

Descelularización de un órgano completo, el hígado, para obtención de la matriz extracelular para posterior uso como andamio

Estefanía Barraza Flores (1), Birzabith Mendoza Novelo (2)

1 Programa Médico Cirujano, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez | Dirección de correo electrónico: al116348@alumnos.uacj.mx

2 Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad Guanajuato | Dirección de correo electrónico: bmnovelo@fisica.ugto.mx

Resumen

La investigación hoy en día apunta a nuevas alternativas para la terapéutica de trasplante de órganos, tal como el hígado. En este proyecto se busca el obtener la matriz extracelular (ECM) de este mediante el proceso de descclularización para su posterior uso como andamio para la repoblación celular *in vitro*. La descclularización del hígado obtenido de ratas Wistar se llevó a cabo mediante la combinación de detergentes (poli (óxido de etileno) octilfenileter/Triton X-100 y dodecil sulfato de sodio/SDS), enzimas (proteasas y nucelasas), así como el método de perfusión. La ECM obtenida se examinó mediante técnicas histológicas y bioquímicas. La ausencia de células y de material nuclear se validó microscópicamente por medio de la tinción de hematoxilina-eosina. La disminución en el contenido de DNA y glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) después de la descclularización se corroboró mediante espectrofotometría. Los métodos evaluados parecen ser apropiados para extraer la ECM de hígado.

Abstract

The research today point to new therapeutic alternatives for organ transplant, such as the liver. This study was aimed in the obtention of extracellular matrix (ECM) as result of the decellularization of liver. We tested the liver decellularization by the perfusion of different agents, such as detergents (poly(ethylene oxide) octyl phenyl ether/Triton X-100 and sodium dodecyl sulphate/SDS), enzymes (proteases and nucleases). The obtained ECM was analyzed by histological and biochemical techniques. The absence of cells and nuclear material was validated by hematoxylin-eosin staining on the decellularized liver tissue. In addition, the reduction in the content of DNA and GAGs was corroborated by spectrometry. The processing of liver seems to be adequate to obtain ECM

Palabras Clave

Hígado, descclularización, matriz extracelular, andamio, hepatocito.

INTRODUCCIÓN

El trasplante hepático es el principal tratamiento hoy en día para enfermedades hepáticas crónicas e irreversibles tales como la hepatitis, cirrosis, insuficiencia hepática, entre otras [1]. La demanda de un trasplante de órgano hoy en día es muy difícil de abastecer, la lista de espera es a veces mortal debido a la escases de donantes. En este caso se buscan nuevas alternativas para la terapéutica del hígado y cubrir las necesidades de hoy en día. Con el proceso de descelularización se busca extraer la matriz extracelular (ECM), buscando el preservar la composición de esta sin perder mucho de su estructura y composición bioquímica [1-3]. Ya obtenida la matriz extracelular es posible ver su funcionalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del Hígado

Para este protocolo, se utilizaron tres ratas Wistar hembra de 200gr, las ratas no presentaron alguna enfermedad o condición especial al momento de ser sacrificadas, la muerte de las ratas se llevó a cabo por medio de dislocación cervical, evitando así que algún fármaco o químico afectara en alguna medida el experimento.[4]

Cabe mencionar que la técnica quirúrgica se realizó bajo los parámetros y normas establecidas. Se les aplicó hepatectomía conservando su vascularización. Se les realizó una incisión media a lo largo del abdomen. Se extrajeron los órganos y se conectaron a un tubo de Tygon® a la vena porta de estas, para permitir la perfusión. Estas ratas fueron proporcionadas por el bioterio de la División de Ciencias de la Salud, Campus León de la Universidad de Guanajuato.

Proceso de descelularización

En la primera etapa, el hígado se sometió a un ciclo de congelamiento - descongelamiento. Posteriormente el hígado se sometió a dos diferentes procesos como se describe en la Tabla 1. Una vez completado el proceso de descelularización, el tejido fue congelado en PBS hasta su evaluación.

Evaluación de la composición del hígado descelularizado

Cuantificación de DNA

DNA de hígado nativo y descelularizado se purificó mediante el Wizard® Genomic DNA Purification Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA purificado se determinó mediante espectrofotometría a 260 nm y se reporta como la media de tres mediciones.

Cuantificación de Glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs)

Los GAGs se extrajeron mediante la digestión enzimática de los tejidos (papaína, PBS, pH 6.8, 60 a 100 mg de tejidos).

Tabla 1 En la siguiente tabla se muestra el proceso de descelularización del protocolo 1 y 2.

