

FUNCIONALIZACION DE MATRIZ HEPATICA
PARA SU RECELULARIZACION EN UN
BIORREACTOR Y SU TRASPLANTE *IN VIVO*



TFM
- MASTER EN INGENIERIA BIOMEDICA -
PROGRAMA OFICIAL DE POSGRADO EN INGENIERIAS TRANSVERSALES

AUTOR: CARLOS SAEZ GUILLEN
DIRECTORES: M^a DEL PILAR MARTIN DUQUE
JESUS MARTÍNEZ DE LA FUENTE

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
HOSPITAL UNIVERSITARIO MIGUEL SERVET.
INSTITUTO ARAGONÉS DE CIENCIAS DE LA SALUD.
UNIDAD DE INVESTIGACION TRASLACIONAL

ZARAGOZA, JUNIO 2011



INDICE

- RESUMEN.....pp3
- ANTECEDENTES.....pp4
- OBJETIVOS.....pp6
- MATERIALES Y MÉTODOS.....pp7
- RESULTADOS.....pp10
- DISCUSIÓN.....pp17
- CONCLUSIONES.....pp19
- AGRADECIMIENTOS.....pp20
- REFERENCIAS.....PP21



RESUMEN

El trasplante hepático ha recorrido un largo camino desde los pasos iniciales en humanos, sin éxito en sus comienzos en 1963. En las últimas tres décadas, el trasplante hepático se ha convertido en una realidad, pero muchos desafíos siguen siendo obstáculos a solucionar. 12.000 pacientes en Europa se encuentran a la espera de poder ser beneficiarios, pero por desgracia existen poco más de 4.000 órganos disponibles provenientes de donantes cadáveres, de los cuales hay que añadir la dificultad de que sean compatibles con el receptor. Así, dada la creciente disparidad entre el número de beneficiarios potenciales y de órganos disponibles, el reto actual en el trasplante hepático es la búsqueda de nuevas alternativas de órganos de donación, entre los que se encuentran los órganos bio-artificiales.

Existen tres técnicas para hacer órganos artificiales (I) Hacer un andamiaje de colágeno con la forma del órgano que será cubierto por las células del paciente (II) "Tatuar" grupos celulares y así formar una estructura montada capa por capa. De esta manera, las venas y las arterias que también tendrán que ser creadas (III) Eliminar completamente todas las células del órgano y, a continuación recelularizar con las células del paciente a transplantar.

En este proyecto, se describe la fabricación de un órgano hepático de tres dimensiones, con los andamios de origen natural y con un árbol vascular intacto. Los hígados serán perfundidos con un tampón rico en jabones, para eliminar de forma selectiva los componentes celulares del tejido, preservando al mismo tiempo la red vascular intacta y los componentes de la matriz extracelular. La red vascular decelularizada es capaz de soportar el flujo de fluido que entra por una vía central, se ramifica en un lecho capilar extenso, y se une en una vía de salida única. La red vascular se utiliza para sembrar de nuevo el componente celular. Estas células injertadas en sus lugares originales dentro del órgano decelularizado, son confirmados por la aparición de marcadores epiteliales típicos endoteliales, hepáticos y biliares y por lo tanto la creación de tejido del hígado como *in vitro*.

Aquí mostramos cómo las técnicas descritas por varios grupos anteriormente para descelularizar órganos, no están en el mismo nivel de eficacia, al menos para el tejido hepático. Por otra parte, hemos observado que una cuestión importante para obtener una descelularización completa o parcial sería la especie animal de estudio. Por lo tanto, se concluye que la especie y técnica correcta empleada son esenciales para el éxito del proceso de descelularización total.



ANTECEDENTES

Las patologías del hígado, van desde la hepatitis viral metabólica congénita, a las lesiones resultantes del abuso del alcohol, que a menudo resultan en la necesidad de un trasplante hepático. Una oferta insuficiente de los órganos adecuados para el trasplante, ha limitado la capacidad de curar muchos casos de estas enfermedades. Desafortunadamente, muchos de estos pacientes sucumbirán a su enfermedad antes de que un órgano adecuado esté disponible.

En la actualidad la Medicina Regenerativa o Terapia Celular, está cobrando cada vez una mayor importancia. Ofrece la esperanza de poder tratar importantes patologías producidas por la pérdida o degeneración celular, como por ejemplo las enfermedades neurodegenerativas, cáncer, diabetes insulínica, problemas cardíacos, las cuales se encuentran en claro ascenso debido al envejecimiento de la población mundial y en general, todas ellas se caracterizan por la pérdida o degeneración celular, que es incapaz de ser tratada mediante fármacos.

Pero los avances no sólo se quedan en la regeneración de tejidos más o menos simples, las últimas investigaciones se dirigen hacia la creación de órganos completos tridimensionales y con funciones complejas y multitud de diferentes estirpes celulares. Estos órganos regenerados se suelen obtener a partir de un entramado o matriz extracelular sembrados con células del hipotético receptor. La regeneración celular/tisular y la producción de órganos para trasplantes, utilizan las células troncales, que son precursores celulares no especializados con capacidad de auto-renovarse y diferenciarse en células especializadas en respuesta a señales específicas (1). Pese al tremendo avance en cuanto a ingeniería de tejidos se refiere, la creación de órganos viables a partir de tejidos descellularizados que son colonizados por células parenquimatosas de otro individuo, ha permaneciendo en el campo experimental y con muchas limitaciones.

