

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO

Establecimiento de una Técnica de descelularización cardíaca en ratas

Wistar mediante perfusión hidrostática

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN NUROMETABOLISMO

Presenta

Biol. Alfonso de Jesús Torres Osornio

Dirigido por

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

25/11/ 2020

Dedicatorias.

A mis padres, sobre todo, porque me han brindado todo el amor, el cariño, el ejemplo y el apoyo a mí y a mis hermanos, para que nunca nos falte lo necesario para avanzar en la vida. Gracias a ellos me he convertido en la persona que soy y he llegado aquí. A Ustedes los amo y respeto y sobre todas las cosas, los admiro como personas. Esto es gracias a ustedes.

Dirección General de Bibliotecas de la UAO

Agradecimientos.

A mis padres Armando Torres Guerrero y María Teresa Osornio Camacho, por todo el amor y apoyo que me han dado para poder cumplir mis metas y formarme como profesionista en el campo de la biología y ahora como Maestro en Ciencias.

A mis hermanos José Osvaldo y Adrián, que siempre han estado ahí, a mis abuelos María Teresa, Margarita, Cenobio y Floriberto, que siempre han creído en mí. A mis primos, tíos, amigos y demás familiares que me apoyan.

A mi director de tesis el Dr. Hebert Luis Hernández Montiel que ha influido y me ha ayudado mucho en mi formación por sus consejos, apoyo, orientación y también regaños, que me han servido en mi formación académica.

A mis compañeros y amigos del posgrado, que han compartido felices y malos momentos conmigo durante estos años.

A todos los profesores que influyeron en mi formación como Maestro en Ciencias en Neurometabolismo.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Universidad como tal y a México.

Índice.

Resumen.	7
Abstract	8
Introducción.	9
Planteamiento del problema.	10
Justificación	10
Antecedentes.	11
Insuficiencia cardiovascular en México y en el mundo	11
Fisiología cardíaca	12
Terapias convencionales e innovadoras en la insuficiencia cardíaca	17
Producción de órganos bioartificiales.....	18
Métodos de Descelularización.....	19
Métodos físicos de descelularización	21
Tratamientos Químicos de Descelularización.....	21
Tratamientos enzimáticos de descelularización	22
Corazón bioartificial	23
Hipótesis.	25
Objetivos	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos	25
Material y Métodos.	26
Toracotomía.....	26
Descelularización cardíaca	26
Análisis de la matriz extracelular cardíaca.....	26
Resultados	30
Descelularización cardíaca	30
Análisis de la matriz extracelular cardíaca.....	31

Extracción de ADN	33
Discusión	34
Conclusiones.	38
Referencias.....	39
Anexos.	44

Dirección General de Bibliotecas de la UAO

Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Técnica de descelularización cardiaca. 30

Cuadro 2. Resultados de la extracción de DNA genómico. 34

Índice de Figuras.

Fig. 1. Diagrama del flujo sanguíneo, tomado de Principios de Anatomía y Fisiología. Gerard j. Tortora y Bryan Derrickson, (2006). pp. 1280.....**¡Error! Marcador no definido.**5

Fig. 2. Time-lapse del proceso de descelularización cardiaca. 31

Fig. 3 Tinción DAPI 25 X microscopia confocal.. 32

Fig. 4 Tinción H y E 10 x en microscopía óptica 33

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Resumen

La insuficiencia cardiaca (IC) es la etapa final de muchas enfermedades cardiovasculares, se caracteriza porque la cantidad de sangre bombeada por el corazón resulta insuficiente, dando como resultado de una alteración funcional y/o estructural. De acuerdo con la Asociación Americana del Corazón (AHA, por sus siglas en inglés) y la Asociación Americana de Infartos (AAHA, por sus siglas en inglés), los padecimientos cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, éstos ocasionan alrededor de 17.3 millones de muertes anualmente; para el 2030, se espera que aumente a más de 23.6 millones. En México, la IC representa un problema de salud pública, los pacientes con disfunción cardiaca progresiva muestran un alto riesgo de muerte súbita y a pesar del avance de las últimas décadas, sólo el trasplante cardiaco consigue ser una solución. El poder obtener órganos mediante ingeniería celular es una estrategia novedosa, por lo que es necesaria la investigación en el posible uso de matrices extracelulares para la obtención de dichos órganos por procesos de recelularización. En el presente trabajo, se utilizaron ratas Wistar, se extrajo su corazón mediante una toracotomía del cual se obtuvo una matriz extracelular cardiaca por descelularización, los corazones fueron perfundidos por detergentes mediante perfusión coronaria, se comprobó el éxito del proceso mediante tinciones de HE, DAPI y extracción de ADN.

Abstract.

Heart failure (HF) is the final stage of many cardiovascular diseases, it is characterized because the amount of blood pumped by the heart is insufficient, resulting in a functional and / or structural alteration. According to the American Heart Association and the American Heart Association, cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world, they cause around 17.3 million deaths annually; by 2030, this is expected to increase to more than 23.6 million. In Mexico, HF represents a public health problem, patients with progressive cardiac dysfunction show a high risk of sudden death and despite the progress of recent decades, only heart transplantation is a solution. Being able to obtain organs through cellular engineering is a novel strategy, which is why research is needed into the possible use of extracellular matrices to obtain these organs through recellularization processes. Wistar rats were used in the present work, their heart was extracted by thoracotomy from which a cardiac extracellular matrix was obtained by decellularization, the hearts were perfused by detergents by means of coronary perfusion, the success of the process was confirmed by H and E staining, DAPI and DNA extraction.

Introducción.

El síndrome de IC responde a múltiples etiologías (diferentes condiciones patológicas pueden influir o determinar su aparición) y es multiorgánico (compromete primariamente el corazón, pero también el sistema vascular periférico, renal, neurohumoral, musculoesquelético y el resto del organismo). En la mayoría de los casos el síndrome es progresivo y tiene mal pronóstico. Dentro de este concepto de progresividad debe tenerse en cuenta la alta incidencia de muerte súbita. El aumento de la incidencia de IC se debe al envejecimiento de la población, a la mejoría en la supervivencia de las cardiopatías en general y de la cardiopatía isquémica en particular. El tratamiento exitoso de la IC explica también el aumento de su prevalencia (Oliveri, 2000).

En México, la IC representa un problema de salud pública por los altos costos de atención que genera. Se estima que, para cada paciente, los gastos de atención rondan aproximadamente \$300,000.00 pesos por año, según cifras del IMSS (Fundación Carlos Slim, 2018). Las terapias y tratamientos médicos y quirúrgicos actuales pueden contribuir a disminuir los síntomas de la IC, pero no restauran la función contráctil del miocardio lesionado (Linde et al., 2002). El poder obtener órganos bioproducidos es una estrategia novedosa, que podría ser muy bien utilizada en el campo de la medicina regenerativa (Aznar et al., 2015). Los órganos pueden ser obtenidos mediante la combinación de células troncales de varios tipos con matrices extracelulares que sean biocompatibles, de esta forma obteniéndose así estructuras biológicas que pueden ser creadas *ex vivo* y que puedan implantarse (Doris et al., 2017). Por otro lado, el poder producir estos órganos utilizando células troncales del propio paciente que va a recibir el trasplante sería beneficioso en cuanto a los problemas de rechazo inmunológico que son muy frecuentes en el trasplante de órganos (Pfister et al., 2014).

La bioingeniería de órganos enteros antes que nada requiere un andamio para permitir que las células se desarrollen y cumplan su función (Ott, et al., 2008). La

matriz extracelular (MEC) realiza esta tarea en vivo, se han generado matrices extracelulares por la técnica de descelularización de forma natural, esto se ha logrado en tejidos y órganos animales. Al hacerlo, los componentes alogénicos y antígenos celulares xenogénicos se eliminan, lo que permite una probable eliminación de la inmunogenicidad (Gilbert et al., 2006).

Planteamiento del problema.

La IC es la etapa final de muchas enfermedades cardiovasculares, los pacientes con disfunción cardíaca progresiva muestran un alto riesgo de muerte súbita y a pesar del avance de las últimas décadas, sólo el trasplante cardíaco consigue ser una solución, pero su uso es limitado por la escasez de donantes y no está exento de complicaciones. Por ello, es necesario desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras, por lo que se plantea como una alternativa la investigación del posible uso de matrices extracelulares cardíacas.

Justificación.

La IC es una problemática de salud pública, la cual es una enfermedad que consiste en la insuficiencia de la cantidad de sangre bombeada por el corazón. Esto como consecuencia de una alteración funcional estructural, por esto el flujo de oxígeno y nutrientes bombeados al organismo se ve comprometido. En México, la IC es una problemática tanto por el incremento en la cantidad de padecimientos como por el costo que esta genera para su tratamiento. Por todo lo mencionado, es necesaria la búsqueda de terapias innovadoras, ya que las terapias actuales no son del todo eficientes en algunos aspectos, ya que en algunos casos suelen tener complicaciones y no resultan ser una buena opción. Por esto, una alternativa de investigación es el posible uso de matrices extracelulares cardíacas obtenidas a partir de corazones cadavéricos, utilizando la técnica de descelularización cardíaca. En el presente proyecto, se pretende estandarizar una técnica de descelularización cardíaca para la obtención de una MEC de características

normales, que potencialmente permita una correcta vascularización y estructura apropiada del corazón tratado.

