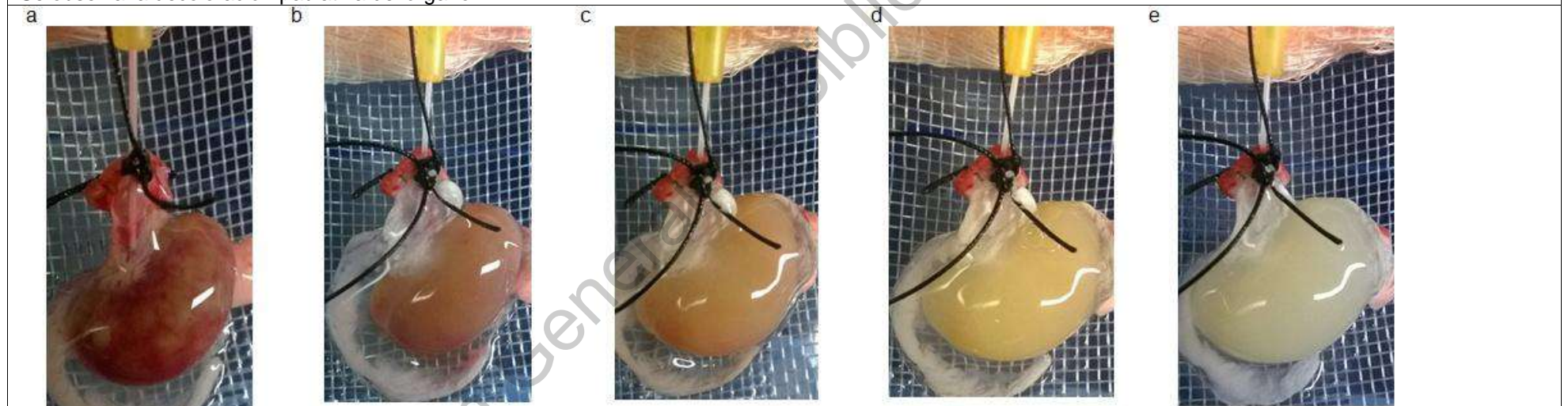


Imagen 2.- Time lapse de la segunda descelularización piloto.

La canulación se realizó vía vena renal pero el tiempo en cada perfusión duró 3 h, con una duración total de 12h. Se observa la decoloración total del órgano hasta un color leuco.

Cuadro 2. 5 Compilación del Time lapse de las descelularizaciones.


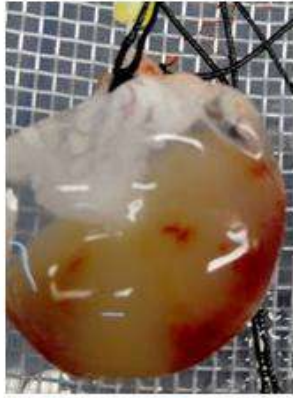



Inicio	Perfusión Tritón 1%	Perfusión Tritón 2%	Perfusión Tritón 3%	Perfusión SDS 0.1%
<p>a</p> 	<p>b</p> 	<p>c</p> 	<p>d</p> 	<p>e</p> 

Imagen 3.- Time lapse de la primera Descelularización.

Con base a los parámetros obtenidos de la segunda descelularización piloto se realizó la primera descelularización reproducible. Se observa la decoloración total del órgano hasta un color blanco.





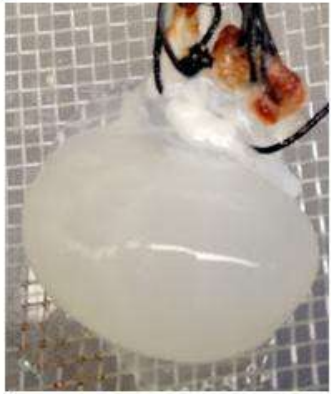
<p>a</p> 	<p>b</p> 	<p>c</p> 	<p>d</p> 	<p>e</p> 
---	---	--	---	---

Imagen 4.- Time lapse de la segunda Descelularización.

Se observa que la decoloración total del órgano hasta llegar a un color blanco.

Cuadro 2. 6 Compilación del Time lapse de las descelularizaciones (Continuación).






Inicio	Perfusión Tritón 1%	Perfusión Tritón 2%	Perfusión Tritón 3%	Perfusión SDS 0.1%
<p>a</p> 	<p>b</p> 	<p>c</p> 	<p>d</p> 	<p>e</p> 

Imagen 5.- Time lapse de la tercera Descelularización.

Se observa la decoloración total del órgano, aunque se observan unas manchas a lo largo del proceso estas se eliminaron totalmente durante la perfusión del último detergente el SDS al 0.1%.

Dirección General de Bibliotecas de VALMAD

La segunda descelularización piloto se identificó la vena renal y se realizó su canulación debido a que su localización facilita el proceso de canulación. Durante este proceso no se presentaron complicaciones y como se muestra a través del tren de imágenes del cuadro 2.4 se puede observar el cambio de coloración en el órgano en la imagen 2. La decoloración va desde una tonalidad roja pasando por el café, el marrón hasta el blanco. Este procedimiento al realizarse de forma más estandarizada procedió a realizar las tinciones histológicas.

Del primer procedimiento no se realizaron tinciones debido a que cualitativamente se puede observar que la decoloración no es la adecuada, y se optó por aumentar el tiempo de permanencia en cada una de las perfusiones.

Los parámetros obtenidos de la metodología piloto para la reproducibilidad de la técnica son:

- Canulación por vena renal por lo que la perfusión es retrograda.
- La secuencia de lavados inicia con la perfusión de Tritón al 1% en concentración creciente de 2% y 3%, finalizando con SDS a 0.1%, cada uno con una duración de 3 horas de perfusión.
- La velocidad de perfusión se estableció en 5 ml/min, con un pH de 7.2 (+/-2) y a temperatura ambiente.
- Fuerza de gravedad a 9.81 m/s^2 .

6.2 Tinciones histológicas

Hematoxilina-Eosina

La tinción de hematoxilina-eosina (HE) se utiliza ampliamente en histología para teñir cortes histológicos de tejidos. La eosina es un colorante ácido de color rosa y es usado junto con la hematoxilina ya que éste es un colorante básico (azul).

La eosina se une principalmente a los componentes citoplasmáticos y de la MEC; por su parte, la hematoxilina tiene afinidad por el núcleo de las células.

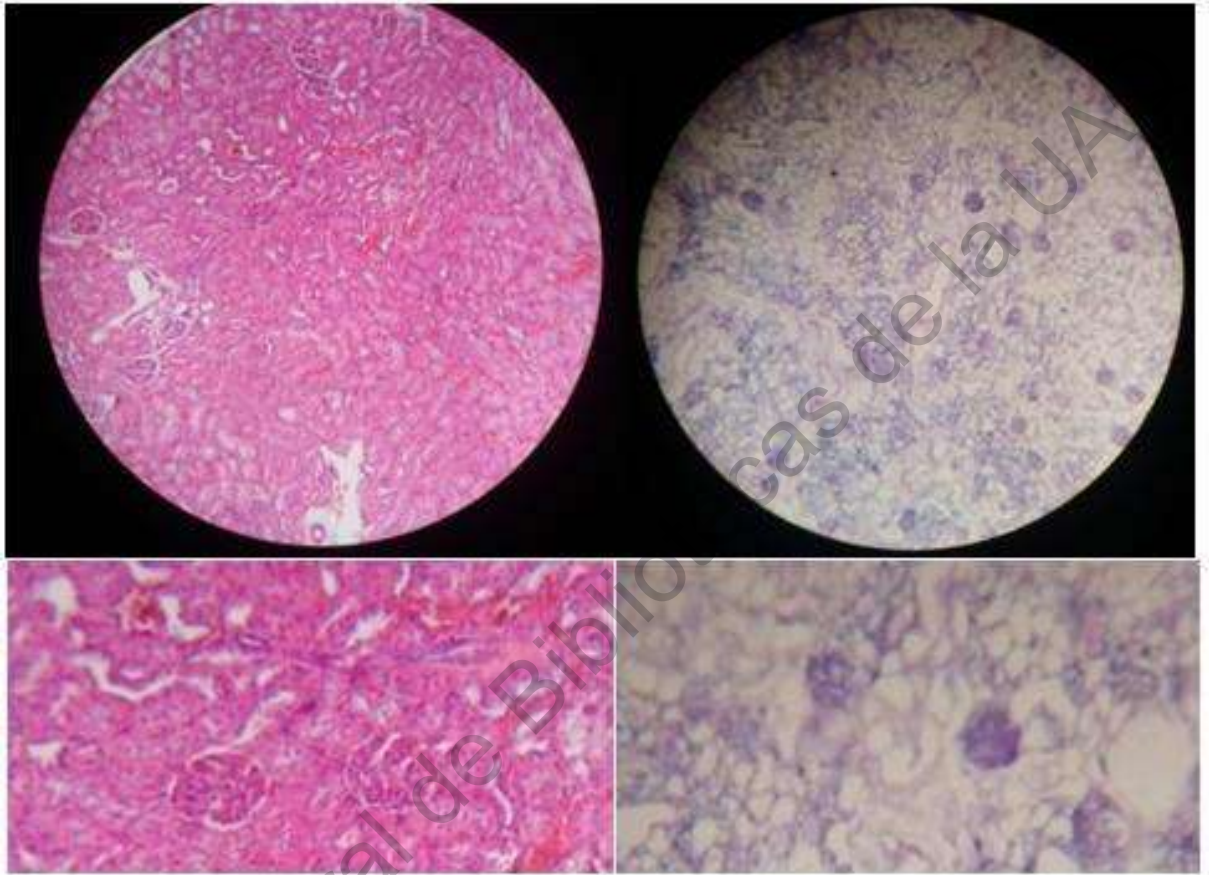


Imagen 6.- Tinción de hematoxilina-eosina riñón del riñón control y del riñón descelularizado. 4X y 10X.

En la imagen 6, el panel izquierdo corresponde a la tinción de HE del riñón control, se evidencia la presencia de células que conforman al riñón y en particular se logran identificar los glomérulos.

Los núcleos de las células renales teñidas en el presente frotis se observan en azul/morado y el contenido citoplasmático en rosa.

En contraste, en el panel derecho que corresponde al riñón descelularizado se puede observar que el contenido celular fue removido ya que no se observa la coloración rosa característica del citoplasma celular, ni la presencia de núcleos.

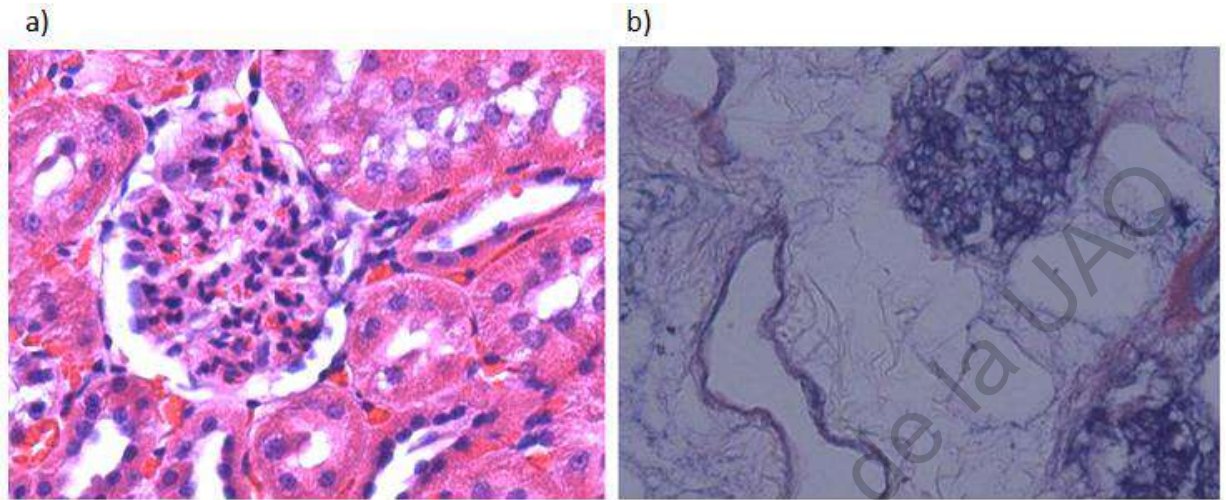


Imagen 7.- Glomérulo teñido con HE. 40X.
a) Riñón control. b) Riñón descelularizado.

