

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTIVIDAD DE DOS MÉTODOS PARA LA  
DESCELULARIZACIÓN DE ARTERIAS UMBILICALES**

Por:

**Alejandro Quiroga Garza**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN MEDICINA**

Enero, 2019

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTIVIDAD DE DOS MÉTODOS PARA LA  
DESCELULARIZACIÓN DE ARTERIAS UMBILICALES**

Por:

**Alejandro Quiroga Garza**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**DOCTOR EN MEDICINA**

Enero, 2019

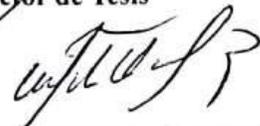
# EFFECTIVIDAD DE DOS MÉTODOS PARA LA DESCELULARIZACIÓN DE ARTERIAS UMBILICALES

Aprobación de tesis:



---

**Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña**  
Director de Tesis



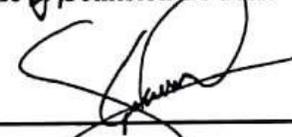
---

**Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**  
Co-Director de Tesis



---

**Dr. med. José Luis Vilchez Cavazos**  
Miembro de la Comisión de Tesis



---

**Dr. med. Santos Guzmán López**  
Miembro de la Comisión de Tesis



---

**Dr. C. Adolfo Saiz Domínguez**  
Miembro de la Comisión de Tesis

---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

# EFFECTIVIDAD DE DOS MÉTODOS PARA LA DESCELULARIZACIÓN DE ARTERIAS UMBILICALES

Por:

**Alejandro Quiroga Garza**

Este trabajo se realizó conjuntamente en los Departamentos de Anatomía Humana e Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) así como en el servicio de Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la misma institución. Bajo la dirección del **Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña** y la Co-Dirección del **Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna**

Firmas:



---

Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña  
Director de Tesis



---

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna  
Co-Director de Tesis

## **DEDICATORIA**

**A mis dos Margaritas, esposa e hija, quienes han sacrificado tiempo sin su esposo y padre, para permitirme sobresalir cada reto. Irma, tu amor y cariño son indispensables para mí. Todos mis esfuerzos y cada logro obtenido son siempre pensando en ti. Eres mi inspiración para mejorar cada día, el pilar y base que me mantiene alto y fuerte. Nada de esto sería posible, sin ti a mi lado. Mejor esposa no pude haber encontrado, ni soñado. ¡Te amo! Y mi pequeña y adorable Amanda, aun eres muy pequeña para entender, pero me has enseñado más de lo que puedas creer. Ser padre ha sido la bendición más grande de mi vida, pero ser un buen padre y ejemplo para ti, es mi mayor inspiración para cada acción, esfuerzo, y sacrificio que hago. Ustedes dos son mi razón de existir and ser.**

**A mi padre y madre: siempre les agradezco todo su amor, esfuerzo, y sacrificio. Ser padre y cabeza de familia me ha hecho entender todo lo que han hecho por mí. Me han educado y guiado por un camino que me convirtió en el hombre que soy hoy. Siempre han compartido mis sueños y anhelos para llegar a mis metas. Comparto todos mis logros de la vida con ustedes, pues sin ustedes, no hubiera llegado a donde estoy. I U both!**

**A mis hermanos: Rogelio, gracias por el apoyo en todo momento, por estar ahí cada vez que fue necesario en mis proyectos y aventuras. Por, detrás de cada conflicto y perdón, ser mi hermano mayor. Alberto, tu cariño como *baby brother* ha sido alentador y espero ser un buen ejemplo para ti. Recuerda que queremos siempre lo mejor para ti y que tu vida este llena de triunfos.**

**A papá Alfredo, mamá Marcela, y Vilmis, gracias por abrirme las puertas a la familia. Sé que me apoyan de igual manera como su hijo y celebran este logro con nosotros. Gracias por todo su apoyo incondicional, su amor y cariño.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Dr. Santos, usted me ha ayudado una y otra vez. Primero para entrar a la Facultad de Medicina, en Anatomía para participar con los proyectos, mi pasantía en investigación, y ahora como profesionista y especialista, me abre las puertas de su casa, Anatomía, incluyéndome en la familia que formamos ahí. Quedo eternamente endeudado con usted. Cada esfuerzo y logro, son gracias a usted y se los dedico. Espero seguir llenando las expectativas que tiene de mí, y cuente siempre conmigo para dedicarme a cuidar y fortalecer nuestra casa. Estoy siempre a sus órdenes.**

**Rodrigo, 16 años de conocernos. Fue una bendición que fuera yo alumno del grupo donde estabas y que notaras algo en mí, impulsándote a invitarme e incluirme en tus ideas y proyectos. Has sido un gran mentor en mi vida profesional y uno de mis más importantes ejemplos a seguir. Agradezco tu ejemplo, la confianza que has puesto en mí, pero, ante todo, tu amistad. Cuenta conmigo para los muchos proyectos y logros más que tendremos juntos, en este camino que recorreremos.**

**Dr. Montes de Oca, gracias por el apoyo de su departamento y todo el tiempo que me ha dedicado. Sus revisiones siempre fueron puntuales y efectivas para fortalecer el proyecto, los resultados, y las presentaciones. Se lo valioso que es su tiempo, y agradezco que, con todas sus ocupaciones, siempre tuviera tiempo para recibirme con una sonrisa y su personalidad siempre tan amable y servicial.**

**Vilchez, te agradezco el apoyo que has brindado a este proyecto en cada uno de sus pasos, pero aún más por las oportunidades que me has dado para mi crecimiento profesional. Gracias por esa confianza y espero siempre poderte servir y apoyar en tus proyectos al nivel que esperas de mí, y tener una larga carrera de trabajo juntos.**

**Adolfo, sin ti, no sabría que estoy viendo en el microscopio. Gracias por tu amistad todo este tiempo y gracias por tu apoyo para la ejecución de esos pasos elementales en el proyecto, ayudándonos a hacer sentido de todo, saber lo que ocupábamos para cumplir nuestros objetivos, y poderlo explicar. Gracias por sentarte conmigo y compartir tu tiempo y**

**conocimiento. Tus asesorías fueron cruciales para mí. Te deseo todo el éxito a ti y tu hermosa familia. Cuenta con mi apoyo en lo que ocupes.**

**Victor, gracias por todo tu apoyo en nuestro proyecto. Tu participación fue la base y fundamento de este trabajo. Sin ti, habiéramos tardado una eternidad. Eres una persona de inmenso valor y cualidades de gran admiración. Vienen grandes retos por sobre pasar en tu futuro, pero no dudo del éxito que tendrás ante ellos y del mismo que tendrás como profesionalista. Cuenta con mi apoyo en todo tu camino y espero el día que trabajemos juntos como especialistas.**

**Brenda, fuiste una gran estudiante, una pasante ejemplar que elevo el estándar, y sé que serás, indiscutiblemente, una maravillosa ginecóloga. Eres muy talentosa, tienes una gran ética de trabajo, eres servicial, con vocación a la docencia e investigación, y muchas otras cualidades muy admirables. La verdad que espero con gran expectativa trabajar de cerca contigo a futuro. Espero que sepas el cariño que te tengo y que puedes contar conmigo.**

**Memo y Pato, ambos son grandes amigos y hacen el ambiente y trabajo más divertido e interesante. Que suerte tener tan excelentes colegas de trabajo. Continuaremos trabajando juntos por mucho tiempo y lograremos muchos logros dentro y fuera de Anatomía, juntos en equipo. Gracias por su apoyo y amistad.**

**Abraham y Claudia, fueron excelentes pasantes de investigación y agradezco todo su apoyo, paciencia y enseñanza, pues fueron mis primeros verdaderos pasantes de investigación. Me alegra ver sus éxitos y avances y espero seguir trabajando con ustedes a futuro.**

**A todos los MPSS de investigación, coordinadores de subgrupos, e integrantes de GIA. Han sido una gran experiencia y me cuento afortunado de formar parte de este grupo. Espero ser un buen tutor para muchos de ustedes y presenciar los logros que obtienen de sus esfuerzos y sacrificios. ¡Gracias a todos por su esfuerzo y trabajo!**

**A mi familia y amigos, por alentarme a sobresalir y compartir mis logros con amor, cariño y orgullo.**

**A Dios, al final, pero es el más importante. Por todas las bendiciones que me has dado, para lo cual la palabra “gracias” queda corta para expresarlo. Gracias por guiarme en este camino. Gracias por darme una familia llena de amor y cariño que me dio todo lo que necesitaba para salir adelante. Gracias por bendecirme con la oportunidad de ser padre, por darme una hija sana y completa, y por este amor que siento por ella. Gracias por mi esposa quien me ha amado y apoyado incondicionalmente siempre. Gracias por la salud y trabajo que me das a mí, a mi familia, y mis seres queridos. Gracias por cuidarnos y protegernos. Pero también te doy gracias por todos los retos que me has puesto en mi camino, pues nunca fueron más de lo que pudiera, pero suficiente para forjarme y hacerme quien soy. Por todas las veces que me dijiste “no” para fortalecerme y buscar un camino mejor del que pensaba que era el correcto, pues nunca te has equivocado. Mis manos son tuyas, que junto con mis palabras sean la herramienta de tu voluntad. Guíame al tratar mis pacientes y me ayúdame a formar y guiar a nuevas generaciones por caminos que los convierta en grandes personas de corazón y servicio tuyo. Gracias Dios por todo tu amor.**

# TABLA DE CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Índice.....	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tablas.....	xiii
Resumen.....	1
<b>CAPÍTULO 1</b>	
MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Sistema cardiovascular.....	4
1.2 Enfermedades cardiovasculares.....	5
1.3 Procedimientos de revascularización.....	7
1.3.1 Vasos sanguíneos utilizados para revascularización .....	7
1.3.2 Injertos vasculares autólogos.....	10
1.4 Ingeniería tisular .....	12
1.4.1 Técnica de descelularización .....	12
1.4.2 Descelularización de vasos sanguíneos .....	13
1.5 Vasos del cordón umbilical .....	14
1.5.1 Arterias umbilicales .....	15
1.5.2 Vena umbilical .....	15
1.5.3 Obtención y almacenamiento de vasos umbilicales.....	16

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

2.1 Descelularización de vasos de diverso origen .....	20
2.2 Descelularización de arterias umbilicales .....	23
2.2.1 Remoción de células y material nuclear.....	23
2.2.2 Matriz extracelular .....	24
2.2.3 Perfil mecánico.....	25
2.3 Descelularización de venas umbilicales .....	26
2.3.1 Remoción de células y material nuclear .....	27
2.3.2 Matriz extracelular.....	29
2.3.3 Perfil mecánico.....	30

## **CAPÍTULO 3**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
---------------------------------	----

## **CAPÍTULO 4**

JUSTIFICACIÓN.....	35
--------------------	----

## **CAPÍTULO 5**

ORIGINALIDAD / CONTRIBUCIÓN.....	37
----------------------------------	----

## **CAPÍTULO 6**

HIPÓTESIS.....	39
----------------	----

## **CAPÍTULO 7**

OBJETIVOS.....	41
7.1 Objetivo General.....	41
7.2 Objetivos Específicos.....	41

## CAPÍTULO 8

MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
8.1 Tipo de estudio.....	44
8.2 Diseño del estudio.....	44
8.3 Consideraciones éticas.....	44
8.4 Características y criterios de la población.....	44
8.4.1 Criterios de Inclusión.....	45
8.4.2 Criterios de Exclusión.....	45
8.4.3 Criterios de Eliminación.....	45
8.5 Tamaño de la muestra .....	45
8.6 Lugar de referencia.....	45
8.7 Obtención de arterias umbilicales .....	46
8.8 Caracterización morfológica de los segmentos arteriales.....	48
8.8.1 Técnica histológica.....	48
8.8.2 Tinciones.....	51
a) Hematoxilina y eosina.....	51
b) Tricómico de Masson.....	52
c) Método de Verhoeff + Tricómico de Van Gieson.....	54
d) Tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS).....	55
e) Tinción de DAPI .....	56
f) Inmunohistoquímica para colágeno I y IV.....	57
g) Inmunohistoquímica para presencia de laminina.....	57
8.9 Descelularización de arterias umbilicales.....	57

8.10 Análisis morfológico.....	59
8.11 Evaluación morfométrica.....	60
8.12 Análisis estadístico.....	61
<b>CAPÍTULO 9</b>	
<b>RESULTADOS</b>	
9.1 Características morfológicas.....	63
9.2 Morfometrías .....	66
<b>CAPÍTULO 10</b>	
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>69</b>
<b>CAPÍTULO 11</b>	
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>CAPÍTULO 12</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 13</b>	
<b>RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

NUMERO	FIGURA	PÁGINA
1	Diferencias histológicas entre vena y arteria humana	5
2	Clasificación de los injertos vasculares	11
3	Histología normal del cordón umbilical	15
4	Cordón umbilical antes de la disección	46
5	Arterias umbilicales disecadas en toda su longitud	47
6	Separación de los segmentos arteriales en grupos	47
7	Pasos claves en el protocolo de descelularización	58
8	Medición del diámetro del vaso	60
9	Medición del grosor de la túnica media	61
10	Tinciones histológicas con microscopía de luz	64
11	Tinción DAPI con inmunofluorescencia	65
12	Inmunohistoquímica de colágeno y laminina	66

## ÍNDICE DE TABLAS

NUMERO	TABLA	PÁGINA
1	Diferentes agentes utilizados para descelularizar venas umbilicales	27
2	Morfometría de las arterias umbilicales en grupos control y descelularización	67

## **RESUMEN**

**Alumno:** Alejandro Quiroga Garza (Candidato para el grado de Doctor en Medicina)

**Fecha de Graduación:** Enero 2019

**Título del Estudio:** Efectividad de dos métodos para la descelularización de arterias umbilicales

**Número de Páginas:** 93

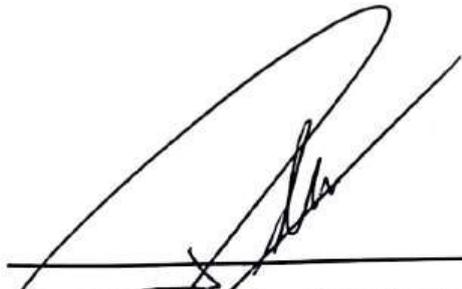
**Área de Estudio:** Morfología

**Propósito y Método del Estudio:** La descelularización de las arterias umbilicales puede proporcionar una solución a la necesidad de injerto vasculares de pequeño calibre. Comparamos la efectividad entre los métodos SDS y Triton X-100. Se utilizó cordones umbilicales obtenidos a partir de embarazos a término con evolución normal y sin complicaciones evidentes del recién nacido, se micro-diseccionaron en 12 horas y se almacenaron en solución salina con fosfato sin congelación. Las arterias se procesaron para la descelularización usando los protocolos de SDS al 0.1% y 1%, y Triton X-100 al 1%. Se realizó la evaluación de material celular y nuclear, fibras de colágeno, fibras elásticas y glucosaminoglicanos de la matriz extracelular (MEC), así como el análisis morfométrico de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

**Resultados:** La descelularización con Tritón X-100 fue ineficaz, conservando restos nucleares identificados por inmunofluorescencia, y causó daño más notable a las fibras

elásticas y la disminución del colágeno. Con SDS se eliminaron efectivamente los núcleos y tuvo una disminución menor en las fibras elásticas y el colágeno. La laminina fue preservada en todos los grupos. No se identificaron diferencias significativas en los diámetros lumbinales de los vasos umbilicales; sin embargo, la capa media disminuyó debido a la descelularización de las células musculares.

**Conclusiones:** La descelularización con SDS al 0.1% fue la más efectiva para eliminar células y preservar los principales componentes de la MEC.



---

Dr. C. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña  
Director de Tesis



---

Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna  
Co-Director de Tesis

# **CAPÍTULO 1**

## **MARCO TEÓRICO**

1.1 Sistema cardiovascular

1.2 Enfermedades cardiovasculares

1.3 Procedimientos de revascularización

1.3.1 Vasos sanguíneos utilizados para revascularización

1.3.2 Injertos autólogos

1.4 Ingeniería tisular

1.4.1 Técnica de descelularización

1.4.2 Descelularización de vasos sanguíneos

1.5 Vasos del cordón umbilical

1.5.1 Arterias umbilical

1.5.2 Vena umbilical

1.5.3 Obtención y almacenamiento de vasos umbilicales

# CAPÍTULO 1

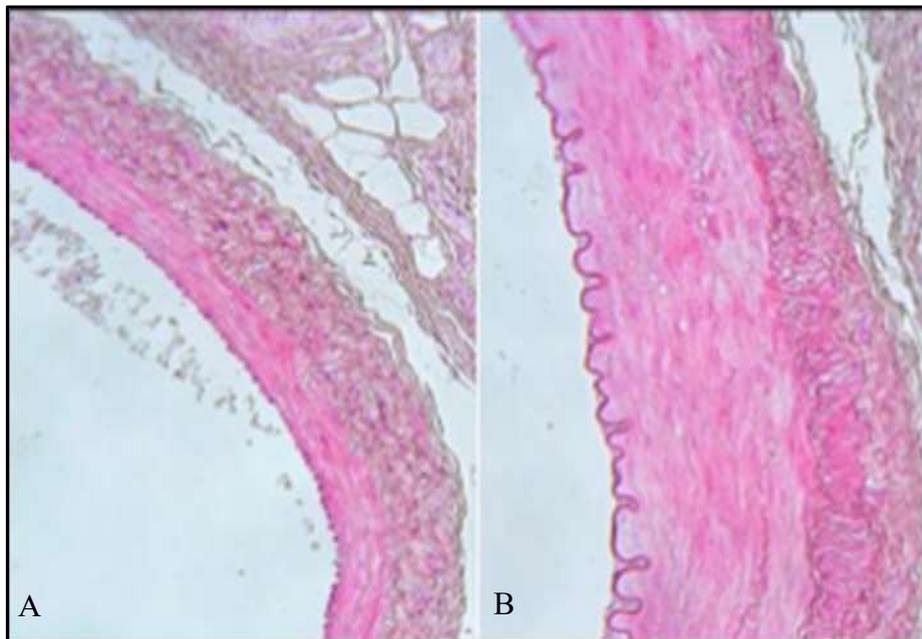
## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Sistema cardiovascular.

El sistema cardiovascular está formado por el corazón, el cual es un órgano que bombea la sangre por medio de una serie de vasos eferentes (arterias), que se vuelven cada vez más pequeños conforme se ramifican. Las arterias conducen la sangre con nutrientes y oxígeno hacia una compleja red de pequeños túbulos que se anastomosan profusamente (capilares) y, a través de sus paredes, ocurre el intercambio de la sangre con los tejidos. Asimismo, los capilares convergen en un sistema de canales dando lugar a las venas, estas se vuelven más grandes conforme se aproximan al corazón; las venas conducen la sangre desoxigenada y escasa de nutrientes de regreso al corazón y de aquí a los pulmones donde se oxigena, posteriormente regresa al corazón y es bombeada nuevamente al resto del cuerpo (Junqueira 2005).