Antecedentes.

Insuficiencia cardiovascular en México y en el mundo

La IC es una afección cardiovascular de rápido crecimiento a nivel mundial y se asocia con tasas considerables de mortalidad, morbilidad y hospitalización (Crespo et al., 2016). Los pacientes hospitalizados por IC tienen un pronóstico particularmente adverso, con alto riesgo de mortalidad, así como re-hospitalización, y representan aproximadamente 70% del gasto total relacionado con el síndrome (Filippatos et al., 2020).

La Asociación Americana del Corazón y la Asociación Americana de Infartos señalan que los padecimientos cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo ocasionando alrededor de 17.3 millones por año además estudios basados en encuestas comunitarias, muestran que del 30 al 40% de los pacientes, mueren durante el primer año de diagnóstico y entre 60 y 70%, en los siguientes cinco años. Representa una causa importante de hospitalización en adultos mayores. Además, se estima que 1 de cada 5 personas entre 70 a 80 años padece de dicha enfermedad, aproximadamente, el 2% de la población (Bleumink et al., 2004).

En México, hasta la semana 35 del año 2018, se han reportado 40,131 nuevos casos de enfermedades relacionadas con isquemia del tejido cardiaco (935 más que en 2017). Para el estado de Querétaro, se reportan 307 hombres y 158 mujeres dando un total de 465 nuevos casos, 50 más que en 2017 (Boletín Epidemiológico, 2018).

En el territorio nacional, se estima que aproximadamente 1.6 millones de personas padecen esta enfermedad, con un promedio de edad de 62 años. Cada año, aparecen 665 mil nuevos casos, lo que representa una enorme carga para los

servicios de salud, su prevalencia aumenta con la edad y se duplica cada década. Debido a toda esta problemática, es importante fomentar medidas preventivas en el estilo de vida de la población y, por otro lado, incentivar la investigación y el desarrollo de nuevas terapias para este padecimiento terminal (Aldama et al., 2005).

La IC tiene 3 causas principales: 1) La cardiopatía hipertensiva, que se caracteriza por una hipertrofia patológica de las células musculares miocárdicas como respuesta a las mayores demandas hemodinámicas exigidas por la hipertensión arterial; 2) La cardiopatía isquémica, asociada con infarto previo, que debido a un desequilibrio entre el flujo sanguíneo de las arterias coronarias y el requerimiento de oxígeno del músculo cardíaco, produce isquemia, con efectos metabólicos, mecánicos y eléctricos; y 3) La miocardiopatía dilatada, enfermedad caracterizada por un músculo cardíaco débil y distendido, que como resultado, no bombea con suficiente presión sanguínea para el resto del cuerpo (Sánchez, 2008).

Sin embargo, cualquier mecanismo fisiopatológico que afecte el gasto cardíaco puede provocar IC. Así, alteraciones que afecten la precarga, disminuyendo el retorno venoso, impacta en el grado de estiramiento de la fibra y en la eficacia de la mecánica del sarcómero. Por otro lado, el incremento sostenido de la poscarga, que pueden producir alteraciones estructurales y funcionales miocárdicas que terminarán afectando directamente la función (Vinay et al., 2014).

Fisiología cardíaca

Para entender la importancia que tiene el corazón en el cuerpo de los seres vivos, se requiere exponer la manera en la que se compone y cuáles son sus funciones.

El sistema cardiovascular se compone por el corazón y los vasos sanguíneos. El corazón es uno de los órganos más importantes del cuerpo, su principal función es la de bombear, creando la presión necesaria para impulsar la sangre a través de las arterias, las cuales conectan con pequeñas arteriolas y capilares, que a su vez, conectan con vénulas y venas, por lo que el sistema circulatorio es un circuito

cerrado. El corazón de un adulto, en estado de reposo, bombea alrededor de 5 L de sangre por minuto (Fox, 2004; Shah et al., 2009).

El corazón se encuentra al centro de la cavidad torácica, con una desviación ligera a la izquierda, sobre el diafragma; es hueco, tiene forma cónica y un tamaño variable, ubicado dentro del mediastino, entre los pulmones. La pared del corazón se compone por tres capas:

- Epicardio (capa externa): Formado por la capa visceral del pericardio seroso, tejido conectivo y tejido adiposo, protege al corazón reduciendo la fricción.
- Miocardio (capa media): Constituido por músculo cardíaco, organizado en tres capas musculares, principalmente presentes en el ventrículo izquierdo y en el *septum* interventricular, también incluye a la capa subepicárdica, una capa concéntrica media y una capa subendocárdica. El resto del corazón se compone principalmente por las capas subepicárdicas y subendocárdicas. Además, posee estructuras importantes como tejido nodal excitable y el sistema de conducción. Su función es el bombeo de la sangre al exterior de las cámaras del corazón.
- Endocardio (capa interna): Formada por tejido conectivo endotelial y subendotelial con varias fibras elásticas y de colágeno. Además, contiene vasos sanguíneos y fibras especializadas de músculo cardíaco, llamadas fibras de Purkinje.

El corazón se divide en cuatro cámaras con paredes musculares de diferente grosor, las cámaras superiores (aurículas) se encuentran divididas por el *septum interauricular*, mientras que a las cámaras inferiores (ventrículos) las divide el *septum interventricular*. El flujo sanguíneo sigue una sola dirección, las cámaras superiores reciben la sangre del sistema venoso y pulmonar y las cámaras inferiores bombean la sangre hacia el sistema arterial y pulmonar. La aurícula y el ventrículo izquierdo están separados de su contraparte derecha por una pared

sólida conocida como *septum*, este evita que el flujo sanguíneo se mezcle, a excepción del periodo fetal. La válvula aurículo-ventricular (válvula AV), se conoce como válvula mitral del lado izquierdo y válvula tricúspide del lado derecho, permiten el flujo unidireccional de la sangre de aurículas a ventrículos. La aurícula derecha recibe el flujo sanguíneo de la vena cava superior y la vena cava inferior, y de una vena más pequeña, el seno coronario, el cual drena la sangre en la aurícula derecha del miocardio. La válvula tricúspide posee proyecciones (cúspides) y se encuentra entre la aurícula y el ventrículo derechos. Esta válvula permite el flujo sanguíneo de la aurícula derecha al ventrículo derecho, evitando que el flujo retorne. Las cúspides de la válvula tricúspide están adheridas a fibras llamadas como *chordae tendinae*, que proyectan hacia el interior de las paredes del ventrículo. Estos músculos se contraen cuando los ventrículos se contraen. En el momento en que la válvula tricúspide cierra, jalan los músculos *chordae tendinae* para evitar que las cúspides penetren dentro de la aurícula, en la fig. 1 se muestra el diagrama del flujo sanguíneo. Entre las aurículas y los ventrículos, hay una capa de tejido conectivo nombrado el esqueleto fibroso del corazón. Un gran número de miocardiocitos se adhieren al esqueleto fibroso, formando la unidad funcional, el miocardio de las aurículas y los ventrículos, estructural y funcionalmente separado entre sí. El tejido conectivo del esqueleto fibroso forma anillos, conocidos como *annuli fibrosi*, alrededor de las cuatro válvulas cardíacas, que proveen soporte a las válvulas (Gerard y Derrickson, 2006).