REGENERACIÓN DE ÓRGANOS PARA TRANSPLANTES

El campo de la ingeniería tisular ha crecido rápidamente. Durante años, los médicos han usado piel manipulada mediante ingeniería tisular para curar a pacientes quemados (2). También se usan cartílagos manipulados para reparar articulaciones (3). Además se han crecido en el laboratorio, vejigas nuevas a partir de las propias células del paciente para ser usadas en esos mismos. De hecho, en la actualidad, un grupo de niños con espina bífida han recibido estas vejigas artificiales en Wake Forest University, donde también se están probando nuevos vasos sanguíneos en pacientes que reciben diálisis (4).



Pero en humanos, el mejor caso sería tomar los órganos de cadáveres, eliminar sus células y hacer matrices donde se re-inyecten células madre, células musculares u otras, del mismo paciente para ser implantado. El proceso de repoblación de la matriz con nuevas células sería únicamente de semanas.

La ciencia ha dado un nuevo paso en la dirección de la creación de nuevos órganos corporales a partir de células madre. Un equipo de científicos ha conseguido re-crear un nuevo corazón de rata capaz de contraerse al inyectar células de ratones recién nacidos en una matriz de válvulas que quedó intacta después de que las células muertas fueran eliminadas (5). Taylor publicó un importante artículo en Nature Medicine, aunque estrictamente no puede hablarse de creación de un órgano artificial.

Korkut Uygun, del Centro de Ingeniería Médica del Hospital General de Massachusetts (EE.UU.) repitió los experimentos de la Dra Taylor pero aplicados al hígado con excelentes resultados, siendo capaces de obtener un hígado teóricamente funcional, ya que aún no ha sido transplantado con éxito (6). Claro está, se trata de una prueba de concepto, un primer paso, tan preliminar como necesario, en el camino hacía un hígado artificial completamente funcional y apto para ser transplantado a un enfermo, ya que será necesario trabajar mucho más, pero es un excelente comienzo. Otros grupos que estaban trabajando en paralelo (como nuestros colaboradores en Wake Forest University) publicaron trabajos similares pocas semanas después (7) convirtiéndose éste, en un campo muy atractivo de estudio.

El experimento consiste en obtener un órgano -en este caso un hígado- y quitarle las células dejando tan sólo el andamiaje (la matriz que las sustenta). Esto se consigue 'lavándolo' con detergentes enzimáticos. Después, mediante perfusión, se repuebla con células nuevas hasta obtener la estructura original, pero compatible con el paciente. En este proyecto hemos intentado aumentar los conocimientos existentes en el campo de la bioingeniería de tejidos y de la realización de nuevos órganos bioartificiales, que en un futuro, podrían ser la base de los trasplantes de órganos.



OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es la descelularización de un órgano completo eliminando todo vestigio celular vivo, conservando la estructura extracelular, de tal modo que pueda ser recolonizado manteniendo la histología para posteriormente recelularizarlo con células madre propias, con capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en células especializadas en respuesta a señales específicas, para su futuro trasplante *in vivo*.

Dado a las discrepancias bibliográficas existentes en la metodología descrita para este proceso nosotros nos propusimos:

- 1- Establecer un protocolo exacto y reproducible para la óptima descelularización hepática.
- 2- Determinar el protocolo óptimo a emplear, de entre los descritos con anterioridad (tampón, tiempos, tratamientos previos etc)
- 3- Determinar la especie animal en estudio para la obtención de los mejores resultados

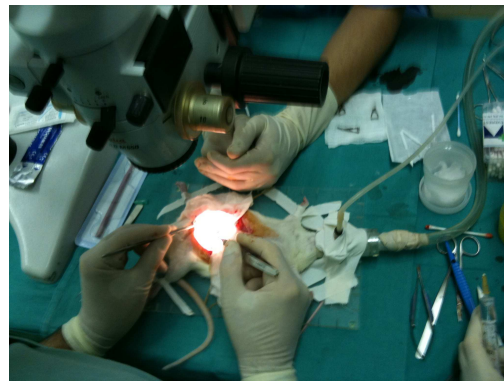
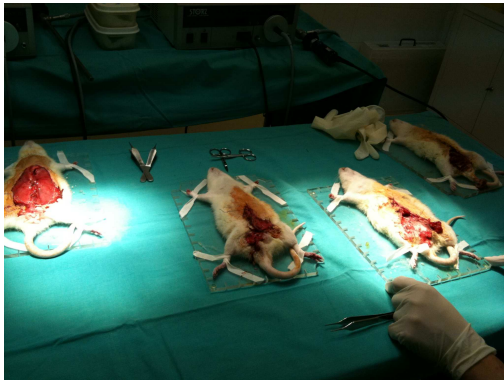
MATERIALES Y METODOS

- **Procedimiento de extracción :**

Tanto en rata, ratón o conejo la cirugía se realiza bajo anestesia inhalatoria o con una inyección de ketamina, con el fin de mantener vivo al animal el mayor tiempo posible y así poder utilizar el flujo natural a la hora de heparinizar todos los órganos manteniéndolos libres de trombos o problemas añadidos. La inducción anestésica comienza con isoflurano al 4% junto a un flujo de oxígeno de 2.5 a 3 L/min, para después mantenerlo bajo inhalación de isoflurano al 1.5 – 2% y flujo constante de oxígeno de 2 – 2.5 L/min, pudiendo variar las cantidades en función del peso y dimensiones del mismo.

Antes de empezar con la microcirugía se coloca el animal en la mesa de intervención inmovilizándolo con bandas elásticas o tensores específicos para poder maniobrar. Posteriormente procederemos a heparinizarlo mediante una inyección intravenosa de 12 u. de heparina sódica a través de la vena central del pene.