La imagen 7 corresponde a una ampliación de la imagen 6 a objetivo 40X, de un glomérulo (panel a), en el cual se pueden observar las estructuras celulares teñidas correctamente debido a que están presentes, mientras que en el panel (b) es evidente que el contenido celular fue removido. No obstante, se puede observar que se conservan las estructuras fibrilares que conforman la MEC del riñón.

Tricrómica de Masson

La tinción Tricrómica de Masson evidencia principalmente fibras de colágeno, sin embargo, al ser una tinción diferencial y policrómica, también se pueden observar de forma diferenciada, núcleos celulares de color azul oscuro/negro, citoplasma del tejido epitelial y muscular de color rojo, tejido conjuntivo en particular colágeno y reticulina de color azul/verde.

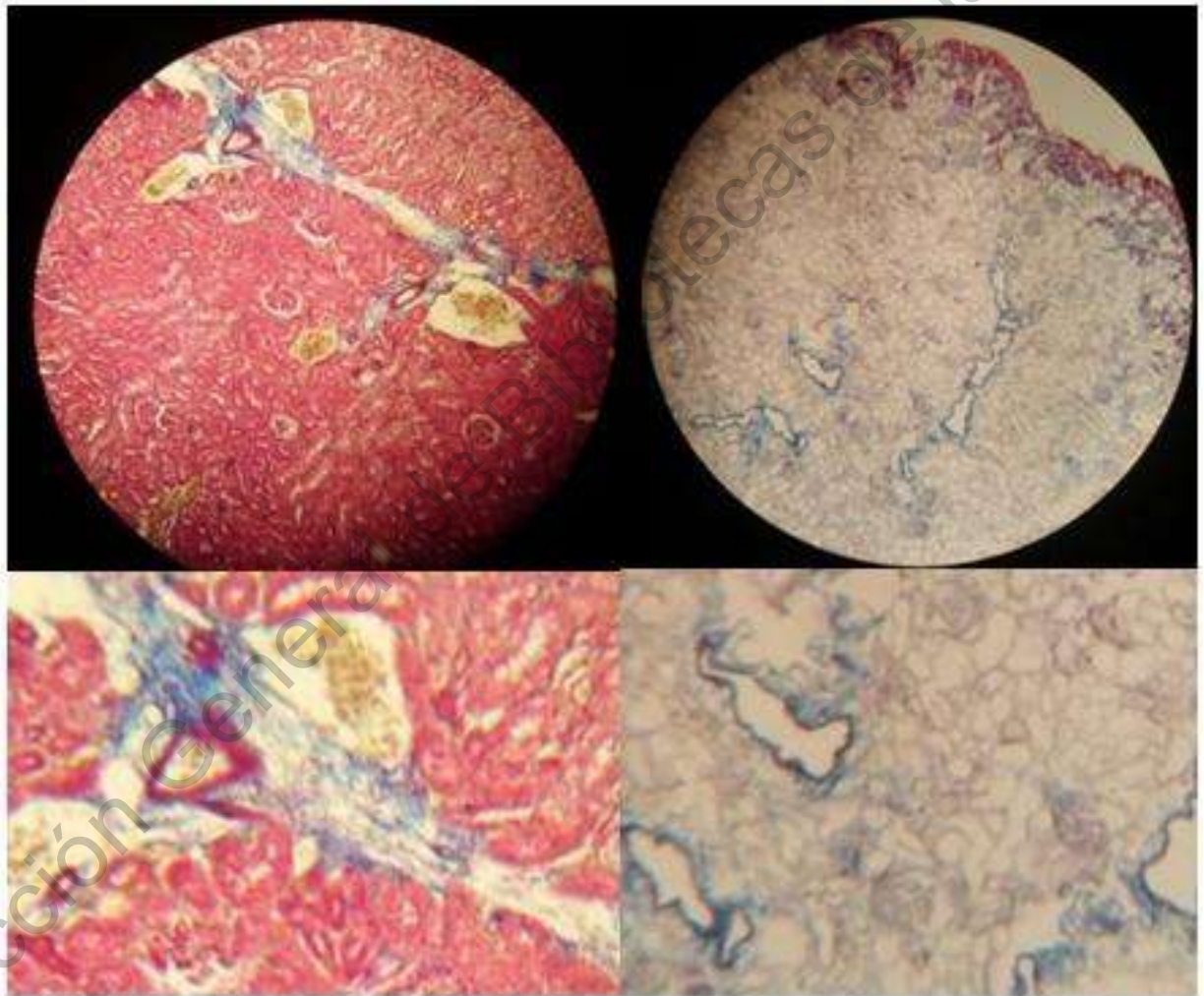


Imagen 8.- Tinción Tricrómica de Masson riñón control y riñón descelularizado. 4X y 10X.

En la imagen 8 la tinción tricrómica de Masson del riñón control que se encuentra en el panel de la izquierda, se observan las células que de forma constitutiva

conforman al riñón, de color rojo el contenido citoplasmático, de color negro los núcleos celulares, mientras que en color azul se encuentran teñidas las fibras del colágeno, en el panel de la derecha se puede observar la carencia celular típica de un órgano descelularizado ya que solo están teñidas de color azul las fibras de colágeno de la MEC renal.

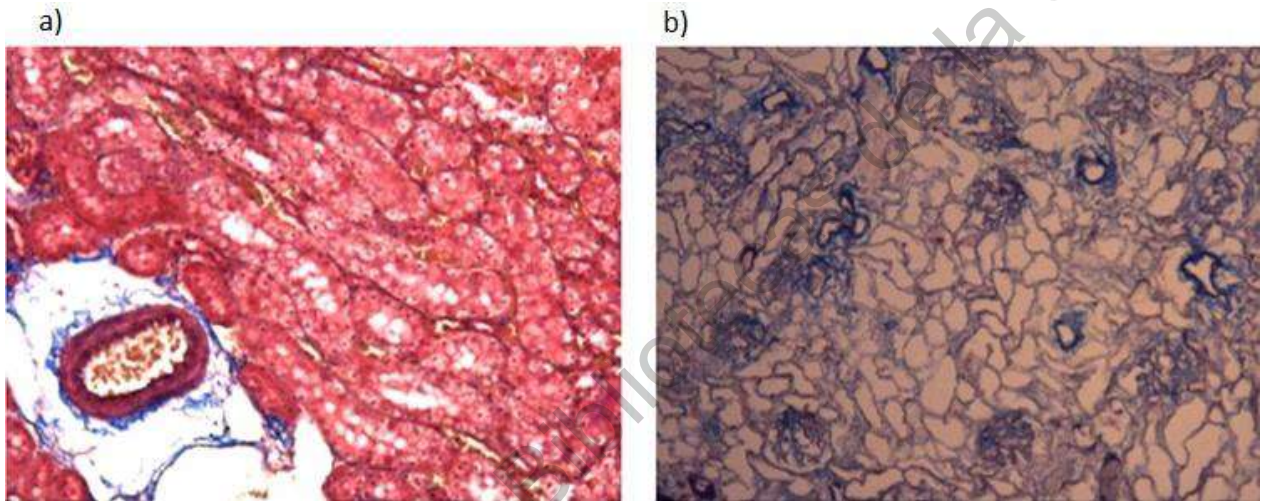


Imagen 9.- Tinción Tricrómica de Masson 10X.
a) Riñón control. b) Riñón descelularizado.

En ambos paneles de la imagen 9 se pueden observar fibras de colágena teñidas en color azul, además de la presencia de la colágena al comparar el panel (a) y el (b), se evidencia la pérdida celular en el riñón descelularizado imagen 9b. En b el riñón descelularizado se encuentra carente de citoplasma celular y de núcleos, pero la red teñida de color azul identifica colágeno, el cual es un componente constitutivo de la MEC.

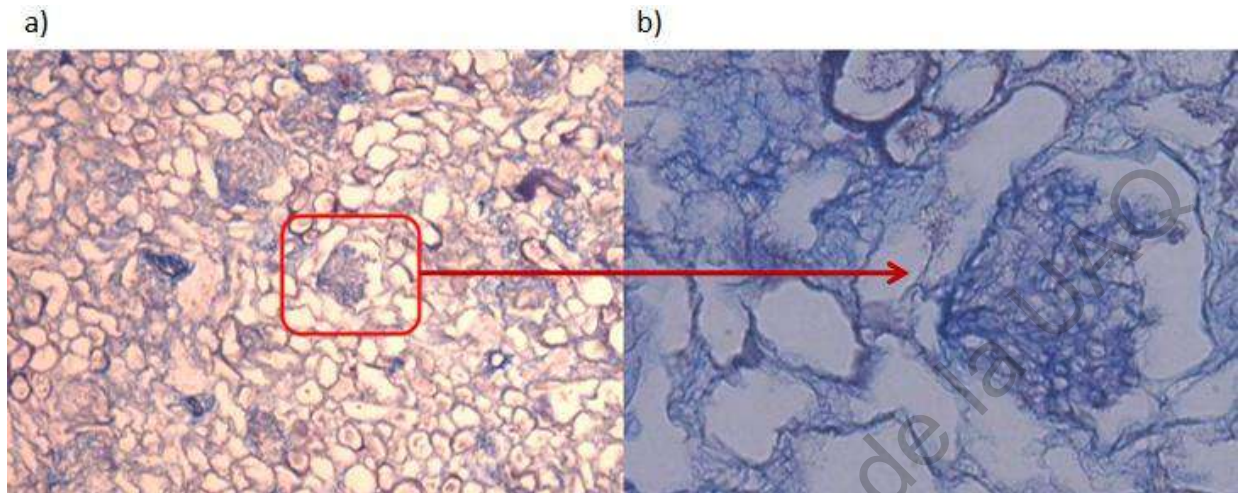


Imagen 10.- Glomérulo teñido con Tricrómica de Masson acercamiento de 10X a 40.
a) Riñón descelularizado vista a 10X. b) Riñón descelularizado vista a 40X.

En la imagen 10 se muestra un glomérulo visto con el objetivo de 10X (panel a) y con el objetivo de 40X (panel b) en el cual se observa la estructura del penacho glomerular, y en la cual se evidencia que la estructura de la membrana basal del glomérulo se conserva ya que se ha teñido de azul propia de las fibras de colágena de su estructura.

6.3 Análisis de imagen por ImageJ

En la imagen 11, correspondiente al riñón control a un objetivo de 40X, se contabilizaron un total de 237 células.

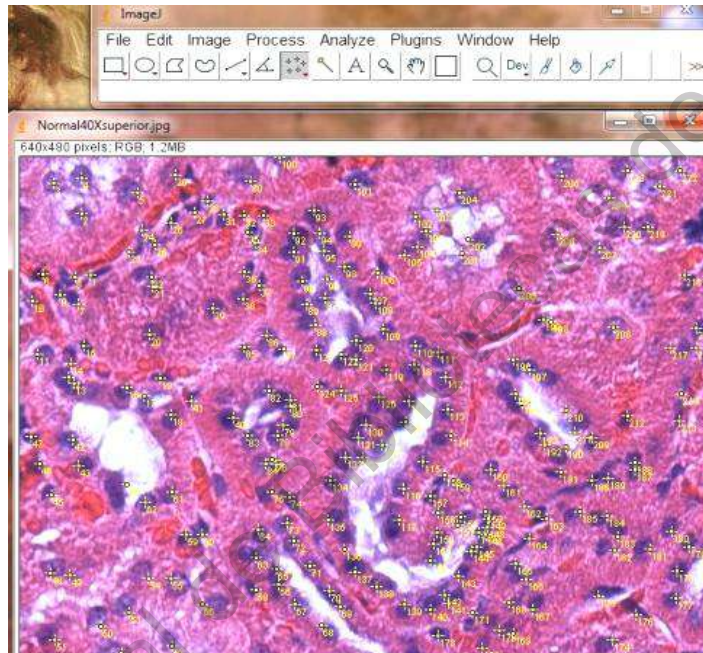


Imagen 11.- Análisis de imagen por ImageJ del riñón control, 40X.