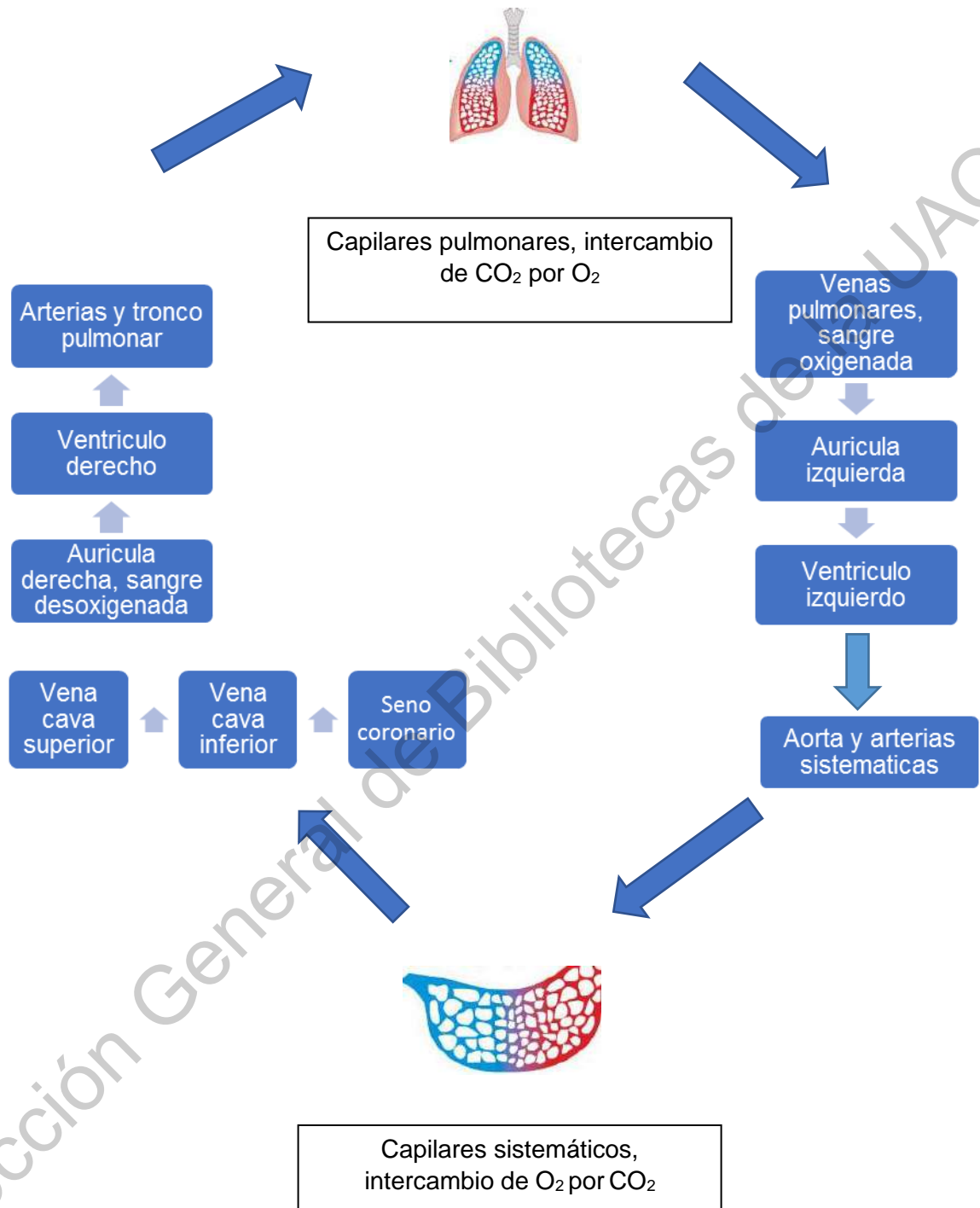


Fig. 1. Diagrama del flujo sanguíneo, tomado de Principios de Anatomía y Fisiología. Gerard j. Tortora y Bryan Derrickson, (2006). pp. 1280.

Al interior de los miocardiocitos, existen filamentos conocidos como miofibrillas, éstas se encuentran rodeadas por retículo sarcoplásmico. Los sarcómeros son conocidos como la unidad contráctil de las miofibrillas y los túbulos T son la continuación de la membrana celular localizada cerca de las líneas Z, estas se encargan de la conducción del potencial de acción (PA) al interior de la célula. Los túbulos T son los encargados de conectar el sarcolema al retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético y el músculo cardíaco. Éste es un músculo estriado involuntario, mononuclear, con estrías transversales formadas por segmentos alternos de proteínas filamentosas delgadas y gruesas, ancladas por segmentos conocidos como líneas Z. El músculo cardíaco es más corto que el músculo esquelético, la actina y la miosina son las principales proteínas estructurales. Los filamentos delgados de actina tienen dos proteínas conocidas como troponina y tropomiosina, se encargan de la contracción. El músculo cardíaco contiene, también, discos intercalados estos separan las células individuales unas de otras en sus extremos. Los discos intercalados están formados de porciones transversales y laterales; la porción transversal del disco es una zona de adhesión firme y una ruta de transmisión de la fuerza contráctil y la porción lateral del disco sirve como una unión a través de la cual ocurre la propagación de los impulsos eléctricos entre las células cardíacas adyacentes. Este efecto permite que las células individuales funcionen como un sincitio (Shah et al., 2009).

Las cámaras del corazón son un sistema coordinado, mientras que las aurículas se contraen (sístole auricular), los ventrículos se relajan (diástole ventricular); y viceversa, cuando los ventrículos se contraen (sístole ventricular), las aurículas se relajan (diástole auricular). Posteriormente, hay un breve periodo de relajamiento de las aurículas y los ventrículos. A esto se le conoce como el ciclo cardíaco, un ciclo ocasiona que la presión en las cámaras cardíacas aumente y disminuya; además de provocar la apertura y el cierre de las válvulas. De acuerdo con la Asociación americana del corazón, la presión sistólica normal es menor a 120 mm Hg y la presión diastólica es menor a 80 mm Hg (Fox, 2004; Shah et al., 2009).

Terapias convencionales e innovadoras en la insuficiencia cardíaca

Son pocas las intervenciones que demuestran ser efectivas en mejorar la supervivencia en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, (Cohn y Tognoni, 2001). Sólo las estrategias que inducen un bloqueo neurohormonal, como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), los bloqueadores del receptor de la angiotensina II (BRA), el bloqueo de la aldosterona y los β -bloqueantes (BB), han demostrado reducir la mortalidad. A ellos se les pueden agregar la resincronización y el desfibrilador implantable, aunque estas intervenciones se aplican a un número reducido de pacientes con IC (Cleland et al., 2005).

Las arritmias ventriculares malignas son la causa de la gran mayoría de muertes súbitas cardíacas, estudios han demostrado que el cardio desfibrilador implantable (CDI) es la terapéutica más eficaz para reducir la muerte súbita cardíaca dado que es capaz de detectar y terminar con las arritmias ventriculares, esta es una terapia muy usada pero no es perfecta (Kuck et al., 2000). La terapia de resincronización en la IC con fracción de eyección reducida (TRC) intenta corregir los trastornos de la conducción intraventricular, principalmente el bloqueo completo de rama izquierda (BCRI), ya que esto determina disincronía interventricular e intraventricular con activación tardía de la pared lateral del ventrículo izquierdo (VI), agravando la disfunción sistólica, disminuyendo la eficiencia en la contracción y causando remodelado ventricular (Linde et al., 2002). Sin embargo, esta terapia tiene algunos problemas como la gran tasa de no respondedores, la cual es aproximadamente de 30%. De hecho, pacientes que responden inicialmente pueden volverse no respondedores, además todo procedimiento de implante de dispositivo tiene complicaciones peri-procedimiento y estas parecen ser mayores en el implante de TRC.

Las terapias y tratamientos médicos y quirúrgicos actuales pueden contribuir a disminuir los síntomas de la IC, pero, no restauran la función contráctil del miocardio lesionado. Gracias a la ingeniería de tejidos, se crea un constructo

funcional *in vitro* y luego se transfiere *in vivo*. Los métodos que existen están limitados por: El tejido cicatricial que evita la interconexión de las células injertadas y las células hospedadoras; la inyección de células no contráctiles, matriz o fluido que mejora la función cardíaca a través del engrosamiento de la pared (ley de Laplace), así como la cicatrización postinfarto y la angiogénesis reactiva (inflamación) y el hecho de que la mayoría de las células se pueden perder por isquemia e inflamación después del infarto y después de la inyección. También depende de la localización, de las barreras inmunológicas y el tiempo de implantación *in vivo* (Mueller et al., 2008).

Un enfoque alternativo es también el uso de los hidrogeles acelulares inyectables estos son producidos por descelularización y pueden proporcionar apoyo mecánico, así como limitar la expansión del infarto y liberar agentes terapéuticos (Costa, 2016).

Producción de órganos bioartificiales

El poder obtener órganos bioproducidos es una estrategia novedosa, esta puede ser muy bien utilizada en el campo de la medicina regenerativa y reparadora. Los órganos pueden ser obtenidos mediante la combinación de células troncales de varios tipos con matrices extracelulares que sean biocompatibles y biodegradables, de esta forma obteniéndose así estructuras biológicas que pueden ser creadas *ex vivo* y que puedan implantarse, y mantenerse en buenas condiciones en lo que se refiere al funcionamiento, después de ser trasplantadas a animales vivos. Por otro lado, el poder producir estos órganos utilizando células troncales del propio paciente que va a recibir el trasplante sería beneficioso en cuanto a los problemas de rechazo inmunológico que son muy frecuentes en el trasplante de órganos (Pfister et al., 2014).

Se puede notar, que el avance en el campo médico que se está comentando es indudable y su uso clínico poco a poco ya se está convirtiendo en realidad, pero es necesaria aún mucha más experimentación preclínica en modelos animales, ya que es necesario evaluar la seguridad y eficacia de tales técnicas y así poder

pensar en su utilización más generalizada en la clínica humana. Primero, se requiere encontrar las matrices extracelulares idóneas, la fuente de células troncales que sea más adecuada según el caso, las óptimas condiciones de cultivo, así como también, el manejo de los pacientes. Todo lo mencionado, debe ser aclarado antes de poder implementar la utilización clínica generalizada de órganos bioproducidos (Aznar et al., 2015).

