



INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El Dr. D. Francisco Javier Iglesias Muñoz y el Dr. D. José Manuel Gonzalo Orden como Directores de la Tesis Doctoral titulada "Desarrollo y análisis de un protocolo de descellularización para la obtención de válvulas cardíacas acelulares" realizada por Dña. Jennifer Ramos Carro en el programa de doctorado Medicina, cirugía y anatomía veterinaria, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a de de

Fdo: Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz

Fdo: José Manuel Gonzalo Orden



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA, CIRUGÍA

Y ANATOMÍA VETERINARIA

**DESARROLLO Y ANÁLISIS DE UN PROTOCOLO DE
DESCELULARIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE
VÁLVULAS CARDIACAS ACELULARES**

Tesis doctoral dirigida por

Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz y Dr. José Manuel Gonzalo Orden

JENNIFER RAMOS CARRO

León, Octubre 2014

“La única posibilidad de descubrir
los límites de lo posible es aventurarse
un poco más allá de ellos...
¡hacia lo imposible!”
Arthur C. Clarke

A todas aquellas sonrisas que me
han acompañado en esta aventura.
¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS

En la reflexión realizada para la redacción de este apartado, he sido consciente de la gran cantidad de personas que se han involucrado con el presente proyecto, aportando la ilusión y el trabajo necesarios para llevarlo a cabo, a todos vosotros... ¡Mil gracias!

En primer lugar, agradecer a mis directores de tesis por brindarme esta oportunidad, por enseñarme y darme ánimos durante el proceso. Al Dr. José Manuel Gonzalo Orden por su amabilidad, disponibilidad y, sobretodo, por su apoyo en los momentos más difíciles. Al Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz, ¡qué puedo decir!, te lo debo todo. Aún hoy sigo preguntándome sobre la razón de tu confianza ciega en mí desde el principio, te lo agradezco infinitamente; gracias por ser el mejor de los referentes y haber fomentado activamente mi desarrollo profesional y personal.

Gracias a mi *dream team*. A la próxima doctora, Marta López Laguna, compañera de viaje desde los inicios, he sido afortunada al compartir codo con codo el trabajo con una gran profesional y mejor persona, gracias por tu paciencia, apoyo y generosidad. A la futura doctora, Ana Fernández González, mi *ojín* derecho, ni con todas las palabras incluidas en la RAE podría expresar lo que ha implicado tenerte a mi lado este tiempo, gracias en todos los sentidos posibles. A Helen Izquierdo Martínez, llegaste la última pero te ha bastado poco tiempo para dejar huella, has tenido un papel esencial en el impulso de una parte importante en este trabajo y ha sido un auténtico placer haber compartido ilusión, ganas y esfuerzo contigo.

Gracias por haberme enseñado a trabajar en equipo, por las experiencias disfrutadas y por las risas/lágrimas vividas.

Al Servicio de cirugía cardíaca del Complejo asistencial universitario de León (CAULE), habéis sido el motor y esencia de este proyecto y ha sido un privilegio haber podido colaborar con vosotros. En especial, al Dr. Mario Castaño, *alma mater* y principal impulsor, y a Jesús Gómez-Plana, creo que no se podría tener mejor compañero, gracias por enriquecer estos 6 años no sólo a nivel profesional sino a nivel personal.

Al Servicio de anatomía patológica del CAULE, por el procesado de las muestras histológicas y, en especial, a Nieves Alonso. Gracias por introducirme en el fascinante mundo del corazón y enseñarme a interpretar los resultados obtenidos.

Al Banco de tumores del CAULE, en especial a Cristina Díez por asistirme en la captura de imágenes por microscopía.

A la Dra. Ana Carvajal, por estar siempre dispuesta a buscar soluciones, representando la eficiencia personificada.

Al Departamento de medicina, cirugía y anatomía veterinaria de la Universidad de León, por su colaboración en el desarrollo del modelo experimental. En especial a la Dra. Marta Regueiro, gracias por tu disponibilidad, profesionalidad y buen hacer.

Al Departamento de genética de la Universidad de León, gracias por darme cobijo en esta última etapa, ha sido reconfortante volver a los orígenes y hacerme sentir como en casa. En especial al Dr. Luis Saenz de Miera, sin duda empecé en el mundo de la investigación de tu mano, y este trabajo es el resultado de tus sabios consejos. Una vez más has convertido lo difícil en fácil, enseñándome a defenderme en el mundo estadístico, gracias por enseñarme a pescar y no darme el pescado.

Al Laboratorio de resistencia de materiales de la Escuela técnica superior de ingenieros industriales de Madrid, en especial a Antonio Ros por facilitar la realización de los ensayos biomecánicos y a Marcos Moreno por la impecable ejecución de los mismos; ha resultado muy gratificante trabajar con vosotros.

Al Servicio de microscopía de la Universidad de León, gracias por vuestra paciencia y asistencia en el procesado de las muestras.

Para la realización de este trabajo ha sido imprescindible la ayuda y colaboración de todo el personal del Matadero municipal de Pola de Gordón, gracias por facilitarme la recogida de muestras durante 6 años, voy a echar de menos los viajes y charlas semanales.

Al profesor Felipe Ruiz, principal impulsor de mi desarrollo profesional, gracias por tu ánimo y optimismo constantes.

A la Dra. Paula Arroyo, después de unos años hemos vuelto a coincidir y me has brindado toda tu ayuda incondicionalmente.

A Gracia de Garnica, por ayudarme en la última fase de histología y ser mi compañera de *merendolas*, ¡eres grande!

A la empresa Micros, gracias por compartir las instalaciones en esta última fase del proyecto y facilitarme el trabajo en el día a día.

A la empresa Air Liquide, especialmente a Miguel Ángel Seco, por colaborar en la finalización de este proyecto.

A David Álvarez, por ser mi informático personal, echarme las dos manos con la edición fotográfica y en todas mis crisis binarias.

A Felisa Fernández por su ánimo, ayuda y correcciones con el inglés.

A mis correctores externos, Diego García y Raquel Campos, ¡sois mi promotor y analista preferidos!

A Carlos Rodríguez, editor del presente trabajo, gracias por tu rigurosidad y sabiduría; sin ti no hubiese sido lo mismo.

Al futuro doctor Andoni Otero, eres el vivo ejemplo de ayuda y disponibilidad, gracias por todo.

Dicen que no hay mal que por bien no venga, a la tribu *Omaha*, gracias por ser el mejor ejemplo de cómo une la adversidad.

Finalmente quiero agradecer a las personas que han aportado lo más importante de todo, apoyo incondicional aún a sabiendas que habéis sufrido los mayores daños colaterales al enfrascarme en este trabajo, perdonad mis ausencias.

A Laura y Silvia Rosino, simplemente gracias por quererme, apoyarme y ser mis referentes.

A Javi, sabes lo esencial que ha sido tu apoyo y el de tu familia, gran parte de lo que hay aquí os lo debo a vosotros, ¡gracias por todo!

A mis amigos, porque habéis sido el mejor aliciente para continuar esta aventura y porque, sin duda, estoy hecha de pedacitos de vosotros.

A mi familia, en especial a mi madre. No tendré días suficientes para agradecerte el haberme dado la oportunidad de llegar hasta aquí. Gracias por representar la pasión por el trabajo, el buen hacer hacia uno mismo y hacia los demás, y sobre todo, por enseñarme que la sonrisa es la mejor herramienta para trabajar.

FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias al apoyo económico de las siguientes instituciones:

- Diputación provincial de León, Fundación Clínica San Francisco y Universidad de León, a través de una beca de formación de personal investigador bajo la Cátedra extraordinaria Manuel Elkin Patarroyo.

- Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, a través de la concesión de un Proyecto de Investigación en Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud. Título del Proyecto: *Evaluación in vivo de la funcionalidad de nuevas bioprótesis valvulares basadas en la combinación de andamiajes biológicos y células de origen autólogo*. Año de concesión: 2011. Código del proyecto: GRS/697/A/11.

ÍNDICE

I- RESUMEN/SUMMARY	23
RESUMEN.....	25
SUMMARY	27
II- INTRODUCCIÓN	29
1- EL SISTEMA CIRCULATORIO	31
1.1- ANATOMÍA DEL SISTEMA CIRCULATORIO.....	32
1.2- HISTOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.....	34
2- EL CORAZÓN Y LAS VÁLVULAS CARDIACAS	36
2.1- ANATOMÍA DEL CORAZÓN	36
2.2- HISTOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DEL CORAZÓN.....	37
2.3- ANATOMÍA DE LAS VÁLVULAS CARDIACAS	39
2.4- HISTOLOGÍA DE LAS VÁLVULAS CARDIACAS.....	41
2.5- BIOLOGÍA CELULAR DE LAS VÁLVULAS CARDIACAS.....	44
3- PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LAS VÁLVULAS CARDIACAS.....	46
3.1- ESTENOSIS AÓRTICA	47
3.2- INSUFICIENCIA AÓRTICA.....	50
4- TRATAMIENTO.....	51
4.1- VÁLVULAS MECÁNICAS.....	51
4.2- BIOPRÓTESIS	53
5- INGENIERÍA TISULAR	55
6- DESCELULARIZACIÓN	58
6.1- TRAYECTORIA	58
6.2- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA DESCELULARIZACIÓN DE TEJIDOS... 60	
6.3- PROTOCOLOS DE DESCELULARIZACIÓN.....	61

III- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 69

1- JUSTIFICACIÓN 71
2- HIPÓTESIS..... 73
3- OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS..... 73

IV- MATERIAL Y MÉTODO 75

OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS..... 78
OBJETIVO 1: ANALIZAR LAS COMBINACIONES GENERADAS A PARTIR DE LAS
CONDICIONES EXPERIMENTALES CHOQUES OSMÓTICOS Y CHOQUES DE PH 80
 1.1- MEDICIÓN DE LA OSMOLALIDAD..... 83
 1.2- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS 83
OBJETIVO 2: DESARROLLAR Y OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE
DESCELULARIZACIÓN QUE PRESERVE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y
ELIMINE LOS RESTOS CELULARES GENERADOS 87
 2.1- ESTANDARIZACIÓN DE UN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO MEDIANTE LA
 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS..... 87
 2.2- VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA ESTRUCTURA
 DE LA MATRIZ 90
 2.3- DESCRIPCIÓN DE UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN ÓPTIMO
 90
OBJETIVO 3: CARACTERIZAR LAS ESTRUCTURAS ACELULARES OBTENIDAS..... 94
 3.1- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA/AUSENCIA DE CÉLULAS VIABLES EN
 EL TEJIDO..... 94
 3.1.1- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) ..94
 3.1.2- ESTUDIOS DE VIABILIDAD TISULAR..... 95
 3.2- VALORACIÓN DEL ESTADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR..... 97