La mayoría de los vasos sanguíneos presentan características similares entre sí, aunque también poseen características que los hacen diferentes y permiten clasificarlos en grupos identificables. Los vasos sanguíneos, en general, poseen tres capas o tunicas: íntima, media y adventicia. La túnica íntima, situada en el plano más profundo del vaso sanguíneo, está formada por una capa de células endoteliales (epitelio plano simple) y tejido conectivo subendotelial (tejido conectivo laxo). En un plano intermedio está situada la túnica media, formada por células de músculo liso orientadas de manera concéntrica alrededor de la luz vascular, así como tejido conectivo fibroelástico, aunque estos componentes pueden variar en cantidad según el tipo de vaso sanguíneo.

En el plano más superficial, la túnica adventicia es una capa compuesta principalmente de tejido fibroelástico dispuesto de manera longitudinal con presencia de fibroblastos (Gartner, 2002). Las características de la túnica media se utilizan como criterios para clasificar a las arterias en elásticas o musculares, así como para distinguir los conductos venosos (Figura 1). Si bien la función de los vasos sanguíneos es conducir la sangre, los diferentes tipos de conductos ejecutan funciones un poco diferentes e importantes a las cuales está adaptada particularmente su estructura.



**Figura 1. Diferencias histológicas entre una vena (A) y arteria (B) humana.** La principal característica que las distingue es la composición de la capa muscular.

## **1.2 Enfermedades Cardiovasculares.**

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte a nivel mundial y se proyecta que mantendrán esta posición para el año 2030, ocupando el primer puesto las enfermedades isquémicas del corazón (Mathers *et al.*, 2006; WHO, 2014)

Las enfermedades cardiovasculares son un grupo de enfermedades del corazón y los vasos sanguíneos, producidas en la mayor parte de los casos por disminución en el calibre de la luz de los vasos sanguíneos, lo que produce eventos de isquemia. En un evento isquémico ocurre una disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo en una zona del organismo, con la consecuente disminución del aporte de oxígeno, nutrientes y eliminación de productos del metabolismo de esa región, produciendo estrés celular, que puede ser suficientemente intenso como para causar apoptosis o necrosis (Cotran,1995).

La fisiopatología subyacente suele ser consecuencia de aterosclerosis, que se caracteriza por ser un proceso dinámico en el que se desarrollan lesiones focales y asimétricas, que consisten en aglomeraciones de células, elementos del tejido conectivo, lípidos y detritos celulares (Mozaffarian *et al.*, 2016) Las modificaciones ateroscleróticas en los vasos comienzan en la túnica íntima, y se caracterizan por la presencia de engrosamientos o placas originadas por la proliferación de células musculares lisas, acumulación de lípidos en estas células y en macrófagos, con fibrosis a consecuencia del depósito de fibras de colágeno (Geneser, 2000).

Las manifestaciones clínicas de las enfermedades cardiovasculares y la determinación del tratamiento a utilizar, dependen del sitio donde se produce la isquemia, y por consiguiente el grado de obstrucción circulatoria. De manera general, en casos que existen estrechamientos de la luz vascular que no limitan la circulación sanguínea de forma crítica se pueden utilizar terapias farmacológicas y cambios en el estilo de vida. Si la obstrucción limita significativamente la circulación, existe en múltiples áreas o

bloquea por completo la circulación se utilizan procedimientos quirúrgicos de revascularización.

### **1.3 Procedimientos de revascularización.**

Los procedimientos quirúrgicos de revascularización que existen incluyen angioplastias, colocación de stents, colocación de prótesis vasculares y cirugía de bypass que es empleada en el tratamiento de la insuficiencia coronaria y arterial periférica, así como en pacientes con pérdida extensa de tejido (Rienstra, 2008; Campeau, 1983; Cooper, 1996). Según cifras de la American Heart Association, el número total de pacientes internados a los que se les realizó operaciones cardiovasculares y procedimientos intervencionistas aumentó un 28% de 2000 a 2010 (Gutiérrez *et al.*, 2013)

El objetivo de la cirugía de revascularización, es proveer un conducto que al ser injertado en otra parte del sistema vascular, pueda ser una vía adecuada para la irrigación de los tejidos isquémicos circundantes. Este procedimiento implica la anastomosis de un segmento arterial proximal a la región isquémica con un segmento arterial distal a ésta (Aguirre-Rivero R, 2003).

#### **1.3.1 Vasos sanguíneos utilizados para revascularización**

Los conductos vasculares más utilizados en la cirugía de revascularización son, en orden de importancia: arteria torácica interna, vena safena interna (Pistavos, 2002), arteria radial (Pola, 1996), arteria gastroepiloica derecha (Mills, 1989), arteria cubital (Riekkinen, 2003) y en menor proporción la arteria esplénica (Mueller, 1973) y la

epigástrica inferior (Riekkinen, 2003; Elizondo-Omaña, 2005; Hinojosa-Amaya, 2010).

Se ha reportado que la arteria torácica interna tiene una permeabilidad del 90 al 95 % a los 15 años después de realizada la cirugía. Se utiliza cuando la coronaria afectada es la arteria descendente anterior. La arteria torácica interna izquierda se utiliza más que la derecha, la cual tiene una permeabilidad del 80 al 90 % a los 10 años y se utiliza cuando hay afectación de la arteria marginal (Swartz, 1995). Actualmente, la arteria torácica interna es la primera opción para la revascularización miocárdica (Dallan, 2001).

La vena safena interna también se presenta como una opción para las cirugías de revascularización miocárdica ya que tiene suficiente longitud, diámetro y está libre de ateroma (O'Donnell, 1999), además de ser adaptable y fácil de manejar (González-Santos, 2005).

La arteria radial se usa como injerto al afectarse la arteria descendente posterior. En las cirugías de revascularización, donde se utiliza este conducto como injerto, el 86 % de los pacientes se encuentran libres de angina a los 5 años. Acar *et al.* reportaron que el índice de permeabilidad de la arteria radial a un año fue del 92 %, aparentemente más elevado que para los injertos venosos bajo las mismas condiciones (Acar, 1998). La arteria radial es una alternativa al injerto de vena safena para revascularización, puesto que posee altos índices de permeabilidad y mejor corriente de flujo (Dumanian, 1998).

Se ha reportado el uso de la arteria gastroepiploica derecha para revascularizar la arteria marginal posterior y a la coronaria derecha (Lytle, 1989; Pym, 1987). Mills *et al.* reportaron que la permeabilidad de esta arteria a los 13 meses de realizada la cirugía de revascularización era del 97 %; a los 5 años la tasa de supervivencia era del 92.9%. Esta arteria se utiliza cuando los demás conductos vasculares no son suficientes (Mills, 1989). El uso de la arteria cubital como injerto no es muy común debido a una convicción en la anatomía clásica que ha establecido a esta arteria como dominante del antebrazo, por lo que su extracción podría afectar la funcionalidad de la mano (Buxton, 1998). Sin embargo, un estudio realizado por Hinojosa-Amaya *et al.*, en 2005 afirma que la arteria cubital no es dominante en el antebrazo, por lo que podría ser usada en cirugías de revascularización (Hinojosa-Amaya, 2005).

La arteria esplénica se ha utilizado con injerto *in situ* para la arteria coronaria derecha, sin embargo, el uso de este conducto no es común debido a las dificultades técnicas para su extracción, así como una longitud y diámetro inadecuados (Mueller, 1973).

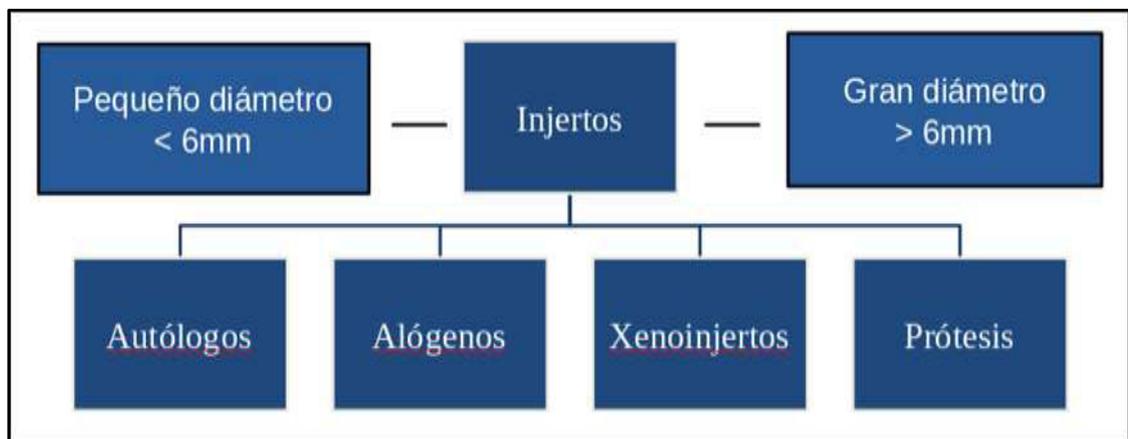
A pesar del uso abundante de los injertos arteriales, los conductos venosos autólogos siguen siendo una opción importante y conveniente para las cirugías de revascularización, debido a la facilidad en la obtención de estos segmentos, así como a la abundante circulación colateral que presenta el sistema venoso (Jiang, 2004; Petrofsky, 2004). Sin embargo, estos conductos suelen presentar complicaciones a mediano y largo plazo. Después del primer año de realizada la cirugía de revascularización, del 12 al 20% de los injertos están ocluidos. Entre 5 a 7 años posteriores a la cirugía, se han ocluido entre 25 y 35% de estos injertos. Y hacia los 10 años después de la cirugía, más del 50% de los injertos están ocluidos (Cooper, 1996).

### **1.3.2 Injertos vasculares autólogos**

Los injertos vasculares autólogos son los más utilizados en cirugías de revascularización, estos consisten en injertar un conducto vascular del mismo paciente en una región o zona isquémica de su organismo. Así mismo, estos injertos se pueden sub-clasificar en arteriales o venosos. Las características ideales de estos conductos son que tengan una larga permeabilidad y que puedan perfundir adecuadamente los tejidos isquémicos. Sin embargo, existen múltiples factores que intervienen en la elección de un conducto vascular. Estos factores pueden estar relacionados al paciente, como su sobrevivencia, edad, condiciones clínicas o disponibilidad de los conductos vasculares. Las características de los conductos que influyen en su elección son su disponibilidad, localización anatómica, predisposición a cambios histopatológicos (trombosis, hiperplasia de la íntima, ateromas). La complejidad de la cirugía o la experiencia del cirujano también pueden influir en la elección del conducto vascular (Elizondo-Omaña, 2008).

A la fecha, los injertos autólogos se mantienen como la mejor opción cuando se requiere un injerto vascular. Sin embargo, en ocasiones no es posible utilizarlos debido a que los vasos no son adecuados para usarse a causa de enfermedad vascular, amputación o ya fueron utilizados previamente. Existen prótesis vasculares compuestas de materiales sintéticos que pueden ser utilizadas con éxito para restituir el flujo sanguíneo en vasos de gran calibre, como la aorta. Sin embargo, no se ha logrado utilizar estas prótesis de manera satisfactoria en casos de vasos de menos de 6mm de diámetro (Martínez-González *et al.*, 2015; Zdrahala, 1996)

Los injertos vasculares pueden ser clasificados según su procedencia en injertos autólogos cuando provienen del mismo paciente, injertos alógenos cuando se obtienen de un individuo distinto al receptor, Xenoinjertos cuando se obtienen de otras especies animales, y prótesis vasculares cuando están construidas a partir de materiales sintéticos como el tetrafluoroetileno extendido (ePTFE) o el Dacron (L'Heureux *et al.*, 2007) Así mismo, según su diámetro se dividen en injertos de gran calibre si su diámetro luminal es mayor de 6mm, y de pequeño calibre si su diámetro es menor a 6mm (Figura 2).



**Figura 2. Clasificación de los injertos vasculares.** Los injertos se clasifican de acuerdo a la especie de origen y al diámetro luminal.

Se han propuesto cuales son los criterios que debe cumplir el injerto vascular ideal (Gui, Muto *et al.*, 2009; Naito *et al.*, 2011; Schaner *et al.*, 2004; Zilla *et al.*, 2007) Debe ser compatible inmunológicamente con el receptor, resistente a la infección, no trombogénico y debe inducir una respuesta adecuada de adaptación que logre integrarlo al cuerpo para que se vuelva indistinguible de un vaso nativo. Además, debe poseer las propiedades biomecánicas adecuadas, debe ser permeable al agua y solutos y debe ser fácil de manejar y suturar.

## **1.4 Ingeniería Tisular**

La ingeniería tisular es una rama de la ciencia que constituye un conjunto de conocimientos, técnicas y métodos de base biotecnológica que permiten diseñar y generar en el laboratorio sustitutos tisulares, tejidos artificiales o constructos de origen heterólogo o autólogo a partir de células madre y biomateriales.

Su aplicación en el área cardiovascular ofrece un enfoque revolucionario que busca satisfacer la demanda de injertos vasculares. Existen 5 acercamientos principales que se utilizan para desarrollar injertos vasculares: (I) prótesis sintéticas revestidas de células endoteliales, (II) Análogos de vasos sanguíneos basados en colágeno, (III) conductos a base de polímeros sintéticos biodegradables, (IV) vasos sanguíneos auto-ensamblables, y (V) injertos vasculares descelularizados (Roy *et al.*, 2005) Los vasos sanguíneos descelularizados mantienen su estructura tridimensional y tienen inmunogenicidad reducida. Sus propiedades biomecánicas son superiores a los materiales sintéticos, con mejor funcionalidad y adaptación (Gui *et al.*, 2009; Roy *et al.*, 2005; Schaner *et al.*, 2004) Debido a estas ventajas que presentan, ha existido un aumento en el uso de este método para intentar desarrollar injertos vasculares de pequeño diámetro.

### **1.4.1 Técnica de Descelularización.**

La técnica de descelularización consiste el uso de diferentes sustancias y procesos para eliminar el material celular y nuclear del vaso sanguíneo sin causar daños en la matriz extracelular (MEC) (Gilbert *et al.*, 2006) La MEC es fundamental para la adhesión, migración y proliferación celular, así como en las respuestas adaptativas del tejido

(Stephen F. Badylak, Freytes, & Gilbert, 2009) Tiene el potencial de servir como andamio para desarrollar un injerto vascular. Existen diferentes técnicas de descelularización que involucran procesos físicos (Bader *et al.*, 1998; Dahl *et al.*, 2003; McFetridge *et al.*, 2004), biológicos (Freytes *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2004) y químicos.(Badylak *et al.*, 1998; Rieder *et al.*, 2004; Vyavahare *et al.*, 1997; Woods & Gratzner, 2005) Es común que se utilicen combinaciones de los mismos. Las técnicas físicas incluyen ciclos de congelado/descongelado, agitación y presión mecánica. No suelen ser suficientes por sí mismos, pero facilitan la ruptura de la membrana celular. Las técnicas biológicas (*e.g.* enzimas) y químicas (*e.g.* detergentes) dañan la membrana celular y rompen los enlaces intra y extracelulares. (Gilbert *et al.*, 2006) La técnica ideal depende del tipo de tejido y la especie de origen.(Crapo *et al.*, 2011)

Órganos y tejidos descelularizados han sido utilizados exitosamente en una variedad de aplicaciones de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. (Badylak *et al.*, 2009)

Todo lo anteriormente expuesto, justifica la creencia de que los vasos sanguíneos descelularizados pueden ser una fuente para desarrollar injertos vasculares de pequeño diámetro.

#### **1.4.2 Descelularización de vasos sanguíneos**

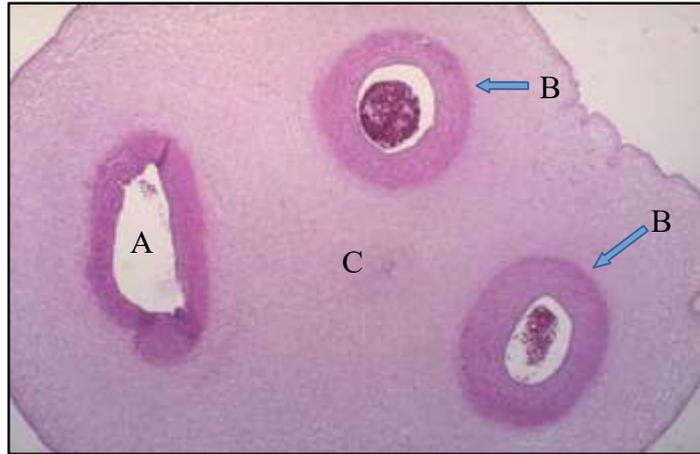
Existe evidencia de la descelularización de diversas arterias y venas. Sin embargo, no hay acuerdo respecto a la mejor técnica de descelularización para vasos sanguíneos. Debido a esto en la mayoría de los estudios no se justifica la elección de la técnica de descelularización ni del vaso sanguíneo elegido para probarla. Además, muchos

estudios son realizados en vasos sanguíneos de otras especies animales, como cerdos, conejos y perros. La información obtenida en estos estudios si bien es útil, puede llevar a interpretaciones erróneas que no son aplicables en la práctica clínica debido a que los vasos humanos pueden diferir en su reacción al proceso de descelularización. (Zilla *et al.*, 2007)

### **1.5 Vasos del cordón umbilical**

En la actualidad, los vasos umbilicales tienen gran potencial para desarrollo de injertos vasculares. El cordón umbilical tiene dos arterias que discurren en paralelo y una vena. Los vasos se encuentran rodeados de una matriz rica en proteoglicanos conocida como gelatina de Wharton (Figura 3). La longitud del cordón umbilical aumenta conforme aumenta la edad gestacional para ser al final de la gestación de entre 55 a 60 cm. Patologías y complicaciones de la gestación pueden afectar la longitud y morfología del cordón umbilical. Los vasos umbilicales no emiten ramas en su trayectoria. (Naeye, 1985) Estas características representan ventajas para desarrollar injertos vasculares a partir de ellos.

Además, son fáciles de obtener, tienen un diámetro adecuado para ser utilizados como injertos de pequeño diámetro y no presentan ramificaciones. (Gui *et al.*, 2009; Hoenicka *et al.*, 2007; Vázquez-Blanco *et al.*, 2011)



**Figura 3. Histología normal del cordón umbilical.** Vena umbilical (A) y arterias umbilicales (B), gelatina de Wharton (C).

### 1.5.1 Arterias umbilicales

Las arterias umbilicales tienen un lumen/luz irregular y se observa colapsada en cortes transversales. No cuentan con lámina elástica interna ni externa claramente definidas. En su túnica media se observan dos capas de células musculares lisas, una en sentido longitudinal y otra circunferencial. (Vázquez-Blanco *et al.*, 2011)

Durante el período fetal forma parte del sistema circulatorio umbilical entre la madre y el hijo, y se encargan del transporte de la sangre desoxigenada desde el feto hacia la madre. Después del nacimiento se interrumpe la circulación umbilical y la arteria correspondiente se transforma en un cordón fibroso.