La bioingeniería de órganos requiere un andamio para permitir que las células se acoplen, desarrollen y cumplan su función (Ott et al., 2008). La MEC realiza dicha tarea *in vivo*, Se han generado matrices extracelulares por la técnica de descelularización de forma natural, esto en tejidos y órganos animales. Al hacerlo, los componentes alogénicos y antígenos celulares xenogénicos se eliminan lo que permite una probable eliminación de la inmunogenicidad lo cual contribuye a evitar un rechazo inmunológico (Gilbert et al., 2006). Se han desarrollado protocolos efectivos de descelularización y en general, incluyen el uso de métodos tanto físicos e iónicos, así como también químicos y enzimáticos, donde la red vascular propia del órgano es utilizada para el suministro de detergente o sustancia de cualquier tipo dependiendo el método. El resultado es un andamio del órgano descelularizado, es decir, la obtención de la MEC, que conserva la estructura del original órgano y que admite la unión, la proliferación y la integración celular (Akhyari et al., 2011).

Métodos de Descelularización

La descelularización es un proceso implementado en ingeniería biomédica para la obtención de una MEC en un tejido, dejando un andamio de MEC del tejido original, que puede ser utilizado en el área de regeneración tisular. Los trasplantes de órganos y de tejido tratan una variedad de problemas médicos, que abarcan desde la insuficiencia multiorgánica hasta la cirugía estética (Colaco y Atala, 2014). Una de las limitaciones para el trasplante de órganos es el rechazo de órganos causado por la superficie celular de los anticuerpos en el órgano que se

dona. Debido a respuestas inmunes desfavorables, los pacientes de trasplantes tienen que conllevar una toma constante de medicamentos inmunosupresivos durante toda su vida. Stephen F. Badylak fue el primero en realizar investigaciones en el proceso de descelularización en el Instituto McGowan de Medicina Regenerativa en la Universidad de Pittsburgh. Con tal proceso, se obtiene un biomaterial natural para que actúe como andamio para el crecimiento celular, la diferenciación celular y el crecimiento de tejidos. Al recelularizar un andamio de MEC con células propias del paciente, se elimina la respuesta inmunológica adversa (Gilbert et al., 2006).

Es posible tomar el tejido de un donante o cadáver, lisar las células dentro del tejido sin causar daño a los componentes extracelulares y terminar con un andamio de MEC natural que posee las mismas funciones físicas y bioquímicas del tejido natural. Para poder introducir químicos y enzimas en su forma líquida a un órgano u tejido, se han usado técnicas de descelularización de perfusión, así como de inmersión (Gilbert et al., 2006). La descelularización por perfusión es posible aplicarla cuando hay un gran sistema de vasculatura presente en el órgano o tejido. De esta forma se pueden perfundir químicos y enzimas a través de las arterias, venas y capilares presentes. Por este mecanismo y con las condiciones fisiológicas apropiadas, los tratamientos se pueden difundir igualmente a todas las células dentro del órgano, los tratamientos pueden ser removidos a través de las venas al final del proceso. La descelularización cardiaca y pulmonar usa este mecanismo frecuentemente para introducir los tratamientos gracias a sus redes vasculares. La descelularización por inmersión se realiza a través de la inmersión de un tejido en tratamientos químicos y enzimáticos, este proceso es más sencillo que el de perfusión, pero está limitado a tejidos delgados con un sistema vascular limitado (Ott et al., 2008).

Métodos físicos de descelularización

Los métodos físicos más comunes utilizados para lisar células de la matriz de un tejido son el uso de temperatura, fuerza, presión, y la interrupción eléctrica. Los métodos de temperatura frecuentemente se usan en un mecanismo de congelación y descongelación rápida. Al congelar rápidamente un tejido, se forman cristales microscópicos de hielo alrededor de la membrana plasmática y la célula se lisa. Después de la lisis de las células, el tejido puede exponerse aún más a químicos líquidos que degraden y eliminen los componentes celulares indeseables. Los métodos de temperatura conservan la estructura física del andamio de la MEC, pero se usan mejor con tejidos gruesos y fuertes (Flynn, 2010).

La descelularización por presión implica el uso controlado de la presión hidrostática aplicada a un tejido u órgano. Esto se hace mejor a altas temperaturas para evitar la formación de cristales de hielo no deseados que podrían potencialmente dañar el andamio. La interrupción eléctrica de la membrana plasmática es otra opción para poder lisar las células en un tejido u órgano, ya que, al exponer un tejido a pulsos eléctricos, se forman microporos en la membrana plasmática, las células eventualmente mueren después de que su equilibrio eléctrico homeostático se arruina a través del estímulo aplicado. Este proceso eléctrico está llamado electroporación irreversible no térmica (NTIRE) y está limitado a tejidos pequeños (Gilbert et al., 2006).

Tratamientos Químicos de Descelularización

La combinación adecuada de químicos para una correcta descelularización es seleccionada dependiendo el grosor y composición de la matriz extracelular y uso pretendido del tejido u órgano. Los químicos utilizados para lisar y remover las células incluyen ácidos, tratamientos alcalinos, detergentes iónicos, detergentes no iónicos y detergentes zwitteriónicos. El detergente aniónico, dodecil sulfato sódico es frecuentemente utilizado debido a su alta eficacia para lisar las células sin causar daño significativo a la matriz extracelular. Los detergentes actúan

lisando la membrana celular y exponiendo los contenidos celulares para que puedan ser degradados. Después de que el SDS lisa la membrana celular, las endonucleasas y exonucleasas se encargan de degradar los contenidos genéticos, mientras que otros componentes de las células son solubilizados y enjuagados. El SDS es usado comúnmente, aunque tiene una tendencia de modificar ligeramente la estructura de la matriz extracelular. El detergente no iónico más utilizado es el Tritón X-100, el cual es usado debido a su habilidad para alterar las interacciones de los lípidos con otros lípidos y con proteínas. El Tritón X-100 no interrumpe las interacciones entre proteínas, lo cual es benéfico ya que ayuda a mantener en buen estado a la matriz extracelular. El EDTA es un agente quelante que captura calcio, el cual es un mineral requerido para que las proteínas interactúen entre sí. Al dejar al calcio inaccesible, el EDTA previene que las proteínas integrales entre células se unan una con otra. Normalmente, el EDTA es acompañado con tripsina, que es una enzima que actúa como proteasa para cortar los enlaces ya existentes entre las proteínas integrales dentro del tejido, esta combinación EDTA-tripsina es una buena opción para descelularizar tejidos (Crapo et al., 2011).

Tratamientos enzimáticos de descelularización

Las enzimas son utilizadas en los tratamientos de descelularización para romper los enlaces e interacciones entre las células que interactúan a través de proteínas vecinas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares, las más comúnmente utilizadas son lipasas, termolisina, galactosidasa, nucleasas y tripsina. Después de que una célula es lisada con un detergente, ácido, presión física, etc., las endonucleasas y exonucleasas se encargan de la degradación del material genético. Las enzimas como la tripsina son proteasas que escinden las interacciones entre proteínas. Aunque la tripsina puede tener efectos adversos en las fibras de colágeno y la elastina de la MEC, su uso de manera controlada puede evitar cualquier daño potencial que pueda causar en las fibras extracelulares. La lipasa se usa para prevenir la agregación indeseada de células, lo que es

beneficioso para promover su separación del andamio MEC, la experimentación ha demostrado que las lipasas son más efectivas en la superficie de un tejido delgado. Para eliminar con éxito las células profundas de un tejido, la agitación mecánica a menudo es incluida en el proceso, la colagenasa solo se usa cuando el producto de andamio MEC no requiere una estructura de colágeno intacta (Petersen et al., 2010).

Corazón bioartificial

Actualmente, la única opción que tienen los pacientes para sobrevivir un fallo cardíaco terminal es el trasplante del órgano. Esta idea ha sido complicada porque la demanda de trasplantes, en general, ha incrementado. Por esta razón y con la ayuda del avance que ha tenido la ciencia y la tecnología, la meta que se han planteado muchos científicos es la creación de un corazón bioartificial fabricado específicamente para el paciente en cuestión, y aprobado para trasplante, disponible para cubrir la escasez de órganos (Doris et al., 2017).

El fundamento principal para la creación de un corazón bioartificial, radica en utilizar una matriz como base para el crecimiento de nuevas células provenientes del propio paciente, que se procesan y son incluidas en la matriz. Tras demostrar la viabilidad del órgano, es trasplantado al paciente en el cual no debería haber problemas de tipo inmunitario, ya que las células utilizadas no se diferencian en composición genética con las células del paciente (Vidaña, 2012).

Para que una línea celular pueda ser competente necesita: a) poder expandirse *in vitro* a gran escala; b) integrarse en el tejido, y c) diferenciarse en nuevos cardiomiocitos acoplados electromecánicamente con el tejido (Gálvez et al., 2013).

Se han hecho varias investigaciones sobre los linajes celulares que pueden ser competentes para el proceso de recelularización cardíaca, pero no se ha logrado tener un acoplamiento óptimo de dichos linajes.