Se observa la cuantificación de núcleos marcados en color amarillo.

En la imagen 12 correspondiente al riñón descelularizado se contabilizaron un total de 27 células.

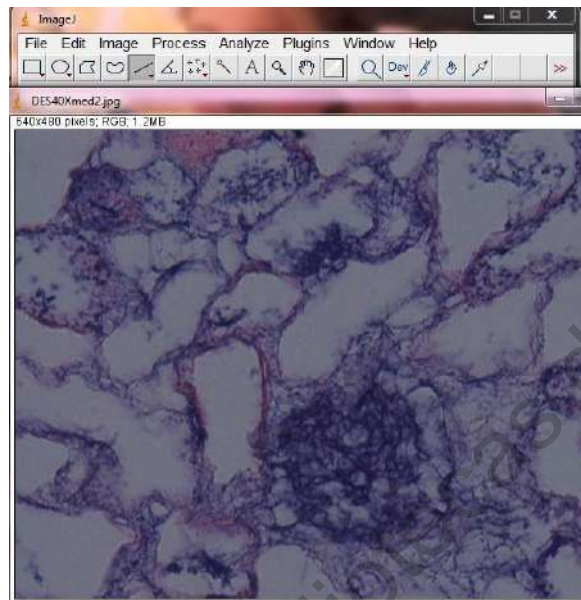


Imagen 12.- Análisis de imagen por ImageJ del riñón descelularizado, 40X.

Para el procesamiento de las imágenes, se contabilizaron 3 campos a nivel de la medula renal de un corte sagital correspondientes al polo superior, polo inferior y zona media a nivel del hilio. La selección del área de la imagen así como la cuantificación de los núcleos celulares se realizó a través del software ImageJ 2018 desarrollado por el National Institutes of Health.

Para la obtención del número de núcleos en un área de μm^2 se realizó una normalización del área de la imagen para los objetivos en 10X y 40x, posteriormente se colocó una celdilla para el conteo de los núcleos celulares, seleccionando 5 celdillas aleatoriamente y posteriormente se extrapoló al área total de la fotografía.

Los cálculos se realizaron por triplicado, a 10X y 40X, tanto del riñón control y el riñón descelularizado. La memoria de cálculo final se muestra en cuadro 2.7 y su representación comparativa entre grupos se muestra en el gráfico 1.

Cuadro 2. 7 Cuantificación de núcleos presentes en las tinciones histológicas de HE.

	Tejido	Aumento	Área celda (μm^2)	Núcleos/celda μm^2	Extrapolación		Media Núcleos/área total μm^2	% Descelularización		
					Área Total (μm^2)	Núcleos/área total μm^2				
Hematoxilina-eosina	Control	10x	130000	34.5	4799308.9	1454.56	1538.24	-		
			130000	45		1661.30				
			130000	40.6		1498.86				
		40x	640	7		22394.88			244.94	237.95
			640	6.8					237.95	
			640	6.6					230.95	
	Descelularizado	10x	130000	0.6	4799308.9		22.15	32.00	2 (98 %)	
			130000	0.6			22.15			
			130000	1.4			51.68			
		40x	640	0		22394.88	0			0
			640	0						
			640	0						

Al realizar los cálculos para la contabilización de los núcleos celulares a objetivo de 40X, se genera un sesgo, por lo que se optó por realizar la contabilización a un objetivo de 10X, debido a que a un objetivo menor los núcleos se vuelven incontables.

Contabilización de los núcleos celulares presentes teñidos con HE

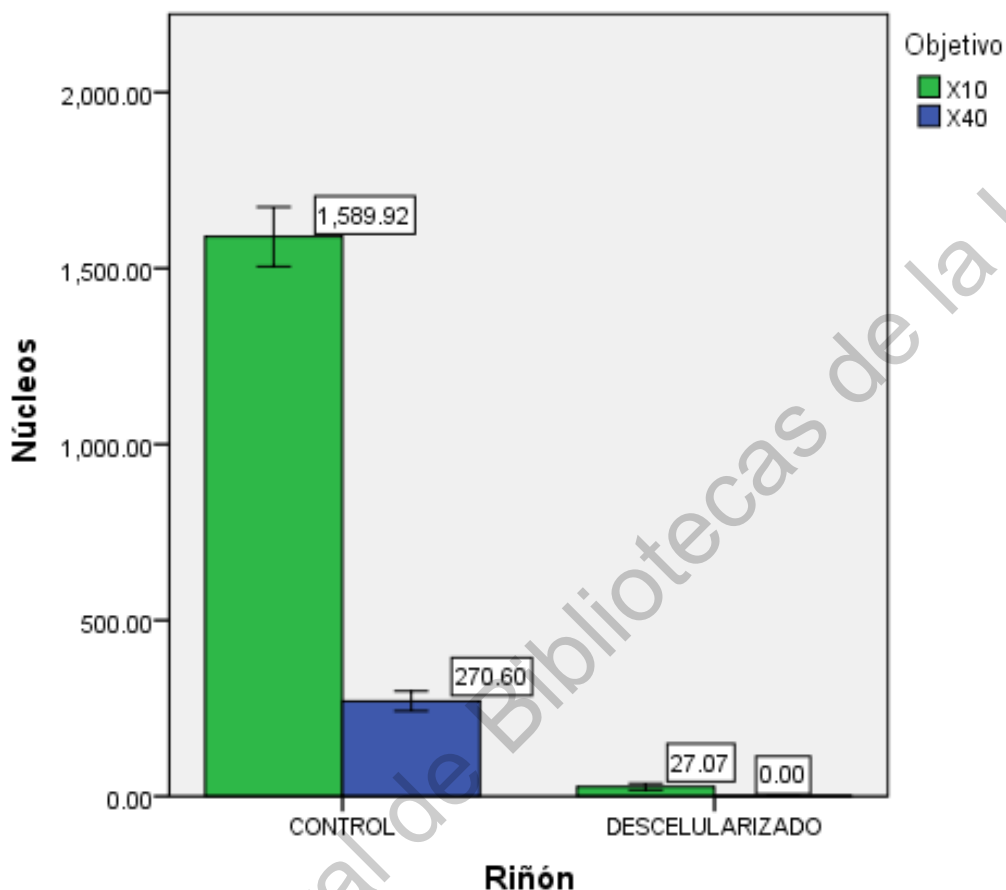


Gráfico 1. Contabilización celular a objetivo de 10X y 40X de los cortes histológicos teñidos con HE.

Tejido control (N=3) y tejido descelularizado (N=3).

Se seleccionaron aleatoriamente 5 celdillas (n=15).

La media de los núcleos con un objetivo de 10X del tejido control $\bar{x}=1589.92$ núcleos; $\sigma=327.38$ y del tejido descelularizado $\bar{x}=27.07$ núcleos; $\sigma=35.48$.

La media de los núcleos con un objetivo 40X del tejido control $\bar{x}=237.92$ núcleos; $\sigma=108.63$ y del tejido descelularizado $\bar{x}=0$ núcleos; $\sigma=0$.

Barras de error: +/- 1, ET

6.4 Tinción DAPI

Las muestras se observaron a 20X y se identificó la presencia de núcleos celulares debido a que hubo señal de fluorescencia DAPI. La cuantificación de los núcleos celulares teñidos con DAPI se representó a través de sus estadísticos descriptivos.



Imagen 13.- Inmunofluorescencia DAPI de la médula renal.

La imagen 13 es una serie de vistas a objetivo de 20X de la MEC de la médula renal descelularizado. La primera imagen corresponde al campo claro donde se puede observar la MEC, en el segundo, sólo se observa la señal DAPI de los núcleos celulares presentes y finalmente se encuentra el merge o co-localización en el que se observa la unión de DAPI con la MEC.

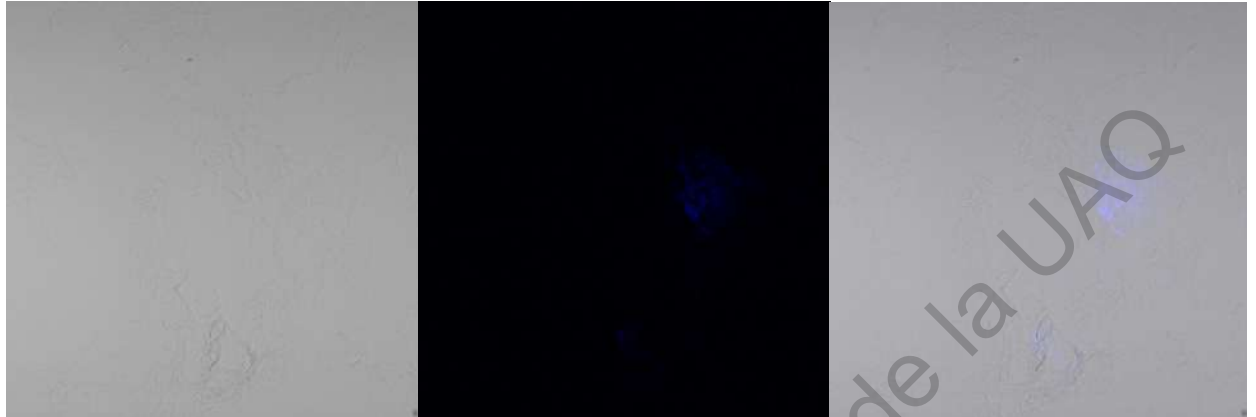


Imagen 14.- Inmunofluorescencia DAPI de la corteza renal.

La imagen 14 es una serie de vistas a objetivo de 20X de la MEC de la corteza renal descelularizado. La primera imagen corresponde al campo claro donde se puede observar la MEC, en el segundo, sólo se observa la señal DAPI de los núcleos celulares presentes y finalmente se encuentra el merge o co-localización en el que se observa la unión de DAPI con la MEC.

En la región de la corteza la señal DAPI se observa con mayor intensidad en comparación con la región de la médula renal.

Análisis de fluorescencia DAPI

Para el análisis de fluorescencia DAPI en ImageJ, se determinó cuales eran los núcleos a través de una máscara binaria (Imagen 15) y posteriormente se contabilizaron, para realizar los estadísticos descriptivos.

Para generar la máscara binaria o contraste se requiere trabajar con un formato de imagen de 8-bits. Se obtuvo una imagen en escala de grises y se aplicó un filtro Gaussiano, con el fin de eliminar el ruido. Posteriormente se invirtió la imagen y tras el algoritmo del software (threshold) se seleccionaron los pixeles que superan un determinado umbral y así a través del contraste en blanco y negro se detectaron automáticamente los núcleos.

Para el conteo de partículas se identifican las segmentaciones que delimitan cada núcleo como áreas de interés (Imagen 16). Para la detección de los núcleos se llevó a cabo un filtrado por área (área mínima y área máxima). El criterio de selección de área para la detección de partículas y cuantificar las regiones de interés de forma automática fue de 5 a 400 píxeles.