### 1.5.2 Vena umbilical

Las venas umbilicales tienen un lumen/luz con forma circular o triangular. Este se mantiene permeable en cortes transversales. La túnica íntima es más delgada al compararla con las arterias umbilicales. Se pueden distinguir segmentos de la lámina elástica interna de manera irregular. La túnica media presenta dos o tres capas de

células musculares con mucopolisacáridos entre ellas. No tienen una clara organización celular en sentido longitudinal o circunferencial, a diferencia de las arterias umbilicales. Su función en el período fetal es del transporte de sangre oxigenada desde la madre al producto.

### **1.5.3 Obtención y almacenamiento de vasos umbilicales**

Durante el proceso de disección se puede alterar el grosor de la pared vascular y por tanto las propiedades biomecánicas del vaso. Se han descrito dos formas de obtención de los vasos sanguíneos: disección manual y automatizada. La principal diferencia entre ambas es que la disección automatizada mantiene el grosor uniforme de la pared vascular, lo que no afecta su comportamiento biomecánico. (Rodríguez, *et al.*, 2012) Por lo tanto, la disección automatizada es un método que ayuda a mantener las características morfológicas y biomecánicas.

Otra variable importante es el almacenamiento de las arterias. Es común congelarlas para conservarlas o para procesarlas posteriormente. Sin embargo, este proceso puede alterar la morfología de las arterias. Tuan-Mu *et al.* (2014) realizaron un estudio comparativo en el que determinaron los efectos de la congelación. (Tuan-Mu *et al.*, 2014) Se evaluó la congelación en arterias umbilicales “frescas” vs arterias que se descelularizaron posteriormente con SDS al 1%. Encontraron que la congelación reduce la cantidad de los glucosaminoglucanos y crea poros en el vaso. Además, el perfil mecánico se deteriora. Sumado a esto, la descelularización se vuelve menos eficiente. No se consiguió eliminar a las células por completo en estos casos. También se potenció el daño a la matriz extracelular y a la biomecánica. Hacen falta más estudios de este tipo.

Sería relevante analizar agentes crioprotectores, ya que no se encontró en la literatura algún estudio donde se evaluará su uso en vasos umbilicales. Sin embargo, está reportado que las arterias femorales humanas criopreservadas tienen un desempeño biomecánico que no difiere significativamente con el de las arterias no congeladas. (Lomas *et al.*, 2013) La evidencia existente sugiere utilizar andamios que tengan un grosor de pared uniforme y no congelar las arterias previo a la descelularización.

De la misma manera que con las arterias umbilicales, las venas umbilicales pueden ser obtenidas por disección manual o automatizada. La disección automatizada es preferida por muchos autores ya que se obtienen venas con morfología adecuada y perfil biomecánico superior. (Daniel *et al.*, 2005; Goktas *et al.*, 2014) Sin embargo para realizar la disección automatizada, es necesario congelar la vena umbilical. El proceso de congelación puede alterar el perfil mecánico y la respuesta a estímulos farmacológicos. (Hoenicka *et al.*, 2007) Hacen falta más estudios que analicen los efectos de la congelación.

Otra variable estudiada es la manera de aplicar las soluciones para descelularizar. Están descritas dos formas: la manera clásica y sistemas de perfusión. La manera clásica consiste en mezclar la solución de descelularización con los segmentos venosos y dejar en agitación. Con el sistema de perfusión, en cambio, las soluciones se hacen circular constantemente a través de las venas. Montoya *et al.* (2009) encontraron que un sistema de perfusión es más eficiente para remover células y se obtienen venas con perfil mecánico superior, comparado con la manera clásica. También está reportado que la capacidad de adhesión y división celular es significativamente mejor. (Tosun *et*

*al.*, 2011) Sin embargo, con el sistema de perfusión puede dañarse la membrana basal. Por otro lado, con el método clásico se conserva más lisa y regular.

La evidencia existente sugiere utilizar un sistema de perfusión para aplicar las soluciones de descelularización. Sin embargo, deben de descartarse alteraciones en la membrana basal.

## **CAPÍTULO 2**

### **ANTECEDENTES**

2.1 Descelularización de vasos de diverso origen

2.2 Descelularización de arterias umbilicales

2.2.1 Remoción de células y material nuclear

2.2.2 Matriz extracelular

2.2.3 Perfil mecánico

2.3 Descelularización de venas umbilicales

2.3.1 Remoción de células y material nuclear

2.3.2 Matriz extracelular

2.3.3 Perfil mecánico

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 Descelularización de vasos de diverso origen.

Rosenberg *et al.* fueron los primeros en proponer el uso de una matriz extracelular desprovista de material celular como un injerto vascular. (Rosenberg *et al.*, 1966) En sus estudios utilizaron arterias carótidas bovinas tratadas con digestión enzimática. Se probó y estandarizó la técnica en modelos animales y posteriormente se utilizó en un ensayo clínico en humanos. Se probó en 17 pacientes con enfermedad arterial periférica avanzada donde se utilizaron como bypass ilíacos y femoropoplíteos. Se encontró que 2 injertos fallaron de manera inmediata, otros dos fallaron a los 2 meses y medio y a los 7 meses, respectivamente. 8 injertos más fueron seguidos por 28 meses y uno falló.

Schaner *et al.* evaluaron la técnica de descelularización en venas safenas mayores humanas con un protocolo de sodio dodecilsulfato (SDS). (Schaner *et al.*, 2004) Su objetivo fue analizar si era posible utilizar las venas descelularizadas como un andamio vascular. Se evaluaron el colágeno, la elastina, la presión de ruptura y el soporte de la sutura. Se desarrolló un modelo canino *in vivo* donde se descelularizó la vena yugular del animal y se implanto como un injerto carotídeo de interposición. Se comprobó que el protocolo de descelularización fue eficaz para remover los componentes celulares y nucleares. La matriz extracelular conservó su estructura tridimensional. El colágeno permaneció sin cambios y la elastina presentó una disminución significativa. No existieron diferencias significativas en la presión de ruptura ni en la fuerza de la sutura.

El modelo canino se siguió por dos semanas mostrándose permeabilidad del injerto sin presencia de dilatación, complicaciones aneurismáticas ni ruptura.

En otro estudio, se utilizó un protocolo de sodio dodecilsulfato (SDS) para descelularizar arterias femorales humanas. (Wilshaw *et al.*, 2012) Se evaluó la morfología de la pared, se cuantificó la celularidad, presencia de colágeno y elastina y se realizaron estudios de citotoxicidad. Se analizaron además la biomecánica de los vasos. Se demostró que el protocolo fue efectivo para remover el material celular y contenido nuclear, respetando los componentes de la matriz extracelular con excepción del colágeno IV. Los resultados de los experimentos de citotoxicidad demostraron que los vasos descelularizados no provocan toxicidad. En los estudios biomecánicos no se encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados.

Se sabe que muchos de los genes que codifican componentes de la MEC como los colágenos y las lamininas se originaron muy temprano en la evolución del reino animal y se han conservado a través de las especies. (Hynes, 2012). Esto genera la posibilidad de utilizar injertos descelularizados obtenidos de otras especies (xenoinjertos). Se han estudiado las propiedades histológicas y biomecánicas de los xenoinjertos descelularizados.

Sylvain *et al.* analizaron la presión de ruptura, compliancia, propiedades elásticas, grosor de la pared arterial, diámetro transversal de la arteria, e histología de arterias carótidas porcinas izquierdas, descelularizadas con un protocolo a base de Tritón X100 y sodio dodecilsulfato. (Sylvain *et al.*, 2011) Se encontró que tras el protocolo de descelularización las arterias sufrieron una disminución en su grosor y su diámetro

transversal, la presión máxima antes de la ruptura disminuyó, la compliancia sufrió cambios en su comportamiento y existieron cambios en las propiedades elásticas. Los autores concluyen que a pesar de los cambios demostrados las arterias descelularizadas muestran ventajas biomecánicas en materia de compliancia comparadas con las prótesis vasculares, además de mostrar presiones de rupturas equiparables con los vasos creados *de novo*.

Xiong *et al.* analizaron el efecto de la descelularización y posterior recelularización de arterias safenas de cerdos en un modelo *in vivo* en conejos. (Xiong *et al.*, 2013) En su estudio se utilizó un protocolo de descelularización que utilizó Triton X-100/NH<sub>4</sub>OH y suero humano. Posteriormente se recelularizaron las arterias con células endoteliales de la arteria pulmonar del cerdo. Se analizó la composición bioquímica y la biomecánica de las arterias. Se encontró que el protocolo de descelularización que utilizaron efectivamente removió todo el material celular y nuclear; el colágeno se conservó sin cambios significativos y la elastina disminuyó. La presión de ruptura disminuyó pero aún mantuvo un margen 10 veces superior al de las presiones fisiológicas. En las propiedades biomecánicas se encontró que la compliancia cambió su comportamiento normal. Tras la recelularización, se observó que las células endoteliales formaron una mono-capa en la porción luminal del injerto. El índice de patencia a 1 y 3 meses fue de 60% y 50%, respectivamente. El fallo de los injertos fue causado por trombosis en los sitios distales de sutura, sin observarse datos de hiperplasia de la íntima o disminución de la luz del injerto.

## **2.2 Descelularización de arterias umbilicales**

Las arterias umbilicales se han estudiado en el pasado con fines de reconstrucción microvascular. (Hwa-Shain, Keller, Brackett, Frank, & Tew, 1984) Recientemente se ha estudiado la posibilidad de utilizar arterias umbilicales humanas descelularizadas como injertos vasculares.

Los detergentes sodio dodecilsulfato (SDS) y 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), son los dos agentes más utilizados para descelularizar arterias umbilicales.

### **2.2.1 Remoción de células y material nuclear**

Esta reportado que el SDS al 1% es eficaz para descelularizar arterias umbilicales. (Rodriguez *et al.*, 2012; Tuan-Mu *et al.*, 2014) Por otro lado, Gui *et al.*, encontraron que al utilizar de forma conjunta SDS + CHAPS persiste material celular. (Gui *et al.*, 2009) Al agregar a esta técnica medio de crecimiento de células endoteliales (EGM-2) se eliminó por completo el material celular. El efecto del EGM-2 es producido por nucleasas que contiene y que potencian la descelularización. (Gui *et al.*, 2010) En un estudio similar donde se utilizó SDS + CHAPS se consiguió la descelularización completa.(Mallis *et al.*, 2014) Sin embargo, en su técnica de descelularización incluyen suero bovino fetal, el que gracias a su contenido de nucleasas pudiera contribuir en la misma medida que el EGM-2.

Por lo tanto, el SDS logra descelularizar arterias umbilicales humanas. Las nucleasas ayudan a eliminar completamente el material nuclear y es recomendable incluirlas.

### 2.2.2 Matriz extracelular

Los principales componentes estudiados en la MEC de un vaso descelularizado son el colágeno y la elastina. Estos pueden ser alterados por el agente elegido para la técnica de descelularización. El SDS al 1% puede alterar la estructura y cantidad de fibras de colágeno. (Tuan-Mu *et al.*, 2014) Sin embargo, está reportado que la combinación de SDS + CHAPS no afecta al colágeno tipo I [36] ni al tipo IV. (Gui *et al.*, 2009) No se encontró más información con respecto a subtipos de colágeno en la literatura evaluada. Sin embargo, Wilshaw *et al.* (Wilshaw *et al.*, 2012) encontraron pérdidas del colágeno tipo IV al descelularizar con SDS arterias femorales humanas.

De la misma forma se ha encontrado disminución de la elastina al descelularizar con SDS + CHAPS. (Gui *et al.*, 2009) Sin embargo, Mallis *et al.*, señalan que se conserva al utilizar un protocolo de descelularización similar. (Mallis *et al.*, 2014) En ningún caso se evaluó cuantitativamente/objetivamente este componente y no puede establecerse la magnitud del daño.

La descelularización de arterias umbilicales con SDS afecta al colágeno. Hacen falta más estudios para definir la magnitud del daño en la estructura y cantidad de los diferentes subtipos de colágeno. Las diferencias que se reportan entre los estudios pueden deberse a la concentración del agente utilizado para descelularizar, el tiempo de exposición al mismo o a diferencias intrínsecas del vaso sanguíneo. Respecto a la elastina, no existe suficiente información para asegurar su integridad tras la descelularización.

### 2.2.3 Perfil mecánico

Las capacidades biomecánicas son una característica fundamental de los vasos descelularizados. Está descrito que las arterias umbilicales descelularizadas tienen un comportamiento mecánico similar a las arterias frescas. (Gui *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2012) También hay reportes de alteraciones significativas en las curvas de tensión-deformación y compliancia. (Tuan-Mu *et al.*, 2014) Estos cambios son en parte causados por la falta de las células musculares. Se cree que también pueden deberse a daño de proteínas de la MEC como la elastina y el colágeno.

En las pruebas de presión máxima de ruptura los resultados reportados son variados. La presión normal a la que están expuestas las arterias umbilicales *in vivo* es de cerca de 70 mmHg. Esto es importante porque al utilizarlas como injertos en presiones distintas pudiera encontrarse alterado su desempeño. (Stehbens, *et al.*, 2005) Gui *et al.*, no identificaron diferencias significativas entre arterias frescas vs descelularizadas. Se encontró una presión máxima de ruptura de  $969.66 \pm 154.42$  mmHg en las arterias frescas y de  $840.37 \pm 114.67$  mmHg en las arterias descelularizadas. (Gui *et al.*, 2009) Maritza *et al.* reportan hallazgos similares (Rodriguez *et al.*, 2012) Por otro lado, Tuan-mu *et al.*, señalan que si existen diferencias significativas en la presión de ruptura al descelularizar las arterias con SDS. (Tuan-Mu *et al.*, 2014) Aun así, las arterias descelularizadas soportaron presiones más elevadas que la presión fisiológica normal.

La compliancia fue encontrada sin cambios significativos en el estudio de Gui *et al.* (Gui *et al.*, 2009) Por otro lado, Tuan-mu *et al.*, reportan resultados contrarios. (Tuan-Mu *et al.*, 2014) El grosor de la pared arterial es un factor determinante en la

compliance, con valores que disminuyen conforme es mayor el grosor de la pared arterial. (Rodríguez *et al.*, 2012)

En modelos animales, se encontró que la arterial umbilical descelularizada cambia su diámetro luminal de 1.5 mm inicialmente a 4.5 mm al ser implantada. (Gui *et al.*, 2009) Esto se asoció con una incidencia alta de trombosis en el sitio de anastomosis proximal. El aumento en el diámetro puede deberse a la diferencia de presión respecto a la que normalmente está expuesta la arteria. Esta diferencia de presiones puede condicionar un cambio de flujo que desencadene la trombosis.

La evidencia existente indica que las arterias descelularizadas son capaces de soportar presiones fisiológicas con un amplio margen de seguridad. Esto permitiría, en principio, utilizarlas en la práctica clínica. Sin embargo, existen reportes de alteraciones en la compliance y cambios en el diámetro con remodelación del vaso. Hacen falta estudios donde se evalúen estos parámetros.

### **2.3 Descelularización de venas umbilicales**

Las venas umbilicales humanas han sido estudiadas extensamente como alternativas para procedimientos de revascularización. (Johnson & Lee, 2000; Klinkert *et al.*, 2004; Neufang *et al.*, 2007) Diversas técnicas de descelularización han sido probadas en las venas umbilicales, entre los que destacan los que utilizan soluciones hipertónicas, los detergentes SDS y Tritón, y solventes como el Etanol (Tabla 1 ).

**Tabla 1.** Diferentes agentes utilizados para descelularizar venas umbilicales.

<b>Autor</b>	<b>Agente</b>	<b>Concentración</b>	<b>Efectividad</b>
Goktas <i>et al.</i> , 2013	NaCl	2M por 24h	✓
Mangold <i>et al.</i> , 2012	NaCl	3M por 2h	X
Uzarski <i>et al.</i> , 2012	SDS	1% por 24h	✓
Van de Walle <i>et al.</i> , 2015	SDS	1% por 24h	✓
Goktas <i>et al.</i> , 2013	Tritón X-100	1% por 24h	✓
Uzarski <i>et al.</i> , 2012	Tritón X-100	1% por 24h	✓
Mangold <i>et al.</i> , 2012	Tritón X-100 + SDS + IGEPAL-CA630	0.05%* por 48h	X
Mangold <i>et al.</i> , 2012	Etanol	4% <sup>+</sup>	X
Uzarski <i>et al.</i> , 2012	Etanol + H <sub>2</sub> O + acetona	60:20:20 <sup>s</sup> por 24h	✓
Mangold <i>et al.</i> , 2012	Etanol + H <sub>2</sub> O + acetona	60:20:20 <sup>s</sup> por 24h	✓
Van de Walle <i>et al.</i> , 2015	Etanol + H <sub>2</sub> O + acetona	60:20:20 <sup>s</sup> por 24h	✓
Daniel <i>et al.</i> , 2015	SDS + Etanol	1%, 75%	X

El símbolo ✓ indica que la técnica fue efectiva para remover el material celular y nuclear. La X indica que la técnica no fue efectiva. NaCl: Cloruro de sodio; SDS: sodio dodecilsulfato; IGEPAL: octylphenoxy polyethoxy ethanol; H<sub>2</sub>O: agua desionizada. 2M: concentración 2 molar; 3M: concentración 3 molar. \* La concentración de cada uno de los detergentes fue de 0.05%. <sup>+</sup> No se especificó el tiempo. <sup>s</sup> Relación de la solución: 60% etanol, 20% agua desionizada y 20% acetona.

### 2.3.1 Remoción de células y material nuclear

Está reportado que con soluciones de cloruro de sodio (NaCl) hipertónicas es posible lograr la descelularización. El tiempo que se aplica y la concentración de la solución de NaCl varían entre los estudios. Es importante considerar estos factores ya que determinan la efectividad de la descelularización.

Otro método que ha sido probado es el que incluye detergentes como el SDS y el tritón X-100. El detergente SDS es eficiente para remover el material celular. (Uzarski *et al.*, 2013; Van de Walle *et al.*, 2015) Daniel *et al.*, (2005) también utilizaron un protocolo con SDS al 1%, pero agregaron en el proceso etanol al 75%. Reportan que con este método aún se aprecian residuos celulares. En estudios que utilizan el detergente tritón X-100 a concentración del 1 % se encontró que este detergente es eficiente para remover células y material nuclear. (Goktas *et al.*, 2014; Uzarski *et al.*, 2013) También se han probado métodos en los que se combinan distintos detergentes.(Mangold *et al.*, 2015) Con la combinación de detergentes no fue posible eliminar por completo las células.