Para recelularizar una matriz biológica una posibilidad es utilizar las propias células adultas maduras de ese órgano, que podrían obtenerse a partir una

biopsia o de un órgano donante. La célula ideal para regenerar un órgano completo debería tener la capacidad de proliferar en número suficiente para repoblar la MEC y por otro lado ser capaz de diferenciarse en los diferentes tipos celulares necesarios para reconstruir el órgano. Las características clave del corazón para actuar como un motor circulatorio y así satisfacer las demandas, las cuales pueden ser variables, van a estar implicadas en la arquitectura asimétrica. Debido a esto, el tejido cardíaco artificial debe ser ideal para reproducir las propiedades mecánicas, estructurales y eléctricas de una manera óptima, por lo tanto, debe haber una participación de una MEC en óptimas condiciones que, de soporte y mantenimiento a las células trasplantadas, al mismo tiempo que estimule la vasculogénesis en el tejido implantado (Castro, 2016).

La primera idea que llamó la atención sobre esta estrategia fue la propuesta y publicada en 1983 por Langer y Vacanti, en la cual hablan de la creación de una estructura tridimensional basándose en el agregado de células del órgano en cuestión, MEC y factores de crecimiento. Tras esta idea, varios científicos se dedicaron a la experimentación de esta propuesta como el grupo de investigación de Doris A. Taylor, los cuales lograron el funcionamiento de un corazón bioartificial durante una vida media de 7 días, tras experimentar con varios corazones de rata. Empezaron realizando la descelularización total, dejando únicamente la matriz de colágeno y otras proteínas para posteriormente recelularizar con células endoteliales tomadas de la aorta de la misma rata, miocitos cardíacos neonatales, fibroblastos y células madre. Esta estructura fue estimulada eléctrica y mecánicamente durante 4 días la cual empezó a contraerse y a los 8 ya podía funcionar como bomba cardíaca, llevándolos a la creación de un órgano contráctil. La compatibilidad biológica fue demostrada al trasplantar el nuevo órgano al abdomen de la rata, directamente conectada a la aorta (Ott et al., 2010).

Según los autores, aunque este estudio fue limitado a ratas, podría en un futuro ser usado en humanos, esto lo adjudican a que también se evaluó la técnica con éxito en mamíferos superiores, como en cerdos, ya que estos muestran una

complejidad cardíaca similar a la humana. Se ha dado un avance significativo en la producción de corazones bioartificiales, cuando en marzo de 2013 se publicó un artículo en Nature Communications (Lu et al., 2013), en este se describe la producción de un corazón híbrido animal-humano. En el cual el estudio consistió en reemplazar en un corazón animal descelularizado sus células con células cardíacas obtenidas a partir de células troncales pluripotentes inducidas (iPS) humanas, estas derivadas de células progenitoras cardiovasculares. Las células humanas trasplantadas a la matriz extracelular de corazón animal proliferan, migran y se diferencian in situ a miocardiocitos, células musculares y endoteliales, hasta que logran reconstruir el corazón descelularizado de la rata. Después de 20 días de perfusión el corazón bioproducto se contrae espontáneamente, señalan que muestra fuerza mecánica y responde a fármacos específicos. En este estudio, se defienden que se comprueba que la matriz extracelular ayuda a contribuir a promover la proliferación de los cardiomiocitos.

Hipótesis.

Se desarrollará una técnica de descelularización cardíaca que nos permitirá obtener una MEC acelular sobre la cual se podrán realizar nuevos procesos de recelularización.

Objetivos.

Objetivo general

Desarrollar una novedosa técnica de descelularización cardíaca en rata Wistar que nos permita la obtención de una MEC acelular.

Objetivos específicos

1. Estandarizar el método de descelularización cardíaca en ratas Wistar.
2. Obtener la MEC acelular de corazón de rata Wistar.
3. Determinar las características morfológicas de la MEC obtenida.

Material y Métodos.

Toracotomía

Se pesó la rata y se anestesió vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (1U/100 g.), una vez que la rata estuvo totalmente anestesiada se procedió a aplicar heparina (100IU/kg.), a partir de un vaso principal (vena cava), Posteriormente, se realizó una toracotomía para poder acceder al miocardio, se disectaron los vasos sanguíneos, fueron ligados y cortados, para posteriormente, remover el corazón. Después se retiró el órgano del animal, posteriormente se puso en una caja Petri con PBS y se realizó un lavado con PBS por perfusión canulando la aorta para retirar restos sanguíneos, después se puso a -20°C por 24 h.

Descelularización cardíaca

Se retiró el órgano de congelación para llevar a cabo la descongelación a temperatura ambiente y se conectó posteriormente al Sistema de Perfusión. Primero, se debe conectar a vía de perfusión, se insertó una cánula de 2,00 x 51 mm pre-cargada en la aorta ascendente, para lograr la perfusión coronaria retrógrada y se vigiló hasta que se inició el flujo de detergente, para inmediatamente controlar la velocidad de flujo (4-5 ml/min). Una vez que se inician los lavados, se inicia el tiempo de lavado de cada solución las cuales fueron: Tripsina 37 C°, EDTA al 0.025% diluida en PBS, 30 min, agua desionizada 15 min, SDS al 2% 12 h, PBS 24 h, y agua tridestilada por 4 h para remover los restos de sales, el órgano se fija en forma anatómica para que la perfusión sea lo más homogénea posible.

Análisis de la matriz extracelular cardíaca

Una vez concluidos los lavados, la matriz extracelular es puesta en Paraformaldehído (PFA) 4% por 24 horas y posteriormente, es cambiada a una solución con sacarosa al 15% por 24 horas, después con sacarosa al 30%, durante 24 horas más. Una vez finalizado el tratamiento, el corazón es congelado a -20°C para obtener cortes en crióstato de 10 µm de grosor fijados con Tissue Tec, los cuales fueron colocados en portaobjetos. Para la detección de

componentes nucleares, se empleó una tinción de inmunofluorescencia con DAPI, para lo cual, el primer paso fue filtrar el PBS 1X y dejar los cortes por 20 min. a temperatura ambiente. En cada laminilla, se marca el límite con un marcador bloqueador de líquido, se colocan de 400 a 500 μ l del buffer filtrado y se deja por 5 min, después se coloca otra cantidad igual y se deja nuevamente por 5 min., el siguiente paso es colocar la solución DAPI 1:4000 y dejarla por 10 min. Se colocaron 70 μ l de vecta chelf (MARCA) para proteger fluorescencia, después se barniza y se deja a -4°C para almacenar o ver en microscopía confocal. Para corroborar tanto núcleos como células y estado de la MEC, como las fibras de colágeno, se utilizó la tinción de hematoxilina/eosina (HE), la primera que por ser catiónica o básica puede teñir estructuras ácidas en azul o púrpura como núcleos celulares y el uso de eosina, que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma. Para esta tinción, lo primero fue pasar los cortes por alcohol al 96% por 5 min. después se dejó en la hematoxilina de Harris de 3 a 4 min., se enjuagó en agua tibia, luego se sumergió y se sacó del ácido clorhídrico, después se enjuagó con agua, se sumerge 2 o 3 veces en carbonato de litio y se enjuaga nuevamente en agua, se pasa a la eosina amarillenta por 3 o 4 min. y de aquí pasa a alcohol al 96%, dando 4 pases por alcohol isopropílico para finalmente, pasar a xilol y agregar 2 gotas de isopropanol. Terminado este proceso, se coloca el cubreobjetos y se examina en el microscopio óptico.

Para saber el porcentaje de DNA de la MEC se realizó la extracción de DNA de un corazón descelularizado y uno sin descelularizar, comparándolos para tener una referencia de la eficacia del método de descelularización usado, en cuanto a restos de ácidos nucleicos. Para esto, se realizó la extracción utilizando el Wizard Genomic DNA Kit y el protocolo de extracción por fenol/cloroformo, para el primero el procedimiento fue tomar la parte ventricular de ambos corazones (control y descelularizado) y pesarlos para de esta forma, agregar la solución de lisis de núcleos con sus cálculos correspondientes y homogenizarlo con el potter en un