Proceso	Solución		Tiempo (hr)
	Protocolo 1	Protocolo 2	
Baño	Batan 0.02% y EDTA 0.05% en agua		4
Perfusión	Triton X-100 3% , EDTA 0.05% en PBS 1X (5-10ml/min)	Triton X-100 3% , EDTA 0.05%, CaO en 150ml de agua (5-10ml/min)	1
Perfusión	Triton X-100 3% , EDTA 0.05% en PBS 1X (5-10ml/min)	Triton X-100 3% , EDTA 0.05% y Sulfato de Amonio en 150ml de agua (5-10ml/min)	1
Perfusión	Triton X-100 3% , EDTA 0.05% en PBS 1X (5-10ml/min)		1
Baño	Batan 0.02% en DMEM		16
Baño	Batan 0.02% en DMEM		6
Perfusión	SDS 1% en agua		4
Perfusión	Triton X-100 3% , EDTA 0.05% en PBS 1X (5-10ml/min)	SDS 1% en agua	14
Lavado	Agua		1
Lavado	Agua		1
Lavado	PBS		1
Lavado	PBS		1

La cuantificación de GAGs se realizó por medio de espectrofotometría mediante el método del azul de dimetilmileno a 525 nm. La concentración de GAGs en mg/ml se obtuvo mediante una curva de calibración usando sulfato de condroitina, a una concentración de 10 a 50 mg/ml. Los resultados se reportan como la media de tres mediciones.

Tinción hematoxilina-Eosina

Aproximadamente un centímetro cúbico de cada una de las muestras fue fijado en formalina por 24 horas. Entonces las muestras fueron congeladas por dióxido de carbono (CO₂) y cortadas en el micrótopo a grosores de 5 µm. Posteriormente se colocaron en un porta objetos y se tiñeron los cortes con el método de hematoxilina-eosina (H&E), para su posterior análisis por microscopia óptica y la determinación de la presencia o no de núcleos y con ello comprobar la eficacia del proceso de descelularización.

Cultivo celular en hígado descelularizado

Primero se realizó la sanitización del tejido en etanol al 70% por 30 minutos. Posteriormente se realizó un lavado con PBS estéril para eliminar el etanol. Los fibroblastos se aislaron de piel de embrión de rata (cultivo primario) y se cultivaron en medio DMEM con 5% de suero fetal bovino y antibiótico de estreptomycin y penicilina (10 µl/ml). Posteriormente, las células se sembraron sobre la muestra y se cultivaron durante 24 h en las condiciones indicadas arriba. La viabilidad de los fibroblastos se determinó mediante en ensayo de MTT. Los resultados se reportan como la media de las absorbancias a 540 nm de cuatro mediciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer protocolo de descelularización arrojó los mejores resultados en términos de la eliminación de DNA. Este protocolo omite el proceso de perfusión con óxido de calcio y sulfato de amonio. Inicialmente estos agentes fueron propuestos para inducir un proceso de hinchamiento reversible, sin embargo, no resultó efectivo para mejorar el proceso de descelularización (Figura 1).

Contenido residual de DNA

Al realizar la cuantificación de DNA se observó claramente la diferencia entre ambas muestras, ya que el grupo control presentó conservación de DNA y el grupo descelularizado presentó concentraciones bajas, lo que indica una descelularización exitosa (Tabla 2).



Figura 1. A) Hígado (peso 20 gr, 6cm de ancho) antes del proceso de descelularización. B) Etapa de perfusión con Triton X-100, EDTA en PBS de acuerdo al Protocolo 1. C) Hígado descelularizado mediante el protocolo 2 donde se observa que solo un lóbulo se perfundió. D) Hígado descelularizado mediante el protocolo 1 donde se observa la efectiva perfusión de varios lóbulos.

Contenido residual de GAGs

La cuantificación de GAGs indicó una ligera disminución después de la descelularización de hígado con el protocolo 1 (Tabla 2). Los GAGs son una familia importante de polisacáridos cargados negativamente y lineales, presentes en los tejidos animales, que están unidos covalentemente a un núcleo de proteína en conjuntos macromoleculares conocidas como proteoglicanos (PGs). Por lo tanto, la función de los GAGs puede ser mantenida en la ECM obtenida de hígado.

Tabla 2 Concentración de GAGs y de DNA de hígado antes y después de la descelularización (protocolo 1).

Muestra de tejido	Concentración de GAGs (mg/ml)	Cuantificación de DNA (ng/mg)
Hígado descelularizado	53.3 ± 40.4	0.0100 ± 0.20
Hígado Control	67.2 ± 11.2	77.46 ± 9.00

Aspecto histológico

El análisis histológico mostró una mínima presencia de material nuclear en la ECM obtenida por el protocolo 1, como se muestra en la Figura 2A. En el tejido no descelularizado se notó la presencia de núcleos como puntos morados (Figura 2B).