3.2.1- CARACTERIZACIÓN BIOMECÁNICA	97
3.2.2- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	99
OBJETIVO 4: EVALUAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS Y REALIZAR UN ENSAYO DE BIOCOMPATIBILIDAD	100
4.1- AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL COMPONENTE CELULAR.....	100
4.2- CITOTOXICIDAD DEL MEDIO DE DESCELULARIZACIÓN	102
4.3- BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS MATRICES ACELULARES	103
5- MICROBIOLOGÍA.....	107
6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	107

V- RESULTADOS..... 109

OBJETIVO 1: ANALIZAR LAS COMBINACIONES GENERADAS A PARTIR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES CHOQUES OSMÓTICOS Y CHOQUES DE PH	111
1.1- MEDICIÓN DE LA OSMOLALIDAD.....	112
1.2- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	114
1.2.1- MUESTRAS EN FRESCO	114
1.2.2- PROTOCOLO N/N (NEUTRO/NEUTRO)	116
1.2.3- PROTOCOLO N/A (NEUTRO/ÁCIDO)	118
1.2.4- PROTOCOLO N/B (NEUTRO/BÁSICO).....	120
1.2.5- PROTOCOLO A/N (ÁCIDO/NEUTRO)	122
1.2.6- PROTOCOLO A/A (ÁCIDO/ÁCIDO).....	124
1.2.7- PROTOCOLO A/B (ÁCIDO/BÁSICO).....	126
1.2.8- PROTOCOLO B/N (BÁSICO/NEUTRO).....	128
1.2.9- PROTOCOLO B/A (BÁSICO/ÁCIDO).....	130
1.2.10- PROTOCOLO B/B (BÁSICO/BÁSICO).....	132
1.2.11- ENSAYO CIEGO	134

OBJETIVO 2: DESARROLLAR Y OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN QUE PRESERVE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y ELIMINE LOS RESTOS CELULARES GENERADOS	140
2.1- ESTANDARIZACIÓN DE UN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	140
2.1.1- ANÁLISIS GLOBAL DE LOS DATOS.....	141
2.1.2- ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO	152
2.1.3- ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL TEJIDO	158
2.1.4- PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	166
2.2- VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MATRIZ.....	167
OBJETIVO 3: CARACTERIZAR LAS ESTRUCTURAS ACELULARES OBTENIDAS....	176
3.1- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA/AUSENCIA DE CÉLULAS VIABLES EN EL TEJIDO.....	176
3.1.1- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	176
3.1.2- ESTUDIOS DE VIABILIDAD TISULAR.....	178
3.2- VALORACIÓN DEL ESTADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	180
3.2.1- CARACTERIZACIÓN BIOMECÁNICA	180
3.2.2- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	187
OBJETIVO 4: EVALUAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS Y REALIZAR UN ENSAYO DE BIOCOMPATIBILIDAD	196
4.1- AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL COMPONENTE CELULAR.....	196
4.2- CITOTOXICIDAD DEL MEDIO DE DESCELULARIZACIÓN	197
4.3- BIOCOMPATIBILIDAD DE LAS MATRICES ACELULARES	199

VI- DISCUSIÓN	203
OBJETIVO 1: ANALIZAR LAS COMBINACIONES GENERADAS A PARTIR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES CHOQUES OSMÓTICOS Y CHOQUES DE PH	209
OBJETIVO 2: DESARROLLAR Y OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN QUE PRESERVE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y ELIMINE LOS RESTOS CELULARES GENERADOS	214
OBJETIVO 3: CARACTERIZAR LAS ESTRUCTURAS ACELULARES OBTENIDAS....	219
OBJETIVO 4: EVALUAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS Y REALIZAR UN ENSAYO DE BIOCMPATIBILIDAD	226
VII- CONCLUSIONES	229
VIII- PERSPECTIVAS FUTURAS	233
1- MODELO EXPERIMENTAL OVINO	235
2- APLICACIÓN EN OTRAS ÁREAS DE INTERÉS.....	236
3- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	237
IX- BIBLIOGRAFÍA	239
X- ÍNDICE DE FIGURAS	267
XI- ÍNDICE DE TABLAS	273
XII- ÍNDICE DE ABREVIATURAS	275
XIII- ANEXOS	279
ANEXO I- MATERIAL.....	281
ANEXO II- PROTOCOLOS.....	289



I-



Resumen/Summary

RESUMEN

Las patologías que afectan a las válvulas cardíacas son uno de los campos más dinámicos dentro de la medicina cardiovascular, con multitud de investigaciones realizadas en el área de la ingeniería tisular. En el presente trabajo, ubicado en este ámbito, se pretende aportar un novedoso protocolo de descelularización como método que genere válvulas cardíacas acelulares.

Para ello se analizó la combinación de dos factores potencialmente descelularizantes, el pH y la osmolaridad. Estas condiciones experimentales fueron clave en la selección de dos protocolos que eliminasen el componente celular y preservasen la estructura tridimensional del tejido.

Los estudios microestructurales, de viabilidad tisular, biomecánicos, bioquímicos, de citotoxicidad y de biocompatibilidad, permitieron caracterizar las matrices acelulares obtenidas. En base a estos análisis, se pudo realizar la elección del protocolo de descelularización óptimo. Además, se demostró su reproducibilidad y eficiencia en la eliminación de los ácidos nucleicos y la conservación de las proteínas constituyentes de la matriz extracelular.

Los resultados mostraron que la innovadora combinación de choques osmóticos y de pH, es capaz de generar estructuras tridimensionales acelulares, en un tejido con un elevado componente celular como son las válvulas cardíacas ovinas, libres de material genético, sin toxicidad y, por tanto, biocompatibles.

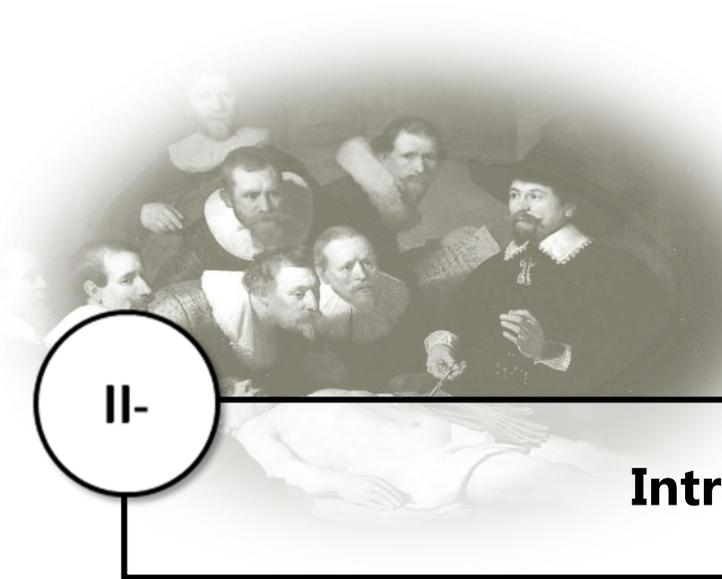
SUMMARY

Valvular heart disease is one of the most dynamic areas into cardiovascular medicine. Tissue engineering has been one of the most important research fields applied to this pathology. In the present doctoral research, the main goal was to develop a new decellularization technique to obtain acellular heart valves.

We analyzed the combination of two potential factors in a decellularization process: the pH and the osmolarity. Those experimental conditions were the key in the selection of two protocols that were able to eliminate cellular components and to preserve the tridimensional tissue structure.

An acellular matrix characterization was carried out through microstructural studies, tissue viability, biomechanical and biochemical assays, cytotoxicity and biocompatible tests. We selected the optimal decellularization protocol, verifying that it was efficient and reproducible in order to eliminate nucleic acid and to preserve extracellular matrix proteins.

Results showed that this new combination of pH and osmolarity shocks were useful in a high cellular density tissue as that of ovine heart valves. Also, it could be a tool to generate no toxic acellular tridimensional structures, free of genetic material and biocompatible.



II-

Introducción

1- EL SISTEMA CIRCULATORIO

El sistema circulatorio es una estructura anatómica formada por el corazón y los vasos sanguíneos. Permite un movimiento continuado de todos los líquidos del organismo facilitando así el transporte de oxígeno y elementos nutritivos, la retirada de anhídrido carbónico y desechos metabólicos, la regulación de la temperatura y la distribución de moléculas y células del sistema inmunitario.¹⁸⁷

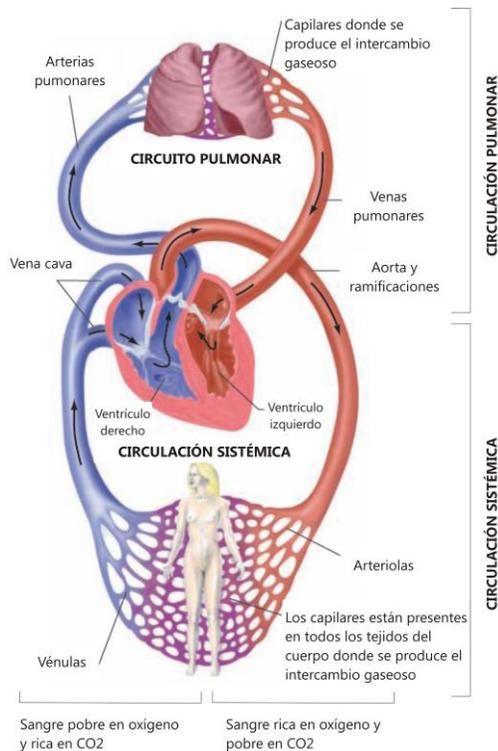


Figura 1: Representación esquemática del flujo unidireccional en la circulación pulmonar y sistémica. Modificado y traducido de Clark RK. Anatomy and Physiology of the cardiovascular system. En Anatomy and Physiology: Understanding the human body. 1ª Edición. Jones & Bartlett Learning; 2005:35-51.