Por otro lado, se ha intentado descelularizar con etanol como único agente. (Mangold *et al.*, 2015) Este método no es suficiente ya que se observan restos celulares remanentes. Al agregar acetona al protocolo se alcanzó la descelularización completa. Otros métodos, como la deshidratación con gas (Hoenicka *et al.*, 2013) han sido probados. Es una alternativa viable para eliminar la capa endotelial, pero no elimina las células del resto de la pared vascular.

Por lo anterior se concluye que de acuerdo a la evidencia analizada los métodos que utilizan detergentes son los más efectivos y con los que se cuenta con mayor experiencia.

### 2.3.2 Matriz extracelular

Mangold *et al.* reportan que el tratamiento con soluciones hipertónicas no produce cambios significativos en la MEC. (Mangold *et al.*, 2015) Sin embargo, al agregar nucleasas al proceso, se encontró una alteración importante de colágeno, elastina, laminina y fibronectina. En otro estudio (Uzarski *et al.*, 2013) encontraron que las soluciones hipertónicas provocan disrupciones en la membrana basal de 5 a 10 micrómetros de ancho. Por otro lado, Goktas *et al.*, no reportan alteraciones al utilizar la misma solución. (Goktas *et al.*, 2014) Sin embargo, encontraron que estas soluciones remueven GAGs de forma importante.

Con respecto a los detergentes, hay reportes controversiales. Un estudio encontró que el detergente SDS no provoca daños significativos en la membrana basal. (Mangold *et al.*, 2015) En cambio, otros autores reportan que el tratamiento con este detergente produce disrupciones parciales en la membrana basal.

El detergente tritón X-100 es agresivo con la membrana basal, produciendo disrupciones de la misma. (Uzarski *et al.*, 2013) Además, es el agente con mayor capacidad para remover GAGs y fosfolípidos. (Goktas *et al.*, 2014)

Si se combinan detergentes es mayor el daño a los componentes de la MEC. Mangold *et al.*, encontraron que al combinar SDS con Tritón e IGEPAL-CA630, se afecta de manera importante el colágeno, elastina, laminina y fibronectina. (Mangold *et al.*, 2015)

Por otro lado, la descelularización con etanol al 4% afecta en menor medida los componentes de la MEC. (Hoenicka *et al.*, 2013) Sin embargo, no queda claro si existe daño significativo.

Hacen falta estudios que analicen de manera específica el colágeno I, IV, y elastina. La evidencia indica que el tritón X-100 es más agresivo que el resto de los agentes y no es recomendable hacer combinaciones de detergentes. Las soluciones hiperosmolares pueden producir disrupciones en la membrana basal. No es claro el efecto producido por los solventes.

### **2.3.3 Perfil mecánico**

El método de disección y el agente utilizado para la descelularización pueden alterar el perfil mecánico de las venas umbilicales.

Daniels *et al.* (Goktas *et al.*, 2014), encontraron que las venas disecadas de forma automatizada soportan mayor presión antes de la ruptura que aquellas disecadas manualmente ( $1,082 \pm 113.4$  mmHg vs.  $699.2 \pm 399.1$  mmHg,  $p = 0.001$ ) y tienen mejor retención de sutura ( $2.03 \pm 0.13$  N vs  $1.68 \pm 0.52$  N).(Daniel *et al.*, 2005) Sin embargo, la presión máxima de ruptura disminuyó al descelularizar las venas. Por otro lado, no alteró negativamente la compliancia, ni la retención de la sutura.

La fuerza de las venas y su elasticidad varían dependiendo del agente utilizado. La “ultimate failure force” de las venas umbilicales reportada es de  $2.39 \pm 0.42$  N. La descelularización con solución hipertónica o con solventes no altera significativamente

este parámetro. Sin embargo, cuando se utilizan los detergentes se observa un aumento significativo. (Mangold *et al.*, 2015)

Dentro del rango fisiológico (80 - 120 mmHg), el módulo elástico de las venas descelularizadas es menor que el de las venas fijadas con glutaraldehído (SDS  $210 \pm 6$  kPa vs. Glu  $240 \pm 12$  kPa;  $p < .001$  and  $p = 0.033$  respectivamente). Los segmentos decelularizados con SDS alcanzan valores significativamente mayores que aquellos tratados con etanol + acetona. (Van de Walle *et al.*, 2015)

Por otro lado, si sólo se remueve el endotelio mediante deshidratación por gas o con soluciones hipotónicas no se afecta la fuerza tensil. (Hoenicka *et al.*, 2013) Esto es posible que sea debido a que el resto de células permanecen en el vaso.

## **CAPÍTULO 3**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

## **CAPÍTULO 3**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existe una necesidad de injertos vasculares de pequeño diámetro. Las enfermedades cardiovasculares son un grave problema de salud pública que genera altos costos y la revascularización es el procedimiento invasivo que más se realiza asociado a estas enfermedades.

Los injertos autólogos se mantienen como la mejor opción, pero en ocasiones no es posible utilizarlos. Además, su uso implica un aumento de morbilidad y eleva el tiempo y costo de hospitalización.

La técnica de descelularización es una opción para proporcionar injertos vasculares de pequeño diámetro. Sin embargo, no existe consenso sobre cual método de descelularización es más eficaz para vasos sanguíneos humanos.

## **CAPÍTULO 4**

### **JUSTIFICACIÓN**

## **CAPÍTULO 4**

### **JUSTIFICACIÓN**

La creación de vasos sanguíneos por ingeniería tisular representa una alternativa para solucionar la necesidad de injertos vasculares.

La técnica de descelularización es un método eficaz para obtener conductos vasculares que pueden ser utilizados posteriormente como injertos. Sin embargo, no es claro cuál protocolo es el mejor para arterias umbilicales.

En nuestra Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” existe un Banco de Huesos y Tejidos, lo que facilitaría la obtención, conservación y distribución de injertos vasculares y genera la posibilidad de proporcionar el material para su implementación en la práctica clínica.

## **CAPÍTULO 5**

### **ORIGINALIDAD**

## **CAPITULO 5**

### **ORIGINALIDAD**

Se utilizaron las arterias umbilicales para determinar el mejor método de descelularización de vasos de pequeño calibre. Estas arterias son un recurso poco explorado y de fácil disponibilidad por ser considerado un tejido de desecho.

Además, existe información limitada sobre los efectos de la descelularización en estos vasos.

No hay un estudio que utilice los dos protocolos con los que se cuenta con mayor experiencia en la literatura, que son los detergentes sodio dodecilsulfato (SDS) y Tritón X-100. Nosotros comparamos las dos técnicas utilizando las concentraciones de 0.1% y 1% para el SDS y de 1% para el Tritón con el fin de determinar cuál técnica es la más óptima para descelularizar arterias umbilicales humanas.

## **CAPÍTULO 6**

### **HIPÓTESIS**

## **CAPÍTULO 6**

### **HIPÓTESIS**

1.- El protocolo de descelularización con SDS tendrá mayor efectividad que el de Tritón X-100 en eliminar el material celular de arterias humanas de pequeño calibre.

2.-La matriz extracelular de arterias humanas de pequeño diámetro sufrirá menos daños con el protocolo de descelularización de SDS en comparación con el protocolo de Tritón X-100.

# **CAPÍTULO 7**

## **OBJETIVOS**

7.1 Objetivo general

7.2 Objetivos específicos

# **CAPÍTULO 7**

## **OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo general**

Analizar la efectividad de dos métodos de descelularización para arterias umbilicales.

### **7.2 Objetivos específicos**

- a) Obtener muestras de arterias umbilicales.
- b) Evaluar las características morfológicas de las arterias umbilicales.
- c) Demostrar el efecto de la descelularización de las arterias umbilicales mediante los protocolos de sodio dodecilsulfato (SDS) y Tritón X-100.
- d) Evaluar y comparar las características morfológicas de los conductos vasculares descelularizados.

# CAPÍTULO 8

## MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Tipo de estudio

8.2 Diseño de estudio

8.3 Consideraciones éticas

8.4 Características y criterios de la población

8.4.1 Criterios de inclusión

8.4.2 Criterios de exclusión

8.4.3 Criterios de eliminación

8.5 Tamaño de la muestra

8.6 Lugar de referencia

8.7 Obtención de arterias umbilicales

8.8 Caracterización morfológica de los segmentos arteriales

8.8.1 Técnica histológica

8.8.2 Tinciones

a) Hematoxilina y Eosina

b) Tricrómico de Masson

c) Método de Verhoeff + Tricrómico de Van Gieson

d) Tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

e) Tinción de DAPI

f) Inmunohistoquímica para colágeno I y IV

g) Inmunohistoquímica para presencia de laminina

8.9 Descelularización de arterias umbilicales

8.10 Análisis morfológico

8.11 Evaluación morfométrica

8.12 Análisis estadístico

## **CAPÍTULO 8**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **8.1 Tipo de estudio**

Experimental

#### **8.2 Diseño de estudio**

Transversal y comparativo

#### **8.3 Consideraciones éticas**

El protocolo de investigación fue sometido y aprobado por el comité de ética e investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” con la clave de aprobación AH15-006.

Los cordones umbilicales fueron obtenidos de forma anónima y no se recolectó ningún tipo de información de la paciente o el producto.

#### **8.4 Características y criterios de la población**

Se disecaron 14 arterias umbilicales obtenidas de 7 cordones umbilicales obtenidos del servicio de obstetricia del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González. Se utilizó técnica de microdissección manual llevada a cabo en el laboratorio de anatomía macroscópica del Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la UANL.

#### **8.4.1 Criterios de inclusión**

Se incluyeron arterias umbilicales procedentes de cordones umbilicales de embarazos normoevolutivos, sin complicación alguna en la madre o el producto durante la gestación o el parto y con una edad gestacional de término (37-42 semanas de gestación contadas desde la fecha de última menstruación).

#### **8.4.2 Criterios de exclusión**

Se excluyeron los cordones umbilicales si se encontraba alguna alteración estructural en la placenta o cordón umbilical o si requería estudio patológico adicional de la pieza.

#### **8.4.3 Criterios de eliminación**

Se eliminaron las arterias que se lesionaron durante el proceso de disección del cordón umbilical o cuando se cometiera algún error en el procesamiento de descélularización o de técnica histológica.

#### **8.5 Tamaño de la muestra**

Se obtuvieron 14 arterias umbilicales. El método de muestreo fue por conveniencia.

#### **8.6 Lugar de referencia**

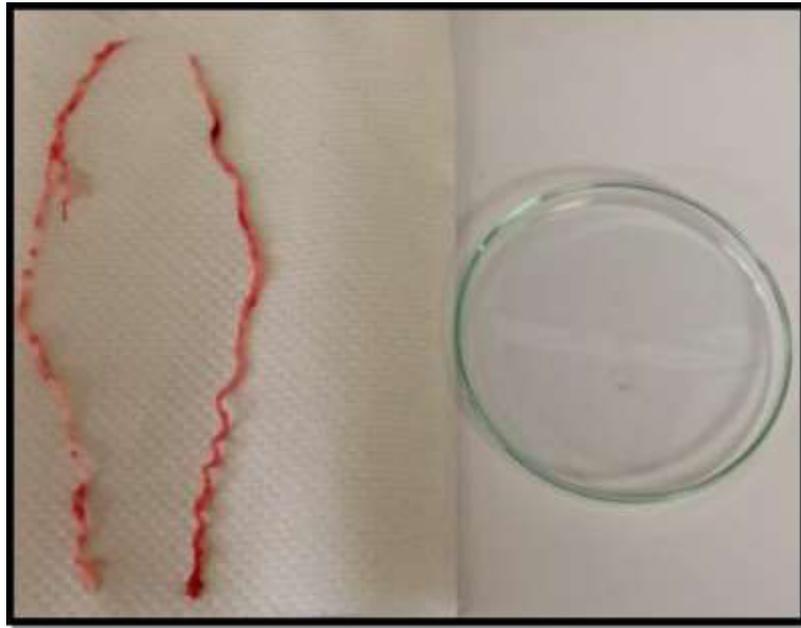
El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Anatomía Macroscópica (LAM) “Dr. med. Ramiro Montemayor Martínez” del Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en conjunto con el Laboratorio de Histología y el Servicio de Obstetricia del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de la misma institución educativa.

### 8.7 Obtención de arterias umbilicales

Los cordones umbilicales fueron obtenidos en el servicio de Obstetricia del Hospital Dr. José Eleuterio González de la Facultad de Medicina de la UANL y transportados de inmediato al Laboratorio de Anatomía Macroscópica para ser procesados sin exceder 24 horas en almacenamiento. Se utilizó técnica de disección manual para remover la gelatina de Wharton que rodea a las arterias y éstas fueron separadas de la vena umbilical y obtenidas en toda su longitud (20 a 30 cm). Una vez separadas, las arterias se dividían en 4 segmentos de aproximadamente 5 centímetros y luego se almacenaron tres de ellos en PBS (pH 7.4) a 4° centígrados para procesamiento posterior y el segmento restante fue almacenado en paraformaldehído (PFH) al 4% para ser utilizado como grupo control (Figuras 4, 5 y 6).



**Figura 4. Cordón umbilical antes de la disección.** Se visualiza un cordón umbilical integro para su disección sobre un disco Petri de vidrio.



**Figura 5. Arterias umbilicales disecadas en toda su longitud.** Se visualizan 2 arterias umbilicales, con su patrón tortuoso posterior a retirar la gelatina de Wharton.



**Figura 6. Separación de los segmentos arteriales en grupos.** Las arterias son seccionadas y colocados en tubos Eppendorf para su almacenamiento y procesamiento.

## **8.8 Caracterización morfológica de los segmentos arteriales**

### **8.8.1 Técnica histológica**

Fijación. Este proceso implica la detención de los procesos de autólisis que se llevan a cabo mediante las enzimas hidrolíticas del tejido obtenido durante la toma de la muestra, además de detener la autólisis. El fijador utilizado es uno de los más comunes, el formaldehído, el cual se utiliza en diluciones variadas y en combinación con otras sustancias químicas y amortiguadores. Este preserva la estructura general de la célula y de los componentes extracelulares al reaccionar con los grupos amino de las proteínas (con mucha frecuencia forma enlaces cruzados entre residuos de lisina, arginina e histidina). Tiene la ventaja de no alterar significativamente la estructura tridimensional de las proteínas, por lo que estas conservan su capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos, esta propiedad es vital para las tinciones de inmunohistoquímica, este compuesto es un mal fijador de membranas, debido a que no reacciona con los lípidos.

Inclusión. Se utiliza un centro de inclusión. Una vez fijado el tejido, adquiere cierta consistencia, pero no la necesaria para efectuar cortes de 5-10 micras de espesor, por lo que es necesario una infiltración con un medio que provea cierta dureza ante el filo de una navaja. Estos medios son conocidos como medios de inclusión, y tienen la propiedad de incorporarse e infiltrarse al interior de las células y tejidos con la finalidad de servirles de soporte.

Se realiza un proceso de deshidratación, por el cual se elimina toda el agua junto con el medio fijador utilizado. Este paso es vital para que el medio de inclusión actúe de

forma adecuada y alcance la dureza requerida. Para esto, se utilizan líquidos deshidratadores en los cuales se sumergen las muestras. Debido a que utilizamos parafina como medio de inclusión, las muestras se deben deshidratar en baños sucesivos de concentraciones crecientes de alcohol etílico. Para nuestras muestras, los siguientes pasos deben realizarse:

- 1.- Alcohol etílico al 70%    12 horas
- 2.- Alcohol etílico al 70%    12 horas
- 3.- Alcohol etílico al 95%    1 hora
- 4.- Alcohol etílico al 95%    1 hora
- 5.- Alcohol etílico al 100%   1 hora
- 6.- Alcohol etílico al 100%   1 hora

Después de que las muestras se hayan deshidratado completamente, continúa la aclaración, por el cual cambia el alcohol por un medio donde sea soluble la parafina y que su vez sea soluble en alcohol. Se utiliza el xilol por su accesibilidad y seguridad, sumergiendo las muestras por un periodo de 2 horas.

Para la inclusión se utiliza la parafina (hidrocarburos saturados provenientes de la destilación de petróleo) la cual es sólida a temperatura ambiente y hierve a los 300° C, emitiendo vapores inflamables. La penetración de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando está en su estado líquido, que se obtiene manteniendo la parafina en una estufa de inclusión con temperatura 2 - 4° C por encima de temperatura ambiente. La parafina se coloca en 3 recipientes y se pasan los tejidos por estos para asegurar una infiltración óptima. Para nuestras muestras, se recomiendan los siguientes tiempos:

- 1.- Primer baño de parafina 1 – 1.5 horas
- 2.- Segundo baño de parafina 1 – 1.5 horas
- 3.- Tercer baño de parafina 1 – 1.5 horas

La formación de bloques se efectúa empleando moldes (metálicos o de plástico) en el cual se coloca la muestra de tejido, orientada correctamente para facilitar la obtención de los cortes. El molde se llena con parafina cliente y utilizando una pinza se orienta el tejido dentro del molde, mientras la parafina empieza a solidificarse. Los moldes son enfriados en una plancha de congelación para formar bloques de parafina listo para su uso.

Microtomía. El proceso de microtomía se lleva a cabo utilizando un micrótopo para obtener cortes de 4-10 micras del bloque de parafina con el tejido. Esto permite que observar los tejidos mediante microscopia una vez que se aplique la técnica deseada para el estudio de los tejidos. El micrótopo tiene varios sistemas para asegurar y controlar la posición del bloque de tejido, asegurar y controlar la navaja, control del movimiento de la pieza con la navaja para asegurar el grosor y uniformidad deseada del corte. El micrótopo utilizado es tipo Minot, el cual mediante una manivela circular (volante), desplaza de arriba hacia abajo y viceversa el bloque de parafina frente al filo de la navaja.

Los cortes del bloque de parafina son levantadas y desplegadas en un baño de flotación a 37° C, del cual se recogen con una laminilla silanizada para su montaje y posterior coloración.

## 8.8.2 Tinciones

### a) Hematoxilina y Eosina.

La tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE) es la comúnmente usada en tinciones histológicas. Su popularidad se basa en su simplicidad comparativa y capacidad de demostrar claramente un enorme número y arreglo de diferentes estructuras de tejidos, dándole una alta capacidad de contraste entre los componentes nucleares y citoplasmáticos.