Este es el procedimiento común, aunque fue mejorado posteriormente al abordar la circulación desde la aorta, ya que es un proceso más fácil y completo, irrigándose todo el organismo.

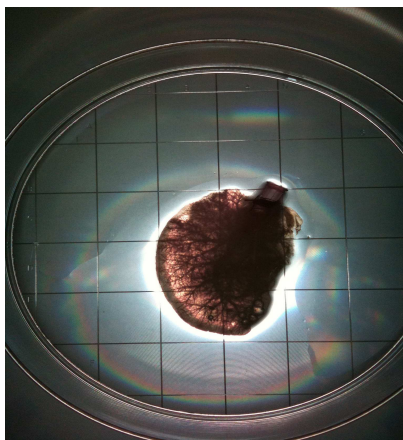


A continuación, se procedió a realizar una laparotomía media que se prolongará con una incisión doble en el abdomen, asegurando los dos extremos con varios pinzamientos y teniendo acceso directo a diversos órganos. Se ligará en bloque la vasculatura con una seda de calibre 2/0 o 3/0 se procederá a enfriarlo en nitrógeno líquido y se mantendrá a una temperatura de -80°C .

Por otro lado también se hicieron pruebas guardándolo con líquido para comprobar si se producían micro fracturas en la matriz, llegando a la conclusión de que era mejor en seco.

- **Procedimiento de descelularización:**

Una vez descongelado el hígado extraído se colocará en un receptáculo con control de temperatura (4°C) y condiciones asépticas. Se canalizará la vasculatura colocándose en un sistema de perfusión peristáltica en circuito abierto. Los hígados serán perfundidos con una solución detergente SDS durante 12 h. Utilizando un circuito de lavado continuo (del mismo modo que se practicaba el lavado del injerto).



Utilizaremos la técnica basada en los experimentos publicados en la revista Nat Med. 2010 Jul;16(7):814-20. (Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. Uygun BE, y col) y la compararemos con la de (The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. Baptista PM, y col). Se conseguirá así la descelularización completa del injerto eliminando cualquier vestigio celular o fragmentos de DNA.

- **Ensamblaje del biorreactor.**

El biorreactor será esterilizado con una corriente de vapor a 121°C y se ensamblará dentro de una cabina de flujo laminar estéril, según se observa en la fotografía, usando principalmente una bomba Masterflex L/S (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL, USA). Una vez conectado, el biorreactor se dejará en un incubador al 5% CO₂ a 37°C.



- **Técnica de descelularización 1: Cloruro de amonio (descrita por Baptista y col)**

En esta primera etapa sólo se utilizó NH_4Cl como compuesto tensioactivo iónico y tritón X-100. Los hígados fueron perfundidos durante una semana con cloruro de amonio en diferentes concentraciones (tras haberlos perfundido con PBS), sin haber utilizado congelación previa y tomando estas concentraciones como referencia

Primer día al 0,01%

Segundo- Tercero al 0,1%

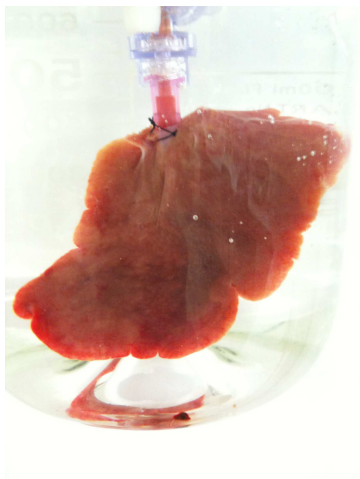
Cuarto-Quinto 1%

Sexto 0,1% triton y 1% triton al final

Finalizando en el séptimo con una extensa limpieza con PBS y antibiótico

- **Técnica de descelularización 2: SDS (descrita por Uygun y col)**

En los siguientes se empleó como base del tampón, el dodecil sulfato sodico (SDS) $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ como agente para lisar las células y al final del proceso triton X-100 como no iónico pero en mucha menor cantidad y durante menos tiempo ya que se vio que se colapsaba mas rápido. En este apartado se procedió con precongelación a -80°C para lisar las células previamente.



RESULTADOS

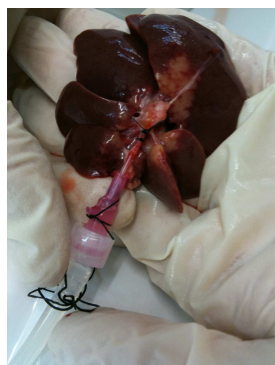
La descclularizaci3n se compone de aproximadamente 6 pasos fundamentales que variar3n en funci3n del estado del 3rgano, su especie, y la v3a de inyecci3n de los compuestos tensioactivos i3nicos o agentes desnaturalizantes, favoreciendo la ruptura de la membrana celular y sus prote3nas. La soluci3n y el protocolo a emplear son fundamentales para obtener un resultado eficiente y un 3rgano con estructuras bien conservadas, para proceder a su correcta recellularizaci3n.

Extracci3n del h3gado a descclularizar

A la hora de proceder a extraer el 3rgano, observamos que podr3a ser interesante realizar una doble canulaci3n anterior a la extracci3n, ya que as3 no perdemos la referencia anat3mica. Esto es muy importante para evitar que los vasos se colapsen. Este proceso realizado completamente al microscopio implica la manipulaci3n de di3metros muy reducidos y tejidos muy delicados. En la parte baja del 3rgano ten3amos dos alternativas para canular pero tras varias pruebas determinamos que el m3todo m3s efectivo era a trav3s de la vena porta, ya que se encuentra muy cerca de la zona de entrada y se mantiene mas estanco tras la saturaci3n del abocad deseado.