El movimiento se genera en el corazón que, en una acción coordinada, bombea sangre oxigenada hacia los tejidos, de donde regresa como sangre venosa, y nuevamente es bombeada hacia los pulmones, para su oxigenación, regresando otra vez al corazón para su suministro sistémico (Figura 1).^{187,145}

1.1- ANATOMÍA DEL SISTEMA CIRCULATORIO

En la circulación sanguínea juega un papel esencial todo un intrincado sistema de vasos, el sistema vascular, que decrecen en tamaño según se alejan del corazón (arterias y arteriolas) finalizando en los capilares (donde se produce el intercambio gaseoso y de nutrientes), y luego incrementan el tamaño según se acercan al corazón (vénulas y venas).³¹

En las paredes vasculares se pueden diferenciar tres capas, interna, media y adventicia (Figura 2).^{31,27} En la capa más interna, (*tunica intima*) se asienta el endotelio vascular constituyendo la capa más delgada de la estructura. La capa media (*tunica media*) es la capa más gruesa del vaso y su componente celular, junto con las células endoteliales, está implicado en los fenómenos de crecimiento, maduración y remodelación vascular.²⁷ Además, el músculo liso contenido en esta capa tiene un papel esencial en los fenómenos de vasodilatación y vasoconstricción.¹⁷⁶ Por último, la capa más externa (*tunica adventitia*) es delgada y está implicada en la regulación del tráfico celular, como mediador de la respuesta inmune y en procesos de remodelación vascular.²⁷

En concreto, la arteria aórtica y la arteria pulmonar presentan una capa interna más compleja, compuesta por endotelio y subendotelio, y una capa media más gruesa, donde las estructuras concéntricas de células de músculo liso se alternan con membranas elásticas fenestradas.¹³

Los capilares, que conectan las arteriolas y las vénulas, presentan una anatomía característica al ser los vasos sanguíneos de menor diámetro.¹⁴⁵ Están conformados por un endotelio semipermeable que favorece todos los procesos de intercambio que se producen.¹³

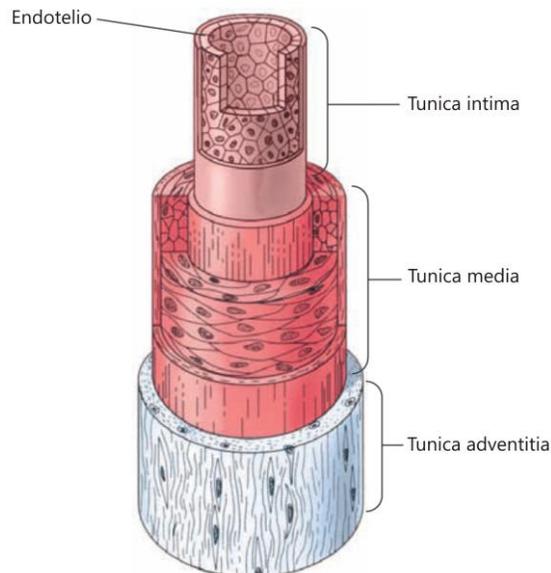


Figura 2: Estructura general de un vaso sanguíneo. Se pueden diferenciar las 3 capas anatómicas: íntima, media y adventicia. Tomado y traducido de Clark RK. *Anatomy and Physiology of the cardiovascular system*. En *Anatomy and Physiology: Understanding the human body*. 1ª Edición. Jones & Bartlett Learning; 2005:35-51.

1.2- HISTOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

Si se profundiza en la microestructura de los vasos sanguíneos, se puede observar que cada una de las capas presenta una complejidad histológica asociada a diferentes funciones fisiológicas (Figura 3).



Figura 3: Corte histológico de una arteria. Se aprecian las 3 capas anatómicas de la arteria: íntima, media y adventicia. Existen grandes diferencias en cuanto al grosor de las capas, siendo mayor en la capa media. En este corte histológico, al corresponderse con una arteria principal, concretamente la pulmonar, se puede observar cómo la capa íntima presenta subendotelio, visualizándose el endotelio que lo recubre (flecha negra). Además, se puede apreciar la organización de las fibras elásticas y de colágeno en láminas elásticas fenestradas (flecha roja). Tinción hematoxilina-eosina (H-E). Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro.

CAPA INTERNA O ÍNTIMA. Está compuesta por una membrana de tejido conectivo, conformada por fibras elásticas y de colágeno (sobre todo tipo III), sobre la que se asienta un epitelio escamoso simple o endotelio vascular,³¹ mencionado anteriormente (Figura 3). Además, en la zona subendotelial, se encuentra un nicho de células progenitoras endoteliales (*Endothelial Progenitor Cells, EPC*).²⁷

CAPA MEDIA. Está constituida por tejido muscular liso y una gruesa capa de fibras elásticas.¹⁸⁷ Entre las fibras de elastina y colágeno se encuentran las fibras de células de músculo liso (*Smooth Muscle Cells, SMC*). Estas células tienen un papel importante en el mantenimiento de la tensión de la pared de la arteria¹²⁰ y constituyen la parte activa en la regulación de la presión sanguínea, a través de la fosforilación de la miosina. En esta capa existen multitud de pericitos, entre los capilares de los haces musculares, que regulan la contractilidad vascular y estabilizan los vasos sanguíneos.¹³

CAPA ADVENTICIA. Como componentes se puede encontrar colágeno, fibras elásticas y células del tejido conectivo, con vasos sanguíneos que penetran, *vasa vasorum*. Las células propias de esta capa, comienzan un proceso de proliferación y migración hacia la capa media e íntima y se diferencian a SMC.¹³

2- EL CORAZÓN Y LAS VÁLVULAS CARDIACAS

2.1- ANATOMÍA DEL CORAZÓN

El estudio del corazón, como centro dinámico de la amplia red vascular, ha suscitado interés a lo largo de la historia.¹⁵⁷ Se trata de un órgano fibromuscular hueco, en forma de cono irregular, situado entre los sacos pleurales, en el medio del mediastino contenido en la cavidad torácica.¹⁰⁶

Se encuentra cubierto por un saco fibroso, el pericardio, que contiene un fluido seroso que reduce la fricción con las estructuras adyacentes. La capa parietal del pericardio se ancla a las raíces de los grandes vasos y continúa con la capa visceral que cubre todo el corazón, el endocardio.¹⁷⁷

Estructuralmente, presenta cuatro cavidades, dos superiores denominadas aurículas o atrios y dos inferiores o ventrículos.^{187, 145} En la entrada y/o salida de los mismos, se encuentran localizadas las cuatro válvulas cardíacas.

Las válvulas mitral y tricúspide (constituidas por dos y tres velos) conectan las aurículas con los ventrículos y poseen control de apertura y cierre; mientras que las válvulas semilunares (constituidas por tres velos o valvas), aórtica y pulmonar, conectan los ventrículos con las arterias, presentando un funcionamiento más pasivo (Figura 4).⁸⁶ La función fisiológica de estos mecanismos es mantener un flujo (ml/min) unidireccional y no obstructivo, sin dañar los elementos sanguíneos contenidos, evitando el contacto entre la sangre oxigenada y la sangre sin oxigenar.⁶⁸

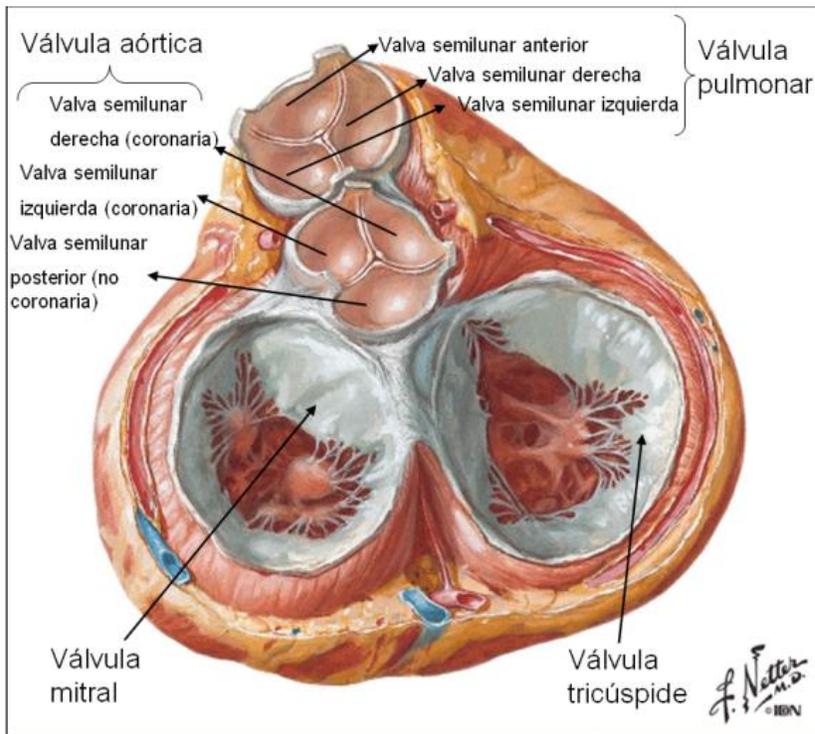


Figura 4: Corazón en diástole visto desde la base con los atrios (aurículas) extirpados. Válvulas y esqueleto fibroso del corazón. Modificado y traducido de Netter FH. Atlas de Anatomía Humana. 3ª Edición. Mason; 2003.

2.2- HISTOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR DEL CORAZÓN

Las paredes de las cámaras cardíacas están constituidas por tres capas principales: una envoltura externa, el epicardio, una capa media, el miocardio y una capa interna, el endocardio.^{106,177}

El epicardio es la capa más externa y se corresponde con la capa del pericardio visceral, formado por tejido conectivo y tejido adiposo.¹⁴⁵

El miocardio o músculo cardíaco, es la capa mayoritaria del corazón y su función principal es propulsar la sangre fuera de las cavidades.³¹ Está compuesta por fascículos digitiformes de células de músculo cardíaco o miocitos. Dichos fascículos se alternan longitudinal o transversalmente y se unen entre ellos por tejido conectivo, que se encuentra muy irrigado por capilares sanguíneos, capilares linfáticos y fibras nerviosas (Figura 5).^{106,177}

Por último, el endocardio es un epitelio adherido a una fina capa de tejido conectivo elástico que recubre todas las cavidades internas.³¹

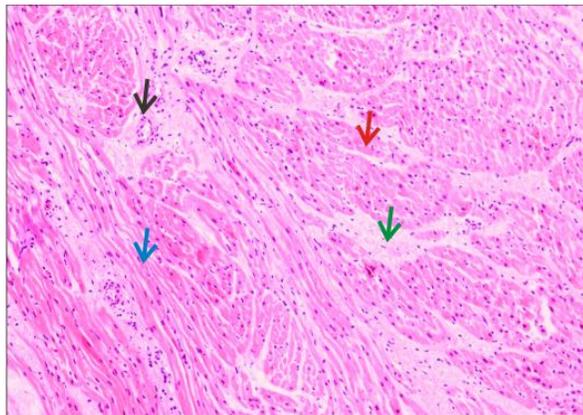


Figura 5: Corte histológico de miocardio. Se pueden observar los haces de fibras tanto longitudinal (flecha azul) como transversalmente (flecha roja). Además se puede apreciar el tejido conectivo entre ambas (flecha verde) donde se encuentra alojada una gran red de vasos sanguíneos (flecha negra). Tinción H-E. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro.