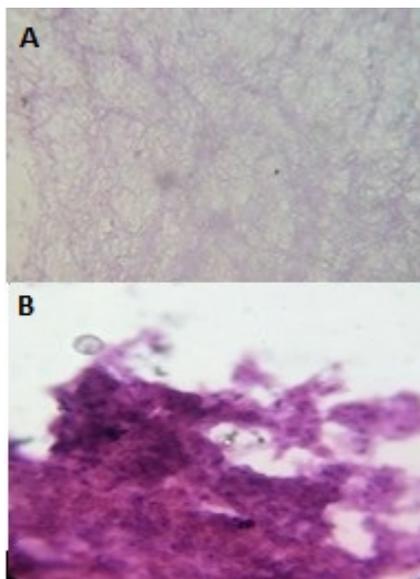


Figura 2. Tinción hematoxilina-Eosina (H&E) A) Tejido hepático descelularizado B) Tejido hepático control.

Cultivo Celular

La viabilidad celular en la ECM obtenida mediante el protocolo 1 fue similar a la viabilidad en tejido no descelularizado (Figura 3). En comparación con el cultivo control (libre de tejido), se obtuvo un mayor

porcentaje de crecimiento celular cuando se incluyen los tejidos.

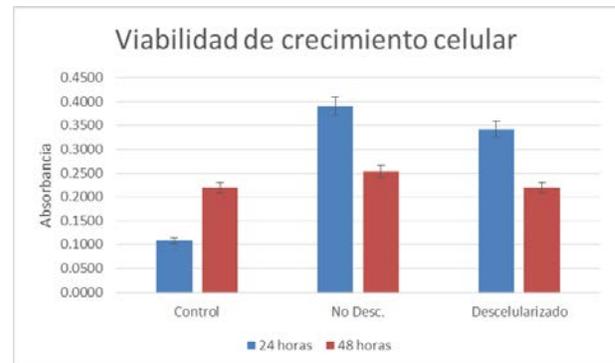


Figura 3. Viabilidad celular después de 24 (azul) y 48 (rojo) h de cultivo de fibroblastos sobre placa de poliestireno (control), y sobre la muestra descelularizada y no descelularizada.

Podemos ver que los resultados obtenidos después de realizar las diferentes pruebas son muy favorecedores. Después de probar dos métodos, se pudo encontrar que el proceso de hinchamiento reversible no favorece la descelularización de hígado. Como un comentario final, con este proyecto de verano se contribuyó en el desarrollo de biomateriales para brindar una nueva tecnología para el tratamiento de las enfermedades más demandantes de hoy en día.

CONCLUSIONES

Como resultado de en este trabajo de investigación se logró obtener una matriz desprovista de células con uso potencial para template para el cultivo celular. Basado en los resultados de este trabajo y coincidiendo con algunos autores, se considera que con la perfusión de soluciones que incluyan enzima proteolítica (como Batan), detergentes (como SDS y Triton X-100), un agente quelante (como EDTA), así como una etapa de congelación-descongelamiento, es posible lograr una descelularización aceptable en un hígado de alrededor de 20 g.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a todas las personas que participaron y ayudaron con la elaboración de esta investigación, a Luis Fernando Gómez C., a todo el personal del laboratorio de biomateriales, a la División de Ciencias e Ingenierías de la Universidad de Guanajuato por sus instalaciones y laboratorios, permitir la realización del proyecto y hacer esto posible.

REFERENCIAS

[1] Gustavo A. Nari, Mariana Cid, Romina Comín, Laura Reyna, Gustavo Juri, Ricardo Taborda y Nancy A. Salvatierra. "Preparación de una matriz extracelular tridimensional por descelularización de hígados de conejos." REV ESP ENFERM DIG (Madrid) Vol. 105. N.º 3, pp. 138-143, 2013

[2] Wei-Cheng Jiang a,b, Yu-Hao Cheng c, Meng-Hua Yen b, Yin Chang a, Vincent W. Yang e, Oscar K. Lee d, f,*."Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering." Biomaterials 35 (2014) 3607e3617

[3] Bühler NE1, Schulze-Osthoff K2, Königsrainer A3, Schenk M3. "Controlled processing of a full-sized porcine liver to a decellularized matrix in 24 h." J Biosci Bioeng. 2015 May;119(5):609-13. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.019. Epub 2014 Nov 21.

[4] Maria-Angeles Aller, Natalia Arias, Isabel Prieto, Salvador Agudo, Carlos Gilsanz, Laureano Lorente, Jorge-Luis Arias and Jaime Arias. "A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research" World J Hepatol 2012 July 27; 4(7): 199-208.

[5] Sáez Guillen C., Del Pilar Martín Duque P., Martínez de la Fuente J. "Funcionalización de matriz hepática para su recelularización en un bioreactor y su trasplante in vivo" Universidad de Zaragoza hospital universitario miguel Servet. Instituto aragonés de ciencias de la salud. Unidad de investigación trasnacional Zaragoza, junio 2011.