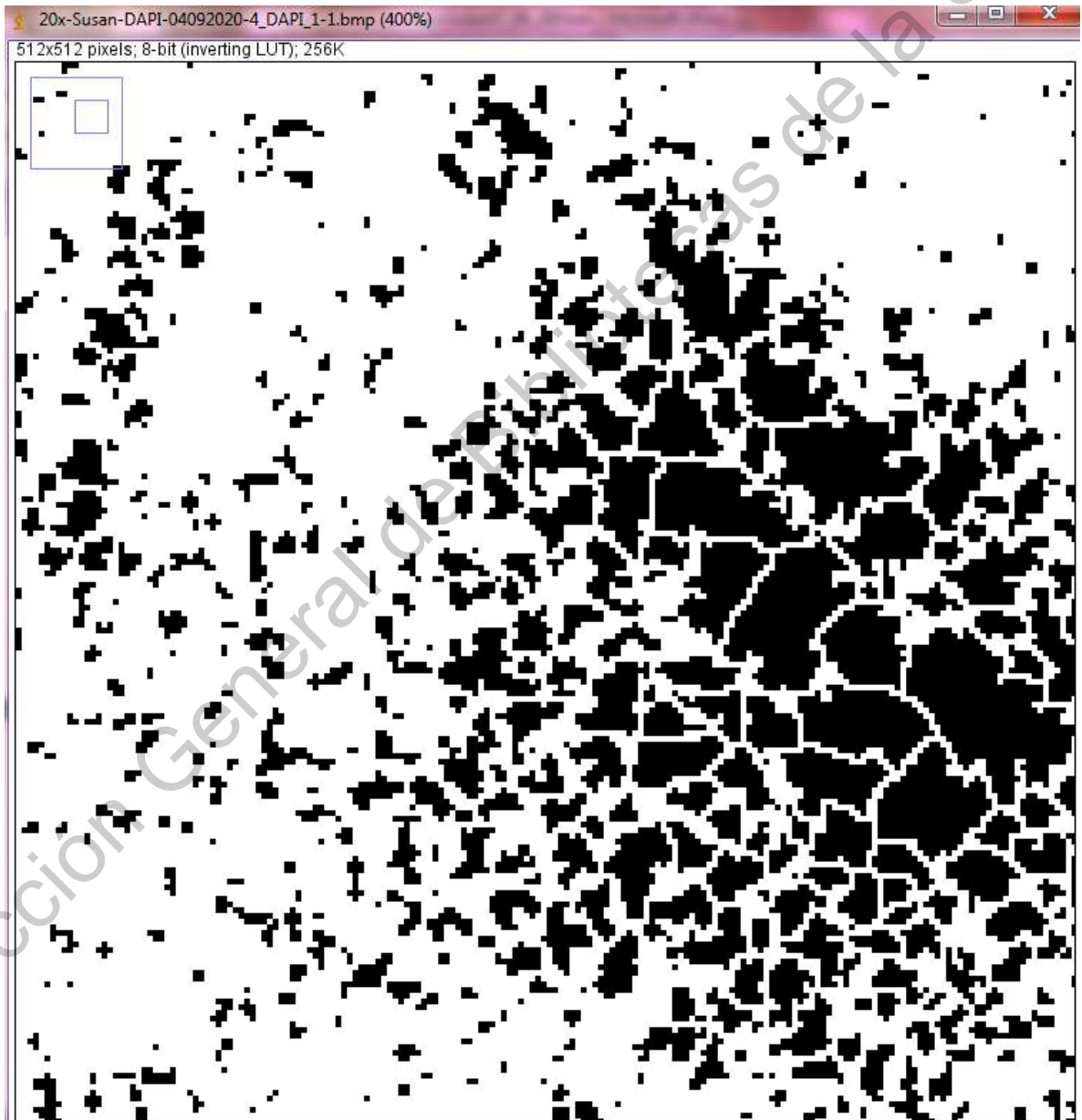


Imagen 15 Máscara binaria de la imagen de tinción DAPI de los núcleos celulares.

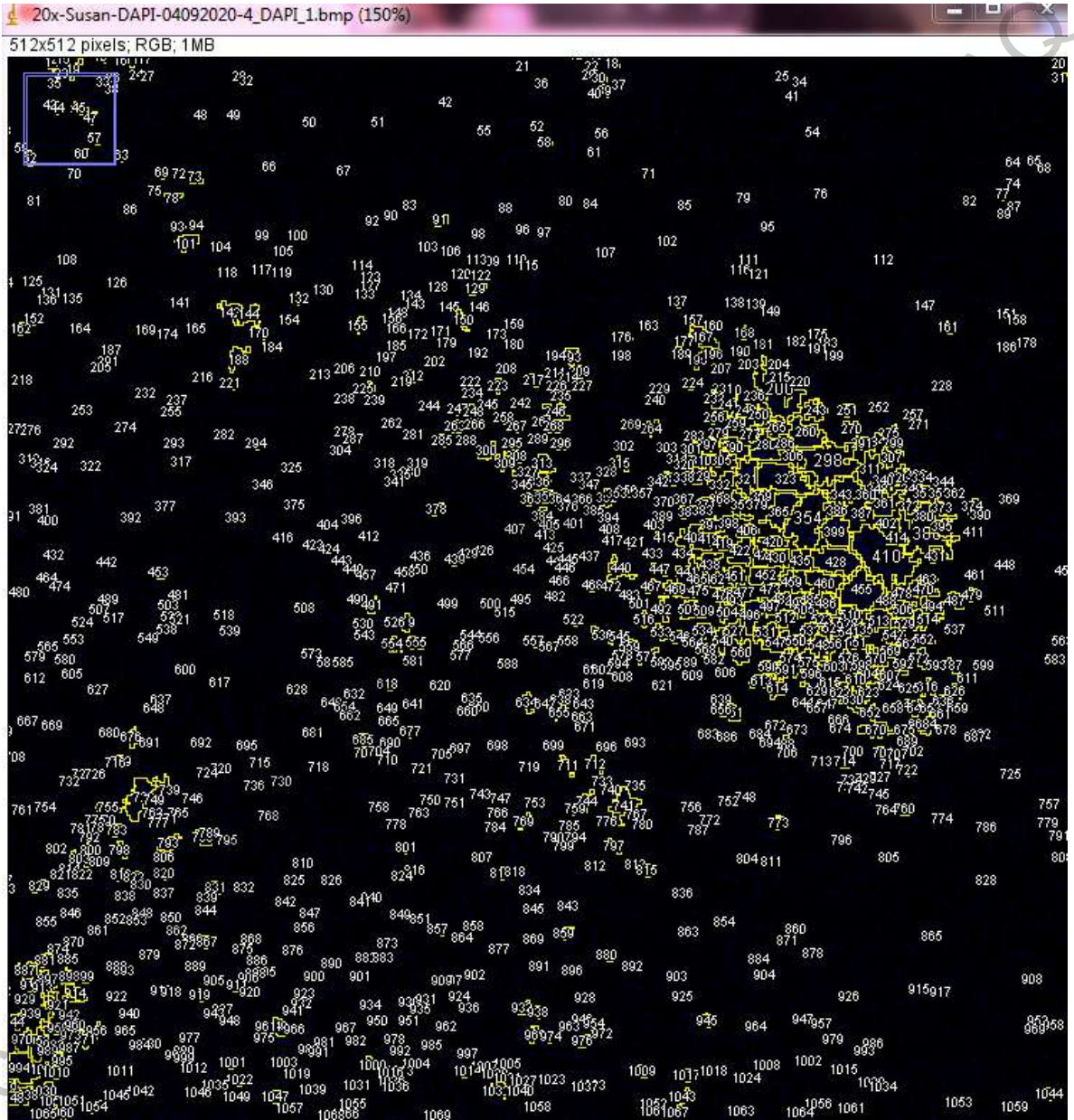


Imagen 16 Filtración por área determinada de núcleos celulares y su cuantificación.

Estadísticos descriptivos de la cuantificación de los núcleos celulares teñidos con DAPI.

Se realizaron las pruebas de normalidad Shapiro-Wilk cumpliéndose con el supuesto de normalidad. Además se realizó la prueba T-Student para determinar si había diferencias significativas entre la media del número de núcleos presentes en la región de la médula renal y en la corteza renal, obteniéndose una diferencia significativa con una P de 0.001.

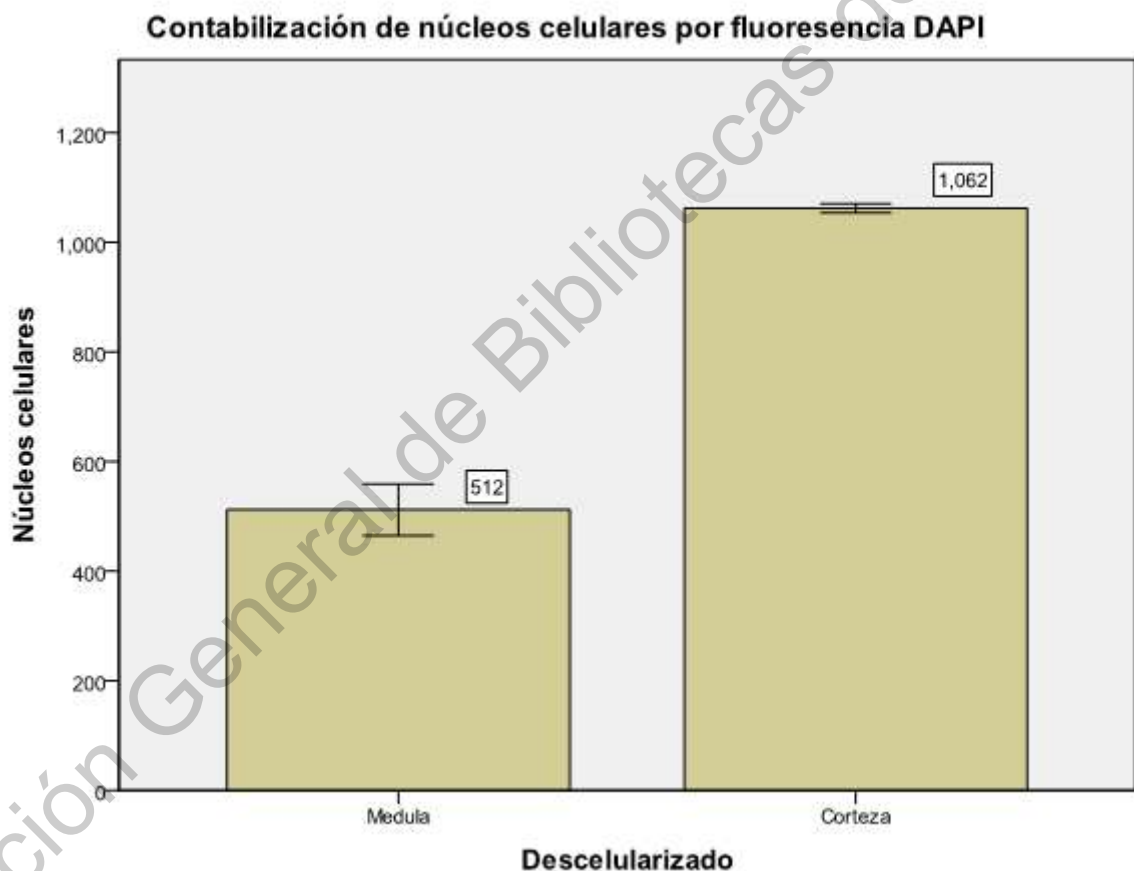


Gráfico 2. Cuantificación de núcleos teñidos por inmunofluorescencia DAPI.
N=3. Barras de error: +/-, DT.

La contabilización se llevó de forma aleatoria y contrastando las dos áreas renales: la médula renal y la corteza renal. Como se logra observar en el gráfico 2 existe una presencia mayor de núcleos celulares en comparación con los

presentes en la región de la médula. El tamaño de la muestra fue 3 a un objetivo de 20X.

Se realizaron los estadísticos descriptivos sin contrastar las regiones renales con un total de 787 núcleos en promedio.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

6.5 Cuantificación de DNA celular

El DNA nuclear que fue cuantificado por espectrofotometría, se representa a través de sus estadísticos descriptivos.