2.3- ANATOMÍA DE LAS VÁLVULAS CARDIACAS

Si se estudia con más detalle la anatomía de las válvulas semilunares aorta y pulmonar, se observa una compleja estructura al encontrarse conformadas por tres tipos tisulares diferentes: la arteria, cuya estructura histológica se ha descrito en el apartado 1.2, el faldón muscular o miocardio, detallado en el apartado 2.1, y los velos semilunares.

Los velos semilunares son repliegues membranosos delgados en los que se diferencian cuatro zonas,⁶⁸ una cara superior o parietal cóncava, una cara inferior o axial convexa, un borde adherente curvo y cóncavo superiormente, por el cual la valva se une a la arteria y, por último, un borde libre, casi horizontal, que presenta en su parte media un pequeño abultamiento formado por un nódulo fibroso, llamado nódulo del velo semilunar (Figura 6). Éste, si se localiza en la válvula aórtica se denomina nódulo de *Arancio*, descrito por *Leonardo da Vinci*,⁶ y nódulo de *Morgagni* si se localiza en la válvula pulmonar.

La región comprendida entre los bordes libres y las comisuras se denomina *lúnula* y el contacto con los otros velos permite un sellado correcto durante el cierre de la válvula en diástole.¹⁸ Las dilataciones, que presenta el tracto ventrículo arterial en la parte posterior de los velos, se denominan senos de *Valsalva* (Figura 6). Dichos senos se llenan de sangre cuando disminuye la velocidad del flujo sanguíneo, a una presión de 85 mmHg en la válvula aorta y 18 mmHg en la válvula pulmonar durante la diástole, facilitando su cierre (Figura 4).⁷⁴

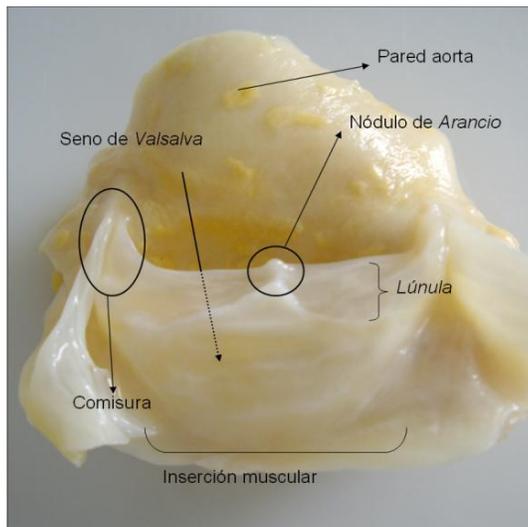


Figura 6: Aspecto macroscópico de un velo de la válvula aorta. Velo posterior de la válvula aórtica, fijado en paraformaldehído al 4%, donde se indican las principales zonas anatómicas de los velos semilunares.

In vivo, los velos semilunares están expuestos a un estado dinámico y complejo de estrés mecánico,¹⁵⁴ estrés intenso durante el paso del flujo sanguíneo (apertura), flexión (apertura y cierre) y tensión (cierre) (Figura 7). Cabe destacar que las válvulas cardíacas se abren y cierran aproximadamente 40 millones de veces al año y cerca de 3 billones de veces durante la vida de una persona, pasando cerca de 8.000 litros de sangre al día.^{113,55} En un estado no patológico, las válvulas semilunares se caracterizan por ser no-obstructivas cuando se abren, ser unidireccionales, ser competentes (habilidad para evitar el reflujo) cuando se cierran, no ser trombogénicas, no ser dañinas para las células sanguíneas, ser resistentes a la infección y ser capaces de reparar y remodelar la matriz extracelular ante una agresión.^{154,112}

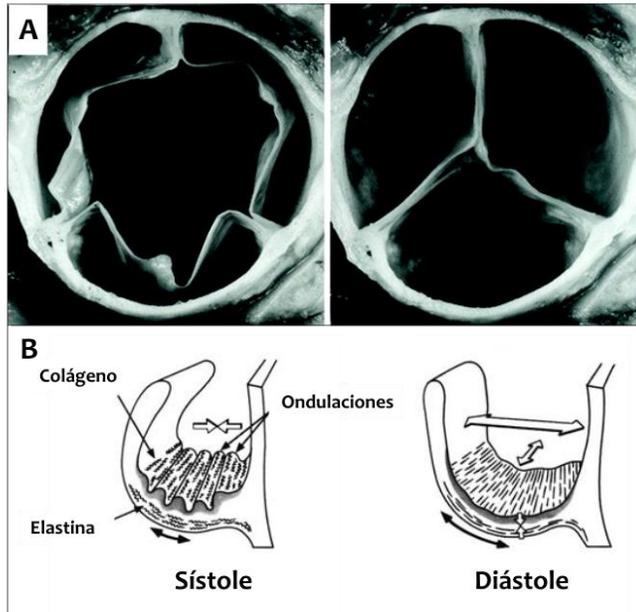


Figura 7: Estructura funcional macroscópica de los velos valvulares. (A) Aspecto de la válvula aórtica abierta (izquierda) y cerrada (derecha), correspondiente a la sístole y diástole respectivamente. (B) Descripción esquemática de la conformación de la elastina y el colágeno durante el ciclo cardiaco. Modificado y traducido de K. Mendelson y F. J. Schoen. Heart Valve Tissue Engineering: Concepts, Approaches, Progress, and Challenges. Ann Biomed Eng. 2006;34(12):1799-819.

2.4- HISTOLOGÍA DE LAS VÁLVULAS CARDIACAS

Desde un punto de visto histológico, las válvulas cardiacas presentan tres características.⁶⁸ 1- Ausencia de vasos sanguíneos, debido a que son lo suficientemente delgadas como para recibir los nutrientes por difusión del torrente sanguíneo. 2- Presencia de fibras nerviosas,¹⁰⁸ aunque se desconoce su significado funcional.

3- Estructura de los velos valvulares compuesta por tres capas claramente diferenciadas (de arteria a ventrículo): fibrosa, esponjosa y *ventricularis*.¹¹²

Las características estructurales únicas que presenta la matriz extracelular, con la combinación de estas tres capas, generan un perfil biomecánico especializado para una correcta funcionalidad (Figura 8).⁷⁴

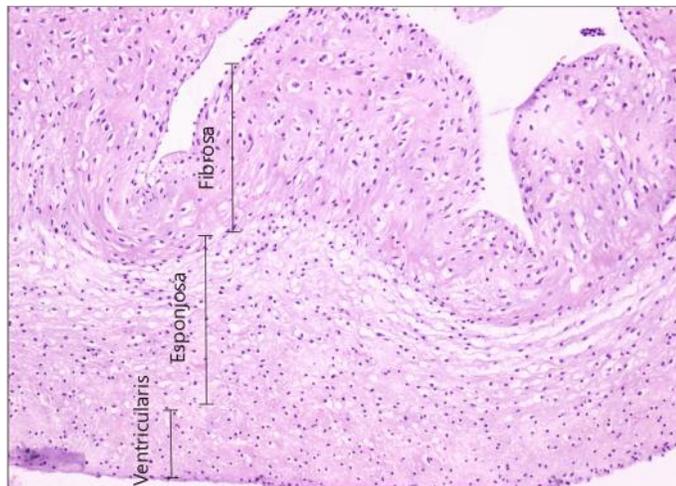


Figura 8: Corte histológico de velo valvular. Se pueden diferenciar las 3 capas histológicas características: fibrosa, esponjosa y ventricularis. Tinción H-E. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro.

CAPA FIBROSA. Supone la unidad de soporte de la válvula y está compuesta por haces de colágeno¹¹³ (mayoritariamente de tipo I y tipo III) dispuestos en dirección transversa a los velos de forma que

se puedan formar ondulaciones* durante la apertura de las válvulas. La conformación en forma de bucles permite la elongación de los velos con un estrés mínimo (Figura 7- B) además, el alineamiento macroscópico del colágeno forma cuerdas que transfieren fuerzas desde los velos hasta la pared de la arteria (Figura 8).¹⁸² Estas estructuras confieren la mayor resistencia mecánica en los velos.¹¹³

CAPA ESPONJOSA. Está constituida por un tejido conectivo desorganizado, a modo de sustancia semifluida. Los componentes mayoritarios de esta capa son proteoglicanos, colágeno orientado al azar y múltiples capas finas de tejido elástico.¹⁵⁵ Las cadenas de glucosaminoglicanos (GAG) están compuestas por moléculas cargadas negativamente, lo que le confiere una capacidad de unión al agua, formando una matriz porosa que permite la hidratación del tejido y así resistir las fuerzas de compresión. Esta capa, como zona intermedia, permite el acoplamiento de la fibrosa y la ventricularis a los cambios morfológicos.^{68,113} Los GAG presentes en las válvulas cardíacas humanas son predominantemente ácido hialurónico y, en menor medida, dermatán sulfato, condroitín-4 sulfato y condroitín-6 sulfato.

CAPA VENTRICULARIS. Es la más fina y orientada hacia los ventrículos, está constituida principalmente por fibras elásticas, que son las responsables de soportar ciclos de apertura y cierre y de mantener la estructura del colágeno en el estado ondulado.^{55,112}

*Las ondulaciones o *corrugations*, son estructuras en forma de acordeón que se forman en los velos cuando cambian de forma y dimensión durante el ciclo cardíaco, ver Figura 7.

2.5- BIOLOGÍA CELULAR DE LAS VÁLVULAS CARDIACAS

Respecto a la composición celular de las válvulas cardíacas, caben destacar dos tipos principales: las células endoteliales (*Valvular Endothelial Cells*, VEC) y las células intersticiales de los velos (*Valvular Interstitial Cells*, VIC).⁵⁵

VEC. Recubren tanto la superficie aórtica como la ventricularis de las válvulas cardíacas y tienen un papel crítico en la función circulatoria y en la interacción no trombogénica entre sangre y tejidos.⁵⁵ Además, conforman una membrana semipermeable que regula la transferencia de pequeñas y grandes moléculas a través de la pared vascular. Para ello, presentan una larga superficie con microapéndices que incrementan la exposición a sustancias metabólicas del torrente sanguíneo.¹⁵⁴ Son críticas en el control de procesos inflamatorios y reacciones inmunes, controlan la proliferación de otros tipos celulares y tienen un papel importante en el metabolismo y la síntesis proteica.