En este punto se ha podido comprobar que es preferible la utilizaci3n de abocads el3sticos con punta redondeada ya que de otra manera podr3an producirse perforaciones en los vasos o en la matriz extracelular (ECM) haciendo que el proceso de recellularizaci3n posterior sea nulo

Una vez que procedamos a extraer el 3rgano precannulado se aseguraran las ligaduras, de tal forma que no incidan de ninguna forma ni en vasos ni en la matriz y procederemos a perfundirlo con suero o PBS inyectando sucesivas dosis de forma muy lenta a trav3s del avocad.



En este procedimiento observaremos como poco a poco cambia el color del mismo y por el aumento de presi3n tambi3n detectaremos posibles fugas en todo el contorno del mismo, haciendo que podamos elegir m3s f3cilmente el l3bulo adecuado en caso de que queramos trabajar de forma parcial con el mismo.



En las fotos anteriores vemos como quedan una vez canulados con avocads convencionales un hígado completo de rata, de conejo de tal forma que se puede distinguir claramente como irrigan directamente desde el centro del órgano con el inconveniente de que puede ser perforada la matriz según como se ubique o se manipule en la cámara del biorreactor.

Descelularización en biorreactor

En la descelularización del órgano se han utilizado diferentes métodos y condiciones, pudiendo así tener una idea global de las mejores variables hasta adaptarlo a un estándar aplicable.

Para la descelularización se ha utilizado una bomba peristáltica masterflex con capacidad limitada para determinar parámetros dejando velocidad y pulsos bajo un caudal constante. Se analizaron también la calidad de los materiales en siliconas ya que se degradaban muy tempranamente y al final se optó por la de grado medio modelo 96410-14 que daba resultados bastante aceptables.

Tras descongelar el hígado progresivamente hasta 4°C durante 24 horas, y se pudo observar como ha quedado toda la estructura exterior pudiendo comprobar que no estaba dañada.

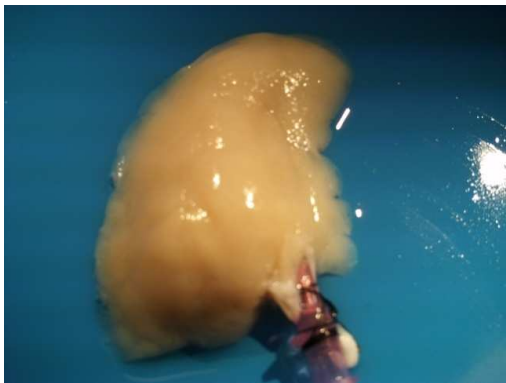
Independientemente de la especie o dimensiones se han procesado una serie de hígados empleando diferentes métodos y condiciones, para poder establecer un patrón general a todos ellos que determine cuál es el mejor procedimiento tal y como se adjunta en la siguiente tabla.

Hígado	Especie	Método	Fragmento	Tiempo	Canulación	Ciclo	Fotos	H&E
1	Conejo	Clor Am	Completo	7d	1 cánula	Norm	SI	NO
2	Conejo	Clor Am	1 lóbulo	7d	1 cánula	Norm	SI	NO
3	Conejo	Clor Am	1 lóbulo	15d	1 cánula	Norm	SI	NO
4	Conejo	SDS	1 lóbulo	7d	1 cánula	Norm	SI	NO
5	Ratón	Clor Am	Completo	15d	1 cánula	Norm	SI	SI
6	Rata	Clor Am	Completo	15d	1 cánula	Inv	SI	NO
7	Ratón	SDS	Completo	7d	1 cánula	Norm	SI	NO
8	Ratón	SDS	Completo	7d	2 cánulas	Norm	SI	NO
9	Ratón	SDS	Completo	7d	1 cánula	Inv	NO	SI
10	Ratón	Clor Am	Completo	7d	1 cánula	Inv	NO	SI

1. TÉCNICA 1 VS TÉCNICA 2 (CONEJOS 1-3)

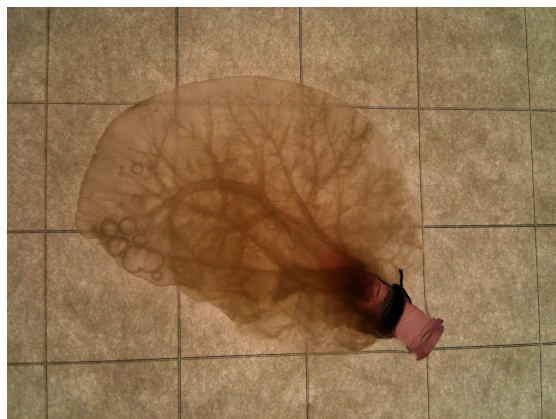
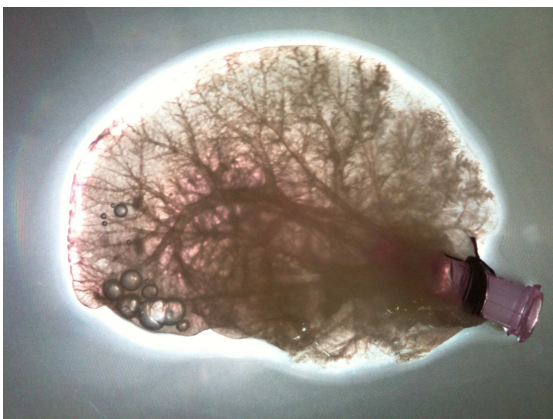
RESULTADOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA TÉCNICA NUMERO 1

Tras todo este proceso largo y tedioso pudimos observar como aun cambiando las concentraciones o el tiempo, la descelularización no era completa quedando casi todos ellos estancados en la cuarta fase de descelularización y sin poder discernir con definición la vasculatura del interior del hígado. Ampliando los tiempos a las dos semanas, se pudieron ver resultados algo más esperanzadores, como los mostrados en la fotografía de la derecha, pero nunca alcanzando los niveles obtenidos con el protocolo 2, ya que se observaban numerosos grumos celulares.