El procedimiento para la tinción de HyE es el siguiente:

- 1.- Desparafinar los cortes en la estufa por 15-20 min
- 2.- Re-hidratar los cortes mediante la siguiente:
  - 2.1.- Xilol 5 min
  - 2.2.- Etanol-Xilol 5 min
  - 2.3.- Etanol Absoluto 2 min
  - 2.4.- Etanol al 96% 2 min
  - 2.5.- Agua Destilada en enjuague lento
- 3.- Colocar los cortes en la Hematoxilina por 2 min
- 4.- Realizar 2 lavados de enjuague lento con agua de la llave
- 5.- Hacer 1 inmersión rápida en el alcohol ácido
- 6.- Realizar 2 lavados de enjuague lento con agua de la llave
- 7.- Proceder a hacer 2 inmersiones rápidas en el agua amoniacal
- 8.- Lavar los cortes en un enjuague lento con agua de la llave
- 9.- Posteriormente, lavarlos con agua destilada
- 10.- Realizar 6 inmersiones de los cortes en la Eosina
- 11.- Deshidratar los cortes de la siguiente manera:

11.1.- Etanol 96%	1 min
11.2.- Etanol 96%	2 min
11.3.- Etanol Absoluto	2 min
11.4.- Etanol Absoluto	2 min
11.5.- Etanol-Xilol	3 min
11.6.- Xilol Puro	2 min
11.7.- Xilol	3 min

12.- Montaje en resina sintética o entallan.

La hematoxilina tiñe de azul-negro-violeta el núcleo mostrando buenos detalles intranucleares mientras que la eosina tiñe el citoplasma celular y tejido conectivo en varias tonalidades de rosa, rojo y naranja.

**b) Tricrómico de Masson.**

La tinción de Tricrómico de Masson se utiliza para identificar y diferenciar las fibras que conforman el tejido conjuntivo, principalmente las de colágeno, y permite diferenciarlas de las fibras musculares en algunos tumores o también es posible detectar crecimiento fibrótico en parénquima, dando el lugar a una patología.

El procedimiento para la tinción de Tricrómico de Masson es el siguiente:

- 1.- Desparafinar en horno 56-60° C por 20min
- 2.- Hidratar los cortes de la siguiente manera:
  - 2.1.- Xilol 5 min
  - 2.2.- Xilol-Etanol 5 min
  - 2.3.- Etanol absoluto 2 min

- 2.4.- Etanol 96%                      2 min
- 2.5.- Agua Destilada                      1 min
- 3.- Colocar cortes en Fijador Bouin por 30-60min en horno 56° C o toda la noche a temperatura ambiente
- 4.- Lavar con agua corriente hasta que no libere color amarillo
- 5.- Lavar con agua destilada
- 6.- Pasar a solución de Hematoxilina férrica de Weigert durante 10min. (es un colorante aniónico)
- 7.- Lavar con agua corriente, haciendo 3 cambios de 15 segundos
- 8.- Enjuagar con agua destilada
- 9.- Teñir con la solución Fucsina-Escarlata de Biebrich por 1 min (es un colorante aniónico)
- 10.- Lavar con agua destilada las veces que sea necesario hasta que deje de desteñirse
- 11.- Observar al microscopio la intensidad de coloración. Volver a repetir pasos 9 y 10 si es necesario
- 12.- Colocar en solución de Ácidos Fosfomolibdico-Fosfotúngstico durante 10 min (solución aniónica, actúa como mordiente y diferenciador)
- 13.- Enjuagar con agua destilada
- 14.- Teñir con azul de Anilina por 1 min
- 15.- Lavar con agua destilada las veces que sea necesario hasta que deje de desteñirse.
- 16.- Observar al microscopio la intensidad de coloración. Volver a repetir pasos 14 y 15 si es necesario, o desde el paso 12 si no hay suficiente color
- 17.- Colocar los cortes en solución Ácido Acético al 1% por 2 min

18.- Deshidratar los cortes como sigue:

18.1.- Alcohol al 96%	3 seg
18.2.- Alcohol Absoluto	1-2 min
18.3.- Etanol-Xilol	2 min
18.4.- Xilol	3 min

19.- Montar con resina sintética o entellán

Los núcleos se tiñen de color morado oscuro. El citoplasma y las fibras musculares de un color rojo, mientras que las fibras de colágeno de color azul.

### **c) Método de Verhoeff + Tricrómico de Van Gieson**

La tinción de Verhoeff-Van Gieson es utilizada para identificar las fibras elásticas de manera específica en un tejido biológico. Forma enlaces catiónicos, aniónicos y no iónicos con la elastina, el constituyente principal del tejido elástico fibroso. La elastina tiene una afinidad fuerte por el complejo hierro-hematoxilina formado por los reactivos en la tinción y por lo tanto la retendrá mucho más tiempo que otros componentes del tejido, por lo que aparecerá teñida, mientras los otros elementos aparecen poco coloreados. El uso de tiosulfato de sodio remueve el exceso de iodo y se utiliza una contra-tinción para dar contraste a la tinción principal.

El procedimiento para la tinción de Verhoeff-Van Gieson es el siguiente:

- 1.- Desparafinar y llevar los cortes hasta agua destilada
- 2.- Introducir los cortes en la solución de tinción por 15-30 min
- 3.- Lavar en agua corriente

- 4.- Diferenciar en la solución acuosa de Cloruro Férrico al 2% por 1-2 min, o hasta que las fibras aparezcan en color negro sobre un fondo grisáceo pero muy pálido
- 5.- Enjuagar en agua destilada
- 6.- Lavar en alcohol al 96% por 1min para remover cualquier coloración o residuos de iodo
- 7.- Contrastar en Eosina haciendo 6 inmersiones, o con la solución de Van Gieson por 5 min
- 8.- Escurrir y lavar en alcohol al 96% para remover exceso de coloración
- 9.- Deshidratar rápidamente en alcoholes graduales y montar con resina

Las fibras elásticas y los núcleos celulares se tiñen de negro en la técnica de Verhoeff original. Cuando se utiliza como contra-tinción la técnica de Van Gieson es posible diferenciar al colágeno de los otros tipos de tejido conectivo logrando así que las fibras de colágeno se observen de color rojo, fibras elásticas de color negro, otros elementos del tejido incluyendo fibras musculares y el citoplasma de color amarillo y los núcleos de color negro o marrón Evaluación de presencia de fibras elásticas mediante visualización directa en microscopia de luz.

#### **d) Tinción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS)**

La tinción de ácido peryódico de Schiff se utiliza para demostrar la presencia de polisacáridos simples a complejos y polisacáridos fuertemente sulfatados. La técnica se basa en la oxidación de los grupos hidroxilos en los carbohidratos mediante el ácido peryódico ( $H_5IO_6$ ) lo cual lleva a la formación de aldehídos libres y el rompimiento

del enlace carbono-carbonos adyacentes para que posteriormente estos grupos aldehídos reaccionen con el reactivo de Schiff para generar un rojo brillante/magenta.

El procedimiento para la tinción de Ácido Peryódico de Schiff es el siguiente:

- 1.- Hidratar los cortes hasta agua destilada
- 2.- Sumergir los cortes en solución del ácido peryódico por 5-10min
- 3.- Enjuagar en agua destilada varias veces
- 4.- Sumergir los cortes en el reactivo de Schiff por 20 min. Revisar que tomen color rosa pálido
- 5.- Lavar en agua corriente por 3-5 min
- 6.- Enjuagar en agua destilada
- 7.- Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1-2 min
- 8.- Lavar en agua corriente
- 9.- Decolorar ligeramente el alcohol ácido y lavar en agua corriente
- 10.- Virar con agua amoniacal, lavar en agua corriente y enjuagar con agua destilada
- 11.- Deshidratar en alcoholes graduales hasta el absoluto
- 12.- Aclarar en xilol y montar con resina.

Los polisacáridos se observan de color rosa-magenta.

#### **e) Tinción de DAPI**

El DAPI es un colorante nuclear fosforescente, se excita con luz ultravioleta para producir una fuerte fluorescencia azul cuando se encuentra unido al ADN (cromosomas). El DAPI se une a las regiones de alta repetición A=T en los

cromosomas. Además, no es visible cuando se utiliza con un microscopio de luz. Puede ser utilizado en células vivas o fijadas. La técnica de tinción con DAPI es especialmente adecuada para el recuento celular.

DAPI emite luz azul para marcar cromosomas.

#### **f) Inmunohistoquímica para colágeno I y IV**

Analizar por inmunohistoquímica el colágeno tipo I y IV. Se siguió el protocolo para realizar inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra colágeno tipo I, en un título de 1:50 y colágeno tipo IV en un título de 1:50. La omisión del anticuerpo fue considerado control negativo y se utilizó piel humana como control positivo. Se usaron anticuerpos de control IgG1 e IgG2 para verificar la especificidad de los anticuerpos.

#### **g) Inmunohistoquímica para presencia de laminina**

Se siguió el protocolo para realizar inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales en un título de 1:20. La omisión del anticuerpo se consideró control negativo y se utilizó piel humana como control positivo. Se usaron anticuerpos de control IgG1 e IgG2 para verificar la especificidad de los anticuerpos.

### **8.9 Descelularización de arterias umbilicales**

Las arterias umbilicales fueron descelularizadas utilizando métodos similares a otros descritos previamente. Se realizó una revisión de la literatura con el que se determinó utilizar los detergentes SDS a concentración de 0.1% y 1%; y Tritón X 100 a concentración de 1%. (Figura 7)

Descelularización SDS	Descelularización Tritón X-100
<p><b>1) 2 Ciclos en Buffer Hipotónico</b></p> <p>I: Buffer hipotónico (10mM tris; pH 8.0) a 4°C por 24 h.</p> <p>II: Buffer hipotónico con <b>0.01% ó 1%</b> de SDS a 37°C por 24 h + inhibidores de proteasa (Aprotinin, 10 KIU mL y 0.1% EDTA).</p> <p><b>2) Incubación</b> En Buffer (50 mM tris-Hcl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mg albúmina de suero bovino) con DNAasa (50 U/mL) y RNAasa (1U/mL) por tres horas.</p> <p><b>3) Lavado Hipertónico</b> Buffer hipertónico (1.5 NaCl en 0.05M tris-HCl) por 24 h a 37°C.</p> <p><b>4) Lavado Final</b></p>	<p><b>1) Solución de tritón al 1%</b> En PBS y suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 2% de anfotericina por 24 horas.</p> <p><b>2) Lavado</b> Tres lavados en DPBS, cada uno de 30 minutos de duración.</p> <p><b>3) Incubación</b> En Buffer (50 mM tris-Hcl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mg albúmina de suero bovino) con DNAasa (50 U/mL) y RNAasa (1U/mL) por tres horas.</p> <p><b>4) Lavado final</b></p>

**Figura 7. Pasos clave de los protocolos de descelularización con SDS y Tritón X-100.**

Brevemente, el protocolo de SDS consistió en sumergir las arterias en tubos Falcón de 50 ml con buffer hipotónico (10 mM tris; pH 8.0) a 4°C por 24h y posteriormente a un ciclo en buffer hipotónico (pH 7.4) con 0.1% ó 1% (peso/volumen) de SDS a 37°C por 24 h, con agitación constante y presencia de inhibidores de la proteasa (Aprotinin, 10 KIU \* mL<sup>-1</sup>) y 0.1% peso/volumen de EDTA. Luego los segmentos arteriales eran lavadas tres veces por 30 minutos en PBS. Se seguía con incubación en ADNasa (50 U \* mL<sup>-1</sup>) y ARNasa (1 U \* mL<sup>-1</sup>) en un buffer (50mM tris-HCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 microgramos \* mL<sup>-1</sup> albúmina de suero bovino, a pH de 7.6) por 3h a 37°C. Después de esto cada uno se sumergían en un buffer hipertónico (1.5 M NaCl en 0.05 M tris-HCL, pH 7.6) por 24h a 37°C. Finalmente las arterias fueron lavadas tres veces en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (DPBS) a 4°C por 30 minutos, en agitación constante y seguido de dos lavados de 24 h. El protocolo de Tritón X-100

se realizaba sumergiendo las arterias en PBS en constante agitación con 1% de tritón X-100 por 24 horas. Después las arterias eran lavadas con PBS por 30 minutos en tres ocasiones y posteriormente eran incubadas en ADNasa (50 U \* mL<sup>-1</sup>) y ARNasa (1 U \* mL<sup>-1</sup>) en un buffer (50mM tris-HCL, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 microgramos \* mL<sup>-1</sup> albúmina de suero bovino, a pH de 7.6) por 3h a 37°C. Finalmente eran lavadas tres veces en PBS a 4°C por 30 minutos, en agitación constante y por último dos lavados de 24 h. Al finalizar los protocolos de decelularización, las arterias eran almacenadas en PFH al 4% para procesamiento posterior.

### **8.10 Análisis morfológico**

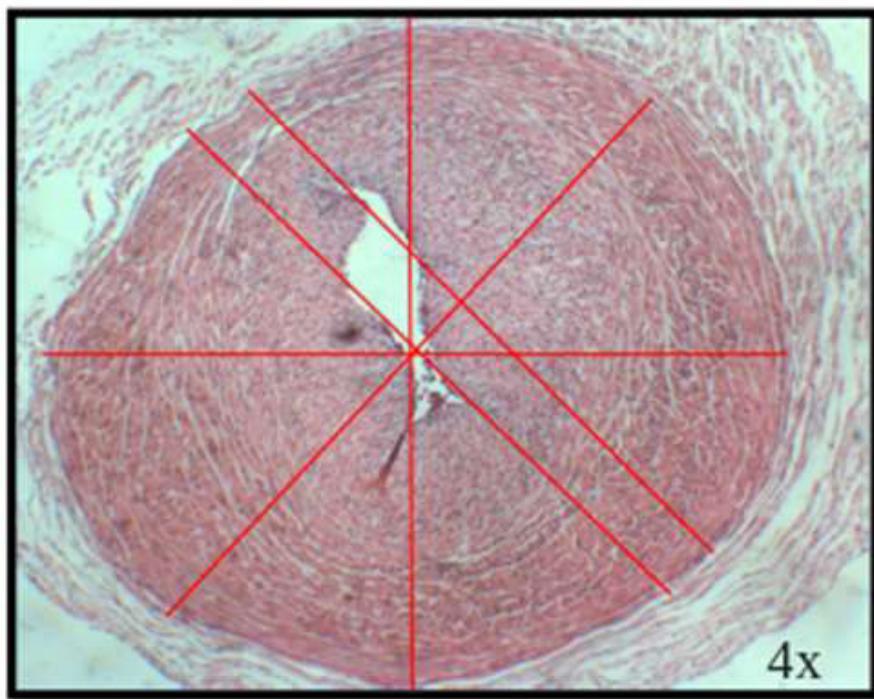
Los resultados obtenidos con las tinciones de hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson, Verhoeff Van-Gieson y PAS fueron evaluados cualitativamente por microscopía óptica con ayuda del software Qcapture para Windows 10 para la visualización y toma de microfotografías.

Las laminillas teñidas con DAPI se evaluaron de forma cualitativa mediante el uso de microscopía de fluorescencia con ayuda del software Qcapture para Windows 10 para la visualización y toma de microfotografías.

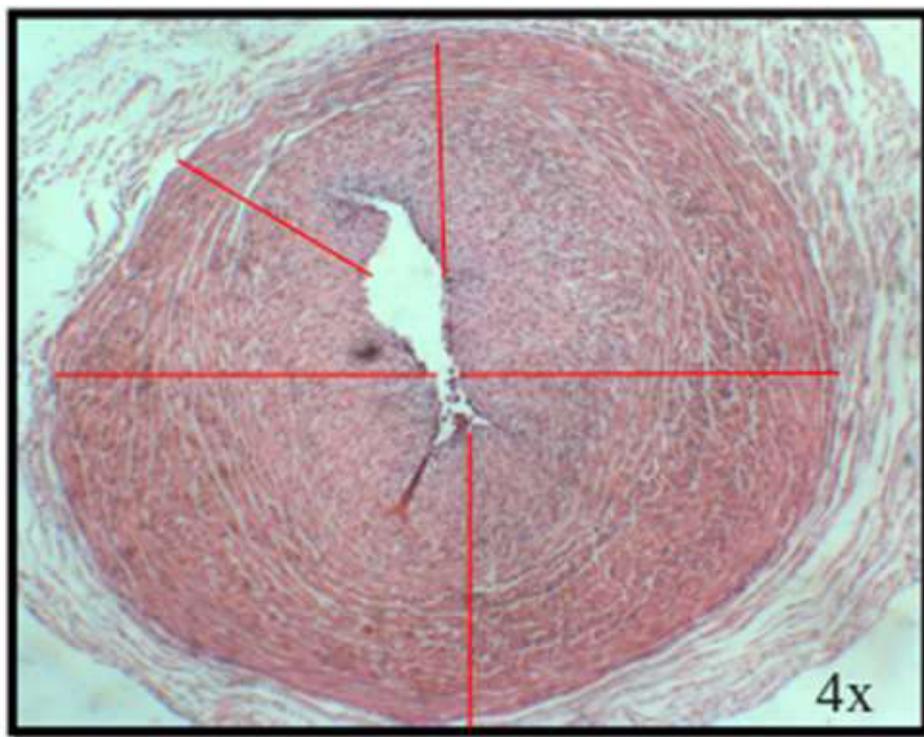
Las muestras teñidas para inmunofluorescencia de colágeno tipo IV y tipo I se evaluaron de forma cualitativa con el uso de microscopía de fluorescencia con ayuda del software Qcapture para Windows 10 para la visualización y toma de microfotografías.

### 8.11 Evaluación morfométrica

Las morfometrías fueron realizadas con el software ImageJ. Se evaluó el diámetro (Figura 8) del vaso y el grosor (Figura 9) de la pared vascular. Se tomaron cinco medidas y se calculó la media en cada caso. No se tomó en cuenta la adventicia, por encontrarla muy irregular.



**Figura 8. Medición de diámetro del vaso.** Imagen representativa de las líneas que se trazan en múltiples ejes hasta la túnica media, utilizando el software ImageJ, para calcular la media del diámetro total del vaso debido a su forma irregular



**Figura 9. Medición del grosor de la pared.** Imagen representativa de las líneas que se trazan en múltiples ejes sobre la túnica íntima y media, utilizando el software ImageJ, para calcular la media del diámetro total del vaso debido a su forma irregular

### **8.12 Análisis estadístico**

Los resultados de la microscopía óptica y de fluorescencia fueron evaluados de forma cualitativa por dos observadores. Para las morfometrías se tomó el valor promedio de las cinco mediciones y se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnoff para determinar la normalidad y en base a esto se decidió utilizar la prueba T de student para buscar diferencias tomando como significativo un valor de p de  $<0.05$ .