Se trata de una población celular muy activa que responde a estímulos externos cambiando su fenotipo y adquiriendo nuevas propiedades a través de un proceso conocido como *activación endotelial*.⁴⁸ Incluso hay datos que sugieren que estas células difieren del resto de células endoteliales alineándose en paralelo al flujo sanguíneo como respuesta ante un estrés mecánico (al contrario que el resto de células).⁴⁰

VIC. Se localizan en el interior de los velos, siendo su componente principal.¹¹² Son alargadas, con prolongaciones que interconectan unas células con otras, formando una red tridimensional.⁶⁸ Su

principal función es conferir estabilidad a la estructura de los velos y están involucradas en los procesos de síntesis y remodelación de la matriz extracelular.⁵⁵ Presentan características similares a las descritas para fibroblastos, miofibroblastos y SMC (Figura 9).¹⁶³

Existen cinco subpoblaciones de células VIC: embrionarias, progenitoras, quiescentes, activadas y osteoblásticas.^{112,113} Aunque las más relevantes son las VIC quiescentes y activadas, cada subtipo es único y pueden cambiar fenotípicamente de uno a otro dependiendo del ambiente mecánico en el que se encuentren, las señales químicas celulares, las señales hormonales o como respuesta ante un daño.⁴⁸ El movimiento constante y el roce con el resto de estructuras de los velos valvulares,⁴⁰ producen un daño valvular asociado a procesos de degradación que activan las funciones de reparación y mantenimiento de las VIC.

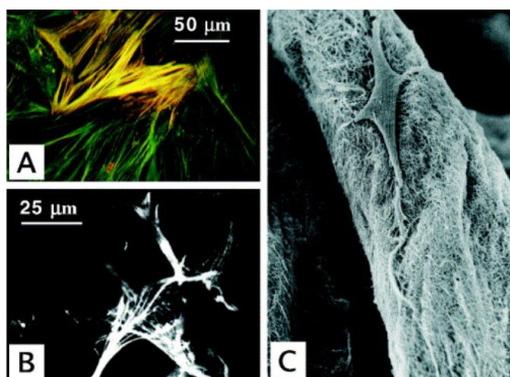


Figura 9: Aspecto de las células VIC con diferentes técnicas de imagen. (A) Fotomicrografía, en amarillo se muestra la tinción para α -actina (positivo para las VIC), en verde se muestran los fibroblastos. (B) Imagen de confocal de VIC cultivadas en una estructura de colágeno. (C) Imagen de microscopía de barrido de una célula VIC. Tomado de Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(2):113–118.

3- PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LAS VÁLVULAS CARDIACAS

La enfermedad valvular está considerada como un problema médico en todo el mundo. Por ejemplo, la Asociación americana del corazón, estimó que entre los años 1998 y 2005 se reemplazaron unas 300.000 válvulas cardíacas.¹⁴⁴ El crecimiento de la población y el aumento de la longevidad, son el marco de unas previsiones de unos 850.000 procesos de sustitución de válvulas cardíacas para el año 2050.¹¹²

Su prevalencia en la población española es de un 2,5% (no existen diferencias de frecuencias entre hombres y mujeres), porcentaje que va incrementándose con la edad desde un 0,7%, en edades comprendidas entre los 18 y 44 años de edad, hasta un 13,3%, en mayores de 75 años.^{41,124}

La patología de la enfermedad valvular se manifiesta de dos formas diferenciadas: estenosis e insuficiencia.¹¹² La estenosis se presenta cuando la válvula no se abre completamente, y tiene como resultado una disminución del flujo sistémico, mientras que la insuficiencia consiste en un reflujo sanguíneo debido a un cierre incompleto de las válvulas.^{41,99}

Como ya se ha detallado, la presión ejercida por el flujo sanguíneo en diástole es 5 veces mayor en la válvula aórtica que en la pulmonar,⁷⁴ lo que implica que las afecciones valvulares se presentan con mayor frecuencia en el tracto aórtico y es en esta localización donde se ha descrito ampliamente la patología valvular.

3.1- ESTENOSIS AÓRTICA

En los países desarrollados, la estenosis aórtica es la enfermedad valvular más prevalente en la población, sobre todo en personas adultas.²² Se caracteriza por largos periodos de tiempo en los que la estenosis aórtica permanece latente y, por tanto, asintomática, mientras que la supervivencia desciende drásticamente cuando los síntomas se desarrollan (Figura 10).

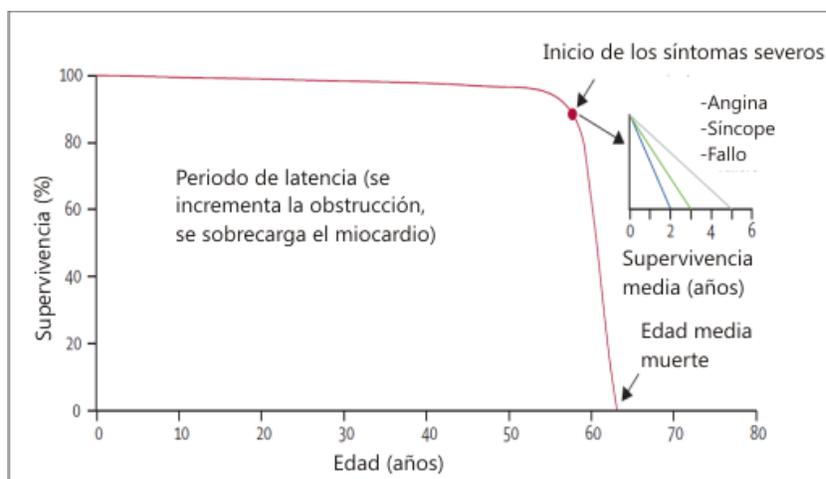


Figura 10: Supervivencia de los pacientes con estenosis aórtica respecto al tiempo. El periodo de latencia puede alargarse hasta los 60 años, donde la aparición de la sintomatología hace descender la tasa de supervivencia de forma abrupta. Tomado y traducido de Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. Lancet. 2009;373(9667):956–66.

La sintomatología se caracteriza por angina, síncope o fallo cardíaco²² y lo que se observa es una degeneración del tejido debido a fenómenos de fatiga mecánica.²⁰ La etiología de esta enfermedad es muy variada.

- Estenosis aórtica congénita. Se trata de una patología que se detecta y trata en la niñez o la juventud.²² Son procesos genéticos que afectan a la formación y maduración de las válvulas. Se presenta en casos de defectos en la formación de los velos (válvulas bicúspides) o su unión a la pared arterial (comisuras).²⁰ Si presenta alguna sintomatología se puede tratar, pero en los casos que no se detecta, la patología finaliza con un fallo cardíaco.²² Entre los síndromes asociados a fenómenos de estenosis aórtica se encuentran: de *Marfan*, de *Williams*, de *Holt-Oran*, de *Noonan*, de *Down*, así como la delección 22q11 o mutaciones en el colágeno.²⁰
- Esclerosis aórtica. Se caracteriza por un engrosamiento de las estructuras valvulares por fibrosis y calcificación, sobre todo en personas ancianas, aunque no está claro qué desencadena este proceso.¹⁶⁰ Se trata de mecanismos tisulares y celulares que se activan en respuesta ante un daño, y se incluyen fenómenos de inflamación, neovascularización, estrés oxidativo, activación del sistema renina-angiotensina, remodelación de la matriz, calcificación y osteogénesis.⁹⁶

Los nódulos de calcificación se desarrollan inicialmente en sitios expuestos a alto estrés mecánico en la capa fibrosa del velo valvular (Figura 11).⁹⁶ Los factores que pueden producir este daño son agentes bioactivos como lipoproteínas, toxinas, químicos y agentes virales o microbianos.¹⁶⁰ Diferentes estudios han mostrado que la calcificación aórtica se puede detectar por la presencia de vesículas apoptóticas, actividad de enzimas como la fosfatasa alcalina,¹¹⁰ expresión del factor de crecimiento transformante $\beta 1$,⁸⁰ osteopontina y péptidos natriuréticos.⁵⁴

- Enfermedad valvular reumática. Constituye la causa más rara en los países desarrollados porque se desencadena a partir de la fiebre reumática. Sin embargo, en países en vías de desarrollo supone un gran problema médico, ya que junto al elevado número de pacientes que la padece, se suma el déficit de medios en las intervenciones quirúrgicas necesarias para su tratamiento.¹⁹¹ Esta enfermedad se produce cuando no se trata la infección por la bacteria gram positiva *Streptococcus pyogenes*, y las complicaciones valvulares son el resultado de una reacción autoinmune.⁹⁶
- Endocarditis infecciosa. Es una infección del endocardio por presencia de bacterias en el flujo sanguíneo que quedan remanentes formando agregados bacterianos en los velos valvulares.⁹⁶ Entre las bacterias causantes de este tipo de infecciones se encuentran los estafilococos, estreptococos y enterococos.

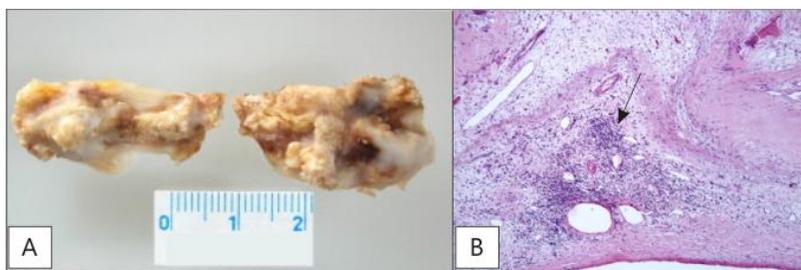


Figura 11: Muestras de velos calcificados en patologías de estenosis valvular. (A) Aspecto macroscópico de un velo calcificado. (B) Aspecto microscópico, donde se puede observar un infiltrado inflamatorio crónico y fenómenos de neovascularización (flecha negra). Tomado y modificado de Steiner I, Krbal L, Rozkoš T, Harrer J, Laco J. Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate. *Pathol Res Pract.* 2012;208(4):231–4.