RESULTADOS OBTENIDOS EMPLEANDO LA TÉCNICA NUMERO 2

Una vez centrado todo el protocolo y ampliándolo hasta que dio resultados correctos en conejo, se consiguió el primer hígado descelularizado semitranslucido viendo como se observa en la siguiente fotografía la vasculatura de una forma clara, y con una buena integridad estructural y uniforme.



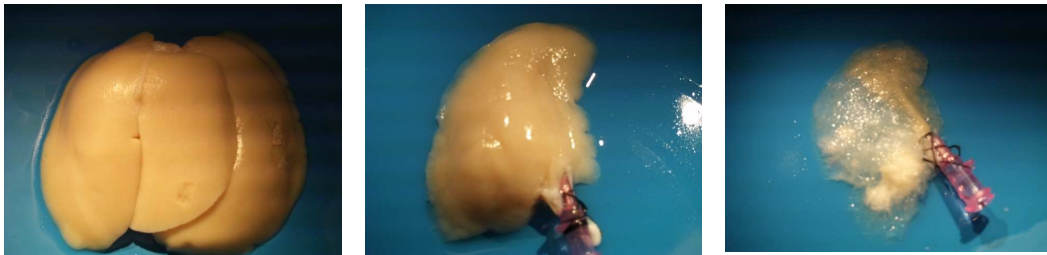
A partir de entonces se estableció un protocolo con pequeñas variaciones en función de la especie, fijando nuestra labor en rata y conejo pero con vistas a trasladarlo a ratón (ya que permitía un mayor abanico de posibilidades, tales como poder usar marcadores fluorescentes en la recelularización para distinguir las células propias de las inyectadas

exógenamente junto a otras muchas posibilidades, al ser el modelo más usado en el campo científico.

Con el objetivo de intentar usar un protocolo lo mas estandarizado posible para aclarar y simplificar todo el proceso, descartamos aquellos procedimientos que no nos dieron resultados totalmente claros, ya hemos concluido todo el proceso, a falta de de las pruebas de inmunohistoquímica con diferentes marcadores celulares y PCR en tiempo real que completarían este estudio.

1.A. VARIACIONES EN LA TÉCNICA 1 (tamaño a procesar y tiempo)

Los hígados de los conejos 1, 2 y 3 fueron procesados mediante el método, basado en el cloruro de amonio. Se incluyó en el biorreactor el hígado completo, en el caso del primero y solo el lóbulo derecho en los últimos, siempre canulados con una única vía. Estos 3 procesos no dieron resultados totalmente satisfactorios, ya que no se descelularizaron de forma completa, ni siquiera aumentando el número de días, como es el caso del último (3).



A su vez se podía comprobar cómo se producía colapsamiento de toda la estructura reduciendo el tamaño del órgano considerablemente. Además a simple vista se puede observar como no es posible discernir la vasculatura interior lo que demuestra que no se ha descelularizado.

1.B. PROCESO ESTANDAR DEL PROTOCOLO 2. CONEJO 4.

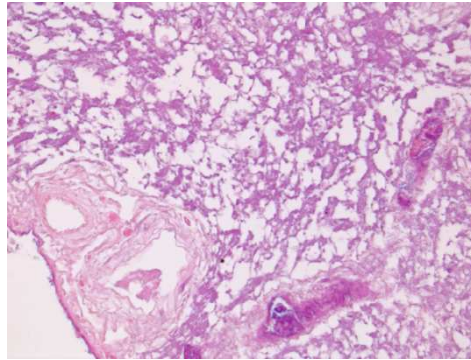
A partir del siguiente y empleando SDS, los resultados estuvieron muy mejorados. Se tomó el lóbulo derecho y monocanulación durante un periodo de 7 días con irrigación normal. Se finalizo con tritón X-100, que aun siendo un agente tensioactivo no iónico es menos agresivo y aportó más calidad y consistencia a la muestra en toda su estructura.

Por otro lado también se observó en otras muestras que el abuso en tiempo y concentración del tritón producía el efecto contrario fomentando una degradación del tejido y el principio de un colapsamiento que se acentuaba sin solución, por lo que se intentó buscar ese punto de inflexión tan determinante a la hora de precisar el momento perfecto de su retirada y preservación en PBS.