## **CAPÍTULO 9**

### **RESULTADOS**

#### **9.1 Características morfológicas**

#### **9.2 Morfometrías**

## CAPÍTULO 9

### RESULTADOS

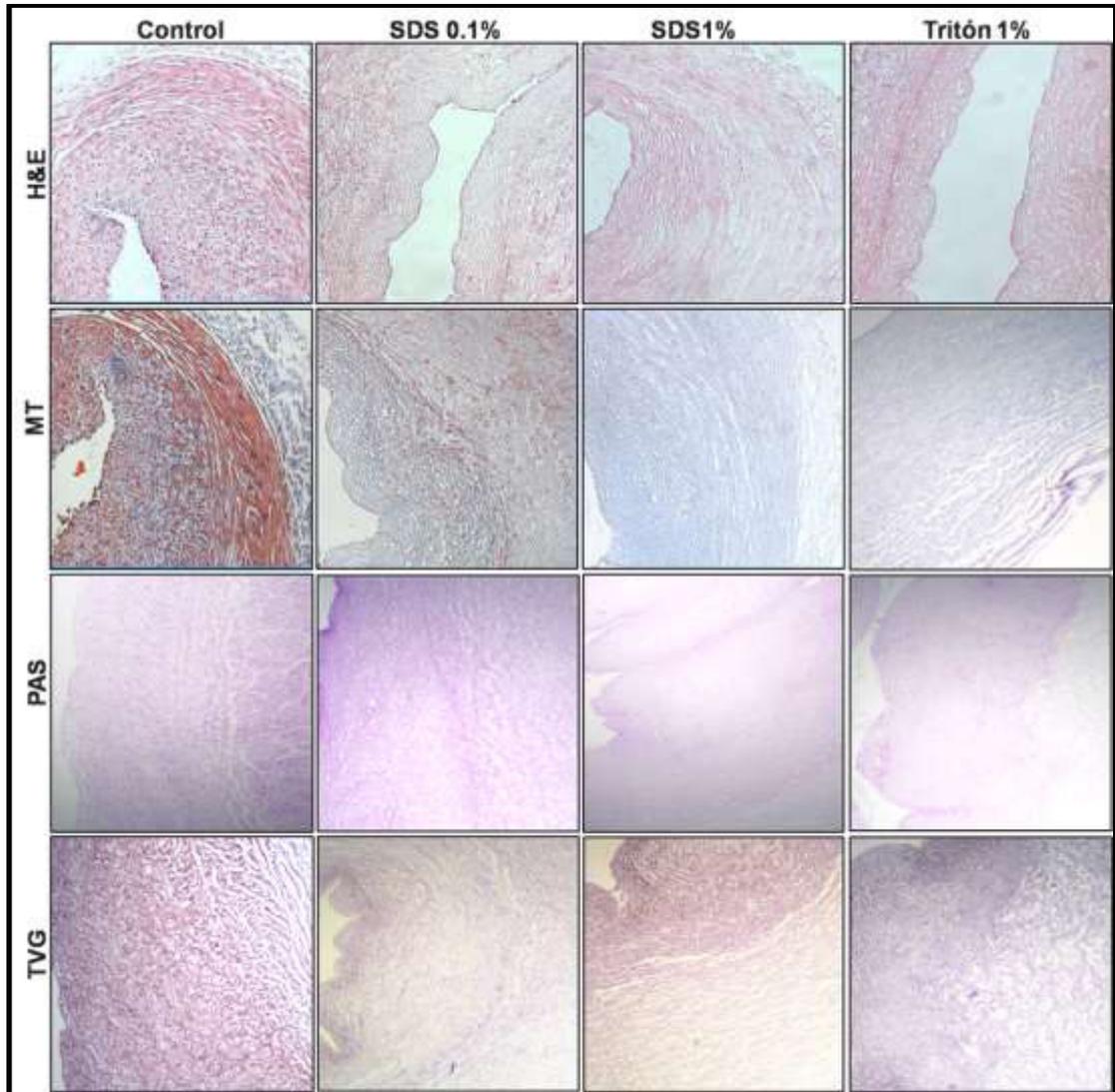
#### 9.1 Características morfológicas

Las arterias umbilicales del grupo control fueron teñidas para evaluar la presencia de material celular y nuclear, fibras de colágeno, fibras elásticas y GAGs de la matriz extracelular (MEC) (Figura 10). Al descellularizar las arterias umbilicales con SDS al 0.1%, SDS al 1% y Tritón X-100 al 1% no se distinguía material celular ni nuclear remanente, observándose poros donde estaban previamente las células. Sin embargo, se encontraron restos nucleares en las arterias descellularizadas con Tritón X-100 con la técnica de fluorescencia DAPI (Figura 11).

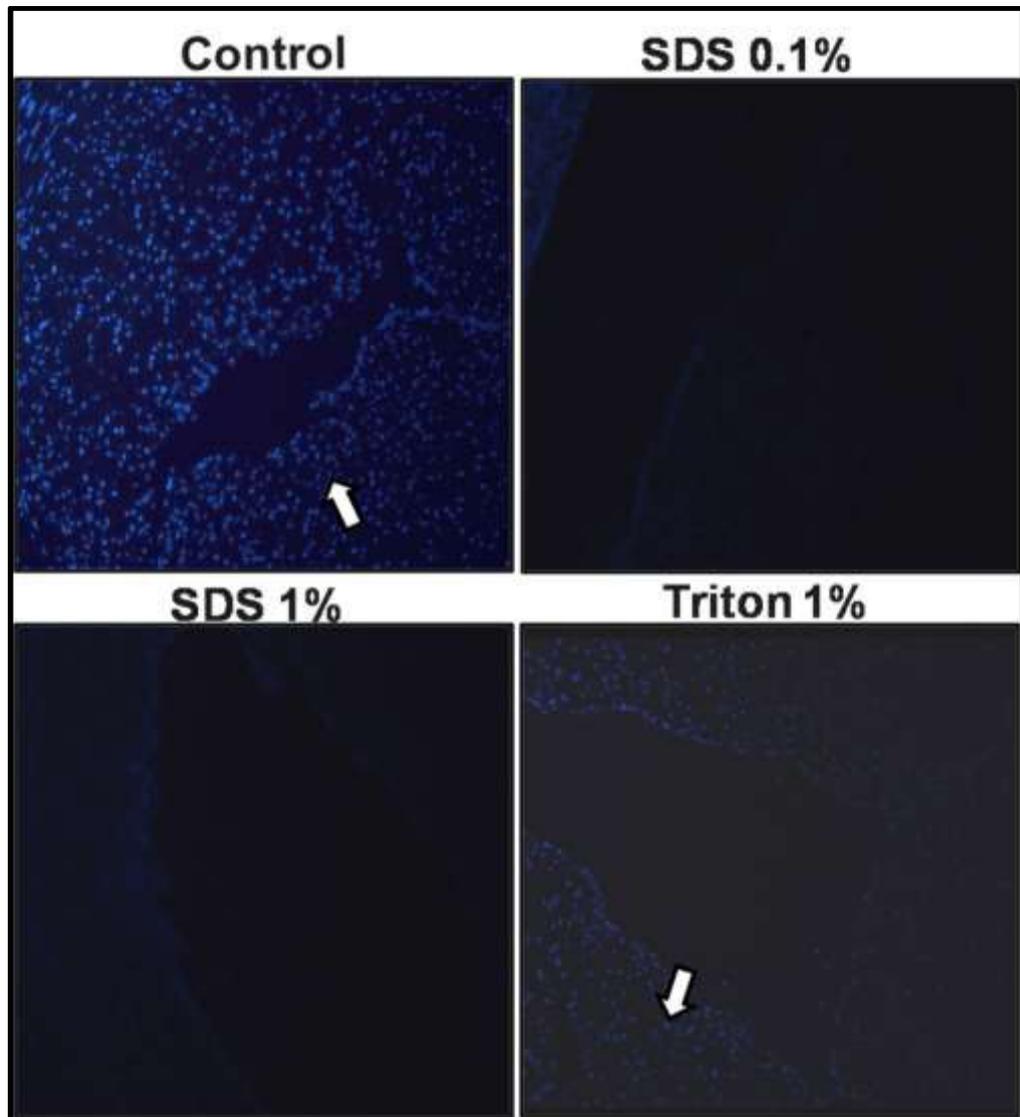
La tinción de Tricrómico de Masson mostró que el colágeno de la MEC se conserva en las arterias umbilicales tras la descellularización, apreciándose atenuado en las arterias tratadas con Tritón X-100 (Figura 10). Al analizar mediante inmunohistoquímica el colágeno tipo I y colágeno tipo IV se confirmó la persistencia de estos tras la descellularización (Figura 12), con una afectación apreciable en las arterias tratadas con Tritón-X100. La tinción de inmunohistoquímica para laminina evidenció persistencia de esta proteína al descellularizar las arterias umbilicales.

Con respecto a la elastina, se evaluó la presencia de fibras elásticas con la tinción de tricrómico de Van Gieson tras descellularizar las arterias umbilicales. Se encontró una atenuación apreciable de las fibras elásticas en las arterias descellularizadas respecto a las arterias del grupo control, que parece ser mayor en las arterias tratadas con Tritón

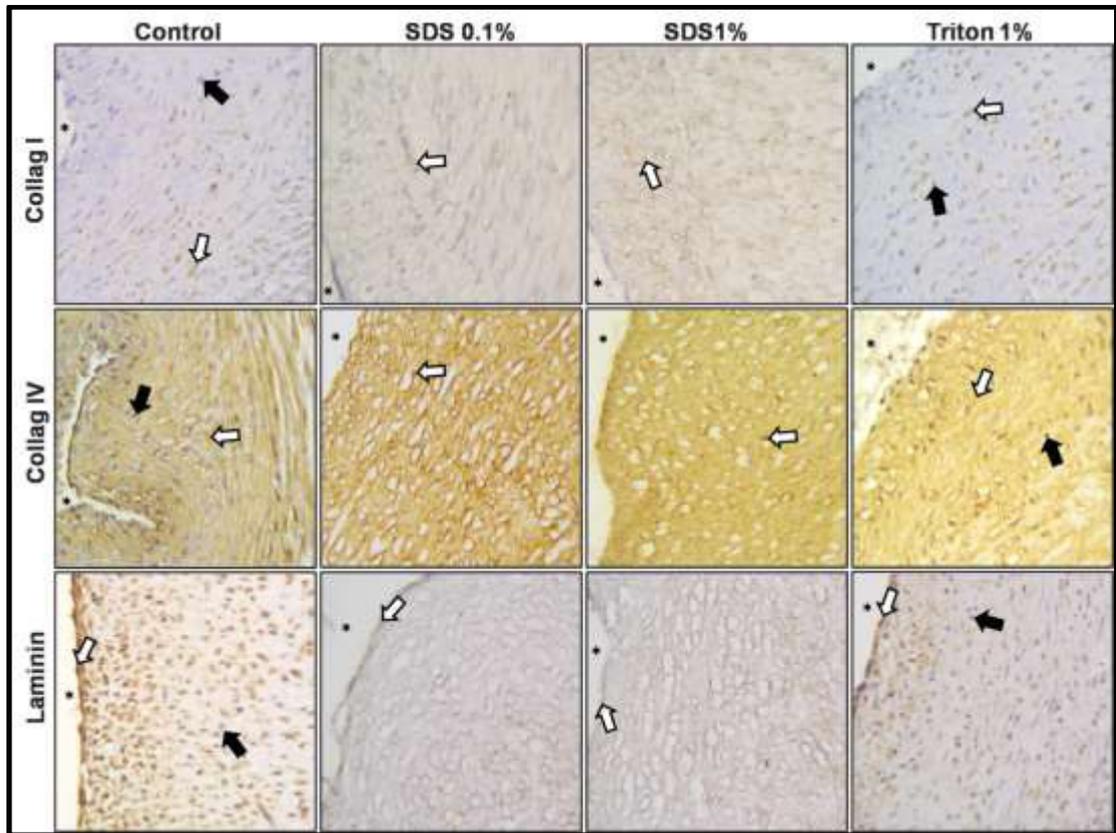
X-100. Resultados similares a estos se encontraron al evaluar los GAG's de la MEC de las arterias umbilicales (Figura 10).



**Figura 10. Tinciones histológicas con microscopia de luz.** Las técnicas histológicas se dividen por filas. Las arterias umbilicales se tiñen con hematoxilina y eosina (H & E), Tricrómico de Masson (MT) (el colágeno se tiñe de azul), Tricrómico de Van Gieson (TVG), y la histoquímica con ácido peryódico Schiff (PAS, glicosaminoglicanos complejo son teñidos de rosa). Los grupos se dividen por columnas como control, sodio dodecilsulfato (SDS) 0,1%, SDS 1% y Triton X-100 1%. Microscopía de luz a 10x de potencia.



**Figura 11.** Tinción de inmunofluorescencia con DAPI. en los grupos control y descelularización. Tinción de inmunofluorescencia DAPI (los restos nucleares se tiñen de azul brillante). Microscopía de fluorescencia a 10x de potencia. Las flechas blancas muestran núcleos o restos nucleares.



**Figura 12.** Inmunohistoquímica de colágeno y laminina. Las inmunohistoquímicas fueron divididas por filas para colágeno tipo I (collag I), colágeno tipo IV (collag IV) y laminina. Los grupos se dividen por columnas como control, sodio dodecilsulfato (SDS) al 0.1%, SDS al 1% y Tritón X-100 al 1%. Microscopía de luz a 40x de potencia. Las flechas blancas muestran positividad; flechas negras muestran núcleos o restos nucleares; \* indica el lumen arterial.

## 9.2 Morfometrías

Los diámetros lumbinales de las arterias umbilicales no mostraron diferencias significativas una vez descellularizadas (Tabla 2). El diámetro promedio de las arterias

umbilicales del grupo control fue de  $1.87 \pm 0.12$  mm vs  $1.83 \pm 0.10$  mm;  $1.9 \pm 0.13$ ; y  $1.86 \pm 0.14$  de las arterias del grupo de SDS 0.1%, SDS 1% y Tritón 1%, respectivamente.

Por otro lado, se encontró una disminución significativa en el grosor de la media al descelularizar las arterias con cualquiera de los tratamientos utilizados.(Tabla 2).

El grosor promedio de la túnica media de las arterias del grupo control fue de  $827.9 \pm 48.14$  micrómetros vs  $664.42 \pm 32$  micrómetros;  $664.5 \pm 81.59$  micrómetros; y  $694.3 \pm 86.6$  micrómetros de los grupos SDS 0.1%, SDS 1% y Tritón X-100, respectivamente.

La base de datos de morfometrías se encuentra en la sección de anexos.

**Tabla 2.** Morfometría de las arterias umbilicales en grupos control y descelularización.

<b>Parámetro</b>	<b>Control</b>	<b>SDS 0.1%</b>	<b>p</b>	<b>SDS 1%</b>	<b>p</b>	<b>Tritón 1%</b>	<b>p</b>
Diámetro	1.87	1.83	0.59	1.9	0.781	1.86	0.81
M ±DE	± 0.12	± 0.10		± 0.13		± 0.14	
Grosor	827.9	664.42	0.012*	664.5	0.015*	694.3	0.02*
M ± SD	± 48.14	± 74.32		± 81.59		± 86.6	

Diámetro expresado en milímetros (mm), grosor en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ); M: Media; DE:

Desviación estándar; mm: milímetros;  $\mu\text{m}$ : micrómetros; \*: valor estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

## **CAPÍTULO 10**

### **DISCUSIÓN**

## CAPÍTULO 10

### DISCUSIÓN

Los vasos del cordón umbilical son una fuente potencial para desarrollar injertos vasculares. Las venas umbilicales han sido ampliamente estudiadas con diferentes métodos de descelularización. Por otro lado, aunque las arterias umbilicales se han estudiado en el pasado con fines de reconstrucción microvascular, (Hwa-Shain *et al.*, 1984) solo recientemente se ha estudiado la posibilidad de utilizarlas como injertos vasculares.

En el presente estudio se decidió comparar la eficacia de dos protocolos de descelularización distintos, ambos con buena evidencia de eficiencia en la literatura. Son los detergentes SDS y Tritón X-100, en concentración de 0.1% y 1%, respectivamente.

Encontramos que, con respecto a la celularidad de las arterias umbilicales, los núcleos fueron eliminados con ambas concentraciones de SDS (0.1% y 1%). Sin embargo, cuando se utilizó Tritón X-100 (1%) aún se aprecian núcleos celulares.

Esta reportado en la literatura que el SDS al 1% es eficaz para descelularizar arterias umbilicales, (Rodriguez *et al.*, 2012; Tuan-Mu *et al.*, 2014) resultados que son congruentes con los nuestros. No encontramos evidencia en la literatura para comparar la eficacia del Tritón-X100 en las arterias umbilicales.

La persistencia de material nuclear en los segmentos arteriales tratados con Tritón X-100 se corroboró al utilizar la tinción de fluorescencia con DAPI. Por otro lado, el SDS en ambas concentraciones es suficiente para eliminar el material nuclear.

Es importante resaltar que los protocolos que estudiamos utilizan las nucleasas ADNasa y ARNasa. Está descrito que las nucleasas ayudan a eliminar completamente el material nuclear,(Gui *et al.*, 2010; Mallis *et al.*, 2014) por lo que parece que el SDS junto con nucleasas es un tratamiento efectivo para remover el material celular y nuclear. No así en el caso de tritón, que aún es posible reconocer material nuclear remanente.

El colágeno es abundante en las arterias umbilicales. Encontramos que cualitativamente la tinción se aprecia con menor intensidad al descelularizar las arterias, y en mayor medida al utilizar tritón. Están reportados daños en el colágeno al utilizar SDS al 1%.(Tuan-Mu *et al.*, 2014) Sin embargo, esto es controversial ya que está reportado que la combinación de SDS + CHAPS no afecta al colágeno tipo I ni al tipo IV. No se encontró más información con respecto a subtipos de colágeno en la literatura evaluada. Sin embargo, Wilshaw *et al.*, (Wilshaw *et al.*, 2012) encontraron pérdidas del colágeno tipo IV al descelularizar con SDS arterias femorales humanas. Nosotros describimos una pérdida similar en las fibras de colágeno tipo IV, que coinciden con los resultados de Wilshaw *et al.*

Las arterias umbilicales no cuentan con láminas elásticas interna ni externa claramente definidas. Encontramos que las fibras elásticas se aprecian cualitativamente disminuidas al utilizar los detergentes para descelularizar, en mayor medida con SDS

al 1% y Tritón. Hay reportes en la literatura de disminución de la elastina al descelularizar con SDS + CHAPS. (Gui *et al.*, 2009) Sin embargo, Mallis *et al.*, señalan que se conserva al utilizar un protocolo de descelularización similar. (Mallis *et al.*, 2014)

Las arterias umbilicales son ricas en GAGs. Estos disminuyen al descelularizar con cualquiera de los métodos, pero de manera más notoria con los protocolos de SDS al 1% y Tritón X-100. No hay otros reportes en la literatura donde se estudien estos componentes en las arterias umbilicales, por lo que consideramos que este hallazgo es importante ya que estos componentes son fundamentales para el funcionamiento integral de la MEC.

En las arterias umbilicales la laminina se encontró preservada principalmente con SDS al 0.1. Con SDS al 1% y con tritón en cambio no se apreciaba claramente. No hay más reportes sobre este componente en la literatura por lo que hacen falta más estudios para evaluar cuantitativamente esta proteína.