tubo. Después se pasó a un tubo falcón de 15 o 50 ml según sea el caso, y se puso a 65 C° por 30 minutos, después se añadió la RNAasa y se dejó a 37 C° por 30 minutos en agitación a 200 RPM. Posteriormente, el buffer de precipitación se coloca en hielo por 5 min., y se centrifugó por 4 min. a 13 mil RPM en tubos eppendorf, se toma el líquido sobrenadante y se coloca en un tubo falcón de 15 ml. Se agregó la misma cantidad de isopropanol que la del tubo y se dejó precipitando toda la noche, después se colocaron 300 µl de acetato para precipitar, se pasa a tubos eppendorf y se centrifuga a 13 mil RPM por 5 min. Esto se realizó hasta que se terminó la solución donde se encontraba el ADN, se juntó todo en un solo tubo eppendorf tanto descelularizado como control y se añadió 70 µl de etanol al 70% y se centrifugo por 5 min. a 12 mil RPM, se tiró el sobrenadante y se puso a 65 C° por 10 min. Se agregó agua libre de nucleasas (100 µl) y se dejó a 60 C° por 20 min. Para el segundo método, lo primero fue pesar nuevamente los tejidos tanto control como descelularizado y hacer sus correspondientes cálculos, después se trituró el tejido y se llegó hasta el volumen adecuado con Tnes, y se agregó el SDS para triturar con el potter, al añadir la RNAasa se dejó 15 min. a 37 C°. Se incubó por 3 horas con proteinasa K, 10 µg por ml a 56 C° con agitación de 130 RPM en tubos de 15 ml, después se transfirió a tubos de 50 ml. Para poder acceder con jeringas de 10 ml y agujas de 21 G, luego se regresó a tubos de 15 mil, se adicionó phenol/cloroformo y se agitó por 15 min., esto se repitió 3 veces, luego se centrifugó a 4500 RPM por 20 min. a temperatura ambiente, se tomó la fase transparente y se pasó a un tubo nuevo de 15 ml, se precipitó con acetato de sodio 3 molar y etanol absoluto a -20 C° por 3 horas, luego se puso en agitación a 4500 RPM a temperatura ambiente. Lo siguiente, fue el paso de agitación por inmersión se agregó un volumen de 1 a 1 de etanol al 70% y una décima parte de acetato de sodio, luego fue un doble paso de lavado con etanol 70% a temperatura ambiente, (fue necesario verificar el paso de la pastilla), después se centrifugó a 4500 RPM por 5 min. a temperatura ambiente y se absorbió el volumen sobre la pastilla sin manchar las paredes. Terminado el proceso, se agregaron 300 µl de agua libre de nucleasas después se

incubo a 60 C° por 10 min. y luego 30 min. con otros 100 µl de agua libre de nucleasas con las tapas abiertas, al final se cuantificó y se almacenó a -4C°.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Resultados.

Descelularización cardíaca

Cuadro 1. Técnica de descelularización cardíaca.

Animal	Tiempo congelación	Soluciones y tiempo
Ratas Wistar	12 horas a -20 C°	Tripsina 37 c°, EDTA al 0.025 % diluida en PBS, 30 min.
		Agua desionizada, 15 min.
		SDS al 2%, 12 h.
		PBS 24 h.

Se realizaron los lavados como se describió en la metodología, donde la tripsina jugó un papel importante en la ruptura de enlaces peptídicos ya que Akhyari y col. en el 2011 señalan, que se obtiene una buena descelularización perfundiendo por una hora. En nuestro caso, el reactivo se pasó por perfusión coronaria a presión hidrostática solo por media hora, seguido de agua desionizada para remover el reactivo y desactivar la enzima, esto con el fin de no dañar la MEC. Debido a la alta concentración del SDS que se utilizó después, ya que este se ha usado más a concentraciones del 1% por 12 h como señala Ott y col. 2008, pero nosotros lo usamos al 2 % por 12 h por falta de una presión positiva ya que todos los protocolos de descelularización se usan bombas de presión a 77.4 mm Hg aproximadamente. Al final, se realizaron lavados con PBS por 24 h para remover los restos de detergente que pudiesen quedar, en la fig. 2 se muestra el *time lapse* de las fotografías tomadas cada 10 min durante la perfusión una vez puesto el SDS al 2%, teniendo que a partir del minuto 50, no hubo cambios en la coloración del corazón.

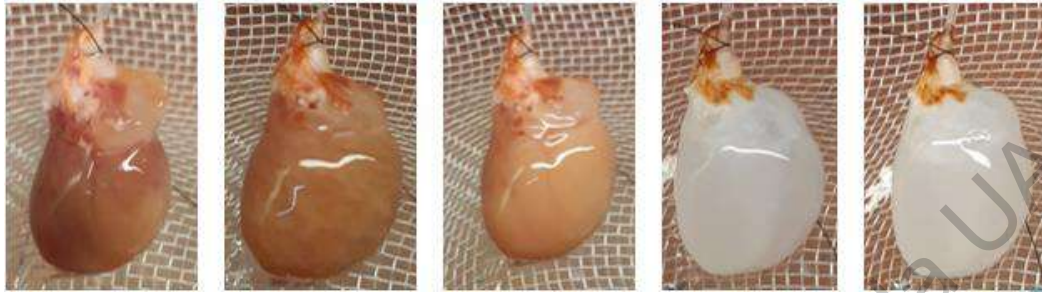
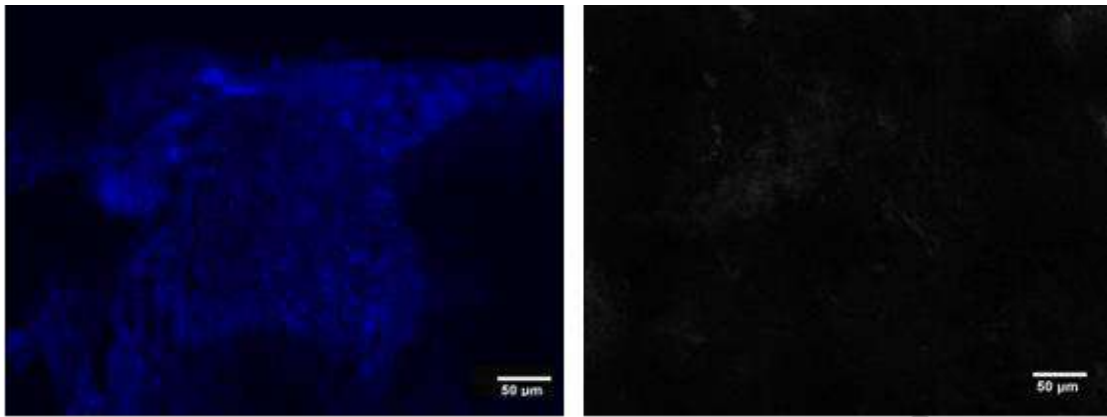


Figura 2. *Time-lapse* del proceso de descelularización cardíaca, las fotos se tomaron cada 10 minutos a partir de la perfusión con SDS al 2%. En este paso es cuando son más notorios los cambios en la coloración del órgano.

Análisis de la matriz extracelular (MEC) cardíaca

Se empleó una tinción de inmunofluorescencia con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) esto para la detección de componentes nucleares, ya que es un marcador fluorescente que se une a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN, donde su máximo de absorción es a una longitud de onda de 358 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión es a 461 nm (azul). Por esto, en la microscopía de fluorescencia DAPI, es excitado con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul/cian, pero éste, no pasa a través de la membrana celular, por lo que solo tiñe células muertas. En la Fig. 3 se muestran los resultados de la tinción, donde se observa que la tinción del tejido descelularizado no muestra fluorescencia, a diferencia de la tinción del tejido control, donde se logra observar la unión del marcador DAPI con los componentes nucleares, lo que corrobora una buena descelularización por parte de la técnica empleada.

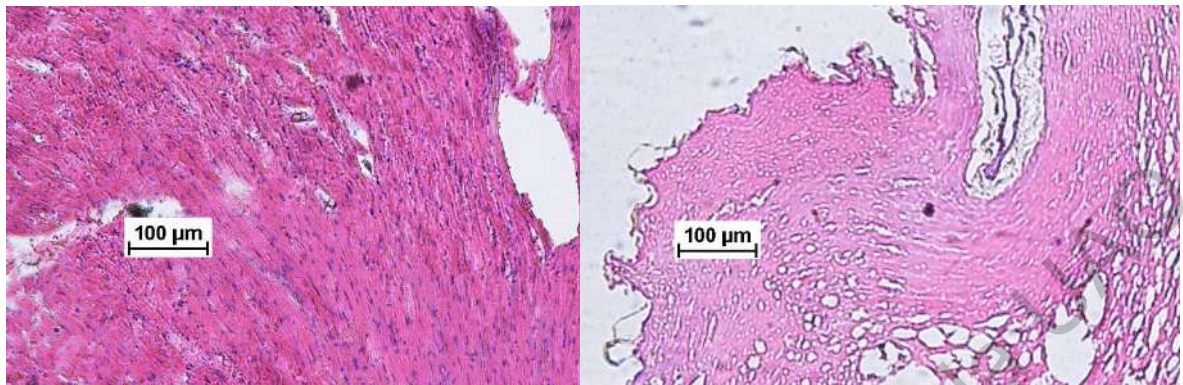


(A)

(B)

Figura 3. Tinción DAPI microscopia confocal, tinción tejido control (A) y tinción tejido descelularizado (B).

La tinción de HE fue utilizada para corroborar tanto núcleos como células y estado de la MEC, como las fibras de colágeno, ya que la primera por ser catiónica o básica tiñe estructuras ácidas en azul o púrpura como núcleos celulares y, el uso de eosina, que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, por su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma y las fibras de colágeno. En la fig. 4, se muestran los resultados de la tinción, donde se observa que el tejido descelularizado no muestra núcleos, a diferencia de la tinción del tejido control, pero se logran observar las fibras de colágeno como componentes de la ECM teñidas de rosa, lo que es un buen indicativo que la MEC extracelular está en buen estado.



(A)

(B)

Figura 4. Tinción H y E de tejido proveniente del ventrículo izquierdo en microscopio óptico, tinción tejido control (A) y tinción tejido descelularizado (B).