En los analisis de hematoxilina & eosina obtuvimos los siguientes resultados

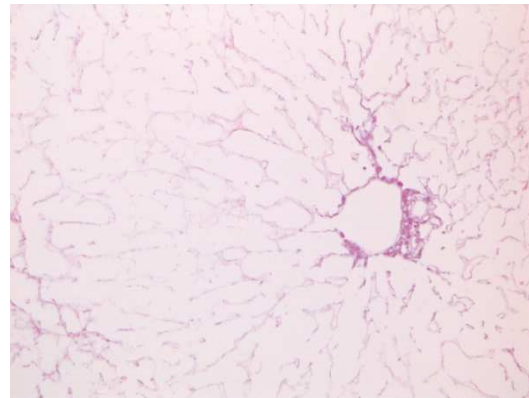
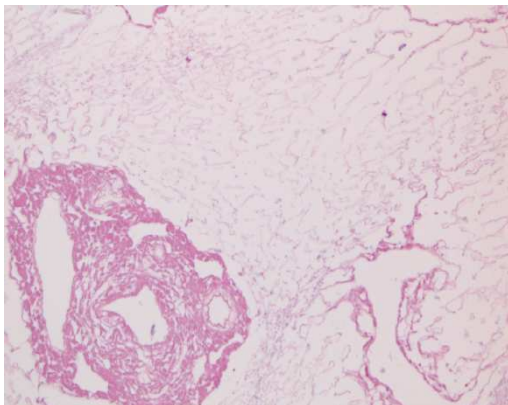
Conejo 3 Con cloruro de amonio:



Arquitectura notablemente conservada aunque se observan numerosos restos celulares.

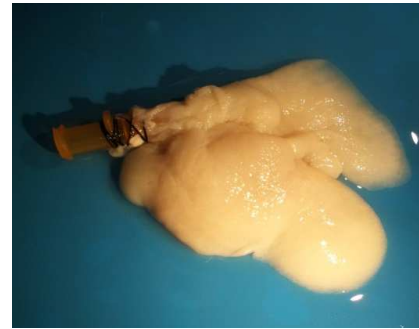
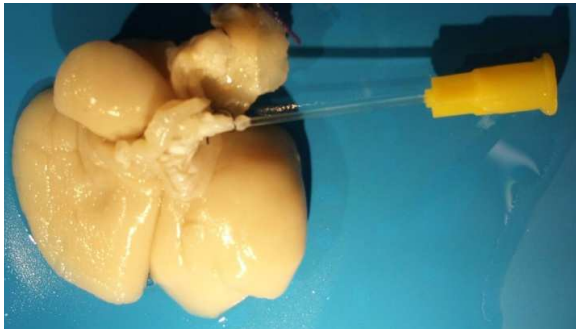
Conejo 4 SDS:

No se observan hepatocitos (células hepáticas) ni de conductos biliares. Tampoco se observan núcleos de ninguna otra célula (por ejemplo vasos sanguíneos, fibras). La arquitectura está parcialmente conservada, aunque en menor grado que en el hígado anterior.



2. COMPARATIVA ENTRE ESPECIES. RATÓN VS RATA (5 Y 6)

Se compararon los hígados de ratón y rata tratados con el protocolo y con cloruro de amonio y monocanulación se mantuvieron el doble de tiempo ya que no pasaban de fase tres. Aun con todo y a modo comparativo y por descartar este método uno de ellos fue canulado en ciclo inverso para ver si daba mejores resultados, sin poder obtener el objetivo deseado por lo que el cloruro de amonio después de todas las pruebas fue descartado de mas ensayos.



Aun así, se observa una cierta transparencia superior en el caso del ratón frente a la rata y una menor solidez en la textura de la matriz, con lo que concluimos que la rata es la peor especie a emplear para la descelularización, mientras que el mejor sería el conejo, aunque empleando el método del SDS las 3 especies mostraron resultados similares y el mismo éxito en el protocolo.

3. COMPARATIVA ENTRE MONOCANULACIÓN VS BICANULACIÓN (7-8):

En las figuras se puede observar como no existen grandes diferencias entre emplear un circuito simple o doble en el interior del hígado para eliminar sus células ya que la observación macroscópica no muestra ninguna diferencia entre ambas variables.

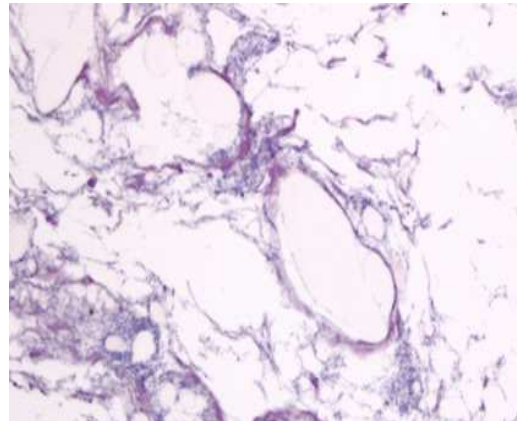
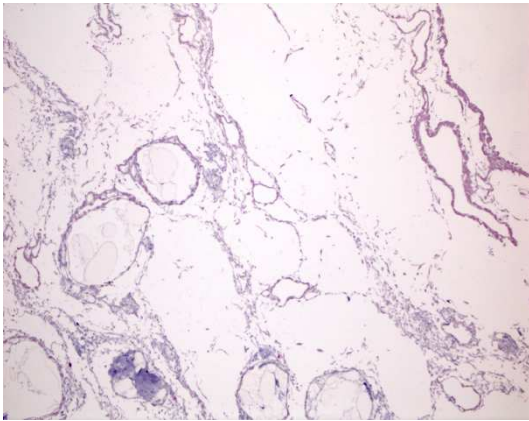


4. COMPARATIVA ENTRE METODO 1 Y 2 EN RATÓN

Comparando los resultados de este apartado con los del apartado 1, queda claro que el protocolo de elección sería el modelo de conejo, según el protocolo de SDS y una única canulación, sobre todo al analizar los resultados de anatomía patológica y sus estudios de hematoxilina & eosina.