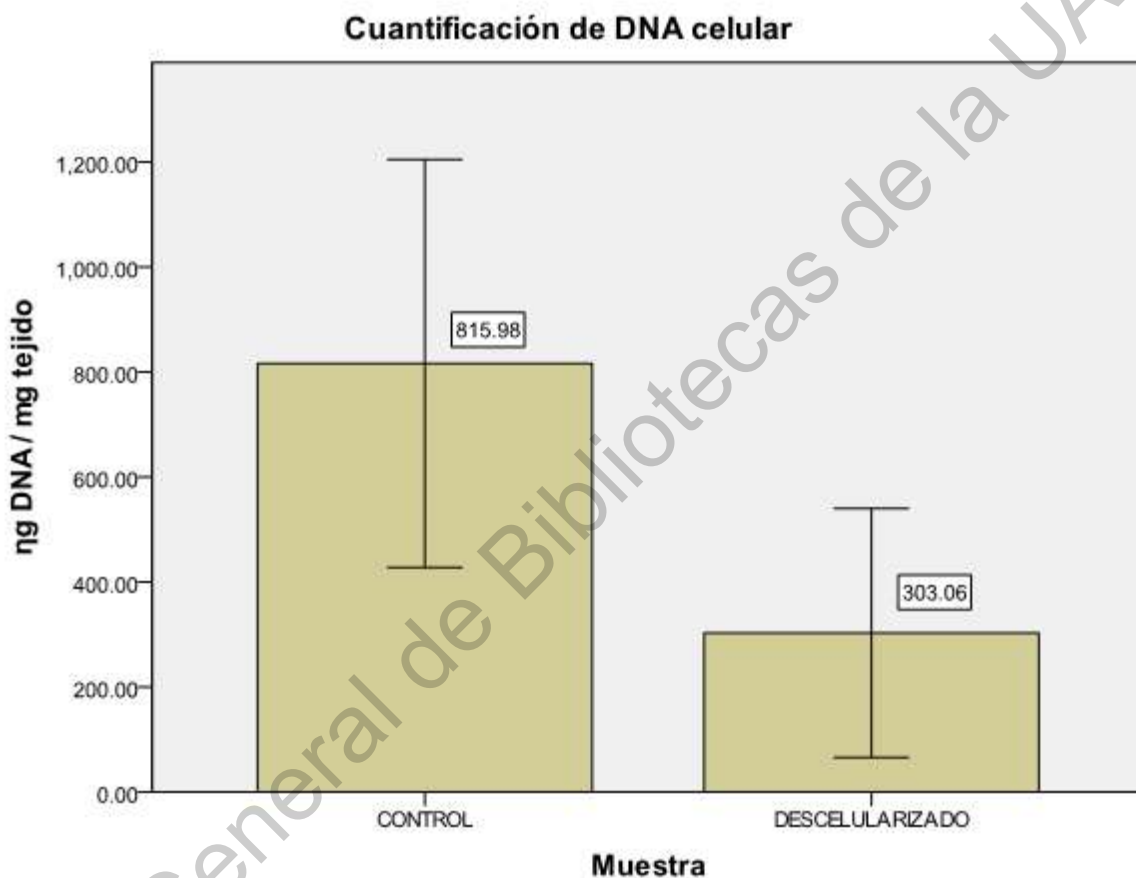


Gráfico 3. Cuantificación del DNA celular.

Tejido control (N=3); \bar{x} =815.98 ng DNA/mg tejido; σ =388; ϵ =224.

Tejido descelularizado (N=3); \bar{x} =303.06 ng DNA/mg tejido; σ =237; ϵ =136

Las muestras pasan las pruebas de normalidad Shapiro-Wilk, sin embargo, para el estadístico de prueba diferencia entre medias, no hay diferencia significativa entre los grupos. Se utilizó la T-Student para muestras independientes cuya significancia fue del $P 0.128 > P 0.05$.

6.6 Discusión

El objetivo de estandarizar la técnica de descelularización renal es: poder obtener una matriz extracelular de riñón acelular que conserve sus propiedades bioquímicas y estructurales; la cual surge de la impetuosa necesidad para cubrir la demanda de trasplantes renales. Además, sí se conserva la relación entre composición bioquímica y configuración estructural de la MEC, esta se convierte en el soporte universal y natural propicio para la diferenciación, proliferación y las funciones metabólicas de las células del receptor que posteriormente se sembrarían para volverlo a repoblar, así mismo se aboliría el rechazo inmunológico.

Actualmente, las técnicas de descelularización de órganos completos se llevan a cabo en biorreactores o a través de bombas peristálticas. El proceso completo para la obtención de una MEC acelular depende del tipo de órgano, el tamaño y su composición celular, en el caso específico de riñón, el tiempo mínimo de operación reportado por Ross *et al.*, 2009 en especies murinas utilizando bomba peristáltica es de 5 días, mientras que para Nakayama *et al.*, 2010 en riñón de mono Rhesus es de 8 días y para Sullivan *et al.*, 2012 en riñón de cerdo de 9 días. Los reportes de descelularización utilizando biorreactor por Schmitt *et al.*, 2017 en especies murinas de 7 días, Nagao *et al.*, 2016 en riñón de humano de 12 días y Poornejad *et al.*, 2017 en riñón de cerdo, 15 días.

En contraposición, las pruebas piloto realizadas en nuestro equipo de trabajo para la descelularización renal de rata Wistar a través de un sistema de perfusión hidrodinámico impulsado por la fuerza de gravedad han demostrado que además de poder obtener una MEC renal en 2 días, el proceso es reproducible y se puede reducir tanto los costos como el tiempo de operación, sin embargo aun necesitan ser optimizadas.

La posible limitante de este método se vería reflejada al momento de escalar el proceso hacia una descelularización renal de una especie más grande como el humano o el cerdo por lo que se tendría que evaluar la eficiencia de la técnica en dichas especies.

Entre los parámetros considerados para la descelularización renal se determinaron como fundamentales: la velocidad de perfusión, la concentración de los detergentes utilizados en el tren de lavado, el tiempo de permanencia, el pH, la temperatura, la concentración micelar crítica y la vía de perfusión.

La elección de los parámetros fueron evidenciados y contrastados a través de las tinciones de hematoxilina-eosina, así como la tricrómica de Masson en la que de forma cualitativa se evaluó la eliminación de un porcentaje considerable del material celular, así como la retención de la colágena perteneciente a la estructura de la MEC (tricrómica de Masson), sin embargo para poder evidenciar que la matriz es viable es necesario verificar a través de tinciones inmunohistoquímicas de colágena IV, ya que como demuestra Laurie et al., 1989 y Ross *et al.*, 2009, las proteínas de la membrana basal como la laminina y del colágena VI en la región de la médula son de crucial importancia que se encuentren conservadas para su posterior recelularización. Y las tinciones realizadas no son específicas.

El análisis de las tinciones histológicas de HE por imagenología realizado en el software ImageJ 2018 arrojó un cálculo de núcleos promedio presentes en el corte descelularizado de 27 núcleos correspondiente a un porcentaje de descelularización del 98.8%, no obstante la cuantificación de DNA fue de 303 ng de DNA/mg de tejido.

La discrepancia de estos dos resultados se debió en principio, al tipo de muestreo que se realizó para la extracción del DNA, si bien, el número de muestras fue reducido (N=3), la perfusión para la eliminación del material no fue homogénea ya que la zona de la cual se realizó el corte fue de la corteza y no de la médula renal, mientras que la cuantificación a través del análisis por imagenología los campos

observados fueron de la medula renal a un objetivo de 10X pero no de la periferia de la corteza renal; en la cual a un objetivo de 4X se observaron precipitaciones de contenido citoplasmático y posiblemente de DNA fragmentado que se quedó retenido y que por espectrofotometría se cuantificó, y se comprobó posteriormente en la tinción DAPI, en la cual se contrastó una concentración significativa de DNA residual en la zona de la corteza. Al comparar la cuantificación con la reportada en la bibliografía, el porcentaje de nuestra técnica de descelularización renal es 303 ng de DNA/mg de tejido >50 ng de DNA/mg de tejido, por lo que debemos de afinar la técnica con el fin de eliminar el DNA residual y obtener una concentración DNA residual <50 ng de DNA/mg de tejido como reporta por Guan *et al.*, 2015.

A través de la observación de las tinciones se puede evidenciar de forma cualitativa que se ha eliminado un porcentaje considerable del material y través del procesamiento de imagen se respalda la eliminación de las células residentes, ya que no se cuantifica la presencia de núcleos. No obstante es imperativo el análisis cuantitativo de ADN y la tinción DAPI, ya que son técnicas cuantitativas específicas. Desde el año 2009 hasta el 2017, el porcentaje de descelularización a través de métodos semicuantitativos, como lo es el análisis de imagenología de las tinciones de HE oscila entre el 91% hasta el 98%, sin embargo, Schmitt *et al.*, 2017 demostró que una descelularización del 97% que resulta ser eficiente y está relacionada con el parámetro de evaluación de presencia de DNA cuya cantidad ideal de DNA residual es <50 ng de DNA/mg de tejido reportado por Guan *et al.*, 2015. Así tejidos descelularizados con una concentración de DNA menor a la reportada es considerada como viable. No obstante, para garantizar y comprobar la obtención de una MEC viable es necesario realizar inmunotinciones específicas para evidenciar laminina y colágena IV, componentes principales de la MEC renal o ensayos de viabilidad. Además, evidenciar la eliminación del DNA residual que se está quedando retenido.

Algunas de las similitudes que tiene nuestra técnica respecto a las ya realizadas se encuentran dadas por el uso de los detergentes como el Tritón X-100 y el SDS, pero difieren en las concentraciones utilizadas así como en la temperatura. En la mayoría de los trabajos consultados se utilizan concentraciones menores al 1%, en cambio nuestra técnica quedó estandarizada para concentraciones por arriba del 1% hasta el 3%. Sin embargo, es imperativo corroborar la viabilidad de la MEC a través de tinciones inmunohistoquímicas, por microscopia confocal, ya que el uso de concentraciones altas de detergente podría generar una disminución considerable de la viabilidad de la MEC para las posteriores pruebas de recellularización.

Respecto a la temperatura, Poornejad *et al.*, 2015 utiliza ciclos de congelación y descongelación, perfundiendo solo con SDS al 0.1% y logrando una remoción de células del 98, pero el tiempo de proceso dura 8 días. Las técnicas utilizadas para la descellularización de riñón manejan temperaturas que oscilan entre los 4° y los 10°, en comparación se estandarizó la técnica a temperatura ambiente utilizando concentraciones por arriba del 1% hasta el 3%, con una duración de 12 h.

Respecto al pH se empleó uno similar al reportado en la literatura, en la mayoría de los artículos el pH es de 7.4 y el utilizado en la técnica estandarizada fue de 7.2 (+/-2).

La vía de perfusión, es variable entre técnicas, esto depende más de la habilidad que se adquiera en la técnica quirúrgica, por lo que puede ser utilizada la arteria renal o la vena renal. En la técnica de estandarización se optó por la canulación de la vena ya que fue una vía de fácil acceso. Sin embargo, se podría realizar la comparación para perfundir a través de la arteria renal, aunque, no se esperarían cambios significativos y en la literatura no se ha reportado que una sea mejor que otra.

VII. Conclusiones

El sistema de perfusión por gravedad con Tritón X-100 al 1%, 2%, 3%, finalizando con SDS al 0.1%, a una velocidad de 5ml/seg y una canulación vía vena renal, es capaz de descelularizar una MEC renal de rata Wistar al 82%, no obstante, es necesario corroborar con inmunohistoquímicas que la composición de la MEC renal se encuentra conservada.

Por el momento, en este estudio se concluye que, la descelularización de riñón de rata Wistar empleando un sistema de presión hidrodinámico utilizando la fuerza de gravedad requiere una mejora de la técnica que esté dirigida hacia la homogenización de la descelularización del riñón, para garantizar la eliminación el ADN residual así como los nucleótidos libres retenidos, porque, si bien, a través de las tinciones histológicas no se observaron núcleos celulares, el tener una concentración de 303 η g de DNA/mg de tejido, que se encuentra muy por arriba a lo establecido (50 η g de DNA/mg de tejido), no podría considerarse como una técnica eficiente para la descelularización. Además, la presencia de DNA también fue evidenciada por tinción DAPI, por lo que, es necesario buscar optimizar la técnica para eliminar el DNA celular retenido. Porque, aunque la técnica sea reproducible y se haya obtenido el 98% de descelularización a través de la cuantificación de HE, no se puede decir que la técnica esta estandarizada, si no cumple con la concentración de DNA residual mínima. Para la optimización de la técnica se propone considerar elevar la temperatura durante el proceso de perfusión y la utilización de DNAsa en conjunto con el SDS al 0.1%.

La obtención de los parámetros para las técnica de descelularización son la piedra angular para la obtención de MEC's viables, esto incentiva la experimentación hacia la recelularización y su aplicación en la práctica clínica, con el objetivo de incrementar la disponibilidad de órganos para trasplantes, y que podría llegar a ser una herramienta alternativa en materia de medicina regenerativa e ingeniería tisular.