Extracción de DNA

En el cuadro 2 se muestran los resultados de la extracción de ADN del corazón descelularizado y uno sin descelularizar, para la comparación de los dos corazones y tener un porcentaje aproximado de la eficacia del método de descelularización usado en cuanto a restos de DNA. Para esto, se realizó la extracción utilizando el Wizard Genomic DNA Kit (faltan datos de la marca) y el protocolo de extracción por fenol/cloroformo, donde los resultados indican que hubo una buena remoción del DNA mayor al 80%. Weymann y col., 2011, mencionan que éste es el porcentaje con el cual ya no habrá una reacción inmunitaria y la adhesión se podrá llevar a cabo, se observó un porcentaje de remoción de ADN más alto en el método por kit que por el fenol/cloroformo. Esto puede ser debido a que para la extracción por kit se tomó la parte ventricular y para la extracción con fenol/cloroformo fue tomada una parte más cercana a las aurículas, cerca del septo, lo que podría explicar una mejor descelularización ventricular.

Cuadro 2. Resultados de la extracción de DNA genómico.

Método extracción de DNA por kit Wizard genomic DNA	Método extracción phenol/cloroformo
Corazón control: 0.37 µg/µg	Corazón control: 0.541 µg/µg
Corazón descelularizado: 0.0093 µg/µg	Corazón descelularizado: 0.059 µg/µg
Descelularización: 97.49 %	Descelularización: 90.83 %

Discusión

En el presente trabajo, se desarrolló una técnica de descelularización cardíaca mediante perfusión coronaria, pero utilizando por primera vez, sólo la presión hidrostática de lavado, sin mecanismos o dispositivos de presión positiva. Los experimentos fueron llevados a cabo en ratas Wistar macho, corroborando su eficiencia a través de tinciones HE, DAPI y la extracción de ADN.

Al implementar la técnica de descelularización cardíaca, se logró una MEC en buen estado. Sin una bomba de presión positiva, se estima que la presión de lavado mediante la perfusión con presión hidrostática fue de aproximadamente 7.5 mm de Hg. Este hecho resulta prometedor, al trabajar con presiones de perfusión fisiológicas, lo que permite predecir una drástica disminución de los artefactos y daños tisulares producidos por otras técnicas con presiones positivas. Resultados obtenidos en otros estudios como los llevados a cabo por Ott et al., en 2008 o los de Weymann et al., 2011, resultan similares, sólo que en estos utilizan procesos

de descelularización cardíaca por perfusión coronaria con una presión positiva de alrededor de 77.4 mm de Hg, es decir, alrededor de 10 veces mayor.

El protocolo del presente estudio, comenzó con la congelación del órgano durante 12 h seguido de la perfusión con tripsina al 0.025% por aorta ascendente por 0.5 h seguido de agua desionizada por 15 min, posteriormente, se perfundió con SDS al 2 % por 12 h, PBS por 24 h y agua tridestilada por 4 h. Se logró la estandarización de tiempos y concentraciones de los reactivos usados orientándonos en los trabajos de Akhyari et al., 2011. Donde realizaron también el uso de tripsina al 0.025% 1 h, junto con tritón X100 al 3% y ácido desoxicólico 4%, obteniendo un 80% de remoción de ácidos nucleicos. En el presente caso, se usó la tripsina al 0.025% la cual se administró vía perfusión coronaria sólo por 0.5 h. Ningún otro protocolo utiliza cifras de presión tan bajas, en general, los protocolos de descelularización como el empleado por Akhyari et al., 2011 utilizan bombas de presión positiva a 77.4 mm Hg aproximadamente, por lo que se redujo el tiempo de la tripsina durante la perfusión con el fin de que esta no dañara la MEC, lo que ayudo a una mejor remoción del contenido celular, obteniendo los resultados descritos en un menor tiempo.

Debido a los cambios en la presión de perfusión, se incrementó la concentración del SDS, utilizándolo al 2 % por 12 h. Finalmente, se realizaron enjuagues con PBS, por 24 h y agua tridestilada por 4 h, para remover los rastros finales de detergente. Esto a diferencia de otros protocolos como el de Ott et al., en 2008, Weymann et al., en 2011 y el de Nathaniel et al., en 2012., donde describen resultados favorables con una presión positiva de aproximadamente 77.4 mm de Hg, SDS al 1% por 12 h, enjuagues con PBS por 24 h, donde el último estudio mencionado utiliza concentraciones de SDS de hasta el 4%. Esto les permitió una remoción del contenido nuclear aproximado del 97%, resultado similar al obtenido utilizando el protocolo del presente estudio.

Para demostrar el éxito de la técnica empleada en la descelularización cardíaca se empleó la técnica de la tinción H/E. Con esta tinción se corroboró el éxito de la

técnica empleada en la descelularización cardíaca, ya que muestra el tejido descelularizado sin núcleos, a diferencia de la tinción del tejido control, lo que se volvió a verificar con la tinción de inmunofluorescencia con DAPI. Además, se logran observar las fibras de colágeno como componentes de la MEC teñidas de rosa, esto es un indicativo de que la MEC está en buen estado después de los lavados, por lo que se obtuvieron resultados similares que Ott et al., 2008 y Weymann et al., 2011 con respecto a esta tinción.

Estos resultados corroboran una remoción de ADN del 97.49%, un nivel muy adecuado de efectividad, ya que Perea y cols. en 2015, en un estudio donde se realizó la recelularización con células progenitoras humanas derivadas de tejido adiposo cardíaco de cortes de corazón de puerco descelularizados, consideran que una remoción mayor al 82%, no provocará una reacción inmunitaria y la adhesión de nuevas células podría llevarse a cabo.

Al no usar un biorreactor lo cual incluye una bomba de presión, al utilizar presiones positivas de lavado mucho más bajas que los protocolos actuales, también se disminuye la posibilidad de daño y artefactos causados a la MEC por el propio procedimiento.

Además, el presente protocolo de descelularización no involucra dispositivos especializados, disminuyendo, por tanto, el costo de las instalaciones para poderse llevar a cabo procesos exitosos de descelularización. Actualmente, los protocolos actuales requieren frecuentemente de bombas de infusión, eléctricas o automatizadas, así como dispositivos especializados como el biorreactor lo que tendría un costo de alrededor de 1 millón de pesos dependiendo del modelo y la marca, lo que vuelve muy difícil el procedimiento. El presente procedimiento involucra una menor cantidad de equipo, no especializado con un costo aproximado de 4000 pesos. Además, esta técnica podría también, ser eficiente para otros tipos de órganos, como el pulmón, hígado, riñón y músculo.

Por otro lado, con el uso de la técnica descrita en el presente estudio, no se pueden controlar variables como la presión y la temperatura de los reactivos, utilizados a diferencia de las técnicas utilizadas con biorreactor, lo cual supone una desventaja. Pero que, con la implementación de otros métodos, podrían añadirse a la misma.

Una perspectiva sería probar la implementación de la técnica manipulando dichas variables en biorreactor para así, estandarizar un protocolo de descclularización cardíaca aún más eficiente. El avance que promueva esta técnica avizora posibles buenos resultados en los procesos de descclularización en órganos de mayor tamaño, como los llevados a cabo por Roy et al., en 2005, o los de Remlinger et al., en 2012. Donde ya se han realizado con cierto éxito, la descclularización por perfusión al corazón porcino, lo que muestra la posibilidad de escalar a corazones de mayor tamaño y complejidad.

Con este trabajo se aportó una técnica de descclularización cardíaca con la ventaja que puede ser aplicable en cualquier laboratorio que cuente con una campana de flujo laminar y los reactivos mencionados en dicha técnica. Involucra una menor cantidad de equipo, disminuyendo, por tanto, el costo de las instalaciones para poder llevar a cabo estos procesos de descclularización cardíaca. Además, en nuestro laboratorio, esta técnica, con algunas modificaciones, ha mostrado ser efectiva para la descclularización de tejidos como el hígado y el riñón.

Conclusiones.

Son pocas las terapias que muestran ser efectivas en ayudar a mejorar el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, además actualmente la única opción que tienen los pacientes con fallo cardíaco terminal, es el trasplante del órgano por lo que la generación de órganos bioartificiales mediante la descelularización y recelularización es un área de investigación muy prometedora. En el presente trabajo por primera vez se ha estandarizado un protocolo de descelularización cardíaca en rata Wistar por presión hidrostática y perfusión coronaria retrograda, sin uso de equipo especializado como el biorreactor y una bomba de presión.

Las condiciones de presión, así como la concentración de cada reactivo utilizado y el tiempo de perfusión influyen de manera decisiva en los protocolos de descelularización, por lo que dependiendo el tipo de tejido a descelularizar estas variables son altamente ajustables. Una descelularización más eficiente en el tejido cardíaco se dio al aplicar el SDS al 2% en parte gracias a la previa congelación, descongelación la aplicación de la tripccina y concentración del reactivo, además por el hecho de no usar presiones altas por una bomba de presión se disminuye la posibilidad de daño a la MEC.