Con respecto a las morfometrías en arterias umbilicales, no se encontraron diferencias en el diámetro al comparar entre grupos. Por otro lado, el grosor se encontró disminuido significativamente tras aplicar la descelularización con SDS y con Tritón. Estos resultados no hablan de que la estructura morfológica tridimensional de las arterias umbilicales se conserva tras la descelularización. Por otro lado, la disminución en el grosor de la media puede ser a causa de la desaparición de las células musculares. Sin embargo, es posible que también sea debido a un daño en las proteínas estructurales. Por lo tanto, hacen falta más estudios para analizar el perfil mecánico de

las arterias umbilicales descelularizadas con estos métodos y poder definir más claramente su integridad estructural.

## **CAPÍTULO 11**

### **CONCLUSIONES**

# CAPÍTULO 11

## CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos del estudio, se puede concluir lo siguiente:

1. Las arterias umbilicales contienen abundante colágeno y glucosaminoglicanos (GAGs), y menor proporción de elastina.
2. El detergente sodio dodecilsulfato (SDS) a concentración de 0.1% es el más eficaz para eliminar material celular, respetando en mayor medida la matriz extracelular (MEC).
3. El SDS al 1% logra remover restos celulares, sin embargo, es más agresivo con la MEC, dañando al colágeno y elastina, y en mayor medida a los GAGs.
4. El Tritón X-100 al 1% no fue efectivo para remover el material celular y nuclear y fue agresivo a la vez con la MEC.
5. El daño a la MEC aumenta en relación con la concentración de los detergentes. Esto es crucial para mantener el equilibrio entre eliminación de células y daño a la MEC.
6. Los detergentes utilizados en el estudio no afectan el diámetro luminal del vaso, lo que significa que la estructura del vaso y su forma tridimensional no se altera.

7. Es importante que los vasos tengan similitud morfológica al sitio donde se va a implantar, ya que esto define su pronóstico a mediano y largo plazo.
  
8. Por otro lado, se encontró una disminución significativa del grosor de la pared vascular de las arterias umbilicales, que podría ser explicado en parte por la eliminación de células musculares.
  
9. Concluimos que el protocolo de descelularización con SDS al 0.1% es superior que los protocolos de SDS al 1% y Tritón X-100 al 1%, con respecto a la eliminación de material celular y respeto de los componentes principales de la MEC.

## **CAPÍTULO 12**

### **BIBLIOGRAFÍA**

## CAPÍTULO 12

### BIBLIOGRAFÍA

1. Junqueira L.C., Carneiro J. Basic Histology. Text & Atlas. 11 a Edición. Editorial Mc Graw Hill. Estados Unidos de América. 2005: 205.
2. Gartner L.P., Hiatt J.L. Texto y Atlas de Histología. 2 a Edición. Editorial Mc Graw Hill. México, D.F. 2002: 243-245.
3. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. Patología estructural y funcional. 5a Edición. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. España 1995: 580.
4. Geneser F. Histología. 3 a Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2000: 242-243, 391.
5. Rienstra H., Zeebregts C.J., Hillebrands J.L. The source of neointimal cells in vein grafts: does the origin matter. *Am. J. Pathol.* 2008; 172: 566-570.
6. Campeau L., Enjalbert M., Lespérance J., Vaislic C., Grondin C.M., Bourassa M.G. Atherosclerosis and late closure of aortocoronary saphenous vein grafts: sequential angiographic studies at 2 weeks, 1 year, 5 to 7 years, and 10 to 12 years after surgery. *Circulation.* 1983; 68: II 1-7.
7. Cooper R., Cutler J., Desvigne-Nickens P., Fortmann S.P., Friedman L., Havlik R., Hogelin G., Marler J., McGovern P., Morosco G., Mosca L., Pearson T., Stamler J., Stryer D., Thom T. Trends and disparities in coronary heart disease, stroke, and other cardiovascular diseases in the 40 United States: findings of the national conference on cardiovascular disease prevention. *Circulation.* 2000; 102: 3137-3147.
8. Aguirre-Rivero R. Tratado de Cirugía General. 1 a Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003.
9. Pistavos C.E., Panagiotakos D.B., Chrysohoou C.A., Skoumas J., Stefanadis C., Toutouzas P.K. Education and acute coronary syndromes: results from the CARDIO2000 epidemiological study. *Bull. World. Health. Organ.* 2002; 80: 371-377.
10. Pola P., Serricchio M., Flore R., Manasse E., Favuzzi A., Possati G.F. Safe removal of the radial artery for myocardial revascularization: a Doppler study to prevent ischemic complications to the hand. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1996; 112: 737-744.
11. Mills N.L., Everson C.T. Right gastroepiploic artery: a third arterial conduit for coronary artery bypass. *Ann. Thorac. Surg.* 1989; 47: 706-711.

12. Riekkinen H.V., Karkola K.O., Kankainen A. The radial artery is larger than the ulnar. *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 75: 882-884.
13. Mueller C.F., Lewis C.E., Edwards W.S. The angiographic appearance of splenic-to-coronary artery anastomosis. *Radiology.* 1973; 106: 513-516.
14. Riekkinen H.V., Karkola K.O., Kankainen A. The radial artery is larger than the ulnar. *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 75: 882-884.
15. Elizondo-Omaña R.E., García-Rodríguez M.A., Morales-Gómez J.A., Guzmán-López S., Tijerina-de la Garza O., Fernández Rodarte B., Montemayor-Flores M.L., Herrera-Meléndez J. Conductos vasculares utilizados en la operación de revascularización miocárdica. *Medicina Universitaria.* 2005; 7: 222-225.
16. Hinojosa-Amaya J.M., Villarreal-Silva E.E., Elizondo-Omaña R.E., Gutiérrez-de la O J., Dávila Canales R., González-Cantú A., Fernández-Zambrano E.M., Guzmán-López S. Conduits for myocardial revascularization grafts: The importance of morphology and imaging. *Medicina Universitaria.* 2010; 12: 115-119.
17. Dallan L.A., de Oliveira S.A., Lisboa L.A., Platania F., Jatene F.B., Iglesias J.C., Filho C.A., Cabral R., Jatene A.D. Complete myocardial revascularization using arterial grafts. *Heart. Surg. Forum.* 2001; 4: 179-183.
18. O'Donnell A. Coronary artery bypass graft surgery: principles and choice of conduit. *Heart. Wise.* 1999; 2: 7-10.
19. González-Santos J.M., López-Rodríguez J., Dalmau-Sorlí M.J. Arterial grafts in coronary surgery. Treatment for everyone?. *Rev. Esp. Cardiol.* 2005; 58: 1207-1223.
20. Acar C., Ramsheyi A., Pagni J.Y., Jebara V., Barrier P., Fabiani J.N., Deloche A., Guermonprez J.L., Carpentier A. The radial artery for coronary artery bypass grafting: clinical and angiographic results at five years. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1998; 116: 981-989.
21. Dumanian G.A., Segalman K., Mispireta L.A., Walsh J.A., Hendrickson M.F., Wilgis E.F. Radial artery use in bypass grafting does not change digital blood flow or hand function. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 65: 1284-1287.
22. Lytle B.W., Cosgrove D.M., Ratliff N.B., Loop F.D. Coronary artery bypass grafting with the right gastroepiploic artery. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1989; 97: 826-831.
23. Mills N.L., Everson C.T. Right gastroepiploic artery: a third arterial conduit for coronary artery bypass. *Ann. Thorac. Surg.* 1989; 47: 706-711.
24. Buxton B.F., Chan A.T., Dixit A.S., Eizenberg N., Marshall R.D., Raman J.S. Ulnar artery as a coronary bypass graft. *Ann. Thorac. Surg.* 1998; 65: 1020-1024.

25. Hinojosa-Amaya J.M., Elizondo-Omaña R.E., García-Rodríguez M.A., Morales-Gómez J.A., Guzmán-López S., Montemayor-Flores M.L., Herrera-Meléndez J. Características anatómicas de la arteria cubital: longitud, diámetro y ramos musculares. *Medicina Universitaria*. 2005; 7: 67-70.
26. Mueller C.F., Lewis C.E., Edwards W.S. The angiographic appearance of splenic-to-coronary artery anastomosis. *Radiology*. 1973; 106: 513-516.
27. Zhu Z.T., Jiang X.S., Wang B.C., Meng W.X., Liu H.Y., Tian Y. Andrographolide inhibits intimal hyperplasia in a rat model of autogenous vein grafts. *Cell. Biochem. Biophys*. 2011; 60: 231-239.
28. Cooper G.J., Underwood M.J., Deverall P.B. Arterial and venous conduits for coronary artery bypass. A current review. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 1996; 10: 129-140.
29. Elizondo-Omaña R.E. Empleo de polidioxanona, polipropileno o seda como materiales de sutura en anastomosis termino-terminal en arterias muscular, elástica o vena. Tesis doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L., 2008.
30. Rosenberg N, Martinez a, Sawyer PN, Wesolowski S a, Postlethwait RW, Dillon ML. Tanned collagen arterial prosthesis of bovine carotid origin in man. Preliminary studies of enzyme-treated heterografts. *Ann Surg*. 1966;164(2):247–56.
31. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, *et al*. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg*. 2004;40(1):146–53.
32. Wilshaw S, Ph D, Rooney P, *et al*. Development and Characterization of Acellular Allogeneic Arterial Matrices. *Tissue Eng*. 2012;18.
33. Hynes RO. The evolution of metazoan extracellular matrix. *J Cell Biol*. 2012;196(6):671–9.
34. Xiong Y, Chan WY, Chua AWC, *et al*. Decellularized porcine saphenous artery for small-diameter tissue-engineered conduit graft. *Artif Organs*. 2013;37(6):74–87.
35. Bader, A., Schilling, T., Teebken, O. E., Brandes, G., Herden, T., Steinhoff, G., & Haverich, A. (1998). Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 14(3), 279–84. Retrieved from
36. Badylak, S. F., Freytes, D. O., & Gilbert, T. W. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 5(1), 1–13.

37. Badylak, S. F., Record, R., Lindberg, K., Hodde, J., & Park, K. (1998). Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 9(8), 863–78.
38. Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F. (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), 3233–3243.
39. Dahl, S. L. M., Koh, J., Prabhakar, V., & Niklason, L. E. (2003). Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplantation*, 12(6), 659–66. Retrieved from
40. Daniel, J., Abe, K., & McFetridge, P. S. (2005). Development of the human umbilical vein scaffold for cardiovascular tissue engineering applications. *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)*, 51(3), 252–61.
41. Freytes, D. O., Badylak, S. F., Webster, T. J., Geddes, L. A., & Rundell, A. E. (2004). Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 25(12), 2353–2361.
42. Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badylak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675–3683. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
43. Gilbert, T. W., Stolz, D. B., Biancaniello, F., Simmons-Byrd, A., & Badylak, S. F. (2005). Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26(12), 1431–1435.
44. Goktas, S., Matuska, A. M., Pierre, N., Gibson, T. M., Dmytryk, J. J., & McFetridge, P. S. (2014). Decellularization method influences early remodeling of an allogenic tissue scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(1), 8–16.
45. Gui, L., Chan, S. a, Breuer, C. K., & Niklason, L. E. (2010). Novel Utilization of Serum in Tissue Decellularization. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(2), 173–184.
46. Gui, L., Muto, A., Chan, S. a, Breuer, C. K., & Niklason, L. E. (2009). Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Engineering. Part A*, 15(9), 2665–2676.
47. Gutiérrez, E., Flammer, A. J., Lerman, L. O., Elizaga, J., Lerman, A., & Fernández-Avilés, F. (2013). Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *European Heart Journal*, 34(41), 3175–3181.
48. Hoenicka, M., Lehle, K., Jacobs, V. R., Schmid, F. X., & Birnbaum, D. E. (2007). Properties of the Human Umbilical Vein as a Living Scaffold for a Tissue-Engineered Vessel Graft. *Tissue Engineering*, 13(1), 219–229.

49. Hoenicka, M., Schrammel, S., Bursa, J., Huber, G., Bronger, H., Schmid, C., & Birnbaum, D. E. (2013). Development of endothelium-denuded human umbilical veins as living scaffolds for tissue-engineered small-calibre vascular grafts. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(4), 324–336.
50. Hwa-Shain, Y., Keller, J. T., Brackett, K. A., Frank, E., & Tew, J. M. (1984). Human umbilical artery for microvascular grafting. Experimental study in the rat. *Journal of Neurosurgery*, 61, 737–742.
51. Johnson, W. C., & Lee, K. K. (2000). A comparative evaluation of polytetrafluoroethylene, umbilical vein, and saphenous vein bypass grafts for femoral-popliteal above-knee revascularization: A prospective randomized Department of Veterans Affairs cooperative study. *Journal of Vascular Surgery*, 32(2), 268–277.
52. Klinkert, P., Post, P. ., Breslau, P. ., & van Bockel, J. . (2004). Saphenous Vein Versus PTFE for Above-Knee Femoropopliteal Bypass. A Review of the Literature. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 27(4), 357–362.
53. L'Heureux, N., Dusserre, N., Marini, A., Garrido, S., de la Fuente, L., & McAllister, T. (2007). Technology Insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts—from research to clinical practice. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 4(7), 389–395.
54. Lin, P., Chan, W. C. W., Badylak, S. F., & Bhatia, S. N. (2004). Assessing Porcine Liver-Derived Biomatrix for Hepatic Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 10(7–8), 1046–1053.
55. Lomas, R. J., Dodd, P. D. F., Rooney, P., Pegg, D. E., Hogg, P. A., Eagle, M. E., ... Kearney, J. N. (2013). A standardised protocol for the validation of banking methodologies for arterial allografts. *Cell and Tissue Banking*, 14(3), 495–503.
56. Mallis, P., Gontika, I., Pouligiannopoulos, T., Zoidakis, J., Vlahou, A., Michalopoulos, E., ... Stavropoulos-Giokas, C. (2014). Evaluation of Decellularization in Umbilical Cord Artery. *Transplantation Proceedings*, 46(9), 3232–3239.
57. Mangold, S., Schrammel, S., Huber, G., Niemeyer, M., Schmid, C., Stangassinger, M., & Hoenicka, M. (2015). Evaluation of decellularized human umbilical vein (HUV) for vascular tissue engineering - comparison with endothelium-denuded HUV. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(1), 13–23.

58. Martínez-González, B., Theriot-Giron, M. del C., López-Serna, N., Morales-Avalos, R., Quiroga-Garza, A., Reyes-Hernandez, C. G., ... Guzmán-López, S. (2015). Morphological Analysis of Major Segments of Coronary Artery Occlusion. Importance in Myocardial Revascularization Surgery. *International Journal of Morphology*, 33(4), 1205–1212.
59. Mathers, C. D., & Loncar, D. (2006). Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 3(11), 2014–2030.
60. McFetridge, P. S., Daniel, J. W., Bodamyali, T., Horrocks, M., & Chaudhuri, J. B. (2004). Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 70A(2), 224–234.
61. Montoya, C. V., McFetridge, P. S., Montoya-Villegas, C., & McFetridge, P. S. (2009). Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 15(2), 191–200.
62. Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., ... Turner, M. B. (2016). Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation*, 133(4), e38–e360.
63. Naeye, R. L. (1985). Umbilical cord length: Clinical significance. *The Journal of Pediatrics*, 107(2), 278–281.
64. Naito, Y., Shinoka, T., Duncan, D., Hibino, N., Solomon, D., Cleary, M., ... Breuer, C. (2011). Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(4–5), 312–323.
65. Neufang, A., Espinola-Klein, C., Dorweiler, B., Messow, C. M., Schmiedt, W., & Vahl, C. F. (2007). Femoropopliteal prosthetic bypass with glutaraldehyde stabilized human umbilical vein (HUV). *Journal of Vascular Surgery*, 46(2), 280–288.
66. Rieder, E., Kasimir, M.-T., Silberhumer, G., Seebacher, G., Wolner, E., Simon, P., & Weigel, G. (2004). Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127(2), 399–405.
67. Rodriguez, M., Juran, C., McClendon, M., Eyadiel, C., & McFetridge, P. S. (2012). Development of a mechanically tuneable 3D scaffold for vascular reconstruction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 100(12), 3480–3489.
68. Roy, S., Silacci, P., & Stergiopoulos, N. (2005). Biomechanical properties of decellularized porcine common carotid arteries. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 289(4), H1567–H1576.

69. Schaner, P. J., Martin, N. D., Tulenko, T. N., Shapiro, I. M., Tarola, N. A., Leichter, R. F., ... DiMuzio, P. J. (2004). Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Vascular Surgery*, 40(1), 146–153.
70. Stehbens, W. E., Wakefield, J. S. J., Gilbert-Barness, E., & Zuccollo, J. M. (2005). HISTOPATHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF HUMAN UMBILICAL BLOOD VESSELS. *Fetal and Pediatric Pathology*, 24(6), 297–315.
71. Tosun, Z., Villegas-Montoya, C., & McFetridge, P. S. (2011). The influence of early-phase remodeling events on the biomechanical properties of engineered vascular tissues. *Journal of Vascular Surgery*, 54(5), 1451–1460.
72. Tuan-Mu, H.-Y., Yu, C.-H., & Hu, J.-J. (2014). On the Decellularization of Fresh or Frozen Human Umbilical Arteries: Implications for Small-Diameter Tissue Engineered Vascular Grafts. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(6), 1305–1318.
73. Uzarski, J. S., Van De Walle, A. B., & McFetridge, P. S. (2013). Preimplantation processing of ex vivo -derived vascular biomaterials: Effects on peripheral cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A(1), 123–131.
74. Van de Walle, A. B., Uzarski, J. S., & McFetridge, P. S. (2015). The Consequence of Biologic Graft Processing on Blood Interface Biocompatibility and Mechanics. *Cardiovascular Engineering and Technology*, 6(3), 303–313.
75. Vázquez-Blanco, M., Ruda-Vega, H., Guerri-Guttenberg, R. A., Giuliano, R., Grana, D. R., Azzato, F., & Milei, J. (2011). Histopathology and histomorphometry of umbilical cord blood vessels. Findings in normal and high risk pregnancies. *Artery Research*, 5(2), 50–57.
76. Vyavahare, N., Hirsch, D., Lerner, E., Baskin, J. Z., Schoen, F. J., Bianco, R., Levy, R. J. (1997). Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms. *Circulation*, 95(2), 479–88.
77. WHO. (2014). Global status report on noncommunicable diseases 2014. *World Health*.
78. Wilshaw, S., Ph, D., Rooney, P., Berry, H., Kearney, J. N., Homer-vanniasinkam, S., Ingham, E. (2012). Development and Characterization of Acellular Allogeneic Arterial Matrices. *Tissue Eng*, 18.
79. Woods, T., & Gratzer, P. F. (2005). Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft. *Biomaterials*, 26(35), 7339–7349.

80. Zdrahala, R. J. (1996). Small Caliber Vascular Grafts. Part I: State of the Art. *Journal of Biomaterials Applications*, 10, 309–329.
81. Zilla, P., Bezuidenhout, D., & Human, P. (2007). Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials*, 28(34), 5009–27.