3.2- INSUFICIENCIA AÓRTICA

Esta patología hace referencia a un reflujo de sangre a través de la válvula aórtica durante la diástole.¹³⁷ Se caracteriza por una inadecuada coaptación de los bordes de los velos que no pueden evitar que la sangre descienda desde la raíz de la aorta hasta el ventrículo izquierdo. Se diferencia entre insuficiencia aórtica aguda o crónica.⁴¹

- Insuficiencia aórtica aguda. Presenta una sintomatología severa como fallo cardíaco o *shock* cardiogénico.⁶⁹ Es difícil de reconocer clínicamente porque se suele diagnosticar erróneamente como sepsis, neumonía o enfermedades no valvulares. Puede estar causada por una endocarditis infecciosa, una disección de la aorta descendente o un daño en la propia válvula aórtica, generado por un trauma.⁶⁹
- Insuficiencia aórtica crónica. Resulta asintomática durante varios años y cuando se presentan síntomas suelen ser disnea, disnea paroxística nocturna, ortopnea, palpitaciones y dolor en el pecho.¹³⁷ Los mecanismos suelen ser multifactoriales y están relacionados con enfermedades que dilaten la raíz aórtica o defectos en las comisuras valvulares.⁴¹ Entre las patologías asociadas se pueden encontrar: presencia de válvulas bicúspides o con fenestraciones, degeneración idiopática, fiebre reumática, endocarditis infecciosa, degeneración mixomatosa, trauma, defecto del septo ventricular, osteogénesis imperfecta o los síndromes de *Marfan* y *Ehlers-Danlos*.^{41,69}

4- TRATAMIENTO

Aunque existen diversas técnicas quirúrgicas de abordaje para la corrección de patologías valvulares, es necesario centrar la atención en el reemplazo de toda la raíz ventriculoarterial puesto que es el tratamiento más habitual.⁵⁵ Desde que en 1952 *Hufnagel* realizó el primer implante valvular con éxito, se han desarrollado más de 80 diseños de prótesis valvulares.¹¹² Aunque han experimentado mejoras durante estos años, su clasificación ha permanecido estática.¹¹⁸

- Válvulas mecánicas, compuestas solamente de materiales sintéticos (se han implantado en un 55% de los casos).⁸⁹
- Bioprótesis, contienen componentes biológicos (se han implantado en un 45% de los casos en todo el mundo).⁵⁵ El 50-60% de todos los pacientes que reciben una bioprótesis requerirán una reintervención antes de los 10 años, además suponen un reto en lo que a disponibilidad se refiere. Los cuatro tipos de complicaciones más comunes son trombosis, endocarditis, disfunción estructural y disfunción no estructural.^{89,112}

4.1- VÁLVULAS MECÁNICAS

Presentan una gran durabilidad debido a las propiedades mecánicas de los materiales sintéticos sin embargo, son poco biocompatibles.^{112,118} Para evitar riesgos de tromboembolismos, al perder la continuidad endotelial, se somete al paciente a una terapia anticoagulante de por vida. El inconveniente asociado de

los tratamientos anticoagulantes sistémicos radica en el riesgo de hemorragias.⁸⁹ Respecto a su evolución, en 1960 se implantó la primera válvula mecánica modelo *bola en jaula* y en décadas posteriores se adaptó la tecnología para la producción del modelo *disco inclinado* o *semidisco*, en los que se introdujo recubrimiento con carbón pirolítico, material que presenta un bajo nivel de trombogenicidad.^{118,191} Esta tecnología se consolidó hasta que en 1977 se introdujo un modelo compuesto en su totalidad por carbón pirolítico (Figura 12).¹¹⁸

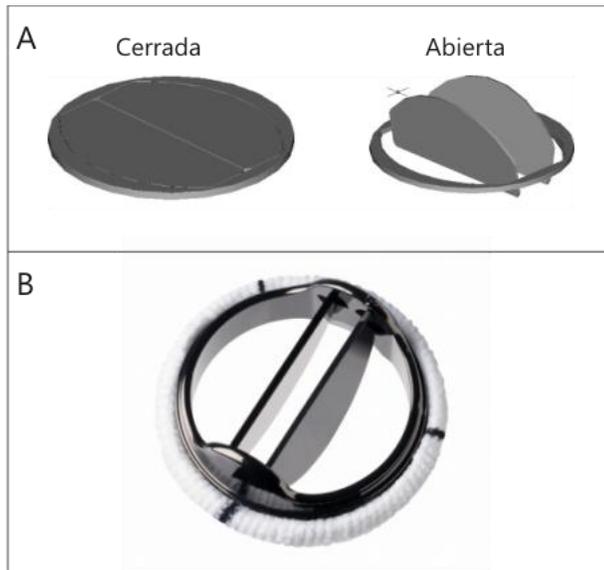


Figura 12: Ejemplo de válvula mecánica. (A) Modelo de apertura y cierre (B) Aspecto macroscópico de un modelo de válvula mecánica de carbón pirolítico. Tomado y modificado de Mohammadi H, Mequanint K. Prosthetic aortic heart valves: modeling and design. Med Eng Phys. 2011;33(2):131–47.

4.2- BIOPRÓTESIS

Han surgido como alternativa a las complicaciones tromboembólicas observadas en las válvulas mecánicas, aunque su disponibilidad está mucho más limitada y, una vez implantadas, sufren una degeneración estructural progresiva que desemboca en estenosis y/o insuficiencia. En la actualidad, existe una amplia experiencia previa en el implante de homoinjertos y xenoinjertos^{89,154,191} y es la alternativa quirúrgica más considerada en indicaciones como endocarditis, reconstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho, población pediátrica, etc.

- Xenoinjertos. Bioprótesis de origen animal, como pueden ser válvulas de origen porcino o válvulas obtenidas a partir de pericardio bovino (Figura 13- A y B). La principal ventaja es su disponibilidad, aunque el riesgo de transmisión de virus o priones ha disminuido su elección como sustitutivo valvular.¹¹⁸
- Homoinjertos. Bioprótesis de origen humano, evitan el riesgo de transmisión de enfermedades interespecie, aunque disminuye su disponibilidad (Figura 13- C). Otro de los problemas asociados a la utilización de aloinjertos valvulares de origen humano es la necesidad de preservación hasta el momento de su implante. Inicialmente se utilizaron agentes químicos como el paraformaldehído o glutaraldehído pero llevaban a la alteración irreversible del tejido valvular.¹⁶ No fue hasta principios de los años 70, cuando se comenzaron a desarrollar las actuales técnicas de criopreservación, que permiten el mantenimiento de los tejidos a temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido durante largos periodos de tiempo.⁷² Sin embargo, la capacidad antigénica que

acompaña a los aloinjertos criopreservados conlleva, en determinados casos, problemas de rechazo asociados y fenómenos de degeneración y/o calcificación.^{153,158}

Como opción a considerar dentro de este apartado está el procedimiento de Ross,⁵⁰ que consiste en el reemplazo de la raíz aórtica con un autoinjerto pulmonar. Se utiliza un homoinjerto como sustituto del autoinjerto pulmonar que se ha implantado en la posición aórtica. Se trata de la única cirugía que asegura la viabilidad a largo plazo de un sustituto biológico en la posición aórtica.



Figura 13: Diferentes tipos de bioprótesis. (A) Válvula porcina. (B) Válvula desarrollada con pericardio. (C) Aspecto macroscópico de un homoinjerto aórtico. Tomado y modificado de Mohammadi H, Mequanint K. Prosthetic aortic heart valves: modeling and design. Med Eng Phys. 2011;33(2):131–47.

5- INGENIERÍA TISULAR

La ingeniería tisular se define como *la aplicación de los principios científicos para el diseño, construcción, modificación, crecimiento y mantenimiento de un tejido vivo*.¹¹² A partir de células de distinto origen, una matriz y un entorno adecuado, se pretende obtener un tejido de características morfológicas y funcionales idénticas al que se pretende sustituir.^{20,55}

La válvula cardíaca ideal debería ser perfectamente biocompatible, de disponibilidad inmediata, de larga duración, y con capacidad de crecimiento.¹¹² La elaboración de una válvula cardíaca, por ingeniería tisular, tiene el potencial de aportar estos requerimientos fomentando los mecanismos naturales de reparación, remodelación y regeneración. El objetivo se centra en qué células combinar y cómo llevarlo a cabo, dentro de una matriz tridimensional, de tal forma que se cree un *neotejido* 100% funcional.^{73,79}

La matriz extracelular es una estructura dinámica que se remodela activamente por las células con las cuales interactúa.¹¹² Además presenta un soporte mecánico para la construcción del tejido *in vitro*, y como soporte inicial para que las células se expandan, diferencien y organicen antes de que puedan ser funcionalmente activas para los procesos de reparación, remodelación y regeneración.^{73,79} Dentro de los biomateriales utilizados para ingeniería tisular encontramos (Figura 14):

- Matrices descelularizadas. Se utiliza la matriz del propio tejido al presentar la heterogenicidad estructural y mecánica que se

requiere.¹³ Se describe con más profundidad en el apartado 6 (Figura 14- A y 15- A).

- Matrices sintéticas. Son materiales biodegradables, presentan una gran variedad, son lábiles para generar una determinada forma (se puede controlar el tamaño de poro) y suponen un suministro ilimitado (Figura 14- B).²⁰ Como materiales utilizados estarían el ácido poliglicólico (PGA)¹¹² y el ácido poliláctico (PLA)⁵⁵ (Figura 15- B).
- Matrices biológicas. Son biocompatibles, se integran en el paciente con facilidad,²⁰ con alto contenido acuoso (Figura 14- C),

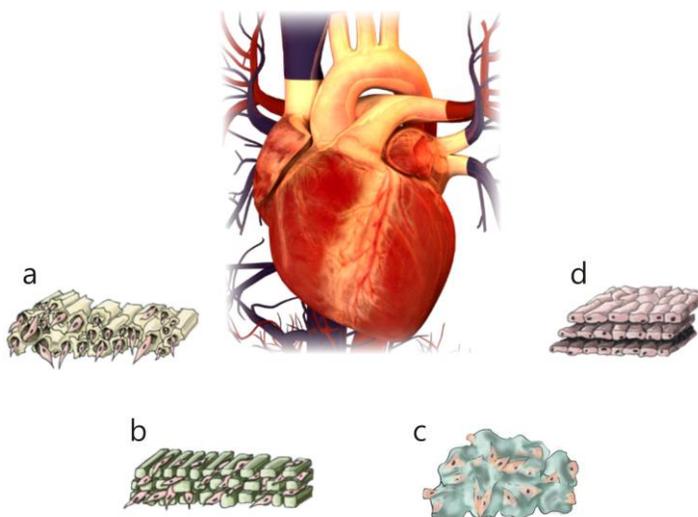


Figura 14: Diferentes alternativas, dentro del área de la ingeniería tisular, para su aplicación en válvulas cardíacas. (A) Descelularización. (B) Matrices sintéticas. (C) Matrices biológicas (en este caso, un hidrogel). (D) Tejido autogénico. Tomado y modificado de Gálvez-Montón C, Prat-Vidal C, Roura S, Soler-Botija C, Bayes-Genis A. Cardiac tissue engineering and the bioartificial heart. Rev Esp Cardiol (Engl Ed). 2013;66(5):391–9.

son muy permeables al oxígeno y a los nutrientes.⁷⁹ Como ejemplo, encontramos la submucosa intestinal acelular, la fibrina⁵⁵ (se puede producir a partir de la sangre del propio paciente), el alginato o el colágeno (Figura 15- E y C).⁷³