Con el protocolo empleado se logró obtener una MEC en buen estado, lo cual fue corroborado por la tinción H/E donde se muestra claramente la ausencia de núcleos en el tejido esto se refuerza con la tinción de inmunofluorescencia con DAPI la remoción de ADN del 97.49% y las fibras de colágeno como componentes de la MEC teñidas de rosa que se logran observar en la tinción H/E con lo que se concluye la descelularización y buen estado de la MEC.

Después de realizar el presente proyecto podemos llegar a la conclusión de que, se ha estandarizado un protocolo de descelularización cardíaca sin uso de equipo especializado como un biorreactor con lo que se disminuyen los costos considerablemente y que puede ser aplicable en cualquier laboratorio que disponga de una campana de flujo laminar y los reactivos necesarios para dicho protocolo.

Referencias.

1. Akhyari P, Aubin H, Gwanmesia P, Barth M, Hoffmann S, Huelsmann J, Preuss K, Lichtenberg A., (2011). The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: A comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities. *Tissue Eng Part C Methods*; 17:915-26; PMID:21548726; <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0210>
2. Aldama López G, Piñeiro Portela M, Campo Pérez Esteban P. (2005). Insuficiencia cardiaca: concepto, epidemiología, clasificación, etiología y fisiopatología. *Medicine*;9(35):2279-90.
3. *Argent Cardiol* 2000;68 (supl III):1-64
4. Aznar Lucea Justo, Tudela cuenca Julio, Sánchez García José Luis, (2015). producción de órganos bioartificiales. Instituto de Ciencias de la Vida de la Universidad Católica de Valencia. Cuadernos de Bioética XXVI 2015/1ª
5. Bleumink GS, Knetsch AM, Sturkenboom MC. (2004). Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure. *Eur Heart J*;25:161419.
6. Castro, M. A. E. (2016). Citocompatibilidad de tejidos cardiacos humanos descelularizados con detergentes (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
7. Cleland JGF, Daubert JC, Erdmann E, et al., (2005). The Cardiac Resynchronization Heart Failure (CARE-HF) Study Investigators. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med*;352(15):1539-49.
8. ClikiSalud.net | Fundación Carlos Slim. (2018). Insuficiencia cardíaca, una de las patologías más costosas en México. [online] Available at: <https://www.clikisalud.net/insuficiencia-cardiaca-patologia-costosa> [Accessed 12 Sep. 2018].

9. Cohn JN, Tognoni G. A., (2001). Randomized Trial of the Angiotensin-Receptor Blocker Valsartan in Chronic Heart Failure. *N Engl JMed*; 345:1667-1675.
10. Colaco, M., & Atala, A. (2014). The Future of Transplant Biology and Surgery. *Interdisciplinary Medicine*.
11. Costa, K. D. (2016). Decellularized Scaffold Hydrogel Materials for MI Treatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(9), 1087-1090.
12. Crapo, Peter M.; Gilbert, Thomas W.; Badylak, Stephen F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *32: 3233-3243*.
13. Crespo-Leiro MG, Anker SD, Maggioni AP, Coats AJ, Filippatos G, Ruschitzka F, Ferrari R, Piepoli MF, Delgado Jimenez JF, Metra M, Fonseca C, Hradec J, Amir O, Logeart D, Dahlstrom U, Merkely B, Drozd J, Goncalvesova E, Hassanein M, Chioncel O, Lainscak M, Seferovic PM, Tousoulis D, Kavaliuniene A, Fruhwald F, Fazlibegovic E, Temizhan A, Gatzov P, Erglis A, Laroche C, Mebazaa A. Heart Failure Association of the European Society of C. European Society of Cardiology Heart Failure Long-Term Registry (ESC-HF-LT): 1-year follow-up outcomes and differences across regions. *Eur J Heart Fail* 2016; 18: 613–625.
14. Doris A. Taylor, O. H. Frazierb, Abdelmotagaly Elgaldb, Camila Hochman-Mendez, Luiz C. Sampaioa,b. (2017). Building a Total Bioartificial Heart: Harnessing Nature to Overcome the Current Hurdles. *Regenerative Medicine Research, Cullen Cardiovascular Surgery Research*. 10-11
15. Echeverri-Rico J. V., ,a Rocío Aceves -M.illán,a Lilia Amezcua-Gómez L.,,a Carlos Haroldo Ixcamparij-Rosales,C: H.,a Antonio Ruiz-Rivero, A.,b Armando Torres ,A.c, Abraham Majluf-Cruz A.,. (2014). Insuficiencia cardiaca Trascendencia y utilidad de la evaluación ecocardiográfica. *Temas de actualidad*, 52(2), 188-91.

16. Filippatos G, Angermann CE, Cleland JGF, Lam CSP, Dahlström U, Dickstein K, Ertl G, Hassanein M, Hart KW, Lindsay CJ, Perrone SV, Guerin T, Ghadanfar M, Schweizer A, Obergfell A, Collins SP., (2020) Global Differences in Characteristics, Precipitants, and Initial Management of Patients Presenting with Acute Heart Failure [published online ahead of print, 2020. Jan 8]. JAMA Cardiol. 2020. 10.1001/jamacardio.2019.
17. Flynn, L.E. (2010). The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. 31: 4715-4724.
18. Fox, S. I. (2004). Human physiology. Boston: Mc-Graw-Hill .
19. Gálvez-Montón, C., Prat-Vidal, C., Roura, S., Soler-Botija, C., & Bayes Genis, A. (2013). Ingeniería tisular cardiaca y corazón bioartificial. Revista Española de Cardiología , 66 (5), 391-399.
20. Gerard j. Tortora y Derrickson b., (2006). Principios de Anatomía y Fisiología . MX: editorial medica panamericana páginas; 1280.
21. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF., (2006). Decellularization of tissues and organs. Biomaterials; 27:3675-83; PMID:16519932
22. Gilbert, Thomas W.; Sellaro, Tiffany L.; Badylak, Stephen F. (2006). Decellularization of tissues and organs. 27: 3675-3683.
23. Gobierno de la República. (2018). Boletín Epidemiológico de Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sitio web: <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologicosistemanacion-al-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-163375>.
24. Kuck KH, Cappato R, Siebels J, Rüppel R., (2000). Randomized comparison of antiarrhythmic drug therapy with implantable defibrillators in patients resuscitated from cardiac arrest: the Cardiac Arrest Study Hamburg (CASH). Circulation; 102(7):748-54.
25. Linde C, Leclercq C, Rex S, Garrigue S, Lavergne T, Cazeau S, et al., (2002). Long-term benefits of biventricular pacing in congestive heart

failure:results from the MULTISiteStimulation in cardiomyopathy (MUSTIC) study. *J Am Coll Cardiol*;40(1):111-8.

26. Lu T, Lin B, Kim J, Sullivan M, Tobita K, Salama Gea, (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature Communications* DOI: 10.1038/ncomms330.
27. Mozaffarian, D., Benjamin, E., Go, A., Arnett, D., Blaha, M., Cushman, M., . . . McGuire, D. (2015). Heart failure and stroke statistics. *American Heart Association*.
28. Mueller-Stahl, K., Kofidis, T., Akhyari, P., Lee, D. H. L., Lenz, A., Martinez, E. C., ... Haverich, A. (2008). Determinants of Bioartificial Myocardial Graft Survival and Engraftment In Vivo . *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 27(11), 1242–1250.
29. Oliveri R, Pomés Iparraguirre H, Barisani JL, Nul D, Doval H, Grancelli H y cols. Consenso de Insuficiencia Cardíaca – SAC (2000). *Rev*
30. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomidou L, et al., (2010). Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nature Medicine*; 16: p. 927–933.
31. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008; 14:213-21; PMID:18193059; <http://dx.doi.org/10.1038/nm1684>
32. Petersen, T.H.; Calle, E.A.; Zhao, L.; Lee, E.J.; Gui, L.; Raredon, M.B. (2010). Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. 329: 538-541.
33. Pfister O, Della Verde G, Liao R, Kuster GM. (2014). Regenerative therapy for cardiovascular disease. *Transl Res*; 163: p. 307-20.
34. Rivero E.R.C., Neves A.C., Silva-Valenzuela M.G., Sousa S.O.M., y Nunes F.D. 2006. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology - Research and Practice*. 202 (7): 523–529.

35. Roy, S., Silacci, P. & Stergiopoulos, N. Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1567– H1576 (2005).
36. Sánchez, R. A. (2008). El uso de células madre en la insuficiencia cardíaca. Implante celular autólogo intramiocárdico total. Método de siembra.
37. Shah, S., Gnanasegaran, G., Sundberg-Cohon, J., & Buscombe, J. R. (2009). The heart: anatomy, physiology and exercise physiology. In A. Movahed, G. Gnanasegaran, J. Buscombe, & M. Hall, *Integrating cardiology for nuclear medicine physicians* (pp. 3-22). Alemania: Springer.
38. Vidaña Martínez, L., (2012). Actualización bibliográfica sobre la regeneración cardíaca y propuesta técnica para el desarrollo de un corazón bioartificial apto para el trasplante. Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud. 13-14.
39. Vinay, K., Abul, K. et. al. (2014). *Patología estructural y funcional*. Estados Unidos de América: ELSEVIER.

Anexos.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