## **CAPÍTULO 13**

### **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

## CAPÍTULO 13

### RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Alejandro Quiroga Garza** nació en Monterrey, Nuevo León, México, el 19 de abril de 1984. Sus padres son el Ing. Rogelio Quiroga García y la Maestra María del Consuelo Garza García. Su formación académica escolar lo llevo a graduarse de preparatoria con mención honorífica en junio del 2002, para ingresar a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en agosto del 2002. Durante el semestre de agosto del 2006, realiza rotaciones de intercambio en los países de Italia, Francia, y Macedonia. En enero del 2009 termina sus estudios como Médico Cirujano Partero con promedio de 81.59, para iniciar su servicio social en investigación, finalizado en enero 2010. En marzo 2010 inicia su posgrado en la especialidad médica de Cirugía General en el Hospital General de Nuevo Laredo donde fungió como jefe de residentes del hospital. Continúa su segundo a cuarto año en el Hospital General de Ciudad Victoria, realizando su servicio social en el Hospital General de Ciudad Mante, y fungió como jefe de residentes del Servicio de Cirugía General durante su último año, graduándose en febrero del 2014 por parte de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (UAT) con promedio de 93.88. Durante este tiempo, se casa con la Dra. Irma Margarita Pérez Rodríguez, el 10 de noviembre del 2012, después de 5 años de noviazgo, con quien luego tiene su primer hija, Amanda Margarita el 8 de marzo del 2017. En mayo del 2014 inicia su práctica privada como especialista, y posteriormente incorporándose a la UANL como profesor del Departamento de Anatomía Humana de la Facultad de Medicina en junio del 2014. Durante noviembre del 2014 realiza una estancia de investigación en la Universidad Autónoma de Madrid y rotación de cirugía vascular con la Zurbano Clínica Vascular

de Madrid, España. En agosto del 2015 es aceptado en el programa de Doctorado en Medicina por parte de la UANL, terminando su tesis en febrero del 2018 y logrando su publicación en octubre del mismo año.

Actualmente trabaja en conjunto con las Subdirecciones de Investigación y de Educación Continua. Mantiene un perfil docente como profesor de clases a nivel pregrado y posgrado. Es coordinador general de investigación en el Departamento de Anatomía Humana. Es miembro activo del comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL). Cuenta con un diplomado en docencia universitaria, otro en investigación educativa, 28 publicaciones científicas, colaborador de 3 diferentes libros, más de 75 reconocimientos por trabajos de investigación presentados en congresos, 8 premios de investigación, más de 50 constancias de capacitaciones médicas, más de 140 reconocimientos como ponente, moderador, o coordinador de diversos cursos médicos, y más de 40 asistencias a cursos, congresos, y simposios desde su egreso de la especialidad.

# ANEXOS

## Bases de datos

Arteria	D1	D2	D3	D4	D5	PromD	Ds	Min	Max	Rango
2c	1613.17	1802.76	1740.05	1588.97	1826.02	1714.19	96.85	1588.97	1826.02	237.05
2_sds0.1	1616.05	1953.78	1726.81	1886.8	1845.75	1805.84	120.25	1616.05	1953.78	337.73
2_sds1	1909.73	2156.81	2285.71	2111.89	2213.54	2135.53	126.99	1909.73	2285.71	375.97
3c	1697.02	2398.62	2132.68	2028.08	1821.86	2015.65	244.78	1697.02	2398.62	701.6
3_sds0.1	1724.32	1809.52	1810.66	1837.28	1647.05	1765.77	70.51	1647.05	1837.28	190.23
3_sds1	1746.55	1655.03	1847.54	1717.04	1639.4	1721.11	74.42	1639.4	1847.54	208.14
4c	1982.19	1867.35	1713.68	1838.6	1714.5	1823.27	101.27	1713.68	1982.19	268.51
4_sds0.1	1816.49	1608.74	1871.43	1652.01	1674.57	1724.65	101.19	1608.74	1871.43	262.69
4_sds1	1658.7	2091.59	1843.47	1747.78	2022.41	1872.79	162.84	1658.7	2091.59	432.89
8c	1786.09	1916.33	1858.82	1875.19	1868.04	1860.9	42.26	1786.09	1916.33	130.24
8_sds0.1	1790.84	2071.11	1888	1908.23	2112.58	1954.15	119.94	1790.84	2112.58	321.74
8_sds1	1866.81	2052.37	1898.78	1683.55	1896.96	1879.7	117.57	1683.55	2052.37	368.82
9c	2205.82	1839.8	2047.44	2126.41	1921.58	2028.21	132.99	1839.8	2205.82	366.02
9_sds0.1	1847.05	1664.6	1771.71	1774.73	1841.66	1779.95	65.9	1664.6	1847.05	182.45
9_sds1	1480.57	2300.4	1749.97	1869.78	2252.73	1930.69	309.64	1480.57	2300.4	819.82
10c	1932.69	1777.92	1768.16	1833.91	1751.33	1812.8	66.04	1751.33	1932.69	181.36
10_sds0.1	1909.25	2050.8	1925.53	1963.43	2002.89	1970.38	51.61	1909.25	2050.8	141.55
10_sds1	1895.59	1880.14	1933.04	1787.52	1925.83	1884.42	52.18	1787.52	1933.04	145.52

G1	G2	G3	G4	G5	PromG	Ds	Min	Max	Rango
881.67	671.9	778.69	897.17	546.99	755.28	131.91	546.99	897.17	350.19
776.66	739.34	734.44	478.81	696.15	685.08	106.24	478.81	776.66	297.85
756.96	514.98	715.51	844.43	919.34	750.24	137.16	514.98	919.34	404.36
1014.86	706.69	1026.19	678.47	911.56	867.56	148.61	678.47	1026.19	347.72
555.87	858.85	634.56	698.96	478.89	645.42	129.84	478.89	858.85	379.96
658.89	706.2	766.41	545.98	673.11	670.12	72.28	545.98	766.41	220.43
734.96	1034.93	994.92	1007.37	549.41	864.32	191.07	549.41	1034.93	485.52
747.35	599.84	449.42	306.48	577.54	536.13	148.76	306.48	747.35	440.87
638.84	614.36	526.74	427.01	607.61	562.91	77.7	427.01	638.84	211.83
947.54	754.08	855.99	824.62	728.52	822.15	77.81	728.52	947.54	219.02
453.54	641.49	732.54	528.15	890.47	649.24	153.72	453.54	890.47	436.93
643.86	836.58	876.88	959.82	507.81	764.99	165.18	507.81	959.82	452.01
847.4	697.24	626.53	1077.53	1101.36	870.01	192.99	626.53	1101.36	474.83
877.93	608.9	629.34	730.57	796.57	728.66	101.1	608.9	877.93	269.03
737.37	600.15	881.71	588.86	421.8	645.98	154.62	421.8	881.71	459.91
840.54	922.59	459.6	635.37	1080.88	787.79	218.08	459.6	1080.88	621.28
880.16	728.65	817.98	712.84	570.37	742	105.21	570.37	880.16	309.79
696.62	720.89	649.16	444.97	452.13	592.75	120	444.97	720.89	275.92

## Human Umbilical Vessels: Choosing the Optimal Decellularization Method

VICTOR E. RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, BRINDA MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, ALEJANDRO QUIROGA-GARZA, CYNTHIA GUADALUPE REYES-HERNÁNDEZ, DAVID DE LA FUENTE-VILLARRIAL, OSCAR DE LA GARZA-CASTRO, SANTOS GUZMÁN-LÓPEZ, AND RODRIGO ENRIQUE ELIZONDO-OMASA

There is an increasing demand of small-diameter vascular grafts for treatment of circulatory pathologies. Decellularization offers the possibility of using human blood vessels as scaffolds to create vascular grafts. Umbilical vessels have great potential because of their availability and morphological characteristics. Various decellularization techniques have been used in umbilical vessels, but consensus on which is the most appropriate has not yet been reached. The objective of this review is to analyze the morphological and biomechanical characteristics of decellularized human umbilical arteries and veins with different techniques. Evidence indicates that the umbilical vessels are a viable option to develop small-diameter vascular grafts. Detergents are the agents most often used and with most evidence. However, further studies are needed to accurately analyze the components of the extracellular matrix and biomechanical characteristics, as well as the capacity for recellularization and *in vivo* functionality. *ASAIO Journal* 2018; 64:575–580.

**Key Words:** vascular graft, decellularization, umbilical artery, umbilical vein, tissue engineering

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and are estimated to hold this position by 2030.<sup>1,2</sup> Atherosclerosis and endothelial dysfunction are the main etiology.<sup>3,4</sup> When circulatory obstruction is present, surgical revascularization procedures such as stent placement, angioplasty, or vascular grafting are performed. A graft redirects blood circulation, bypassing an obstruction. They are classified according to their origin as autologous, allogeneic, xenogeneic, or prosthetic.<sup>5</sup> When the diameter is less than 6 mm, they are considered small-caliber grafts.<sup>7</sup> When selecting a graft, it is important to consider morphological similarity between the graft and the vessel where it will be placed to optimize long-term permeability.<sup>8</sup> Autologous grafts represent the most effective option for small-diameter vessels. However, they are not always available or do not have the required characteristics.<sup>9</sup> In these cases, vascular prostheses are of little use because

of their high incidence of thrombogenic events due to the absence of endothelium.<sup>10</sup> Therefore, the search for an ideal graft for small-diameter vessels is still ongoing.

Different methods have been proposed to develop substitutes for small-diameter vessels. Synthetic prostheses coated with endothelial cells, vascular collagen analogs, biodegradable polymer conduits, and decellularized blood vessels are examples.<sup>11</sup> Decellularized blood vessels maintain their three-dimensional structure and have reduced immunogenicity. Their biomechanical properties are superior to synthetic materials, with better functionality and adaptation.<sup>12–14</sup> These advantages have increased the interest in the use of this method.

The purpose of decellularization is to remove all cellular and nuclear materials from the blood vessel without causing damage to the extracellular matrix (ECM).<sup>15</sup> ECM is critical for cell adhesion, migration, and proliferation, as well as adaptive tissue responses.<sup>16</sup> It has the potential to serve as a scaffold to develop a vascular graft. Decellularization techniques may involve physical,<sup>17–19</sup> biological,<sup>20–22</sup> and chemical methods,<sup>23–26</sup> often combining different parts of these.

Physical methods include freeze/thaw cycles, agitation, and mechanical pressure. These are rarely sufficient by themselves, but they facilitate cell membrane rupture. Biological (e.g., enzymes) and chemical (e.g., detergents) techniques tend to damage the cell membrane and break down intra- and extracellular bonds.<sup>15</sup> The ideal technique varies depending on the type of tissue and the species of origin.<sup>27</sup>

There is no agreement on which is the best decellularization technique for blood vessels. In most studies, the decellularization technique or blood vessel selection is not warranted. In addition, many studies use blood vessels originating from other animal species, which may lead to misinterpretations of results that may not be applicable to clinical practice. For instance, it has been described that prosthetics and saphenous grafts used in humans do not undergo re-endothelialization because of their length. Animal models use short-length vessels that can undergo remodeling due to trans-anastomotic re-endothelialization, a phenomenon absent in human vessels.<sup>10</sup>

Umbilical vessels are a promising option for the development of vascular grafts. They have a diameter suitable to be used as small-diameter grafts, and lack branches.<sup>12,16,28</sup> They are easy to obtain and highly available. Most centers dispose of the umbilical cords as biological tissue. In 2015, almost 4 million births were registered in the United States alone.<sup>29</sup> This makes vessels an easily obtainable resource.

A comparison of the different decellularization techniques for human blood vessels is therefore needed to aid in the technique selection. The objective of this review is to analyze the morphology and biomechanics of decellularized umbilical vessels with different techniques.

From the Human Anatomy Department, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey N.L., Mexico.

Submitted for consideration July 2017; accepted for publication in revised form October 2017.

Disclosure: The authors have no conflicts of interest to report.

Correspondence: Alejandro Quiroga-Garza, MD, Departamento de Anatomía Humana, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Ave. Madero y Dr. Aguirre Pequeño S/N, Colonia Mitras Centro, Monterrey N.L., C.P. 64460, México. Email: draqui-roga@gmail.com

Copyright © 2017 by the ASAIO

DOI: 10.1097/MAT.0000000000000715

IJM 564-18

Articles X



MARIANO GUILLERMO ARMANDO DEL SOL CALDERÓN (mariano.delsol@ufontera.ci)

Wed, 26 Oct 9:38 ☆ ↶ ⋮

para mí

Dear Dr. Quiroga

I am very pleased to inform you that the paper: "Decellularization of human umbilical arteries", has been accepted by the Scientific Board for publication in *International Journal of Morphology*.

Your article will be published in issue 1 volume 37, 2019.

Very truly yours,

Dr. Mariano del Sol  
Editor  
Int. J. Morphol.



Facultad de Medicina, UANL

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León  
a través de la Subdirección de Investigación otorga  
la presente

## CONSTANCIA

Dr. Victor Emanuel Rodríguez Rodríguez, Est. Carlos Saúl Rodríguez Roque, Dra. Brenda Martínez González,  
Dr. Alejandro Quiroga Garza, Dr. Roberto Montes de Oca Luna, Dr. Adolfo Soto Domínguez,  
Dr. Abel Guzmán López, Dr. Rodrigo Enrique Elizondo Omaña, Dr. Santos Guzmán López

por la presentación en DIAL del trabajo titulado:

"ARTERIA UMBILICAL DESCELULARIZADA COMO INJERTO VASCULAR DE PEQUEÑO DIÁMETRO"



XXIX CONGRESO NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA

"Translational Medicine,  
From Bench to Bedside"

Llevado a cabo del 4 al 7 de Octubre de 2017  
en Monterrey, N.L., México  
"Aieve Flammas Veritatis"

Dr. med. Edelmir Pérez Rodríguez  
Director

Dr. med. José Gerardo González González  
Subdirector de Investigación

Dr. C. Guillermo Elizondo Riojas  
Secretario de Fomento a la Investigación

Dr. med. Conrado Treviño Garza  
Coordinador XXIX Congreso Nacional  
de Investigación en Medicina



La Facultad de Medicina de la UANL, a través de la Subdirección de Educación Continua, otorgan el presente

# RECONOCIMIENTO

**Dr. Alejandro Quiroga Garza**

Por su participación como PROFESOR con el tema  
"Anatomía de cordón umbilical y técnica de micro disección"  
en el

## "Curso-Taller Morfología de Vasos Sanguíneos"

Realizado en el Aula 5 y el Laboratorio de Microscopía Electrónica del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, el 25 y 26 de noviembre de 2016.

"Alere Flammam Veritatis"  
Monterrey, N.L. 25 de noviembre de 2016.

  
Dr. med. Santos Guzmán López  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA



  
Dr. Félix Ramón Cedillo Salazar, FACC  
SUBDIRECTOR DE EDUCACIÓN CONTINUA



La Universidad Autónoma de Nuevo León  
a través de la Secretaría de Investigación, Innovación y Sustentabilidad  
otorga el presente *Reconocimiento a:*

**Brenda Martínez González**

**Por la presentación de su trabajo titulado:**

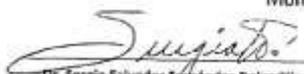
*Conductas utilizadas en la cirugía de revascularización miocárdica.  
Importancia de los estudios morfológicos.*

**Asesor: Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña**

**Coadyutores: Dra. Brenda Martínez González, Dr. Alejandro Quiroga Garza, Dr. Víctor Rodríguez Rodríguez, Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Omaña, Dr. med. Santos Guzmán López.**

Que participó en el IV Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Nuevo León,  
auspiciado por la UANL y el CONACYT

Monterrey, N.L. octubre de 2016

  
Dr. Sergio Salvador Fernández Delgadillo  
Secretario de Investigación, Innovación y Sustentabilidad

  
Dra. Patricia Del Carmen Zambrano Robledo  
Directora de Investigación



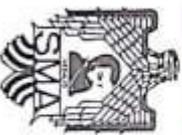
# XXVI CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA

DR. ALBERTO ARANDA DE LA PARRA



Sociedad Mexicana de AnATOMÍA, A.C., Departamento de Medicina y Nutrición  
2016 Año Académico Dr. Soledad de Larralde  
Universidad Autónoma de Guanajuato - León

OTORCAN LA PRESENTE



## Constancia



Martínez-González B, Reyes-Hernández CG, Quiroga-Garza A,  
Rodríguez-Rodríguez VE, Esparza-Hernández CN, Elizondo-Omaña RE,  
Guzmán-López S.

Por haber presentado el trabajo titulado:

CONDUCTOS UTILIZADOS EN LA CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN  
MIOCARDICA. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.

XXVI Congreso Nacional de Anatomía  
León, Guanajuato 26 al 30 de septiembre de 2016

Dr. William H. Ortiz Briceño  
Presidente SMA

Dr. Francisco E. González Bravo  
Director, Medicina U Gio - León.

 **Wolters Kluwer**

When you have to be right

# XXVI CONGRESO NACIONAL DE ANATOMÍA

DR. ALBERTO ARANDA DE LA PARRA



Sociedad Mexicana de AnATOMÍA, A.C., Departamento de Medicina y Nutrición  
2016 Año Académico Dr. Soledad de Larralde  
Universidad Autónoma de Guanajuato - León

OTORCAN LA PRESENTE



## Constancia



Martínez-González B, Reyes-Hernández CG, Quiroga-Garza A,  
Rodríguez-Rodríguez VE, Esparza-Hernández CN, Elizondo-Omaña RE,  
Guzmán-López S.

Por haber presentado el trabajo titulado:

CONDUCTOS UTILIZADOS EN LA CIRUGÍA DE REVASCULARIZACIÓN  
MIOCARDICA. IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.

XXVI Congreso Nacional de Anatomía  
León, Guanajuato 26 al 30 de septiembre de 2016

Dr. William H. Ortiz Briceño  
Presidente SMA

Dr. Francisco E. González Bravo  
Director, Medicina U Gio - León.

 **Wolters Kluwer**

When you have to be right

## CONSTANCIA

a:  
**Dr. Alejandro Quiroga Garza**



Por su participación como ponente en el  
**"CURSO INTERNACIONAL DE AVANCES EN INVESTIGACIÓN VASCULAR  
Y PROGRAMACIÓN FETAL DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR"**  
Llevado a cabo el 26 y 27 de enero de 2016 en Monterrey N.L. México

**"Alere Flammam Veritatis"**  
Monterrey, N.L. 27 de enero de 2016



Dr. med. Santos Guzmán López  
Director  
Facultad de Medicina UANL



Dr. med. José Gerardo González  
Subdirector de Investigación  
Facultad de Medicina UANL



Dr. C. Guillermo Elizondo Rojas  
Secretario de Fomento a la Investigación  
Facultad de Medicina UANL



Dr. C. Rodrigo E. Elizondo Ormañá  
Secretario de Investigación en Ciencias Básicas  
Facultad de Medicina UANL