- Matrices autólogas. A través de células del propio paciente, se cultivan láminas de células en placas específicas que permiten generar capas plegables (Figura 14- D y 15- D).^{20,73}
- Otras matrices. Suelen ser híbridos entre diferentes tipos de matrices sintéticas y biológicas.^{20,73} Además, destacar la evolución en las técnicas de producción, como es la impresión en 3D²⁰ o el *electrospinning* (Figura 15- F).⁷⁹

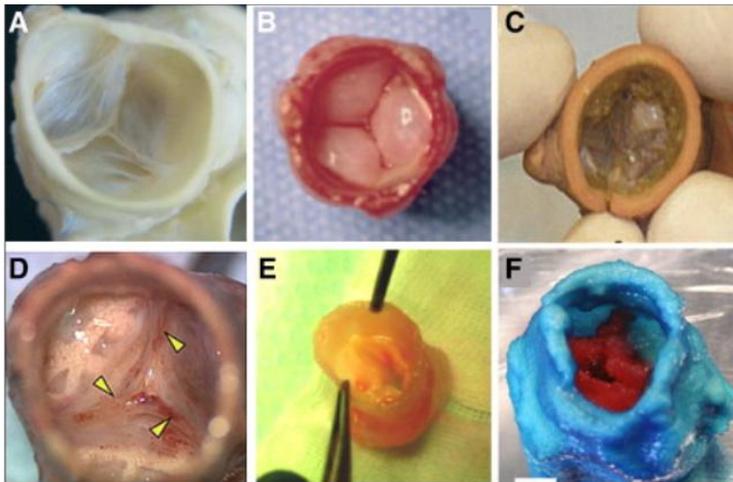


Figura 15: Válvulas cardíacas generadas por ingeniería tisular. Válvula (A) descelularizada, (B) generada con PGA-PLA, (C) generada con colágeno, (D) a través de células del propio paciente, (E) generada con fibrina y (F) con bioimpresión en 3D. Tomado de Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4-5):242–68.

6- DESCELULARIZACIÓN

La descelularización, como disciplina dentro de la ingeniería tisular, aporta el concepto de la creación de matrices biológicas a partir de los propios tejidos, donde la complejidad del conjunto de moléculas y proteínas que los conforman es máxima.¹¹²

6.1- TRAYECTORIA

En 1995 se publicó por primera vez la aplicación de técnicas de descelularización en válvulas cardíacas caninas,¹⁷⁹ previamente descritas en pericardio bovino.³⁷ Tres años más tarde, se recelularizaron válvulas porcinas acelulares con células endoteliales autólogas⁹ y, en el año 2000, se implantaron 10 válvulas descelularizadas en posición ortotópica en un modelo experimental ovino.¹⁶² Tras 4 semanas de evolución, se evidenció una endotelización de toda la superficie del tejido valvular pero también se detectó reacción inflamatoria e indicios de calcificación en 2 de las 10 válvulas implantadas.¹⁶²

En este periodo se han podido diferenciar dos alternativas en cuanto al uso en clínica humana de un tejido descelularizado: el implante de estructuras descelularizadas o recelularizadas. Por un lado, se han generado matrices y se han implantado in vivo^{33,34} (sin introducir componente celular) con factores que promoviesen una recolonización por células precursoras endoteliales²⁴ y mesenquimales presentes en el torrente sanguíneo (Figura 16- Opción B).¹¹³ Los resultados más recientes indican que, tras 18 años de seguimiento, los injertos descelularizados han

proporcionado una excelente tasa de supervivencia y una baja incidencia en reintervenciones, mostrando una alternativa quirúrgica idónea en pacientes jóvenes.³⁶ Sin embargo, en la aplicación de la válvula descelularizada porcina⁵¹ SynerGraft™, las características funcionales fueron similares a las que presentaban los homoinjertos criopreservados pero, a medio plazo, se obtuvieron resultados contraproducentes.³⁰ Estudios *post mortem* han mostrado que el implante de matrices sin componente celular lleva a una degeneración progresiva del tejido y a la aparición de calcificaciones, restringiendo la capacidad de las células para regenerar el tejido.¹⁴⁹

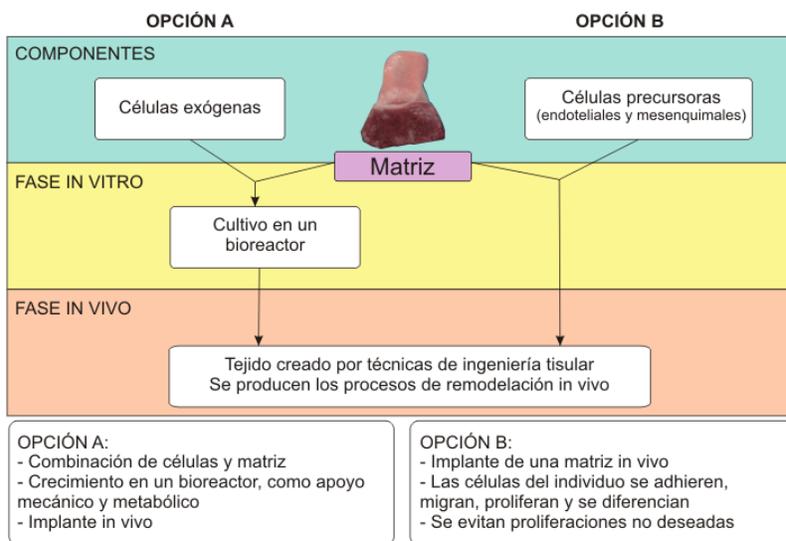


Figura 16: Alternativas en el implante de válvulas descelularizadas. Se puede implantar el tejido (Opción A), recelularizándolo previamente, o sin haber introducido ningún componente celular (Opción B). Tomado y modificado de Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng.* 2006;34(12):1799–819.

Otra opción considerada es el implante de la válvula obtenida por descelularización, introduciendo previamente células del propio paciente (Figura 16- Opción A).⁴³ Se ha hipotetizado que la aplicación previa de un componente celular es fundamental en el mantenimiento de las funciones/interacciones célula-matriz.^{112,42} Se han aislado células de diversas fuentes para la recolonización del tejido: dermis, venas, torrente sanguíneo, fluido amniótico, cordón umbilical, médula ósea, tejido adiposo...¹⁹ En el proceso de recelularización es esencial el uso de un bioreactor que exponga el tejido a un flujo cíclico y a cambios de presión que mimeticen las condiciones fisiológicas.¹¹³

6.2- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA DESCELULARIZACIÓN DE TEJIDOS

La descelularización es una de las mejores alternativas para la obtención de matrices acelulares cuando se intenta reparar un tejido de una complejidad estructural evidente.¹¹² Es un método sencillo que disminuye la respuesta inmune y que genera biomateriales 100% compatibles.⁵⁵

El principal inconveniente radica en la gran variabilidad de las muestras, puesto que el tejido de partida es diferente para cada caso. Asimismo, se encuentra la incapacidad de especificar y caracterizar completamente los componentes bioactivos que lo constituyen, presentando una gran variabilidad dependiendo del origen. Es esencial que la descelularización sea completa, porque si no, se pueden desencadenar respuestas inflamatorias o inmunológicas.^{72,159}

6.3- PROTOCOLOS DE DESCELULARIZACIÓN

El objetivo principal de un protocolo de descelularización es la eliminación de material celular y nuclear, minimizando los efectos adversos en la composición, la actividad biológica y la integridad mecánica de la matriz extracelular.⁵⁹

El grado preciso en el que los componentes de señalización y la estructura tridimensional se mantienen preservados, va a estar intrínsecamente relacionado con la elección del método de descelularización, los reactivos utilizados y su posible toxicidad.^{38,59} Además se debe considerar que cualquier proceso de descelularización altera la matriz extracelular, y el objetivo es minimizar esa modificación.⁵³

Los métodos de descelularización se pueden clasificar según el agente descelularizante (Tabla 1).

- **Métodos físicos.** Se genera una ruptura celular directa por congelación rápida o ciclos de congelación-descongelación, aplicación de fuerza mecánica, ultrasonidos aplicados por sonicación, alta presión y eliminación de oxígeno o generación de anaerobiosis.³⁸ Muestran efectividad en la ruptura de la membrana celular, pero pueden generar un daño directo e irreversible sobre la matriz.^{53,59}
- **Métodos químicos.** Se solubiliza la membrana plasmática de las células para inducir lisis celular a través de la acción de detergentes (iónicos, no iónicos o *zwitteriónicos*), alcoholes, soluciones hipotónicas e hipertónicas (generan choques osmóticos) y ácidos o bases.⁵³ Son muy efectivos porque rompen

las interacciones lipídicas, sin embargo, también eliminan componentes de la matriz como los GAG o los factores de crecimiento.

- Métodos biológicos. Se pretenden eliminar las interacciones célula-matriz con enzimas como la tripsina, la colagenasa, la lipasa, la dispasa o la termolisina. Si actúan prolongadamente, también disgregan proteínas de la matriz extracelular.

Un análisis bibliográfico realizado sobre 139 protocolos de descelularización descritos (Tabla 1), reflejó que en la mayor parte de publicaciones (81%) se utilizan detergentes en alguna de sus etapas, ya sea sólo el detergente, combinaciones de detergentes o combinaciones con otros métodos de descelularización (Figura 17). El tratamiento enzimático es la segunda opción más utilizada (10%), siendo el resto (9%) métodos físicos o químicos que no utilizan ninguno de los anteriores. Entre los detergentes más empleados se encuentran el detergente iónico dodecilsulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) (46%) y el detergente no iónico Tritón X-100 (39%) (Figura 17). Los menos utilizados serían el detergente iónico desoxicolato de sodio (*Sodium Deoxycholate*, SD) (13%) y el detergente zwitteriónico CHAP (2%), detergente que presenta ambas cualidades, es iónico y no iónico.⁵⁹

Todos los protocolos de descelularización se complementan con la acción de determinados compuestos como agentes quelantes que se unen al Ca^{2+} y el Mg^{2+} , necesarios en la unión de las células a la matriz extracelular, como el ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA).^{38,53,59}

Tabla 1: Clasificación de los agentes descelularizantes.