VIII. Bibliografía

- Al-Awqati, Qais and Juan A. Oliver. 2002. "Stem Cells in the Kidney." *Kidney International* 61(2):387–95.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2010. *Biología Molecular de La Célula*. 5ta. Barcelona, España: Omega.
- Aquino, Rafael S. and Pyong Woo Park. 2016. "Glycosaminoglycans and Infection." *HHS Public Access* 21:1260–77.
- Avenidaño, Hernando L., P. Aljama, M. Arias, C. Caramelo, J. Egido, and S. Lamas. 2003. *Nefrología Clínica*. 2°. España: Editorial Médica Panamericana.
- Baptista, P. M., G. Orlando, S. H. Mirmalek-Sani, M. Siddiqui, A. Atala, and S. Soker. 2009. "Whole Organ Decellularization - a Tool for Bioscaffold Fabrication and Organ Bioengineering." Pp. 6526–29 in *2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. IEEE.
- Boffa, J. J. and C. Cartery. 2015. "Insuficiencia Renal Crónica o Enfermedad Renal Crónica." *Tratado de Medicina* 19(3):7.
- Bonandrini, Barbara, Marina Figliuzzi, Evangelia Papadimou, Marina Morigi, Norberto Perico, Federica Casiraghi, Chemistry Dipl, Fabio Sangalli, Sara Conti, Ariela Benigni, Andrea Remuzzi, and Giuseppe Remuzzi. 2014. "Recellularization of Well-Preserved Acellular Kidney Scaffold Using Embryonic Stem Cells." *Tissue Engineering - Part A* 20(9–10):1486–98.
- Bonnans, Caroline, Jonathan Chou, and Zena Werb. 2014. "Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(12):786–801.
- Bonneh-Barkay, Dafna and Clayton A. Wiley. 2008. "Brain Extracellular Matrix in Neurodegeneration." *Brain Pathology* 19:573–85.
- Brigham, Narins. 2009. *The GALE Encyclopedia of Surgery and Medical Tests*. 2nd ed. New York: GALE, Cengage Learning.
- Brunicardi, F. Charles, Dana K. Andersen, Timothy R. Billar, David L. Dunn, John G. Hunter, and Raphael E. Pollok. 2005. *Schwartz Principios de Cirugía*. 8°. México: McGraw-Hill.
- Burkart, Rainer, Alexandru Tron, Peter Proding, Mihaela Culmes, Jutta Tuebel, Martijn van Griensven, Belma Saldamli, and Andreas Schmitt. 2014. "Decellularized Kidney Matrix for Perfused Bone Engineering." *Tissue Engineering. Part C, Methods* 20(7):553–61.
- Caralt, M., J. S. Uzarski, S. Iacob, K. P. Obergefell, N. Berg, B. M. Bijonowski, K. M. Kiefer, H. H. Ward, A. Wandinger-Ness, W. M. Miller, Z. J. Zhang, M. M. Abecassis, and J. A. Wertheim. 2015. "Optimization and Critical Evaluation of Decellularization Strategies to Develop Renal Extracellular Matrix Scaffolds as

- Biological Templates for Organ Engineering and Transplantation." *American Journal of Transplantation* 15(1):64–75.
- Cassidy, John W. 2015. "Nanotechnology in the Regeneration of Complex Tissues." *Europe PMC Funders Group Author Manuscript* 25–35.
- CENATRA. 2019. "Centro Nacional de Trasplantes, Reporte Anual 2019 de Donación y Trasplantes En México." 1–81.
- CO&ONT. 2019. *NewsLetterTransplant International Figures on Donation and Transplantation 2018*. Vol. 24. Strassburg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe.
- Costa, Alessandra, Juan Diego Naranjo, Ricardo Londono, and Stephen F. Badylak. 2017. "Biologic Scaffolds." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7(9):1–23.
- Crapo, Peter M., Thomas W. Gilbert, and D. V. M. Badylak. 2011. "An Overview of Tissue and Whole Organ Decellularisation." *Biomaterials* 32(12):3233–43.
- Cuenca Tudela, Julio, Justo Lucea Aznar, and José Luis García Sánchez. 2015. "Producción de Órganos Bioartificiales." 149–70.
- Danzinge, John and Melanie P. Hoenig. 2016. "The Role of the Kidney in Disorders of Volume: Core Curriculum 2016." *AJDK, Core Curriculum in Nephrology* 9.
- Deng, Ying and Jordan Kuiper. 2018. *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds. Materials, Technologies and Application*. United Kingdom: Woodhead Publishing, Elsevier Ltd.
- Dzobo, Kevin, Caroline M. Motaung, and Adetola Adesida. 2019. "Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review." *International Journal of Molecular Sciences* 20:28.
- E. Johnson, Kurt. 1991. *Histology and Cell Biology*. Washington DC.: Williams & Wilkins.
- Edgar, Lauren, Afnan Altamimi, Marta García Sánchez, Riccardo Tamburrinia, Amish Asthana, Carlo Gazia, and Giuseppe Orlando. 2018. "Utility of Extracellular Matrix Powders in Tissue Engineering." *Organogenesis* 14(4):172–86.
- Filipe, Elysse C., Jessica L. Chitty, and Thomas R. Cox. 2018. "Charting the Unexplored Extracellular Matrix in Cancer." *International Journal of Experimental Pathology* 99:58–76.
- Fink, George, Donald W. Pfaff, and Jhon E. Levine. 2012. *Handbook of Neuroendocrinology*. Elsevier.
- Gade Malmos, Kisten, Morten Bjerring, Christian Moestrup Jessen, Erik Holm Nielsen Toustrup, Ebbe T. Poulsen, Gunna Christiansen, Thomas Vosegaard, Troels Skrydstrup, Jan J. Enghild, Jan Skov Petersen, and Daniel E. Otzen. 2016. "How Glycosaminoglycans Promote Fibrillation of Salmon Calcitonin." *The Journal of Biological Chemistry* 32:16849–62.
- Garreta, Elena, Roger Oria, Carolina Tarantino, Mateu Pla-roca, Josep Maria Campistol, Patricia Prado, Francisco Ferna, and Josep Samitier. 2017. "Tissue Engineering by Decellularization and 3D

- Bioprinting.” 20(4).
- Geneser, Finn. 2003. *Histología. Sobre Bases Biomoleculares*. 3ra. edited by D. K. Mikkelsen. Dinamarca: Médica Panamericana.
- Godfrey, Maurice. 2014. “Extracellular Matrix.” Pp. 265–74 in. USA.
- Goodman, H. Maurice. 2009. *Basic Medical Endocrinology*. 4th ed. edited by U. of Massachusetts. Elsevier.
- Guan, Yong, Shuangde Liu, Yuqiang Liu, Chao Sun, Guanghui Cheng, Yun Luan, Kailin Li, Jue Wang, Xiaoshuai Xie, and Shengtian Zhao. 2015. “Porcine Kidneys as a Source of ECM Scaffold for Kidney Regeneration.” *Materials Science and Engineering: C* 56:451–56.
- Gumbiner, Barry M. 1996. “Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis.” *Cell Press* 34:345–57.
- Henry Bernard, John. 2005. *El Laboratorio En El Diagnóstico Clínico*. España: Marban Libros.
- Hillebrandt, Karl H., Hannah Everwien, Nils Haep, Eriselda Keshi, Johann Pratschke, and Igor M. Sauer. 2019. “Strategies Based on Organ Decellularization and Recellularization.” *Transplant International* 32:571–85.
- Hogg, Nancy. 1998. “Integrins.” Pp. 1404–9 in *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier Ltd.
- Hossler, Fred E. 2014. *Ultrastructure Atlas of Human Tissues*. Tennessee, USA: John Wiley & Son, Inc., Blackwell.
- Joaquín, Álvarez Gregori and Macías Núñez Juan F. 2014. “Diferencias Entre Filtrado Glomerular Disminuido e Insuficiencia Renal : Riesgos de Asociar Estos 2 Conceptos En El Anciano Sano.” *Revista Española de Geriátría y Gerontología* 49(4):184–87.
- Karp, Gerald. 2013. *Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments*. 7th ed. USA: John Wiley & Son, Inc.
- Karsdal, Morten A., Mette J. Nielsen, Jannie M. Sand, Kim Henriksen, Federica Genovese, Anne Christine Bay-Jensen, Victoria Smith, Joanne I. Adamkewicz, Claus Christiansen, and Diana J. Leeming. 2013. “Extracellular Matrix Remodeling: The Common Denominator in Connective Tissue Diseases Possibilities for Evaluation and Current Understanding of the Matrix as More than a Passive Architecture, but a Key Player in Tissue Failure.” *Assay and Drug Development Technologies* 11(2):70–92.
- Kovensky, José Eduardo. 1992. “Heparán Sulfatos: Estudios Estructurales y Modificaciones Químicas.” Universidad de Buenos Aires.
- Laurie, G. W., S. Horikoshi, P. D. Killen, B. Segui-Real, and Y. Yamada. 1989. “In Situ Hybridization Reveals Temporal and Spatial Changes in Cellular Expression of MRNA for a Laminin Receptor, Laminin, and Basement Membrane (Type IV) Collagen in the Developing Kidney.” *Journal of Cell Biology* 109(3):1351–62.

- Levy, Matthew N., Bruce A. Stanton, and Bruce M. Koeppen. 2006. *Fisiología de Berne y Levy*. España: Elsevier.
- Liu, Chun-xiao, Si-ran Liu, A-bai Xu, Yu-zhan Kang, Shao-bo Zheng, and Hu-lin Li. 2009. "[Preparation of Whole-Kidney Acellular Matrix in Rats by Perfusion]." *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao = Journal of Southern Medical University* 29(5):979–82.
- Londono, Ricardo and Stephen F. Badylak. 2014. "Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In Vivo Remodeling." *Biomedical Engineering Society (Annals of Biomedical Engineering)*:16.
- Moser, Philipp T. and Harald C. Ott. 2014. "Recellularization of Organs." *Current Opinion in Organ Transplantation*.
- Muncie, Jonathon and Valerie Weaver. 2018. "The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate." *HHS Public Access* 130:1–37.
- Nagao, Ryan J., Jin Xu, Ping Luo, Jun Xue, Yi Wang, Surya Kotha, Wen Zeng, Xiaoyun Fu, Jonathan Himmelfarb, and Ying Zheng. 2016. "Decellularized Human Kidney Cortex Hydrogels Enhance Kidney Microvascular Endothelial Cell Maturation and Quiescence." *Tissue Engineering. Part A* 22(19–20):1140–50.
- Nakayama, Karina H., Cynthia A. Batchelder, Chang I. Lee, and Alice F. Tarantal. 2010. "Decellularized Rhesus Monkey Kidney as a Three-Dimensional Scaffold for Renal Tissue Engineering." *Tissue Engineering - Part A* 16(7):2207–16.
- Netter, Frank H. 2011. *Atlas Der Anatomie*. 5th ed. edited by R. Mühlbauer. München: Elsevier GmbH, Urban and Fischer Verlag.
- Orlando, Giuseppe, Christopher Booth, Zhan Wang, Giorgia Totonelli, Christina L. Ross, Emma Moran, Marcus Salvatori, Panagiotis Maghsoudlou, Mark Turmaine, Ginger Delario, Yousef Al-Shraideh, Umar Farooq, Alan C. Farney, Jeffrey Rogers, Samy S. Iskandar, Alan Burns, Frank C. Marini, Paolo De Coppi, Robert J. Stratta, and Shay Soker. 2013. "Discarded Human Kidneys as a Source of ECM Scaffold for Kidney Regeneration Technologies." *Biomaterials* 34(24):5915–25.
- P. Gartner, Leslie and James L. Hiatt. 2015. *Cell Biology and Histology*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer.
- Pacheco Leal, Daniel. 2006. *Bioquímica Médica*. México: Limusa, Noriega editores.
- Park, K. M. and H. M. Woo. 2012. "Porcine Bioengineered Scaffolds as New Frontiers in Regenerative Medicine." *Transplantation Proceedings* 44(4):1146–50.
- Peloso, Andrea, Jacopo Ferrario, Benedetta Maiga, Ilaria Benzoni, Carolina Bianco, Antonio Citro, Manuela Currao, Alessandro Malara, Annalisa Gaspari, Alessandra Balduini, Massimo Abelli, Lorenzo Piemonti, Paolo Dionigi, Giuseppe Orlando, and Marcello Maestri. 2015. "Creation and Implantation of Acellular Rat Renal ECM-Based Scaffolds." *Organogenesis* 11(2):58–74.