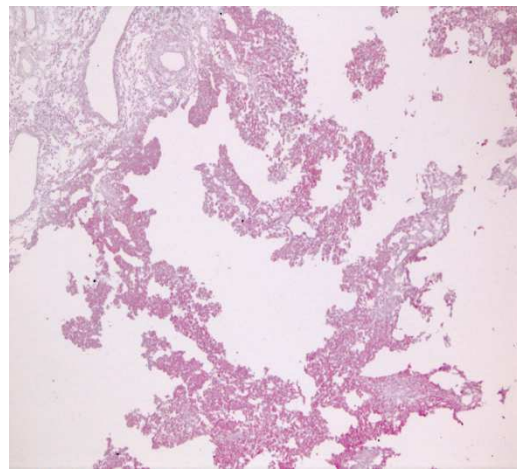
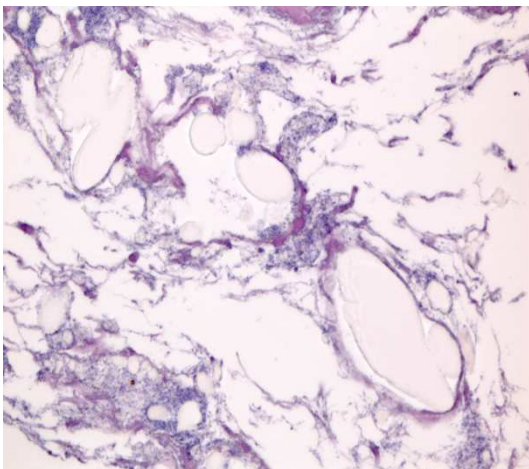
RATON 9/ SDS:

En este espécimen, no se observan hepatocitos, ni ninguna otra célula en el tejido. Se observa tejido fibroso (el que queda de la arquitectura del hígado). Se observa estructura vascular (zona en la que hubo grandes vasos, y se identifica que fueron vasos, pero con ausencia celular).



RATON 10/ CLORURO DE AMONIO:

Hallazgos muy similares al del espécimen anterior. En este caso, en algunas áreas se observa mayor cantidad de material, como restos citoplasmáticos de hepatocitos. Se realizarán pruebas inmunohistoquímicas para evaluar la procedencia de este material celular.





DISCUSION

Dada la escasez de donantes validos o compatibles para los trasplantes de órganos, este proyecto tiene un marcado carácter global, ya que en un futuro y tras varios años de desarrollo, se podría llegar a generar órganos bioartificiales con funciones complejas y múltiples estirpes celulares. Estos serían producidos con las propias células madre del hipotético receptor. Todo ello ha permanecido en el campo experimental y con muchas limitaciones y aunque esta posibilidad tiene visos de hacerse realidad a medio plazo, todavía estamos en el comienzo de la investigación.

La base de estos experimentos es, en primer lugar, la posibilidad de lograr descellularizar un entramado complejo como es un órgano maduro completo, eliminando todo vestigio celular vivo, manteniendo la estructura extracelular, más o menos compleja, de tal modo que pueda ser recolonizado con células del receptor manteniendo la histología, momento al que queremos llegar de forma correcta y reproducible, antes del trasplante.

Dada la novedad y juventud de este campo, no existen demasiados trabajos previos a los que referir nuestros resultados, con lo que este apartado quizás sea uno de los más difíciles de responder. Aquí trataremos de discutir nuestras observaciones realizadas tras muchos ensayos, así como otras que nos servirían para trabajos futuros.

Entre todos esos ensayos fallidos y fructíferos realizados, nuestra principal observación fue la optimidad en los resultados obtenidos al emplear el Dodecil Sulfato Sodico (SDS) y su capacidad como agente a emplear para el proceso de la descellularización frente al Cloruro de Amonio (NH₄Cl). Aun siendo usados ambos en combinación con Triton X-100 la eliminación de las células usando esta metodología fue superior en la mayoría de los casos.

Un problema añadido con el que ha habido que enfrentarse a diario ha sido la necesidad de la mejora del biorreactor y el diseño de una cámara específicos para este cometido, de tal forma que se pudiese desarrollar un proceso continuo desde el inicio de la descellularización hasta el final de la recellularización. Este diseño debería tener muy en cuenta que ha de ser múltiple, amplio y continuo en el proceso, y así que se ayude a reducir su manipulación. Si en un hipotético caso esas cámaras fueran desechables incluso se podría mantener estable hasta el mismo momento del transplante.

Otro de los avances realizados en el proceso, ha sido el evitar las muy dañinas perforaciones que se puedan producir en el órgano y que dificultarían la recellularización del órgano por lo que cambiamos los abocads a emplear, empleando los de punta redonda.



Mas importante de lo que pueda parecer, que el apartado de la ubicaci3n de las conexiones en el 3rgano es fundamental, destacando la doble canulaci3n permanente con abocads de punta redondeada, y sellado en vaso, ya que adem3s de mantener la matriz intacta en todo el proceso tambi3n se reduce el tiempo de isquemia posterior a la descongelaci3n progresiva desde -80°C .

Adem3s y con respecto a este apartado, ser3a muy interesante estudiar en el futuro diferentes procesos de congelaci3n y descongelaci3n, de forma lenta y programada, para ver si as3 la membrana celular se rompe con mayor facilidad sin alterar la ECM. Tambi3n se deber3a estudiar si la congelaci3n con el 3rgano seco o humidificado ayuda a mantener la estructura mejor conservada.

Este proceso podr3a ser aplicado a otros 3rganos. Nosotros hemos hecho algunos experimentos preliminares empleando un modelo de coraz3n. Las pruebas realizadas aun siendo escasas dieron buenos resultados en las tres especies, manteniendo la estructura de aur3culas, ventr3culos y v3lvulas estable y completa a falta de la realizaci3n de pruebas histol3gicas.

Abordando el tema de la recelularizaci3n todav3a en fase inicial, se puede decir que, en nuestras manos, aun nos quedan numerosos obst3culos por abordar. Algunos de ellos, ser3an el definir el tipo de c3lulas a emplear, adem3s del ciclo continuo/puls3til, la estimulaci3n celular en el proceso de crecimiento y adhesi3n y muchos m3s que ir3n surgiendo.

Una vez concluidos los procesos de descelularizaci3n y recelularizaci3n la siguiente fase ser3a el trasplante. Nosotros hemos estado preparando esta t3cnica tan dificultosa, especialmente por el peque1o tama1o de la vasculatura. La prueba de trasplante heterot3pico no tuvo el 3xito deseado, pero se est3 desarrollando un protocolo nuevo para la siguiente fase y ayudados por magn3ficos profesionales de la cirug3a.

Ya solo la posibilidad de poder considerar viable una estructura hep3tica funcional a todos los niveles y de estas caracter3sticas, superando el reto de una recelularizaci3n completa con c3lulas madre sin que se produzcan tumores posteriores, es un paso incre3ble y empieza a formar parte de un futuro cercano que resolver3a uno de los mayores problemas que amenazan a toda la sociedad. Con muchas limitaciones esta posibilidad tiene visos de hacerse realidad pronto, aunque todav3a estamos en el comienzo de la investigaci3n.



CONCLUSIONES

- La capacidad del Dodecil Sulfato Sodico o SDS ($C_{12}H_{25}NAO_4S$) frente al Cloruro de Amonio (NH_4Cl) para la descelularización es muy superior, ya que aún siendo ambos usados en combinación con Triton X-100, los resultados obtenidos con el primero fueron superiores en la mayoría de los casos.
- Siendo el del método del SDS el más óptimo, el tiempo necesario viene a ser casi el mismo en todos los modelos, centrándose el proceso de descelularización en 7 días, ya que a partir de ahí se produce colapsamiento del órgano. Otro paso fundamental fue la pre congelación a $-80^{\circ}C$, ya que ayuda enormemente a acelerar la lisis y eliminación celular. La doble canulación para no perder la referencia anatómica también redujo considerablemente problemas añadidos y la isquemia.
- Tras evaluar todo el proceso con tres especies, se pudo observar que el conejo ha respondido mejor, ya que su textura es más porosa y el tamaño de los vasos mayor. Por el contrario los de rata y ratón siendo más duros, conllevó un mayor esfuerzo de descelularizar con el método de cloruro de amonio, al quedarse en fase 4 pero con SDS finalmente eran uniformes
- Encontrándonos en el principio del proceso en conjunto, se manifiesta un interés en el desarrollo de algunas mejoras en el biorreactor. Se debería de aumentar el tamaño y capacidad de la cámara, y que permita una continuidad en el proceso descelularización-recelularización, que ayude a reducir su manipulación y a poder ser dispensable.
- Como conclusión final me gustaría destacar la apuesta a largo plazo que supone trabajar de forma interdisciplinar, ya que ha sido la base principal para sacar adelante el proyecto.



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer la confianza depositada en mí a la Dra. Pilar Martín Duque y al Dr. Jesús Martínez de la Fuente. Gracias, por su paciencia, por apostar en este proyecto y los del futuro, en los momentos buenos y malos.

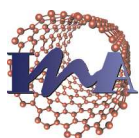
A toda la Unidad de Investigación Traslacional del I+CS en el Hospital Universitario Miguel Servet, que desde el principio de sus comienzos, me han ayudado a crecer, entender y comprender lo que se escapaba de mis manos mostrándome su apoyo y comprensión en todo momento, especialmente Javier Gervas.

A los miembros del Departamento de Cirugía del Hospital Clínico, Dr. Güemes, Dr. Juan Pablo M. Calahorrano, Dra. María Herrero y todos los demás residentes

Al grupo de Manolo Doblare, Iñaki Ochoa, Clara, Claudia, y a los componentes de Ebers Medical Technology

A toda mi familia que ha estado apoyándome incondicionalmente, sobre todo mis hermanos y en primer lugar, a mi madre María Jesús

Finalmente a los patrocinadores e instituciones de donde se ha realizado este trabajo, tanto I+CS, como los proyectos FIS [PI080750], DGA [PI041/08, B84, PI086/09], Fundación MMA [ICS/08/0050] y PIPAMER 0912.



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza





REFERENCIAS

1. Colter, D. C., et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 3213–3218, 2000.
2. Metcalfe AD, Ferguson MW. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(34):5100-13. Review.
3. Schulz RM, Bader A. Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes. *Eur Biophys J*. 2007 Apr;36(4-5):539-68. Review.
4. Atala A. Bioengineered tissues for urogenital repair in children. *Pediatr Res*. 2008 May;63(5):569-75.
5. Radisic M, Marsano A, Maidhof R, Wang Y, Vunjak-Novakovic G. Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems. *Nat Protoc*. 2008;3(4):719-38.
6. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, Milwid J, Kobayashi N, Tilles A, Berthiaume F, Hertl M, Nahmias Y, Yarmush ML, Uygun K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010 Jul;16(7):814-20.
7. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G, Rodriguez SR, Atala A, Soker S. *Hepatology*. 2011 Feb;53(2):604-17.