- Peloso, Andrea, Astgik Petrosyan, Stefano Da Sacco, Christopher Booth, Joao Paulo Zambon, Timothy O'Brien, Charles Aardema, John Robertson, Roger E. De Filippo, Shay Soker, Robert J. Stratta, Laura Perin, and Giuseppe Orlando. 2015. "Renal Extracellular Matrix Scaffolds From Discarded Kidneys Maintain Glomerular Morphometry and Vascular Resilience and Retains Critical Growth Factors." *Transplantation* 99(9):1807–16.
- Pippas, Maria, Anneke Kramer, Marlies Noordzij, Nikolaos Afentakis, Ramón Alonso De La Torre, Patrice M. Ambühl, Manuel I. Aparicio Madre, Felipe Arribas Monzón, Anders Åsberg, Marjolein Bonthuis, Encarnación Bouzas Caamaño, Ivan Bubic, Fergus J. Caskey, Pablo Castro De La Nuez, Harijs Cerneviskis, Maria De Los Ángeles Garcia Bazaga, Jean Marin Des Grottes, Raquel Fernández González, Manuel Ferrer-Alamar, Patrik Finne, Liliana Garneata, Eliezer Golan, James G. Heaf, Marc H. Hemmeler, Alma Idriži, Kyriakos Ioannou, Faical Jarraya, Nino Kantaria, Mykola Kolesnyk, Reinhard Kramer, Mathilde Lassalle, Visnja V. Lezaic, Frantisek Lopot, Fernando Macario, Ángela Magaz, Angel L. Martín De Francisco, Eduardo Martín Escobar, Alberto Martínez Castela, Wendy Metcalfe, Inmaculada Moreno Alia, Maurizio Nordio, Mai Ots-Rosenberg, Runolfur Palsson, Marina Ratkovic, Halima Resic, Boleslaw Rutkowski, Carmen Santiuste De Pablos, Nurhan Seyahi, María Fernanda Slon Roblero, Viera Spustova, Koenraad J. F. Stas, María E. Stendahl, Olivera Stojceva-Taneva, Evgueniy Vazelov, Edita Ziginskiene, Ziad Massy, Kitty J. Jager, and Vianda S. Stel. 2017. *The European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association Registry Annual Report 2014: A Summary*. Vol. 10.
- Poornejad, Nafiseh, Evan Buckmiller, Lara Schaumann, Haonan Wang, Jonathan Wisco, Beverly Roeder, Paul Reynolds, and Alonzo Cook. 2017. "Re-Epithelialization of Whole Porcine Kidneys with Renal Epithelial Cells." *Journal of Tissue Engineering* 8:2041731417718809.
- Poornejad, Nafiseh, Timothy S. Frost, Daniel R. Scott, Brinden B. Elton, Paul R. Reynolds, Beverly L. Roeder, and Alonzo D. Cook. 2015. "Freezing/Thawing without Cryoprotectant Damages Native but Not Decellularized Porcine Renal Tissue." *Organogenesis* 11(1):30–45.
- Porth, Carol Matsson. 2011. *Fundamentos de Fisiopatología*. España: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer.
- Ramalingam, Murugan, Esmail Jabbari, Seeram Ramakrishna, and Ali Khademhosseini. 2013. *Micro and Nanotechnologies in Engineering Stem Cells and Tissues*. USA: John Wiley & Son, Inc.
- Rennke, Helmut G. and Bradley M. Denker. 2007. *Fisiopatología Renal, Fundamentos*. Barcelona, España: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer.
- Ross, Edward A., Dale R. Abrahamson, Patricia L. St John, William L. Clapp, Matthew J. Williams, Naohiro Terada, Takashi Hamazaki, Gary W. Ellison, and Christopher D. Batich. 2012. "Mouse Stem Cells Seeded into Decellularized Rat Kidney Scaffolds Endothelialize and Remodel Basement Membranes." *Organogenesis, Landes Bioscience* (June):49–55.

- Ross, Edward A., Matthew J. Williams, Takashi Hamazaki, Naohiro Terada, William L. Clapp, Christopher Adin, Gary W. Ellison, Marda Jorgensen, and Christopher D. Batich. 2009. "Embryonic Stem Cells Proliferate and Differentiate When Seeded into Kidney Scaffolds." 2338–47.
- Ruiz-Ojeda, Francisco Javier, Andrea Méndez-Gutiérrez, Concepción María Aguilera, and Julio Plaza-Díaz. 2019. "Extracellular Matrix Remodeling of Adipose Tissue in Obesity and Metabolic Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 20(19).
- Salvatori, Marcus, Andrea Peloso, Timil Patel, Sij Hemal, Joao Paulo, and Ravi Katari. 2014. "Renal Regeneration : The Bioengineering Approach." Pp. 227–39 in. Elsevier.
- Saxén, Lauri. 1987. *Organogenesis of the Kidney*. edited by P. W. Barlow, P. B. Green, and C. C. Wylie. London: Cambridge University Press.
- Saxén, Lauri and Hannu Sariola. 1987. "Early Organogenesis of the Kidney." *Pediatric Nephrology* 1:385–92.
- Saxén, Lauri, Hannu Sariola, and Eero Lehtonen. 1986. "Sequential Cell and Tissue Interactions Governing Organogenesis of the Kidney." *Anatomy and Embryology* 175(1):1–6.
- Schmitt, A., R. Csiki, A. Tron, B. Saldamli, J. Tübel, K. Florian, S. Siebenlist, E. Balmayor, and R. Burgkart. 2017. "Optimized Protocol for Whole Organ Decellularization." *European Journal of Medical Research* 22(1):31.
- Sean Chua, Ing Loon, Hae-won Kim, and Jae Ho Lee. 2016. "Signaling of Extracellular Matrices for Tissue Regeneration and Therapeutics." *Tissue Eng Regen Med* 13(1):12.
- Secretaría de Salud. 2018. *Centro Nacional de Trasplante (CENATRA). Reporte Anual 2018 de Donación de Trasplante En México*.
- Secretaría de Salud. 2019. *Estadísticas Sobre Donación de Trasplantes, Segundo Informe Trimestral 2019*. México.
- Seldin, Donald W. and Gerhard Giebisch. 1985. *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Vol. 1. New York: Raven Press.
- Sepúlveda Saavedra, Julio. 2012. *Texto Atlas de Histología Biología Celular y Tisular*. McGraw-Hill.
- Skorecki, Karl, Glenn M. Chertow, Philip A. Marsden, Maarten W. Taal, and Alan S. L. Yu. 2018. *Brenner y Rector. El Riñón*. 10 th. España: Elsevier.
- Slavkin, Harold C. and Richard C. Greulich. 1975. *Extracellular Matrix Influences on Gene Expression*. London: Academic Press, Elsevier Science.
- Song, Jeremy J., Jacques Guyette, Sarah Gilpin, Gabriel Gonzalez, Joseph P. Vacanti, and Harald C. Ott. 2013. "Regeneration and Experimental Orthotopic Transplantation of a Bioengineered Kidney." *HHS Public Access, Nat Med*. 19(5):646–51.
- Sullivan, David C., Sayed-Hadi Mirmalek-Sani, Daniel B. Deegan, Pedro M. Baptista, Tamer Aboushwareb, Anthony Atala, and James J. Yoo. 2012. "Decellularization Methods of Porcine Kidneys for Whole

- Organ Engineering Using a High-Throughput System." *Biomaterials* 33(31):7756–64.
- Swinehart, Ilea and Stephen Badylak. 2016. "Extracellular Matrix Bioscaffolds in Tissue Remodeling and Morphogenesis." *HHS Public Access* 245(3):351–60.
- Tortora, Gerard J. and Bryan Derrickson. 2018. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 15°. Panamericana.
- Tresguerres, J. A. F. 1992. *Fisiología Humana*. 1ra. Madrid: McGraw-Hill.
- Vainio, Seppo and Ulrich Müller. 1997. "Inductive Tissue Interactions, Cell Signaling, and the Control of Kidney Organogenesis." *Cell Press* 90(Minireview):975–78.
- Le Vay, David and James Scott Robson. 2018. "Renal System." *Encyclopedia Britannica* 26.
- Wang, Miao, Lulu Wang, Bo Liu, Qing He, Shiyu Liu, and Yan Jin. 2018. "Immobilization of Heparin on Decellularized Kidney Scaffold to Construct Microenvironment for Antithrombosis and Inducing Reendothelialization." *Science China Life Sciences* 61(10):1168–69.
- Wang, Yujia, Ji Bao, Qiong Wu, Yongjie Zhou, Yi Li, Xiujuan Wu, Yujun Shi, Li Li, and Hong Bu. 2015. "Method for Perfusion Decellularization of Porcine Whole Liver and Kidney for Use as a Scaffold for Clinical-Scale Bioengineering Engrafts." *Xenotransplantation* 22(1):48–61.
- Way, Lawrence. 1989. *Diagnóstico y Tratamiento Quirúrgicos*. 6ta. México: Manual Moderno.
- Welman, Ted, Sebastian Michel, Nicholas Segaren, and Kumaran Shanmugarajah. 2015. "Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges." *Bioengineered* 6(5):257–61.
- WHO. 2018. "Boletín OMS, Donación y Trasplante de Riñones." 713–92. Retrieved (<https://www.who.int/bulletin/volumes/90/10/12-021012/es/%0A>).
- WHO and ONT. 2016. "Organ Donation and Transplantation Activities 2013: Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT)." *Godt* (September):16.
- Wilm, Bettina, Riccardo Tamburrini, Giuseppe Orlando, and Patricia Murray. 2016. "Autologous Cells for Kidney Bioengineering." *Current Transplantation Reports* 207–20.
- Wolfgang, Kuehnel. 2003. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy*, . 4th ed. Stuttgart, Germany: Thieme Flexibook.
- Yamanaka, Shuichiro and Takashi Yokoo. 2015. "Current Bioengineering Methods for Whole Kidney Regeneration." 2015:10.
- Young, Barbara, James S. Lowe, Alan Stevens, and John W. Heath. 2011. *Wheater's Functional Histology a Text and Colour Atlas*. Elsevier.
- Yu, Y. L., Y. K. Shao, Y. Q. Ding, K. Z. Lin, B. Chen, H. Z. Zhang, L. N. Zhao, Z. B. Wang, J. S. Zhang, M. L. Tang, and J. Mei. 2014. "Decellularized Kidney Scaffold-Mediated Renal Regeneration." *Biomaterials* 35(25):6822–28.
- Zambon, Joao Paulo, Renata S. Magalhaes, Inkap Ko, Christina L. Ross, Giuseppe Orlando, Andrea Peloso, Anthony Atala, and James J. Yoo. 2014. "Kidney Regeneration: Where We Are and Future

Perspectives." *World Journal of Nephrology* 3(3):24.

Zulueta, Mendel Manuel, Shu-Yi Lin, Yu-Peng Hu, and Shang-Cheng Hung. 2016. *Synthesis of Glycosaminoglycans*. First. Taiwan: John Wiley & Son, Inc.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

IX. Anexos

9.1 Aprobación comité de Bioética.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA

Facultad de Medicina a 13 de noviembre del 2019

Susan Karen Pérez Salazar

Presente

Por medio de la presente le hacemos llegar las observaciones y recomendaciones al protocolo:
Estandarización de la técnica de descelularización de riñón de rata Wistar
Que ha turnado a este Comité de Bioética:

1.- Aclarar si en las pruebas piloto se requerirán mayor número de animales para extracción de riñones.

Con base en lo anterior el dictamen Correspondiente es de:

APROBADO CON CAMBIOS

"EDUCO EN LA VERDAD Y EN EL HONOR"
"POR LA VIDA Y LA SALUD"


Dr. Carlos Francisco Sosa Petreya
Presidente del Comité de Bioética
Facultad de Medicina


MIMEM Claudia Verónica Cabeza Cabrera
Secretaria del Comité de Bioética
Facultad de Medicina



Ciudad No. 200 Prados de la Capilla, Santiago de Querétaro, México C.P. 76170.
Tels: 01 (442) 192 12 00 Ext. 6200 y 192 12 73

9.2 Registro del protocolo de Investigación

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: 11456
 Fecha de Registro: 18/AGOSTO/2020
 Fecha de inicio de proyecto: 01/06/20
 Fecha de término de proyecto: 01/06/20

1. Datos del solicitante:
 No. de expediente: 281483
 Nombre: Salazar Susan Karen
 Apellido Paterno: Apellido Materno Nombre(s)
 Dirección: Prados de la Capilla
 Bugambillas 112 int. 6 Colonia
 Calle y número: Colonia
 Querétaro 5514243127
 Estado: Teléfono (incluír toda)

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: "Estandarización y evaluación del método para la
 descelularización de riñón de rata Wistar".

 Dr. Hebert Luis Hernández Montiel Director de Tesis M en C Carlos Lozano Flores Co-director Dr. Nicolás Camacho Calderón Jefe de Investigación y Posgrado de la Facultad

IBT, Susan Karen Pérez Salazar Alumna Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea Directora de Facultad Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Peña Directora de Investigación y Posgrado

1 Escribir nombres completos y firma.

9.3 Protocolo de tinción histológica de HE

Materiales y reactivos.

- Cajas coplin
- Canastilla para laminillas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Xileno
- Etanol absoluto
- Agua destilada
- Entellan
- Campana de extracción de vapores
- Horno de calentamiento
- Hematoxilina
- Sulfato de aluminio y potasio $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$
- Óxido rojo de mercurio o yodato de potasio
- Ácido acético glacial
- Eosina Y (hidrosoluble)
- HCl concentrado

Preparación de soluciones

Todas las soluciones se almacenan a temperatura ambiente y se deben de cambiar cada 10 tinciones.

- Etanol:Xileno (50:50)

Etanol absoluto 250 mL

Xileno 250 mL

- Etanol al 96%

Etanol absoluto 480 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Etanol al 80%

Etanol absoluto 400 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Etanol al 70%

Etanol absoluto 350 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Etanol al 50%

Etanol absoluto 250 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Hematoxilina de Harris

Hematoxilina 2.5 g

Etanol absoluto 25 mL

Sulfato de aluminio y potasio $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 50 g

Óxido rojo de mercurio 1.25 g

Ácido acético glacial 20 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

*Nota: Se puede cambiar el óxido de mercurio por 0,5 g de yodato de sodio.

1. Disolver la hematoxilina en el alcohol etílico absoluto.
2. En un poco de agua destilada tibia, disolver el sulfato de aluminio y potasio, y agregarlo a la hematoxilina.
3. Llevar la mezcla a ebullición y agregar lentamente el óxido de mercurio o el yodato de sodio.
4. Enfriar rápidamente colocando la mezcla en un baño de hielo. Una vez que la solución se ha enfriado, proceder a adicionar el ácido acético glacial.

- Eosina (solución matriz)

Eosina Y (hidrosoluble) 1 g

Etanol al 95% 80 mL

Agua destilada Aforar a 100 mL

Solución de trabajo eosina

1. Mezclar 100 mL de solución matriz de eosina con 300 mL de alcohol etílico al 80%.
2. Agregar 1.5 mL de ácido acético glacial.

- Alcohol ácido

Etanol al 70% 1000 mL

HCl concentrado 10 mL

Procedimiento

Desparafinar los tejidos de 30 min a 4 hr a 60° C.

Proceder a teñir las laminillas de acuerdo al siguiente tren de tinción:

Xileno 5 min

Xileno 5 min

Etanol absoluto: Xileno (50:50) 1 min

Etanol absoluto 1 min

Etanol al 96% 1 min

Etanol al 80% 1 min

Etanol al 70% 1 min

Agua destilada 1 min

Hematoxilina de Harris 3-10 min

Agua corriente 5 enjuagues (no directos)

Alcohol ácido 20 seg

Agua destilada 1 min

Agua amoniacal 1 min

Agua corriente enjuague

Etanol 96% 20 seg

Eosina solución de trabajo 1-3 min

Etanol al 70% 20 seg

Etanol al 80% 20 seg

Etanol al 96% 20 seg

Etanol absoluto 20 seg

Etanol absoluto: Xileno (50:50) 20 seg

Xileno 20 seg

Xileno 2 min

Sellar el corte teñido con medio de montaje (Entellan) y colocar un cubreobjetos sobre la laminilla y presionar para eliminar las burbujas formadas.

Limpiar la laminilla y observar al microscopio para su análisis.

9. 4 Protocolo de tinción histológica Tricrómica de Masson

Materiales y reactivos.

- Cajas coplin
- Canastilla para laminillas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Xileno
- Etanol absoluto
- Agua destilada
- Entellan
- Ácido pícrico
- Formalina
- Campana de extracción de vapores
- Horno de calentamiento
- Ácido acético glacial
- Hematoxilina
- Cloruro de hierro (III)
- Ácido clorhídrico
- Escarlata de Biebrich
- Fuscina ácida
- Ácido fosfotúngstico
- Ácido fosfomolibdico
- Azul de anilina

Preparación de soluciones

Todas las soluciones se almacenan a temperatura ambiente y se deben de cambiar cada 10 tinciones.

- Etanol: Xileno (50:50)

Etanol absoluto 250 mL

Xileno 250 mL

- Etanol al 96%

Etanol absoluto 480 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Etanol al 80%

Etanol absoluto 400 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Etanol al 50%

Etanol absoluto 250 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Solución de Bouin

Ácido pícrico en solución saturada 750 mL

Formalina (37-40% pureza) 250 mL

Ácido acético glacial 50 mL

- Ácido clorhídrico al 25 %

Ácido clorhídrico (37% pureza) 676 mL

Agua destilada Aforar a 1000 mL

- Hematoxilina de Weigert

Solución A

Hematoxilina 1 g

Etanol al 96% Aforar a 100 mL

Solución B

Cloruro férrico (III) 1.16 g

HCl al 25% 1 mL

Agua destilada Aforar a 100 mL

Mezclar 1:1 la solución A y la solución B, respectivamente antes de usar.

- Escarlata de Biebrich al 1%

Escarlata de Biebrich 1 g

Agua destilada Aforar a 100 mL

- Fuscina ácida al 1%

Fuscina Ácida 1 g

Agua destilada Aforar a 100 mL

- Solución de fuscina ácida y escarlata de Biebrich

Escarlata de Biebrich al 1% 90 mL

Fuscina ácida al 1% 10 mL

Ácido acético glacial 1 mL

Mezcla de ácidos

Ácido fosfotúngstico 10 g

Ácido fosfomolibdico 10 g

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Azul de anilina

Azul de anilina 7.5 g

Ácido acético glacial 6 mL

Agua destilada Aforar a 300 mL

- Ácido acético glacial al 1%

Ácido acético glacial 5 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

Procedimiento

Desparafinar los tejidos de 30 min a 4 hr a 60° C.

Proceder a teñir las laminillas de acuerdo al siguiente tren de tinción:

Reactivo Tiempo

Xileno 10 min

Xileno 10 min

Etanol absoluto: Xileno (50:50) 5 min

Etanol absoluto 5 min

Etanol al 96% 5 min

Etanol al 80% 5 min

Etanol al 50% 5 min

Agua destilada 5 lavados

Solución de Bouin 1 h (56-60°C)

Agua destilada 3 lavados de 3 min c/u

Hematoxilina de Weigert 3 a 5 min

Agua destilada 5 lavados

Solución de fuscina-escarlata 3 min

Agua destilada 5 lavados

Mezcla de ácidos 15 min

Azul de anilina 16 min

Agua destilada 5 lavados

Ácido acético al 1% 1 min

Etanol al 80% 1 min

Etanol al 96% 1 min

Etanol absoluto 1 min

Etanol absoluto: Xileno (50:50) 1 min

Xileno 1 min

Xileno 5 min

Sellar el corte teñido con medio de montaje (Entellan) y colocar un cubreobjetos sobre la laminilla y presionar para eliminar las burbujas formadas.

Limpiar la laminilla y observar al microscopio para su análisis.

9.5 Protocolo de tinción por fluorescencia DAPI

Materiales y reactivos.

- Cajas coplin
- Canastilla para laminillas
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Plumón hidrofóbico
- Cámara húmeda
- Micropipetas
- Xileno
- Etanol absoluto
- Agua destilada
- Tritón X-100
- Campana de extracción de vapores
- Horno de calentamiento
- Horno de microondas
- Citrato de Sodio dihidratado
- Cloruro de Sodio
- Cloruro de Potasio
- Fosfato de sodio (Na_2HPO_4) Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)
- Tween 20
- DAPI
- Vectashield
- Entellan
- Formalina

Preparación de soluciones

- Etanol: Xileno (50:50)

Etanol absoluto 250 mL

Xileno 250 mL

- Etanol al 96%

Etanol absoluto 480 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

- Etanol al 80%

Etanol absoluto 400 mL

Agua destilada Aforar a 500 mL

Solución de permeabilización

Preparar antes de usar. Agitar antes de aforar.

Tritón X-100 250 µL

Citrato de sodio dihidratado 0.25 g

Agua destilada Aforar a 250 mL

- Buffer de fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio 8.06 g

Cloruro de potasio 0.22 g

Fosfato de sodio (Na₂HPO₄) 1.15 g

Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0.2 g

Agua destilada Aforar a 1L

Ajustar pH a 7.4. Almacenar en refrigeración.

- Buffer de citratos

Citrato de sodio dihidratado 2.94 g

Tween-20 500 µL

Agua destilada Aforar a 1L

Ajustar pH a 6.0. Almacenar en refrigeración. Usar de 2 a 3 veces.

- Diluyente PBS-Tritón-BSA

Tritón X-100 50 µL

Albumina de suero bovino (BSA) 1 g

Buffer de fosfatos (PBS) Aforar a 100 mL

Almacenar en refrigeración.

Preparar al momento.

Procedimiento

Desparafinar los tejidos de 30 min a 4 hr a 60° C.

Hidratar las laminillas de acuerdo al siguiente tren de alcoholes:

Reactivo Tiempo

Xileno 5 min

Xileno 5 min

Etanol absoluto: Xileno (50:50) 1 min

Etanol absoluto 1 min

Etanol al 96% 1 min

Etanol al 80% 1 min

Agua destilada 5 lavados

Incubar las laminillas con la solución de permeabilización por 8 min.

Hacer dos lavados con PBS de 5 min cada uno.

Para el desenmascaramiento, colocar las laminillas en buffer de citratos y calentar 1.5 min en el horno de microondas (Abrir cada 20 seg). Al finalizar enfriar con agua destilada, secar y marcar con plumón hidrofóbico.

Incubar con la solución de bloqueo por 1 hr a temperatura ambiente.

Hacer dos lavados con PBS de 5 min cada uno.

Agregar DAPI dentro de una cámara húmeda, sellar el corte teñido con medio de montaje Vectashield colocar un cubreobjetos sobre la laminilla y presionar para eliminar las burbujas formadas.

Limpiar la laminilla y mantenerlas dejar en refrigeración toda la noche (4-8°C).

Observar al microscopio de fluorescencia para su análisis.

9.6 Protocolo de extracción de DNA

Extracción de DNA a través del kit Wizard Genomic DNA purification Promega.

- Triturar el tejido fue triturado en fresco con una navaja estéril.
- Adicionó 600 µl solución de lisis nuclear y homogenizar durante 10 segundos.
- Adicionar 10 µl de proteína K e incubar con agitación constante durante 15 min a 65 °C.

Lisis y precipitación de proteínas.

- Agregar 3 µl de RNAsa e incubar a 37 °C durante 30 min.
- Adicionar 200 µl de la solución de precipitación de proteína, agitar en vórtex y mantener en hielo durante 5 min.
- Centrifugar a 16,000 rpm durante 4 min.

Precipitación y rehidratación del DNA.

- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 600 µl de isopropanol, mezclar por inversión.
- Precipitar por centrifugación a 16,000 rpm durante 10 min.
- Remover el sobrenadante y añadir 600 µl de etanol al 70%.
- Mezclar por inversión y centrifugar nuevamente a 16,000 rpm durante 10 min.
- Retirar con cuidado el etanol sin aspirar la pastilla formada.
- Hidratar al DNA con 100 µl de H₂O y se dejo toda la noche a 4°C.

El DNA se cuantifico por espectrofotometría (NanoDrop) a una densidad óptica de absorbancia a 260 nm y 280 nm.