CLASIFICACIÓN	AGENTES DESCELULARIZANTES	REFERENCIAS
Acción aislada de los agentes descelularizantes		
<i>Métodos físicos</i>	Alta presión	[58, 111]
	Anaerobiosis	[4]
	Congelación- descongelación	[181]
<i>Métodos químicos</i>	Iónicos (SDS)	[3, 14, 21, 25, 26, 35, 62, 65, 66, 71, 97, 102, 109, 111, 125, 132, 133, 134, 136, 138, 143, 147, 157, 165, 168, 171, 181, 190]
	Iónicos (SD)	[14, 35, 43, 44, 45, 62, 65, 71, 93, 105, 135, 168, 170, 185, 190]
	No iónicos (Tritón X-100)	[9, 14, 65, 67, 81, 97, 109, 114, 126, 132, 143, 147, 170, 171, 184]
	Zwitteriónicos	[62, 107]
	Alcoholes	[114, 130, 169]
	Soluciones hipotónicas e hipertónicas	[116, 148, 190]
	Ácidos y bases	[29, 70, 81, 87, 117]
<i>Métodos biológicos</i>	Enzimáticos (Tripsina)	[23, 24, 67, 75, 97, 116, 140, 150, 151, 152, 162, 168, 172, 184]
Acción combinada de los agentes descelularizantes		
<i>Combinación de métodos químicos (iónicos-iónicos; iónicos-no iónicos)</i>		[7, 8, 12, 15, 17, 46, 64, 77, 85, 90, 98, 101, 104, 103, 109, 129, 131, 141, 142, 175, 170, 186, 188, 189]
<i>Combinación de métodos químicos (iónicos-no iónicos y choques osmóticos)</i>		[32, 70, 78, 83, 91, 92, 95, 102, 107, 115, 116, 121, 122, 123, 128, 167, 178, 192]
<i>Combinación de métodos químicos (iónicos-no iónicos) y métodos biológicos (enzimáticos)</i>		[47, 52, 84, 88, 100, 173, 174]

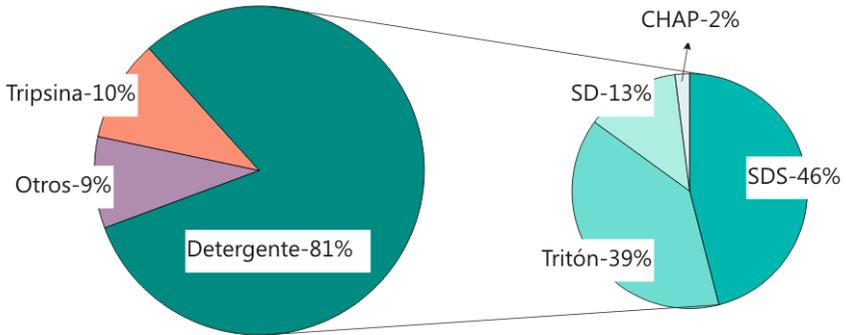


Figura 17: Porcentajes de los diferentes protocolos de descelularización utilizados. En el gráfico circular de la izquierda se encuentran representados los datos globales y en el gráfico circular de la derecha se encuentran desglosados los datos para el porcentaje correspondiente al detergente.

También se suelen incluir inhibidores de proteasas, como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*, PMSF), para evitar la degradación de la matriz extracelular al verse el contenido citoplasmático tras la lisis celular, y antibióticos como prevención a posibles contaminaciones.^{38,53,59} Como etapa complementaria, también se incluye un tratamiento enzimático específico para la eliminación de los ácidos nucleicos remanentes en la estructura.⁵⁹

Se ha podido comprobar, con toda la información recopilada, que los protocolos de descelularización se han aplicado en diferentes especies: caballo, conejo, cerdo, humano, oveja, rata, ratón y vaca; y en multitud de órganos y tejidos, como córnea, pericardio, pulmón o válvula cardíaca (Tabla 2). El tejido y especie más ampliamente utilizada en la prueba de diferentes protocolos de descelularización o análisis de eficiencia de los mismos, ha sido la

descelularización de válvulas cardíacas de cerdo. Desde los inicios, la válvula cardíaca ha representado un tejido con unas características estructurales complejas y ha representado el tejido de referencia en el campo de la descelularización.^{112,113}

La extensa aplicación de estos protocolos en diferentes órganos y tejidos muestra que la efectividad de los protocolos depende de la celularidad de partida, la densidad de la matriz extracelular, el contenido lipídico y el grosor.⁵³ También se ha descrito que los protocolos más efectivos son aquellos que combinan más de una variable (ya sea física, química o biológica).

Tabla 2: Relación de tejidos y órganos descelularizados, clasificados por especie en que se ha realizado.

ESPECIE UTILIZADA	TEJIDO/ÓRGANO DESCELULARIZADO
<i>Caballo</i>	Arteria. ¹⁷
<i>Conejo</i>	Córnea, ¹³³ vena. ¹⁴
<i>Cerdo</i>	Esófago, ⁸⁸ laringe, ⁷⁶ músculo, ¹⁷⁴ pericardio, ^{46,90} piel, ¹¹¹ pulmón, ⁶² submucosa intestinal, ^{87,101} válvula cardíaca, ^{9,12,15,25,32,58,67,75,77,78,83,85,91,92,97,98,121-123,126,129,130,135,140-142,147,148,151,152,168,169,172,175,178,184,185,188-190,192} vejiga, ⁵² tráquea. ⁷⁰
<i>Humano</i>	Arteria, ^{107,167} córnea, ²⁹ cuerdas vocales, ¹⁶⁵ pericardio, ¹¹⁷ pulmón, ^{60,170,171} tejido adiposo, ^{173,47} tráquea, ¹⁰⁴ válvula cardíaca. ^{23,24,35,43,45}
<i>Oveja</i>	Colon, ⁸⁴ válvula cardíaca. ^{44,95,150,152,162}
<i>Rata/ratón</i>	Arteria, ^{138,7} corazón, ^{3,8,57,66,115,134,143,180} hígado, ⁸¹ hueso, ⁹³ laringe, ¹⁰³ páncreas, ⁶⁴ pulmón, ^{62,125,} tráquea. ¹⁰⁵
<i>Vaca</i>	Córnea, ¹³⁶ disco intervertebral, ²⁶ ligamento, ¹⁸⁶ pericardio, ^{21,65,109,114,128} , vena. ¹⁰⁰

Por tanto, en el diseño de un protocolo de descelularización, es imprescindible incluir 4 etapas para asegurar la eficiencia del mismo (Figura 18).

La primera etapa comienza con la puesta en contacto con el agente descelularizante y supone el inicio de la lisis de la membrana plasmática (Figura 18- 1).⁵⁹

En una segunda etapa, se continúa con el contacto directo con un agente descelularizante (sea el mismo o no que para la primera etapa) y se van a solubilizar los restos celulares presentes en la matriz extracelular (Figura 18- 2).⁵³

Como tercera etapa, se considera la inclusión de un tratamiento enzimático, para eliminar los ácidos nucleicos remanentes en el tejido (Figura 18- 3).⁵⁹

Para finalizar con el proceso, es imprescindible realizar un lavado, con soluciones isotónicas, donde se eliminen los posibles restos del agente utilizado y no se generen residuos tóxicos que impidan la recolonización del tejido (Figura 18- 4).⁵³

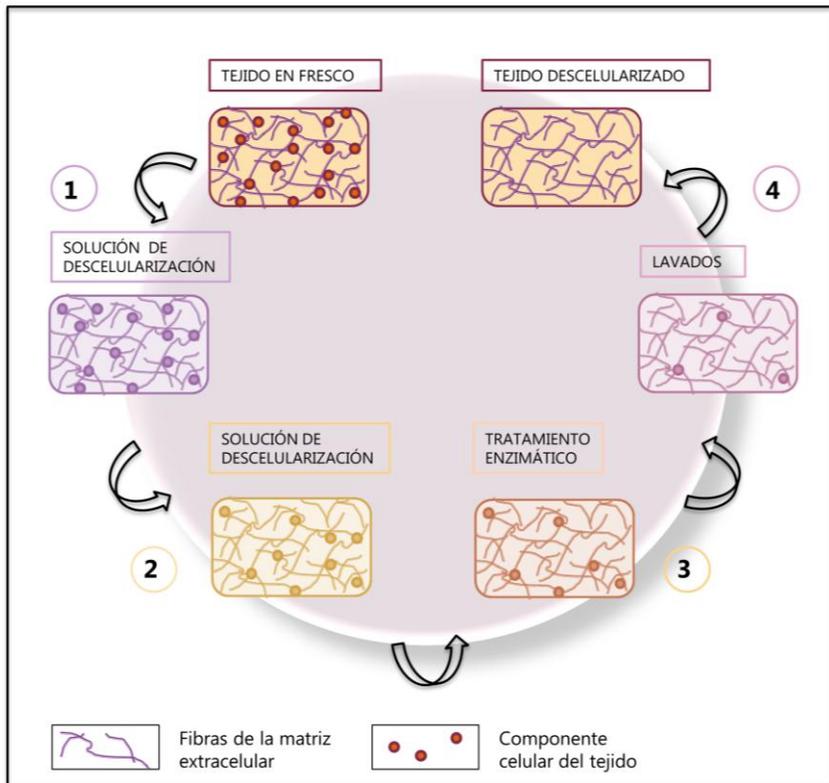


Figura 18: Etapas de un protocolo de descelularización estándar. La representación gráfica muestra cómo, a medida que se avanza por las diferentes etapas de un protocolo de descelularización (etapas 1, 2, 3 y 4), se va eliminando el componente celular del tejido y se mantienen las fibras de la matriz extracelular.



III-

Justificación, hipótesis y objetivos

1- JUSTIFICACIÓN

Los avances científicos cambian nuestra forma de pensar y de vivir. Actualmente nos encontramos en una época de constante evolución en el sector social, económico, tecnológico... y no ha sido menos en el área biosanitaria. La práctica clínica actual demanda altísimos niveles de calidad, funcionalidad y seguridad en los tratamientos, y la mejor forma de alcanzarlo es a través de una completa personalización de los productos sanitarios. Nuevas disciplinas han surgido en las últimas décadas, en relación a esta creciente necesidad en la mejora de la calidad de vida de los pacientes y entre ellas cabe destacar el área de la ingeniería tisular, donde convergen la medicina, la biología básica y la ingeniería de materiales.

Mi toma de contacto con este ámbito se inició en el año 2007, donde tuve la oportunidad de incorporarme a un equipo multidisciplinar especializado en la obtención, procesamiento y distribución de tejidos humanos para su aplicación en clínica humana. La colaboración con profesionales médicos de diferentes especialidades me abrió las puertas a los nuevos desafíos que se les plantean: ¿por qué existe una mayor demanda de tejidos que disponibilidad de ellos?, ¿por qué no se consigue una reparación/regeneración con los tratamientos actuales?, ¿por qué se sigue produciendo rechazo crónico en el receptor?, ¿por qué se destruye el tejido injertado tras largos periodos de evolución? Estas limitaciones han sido el alimento de varios proyectos de investigación desarrollados bajo un mismo nexo común: el desarrollo in vitro de matrices tridimensionales acelulares que

puedan servir como guía para generar una completa funcionalidad tisular al introducir cultivos de células como recolonización.

La presente tesis refleja el trabajo realizado durante estos años, donde se analiza un nuevo concepto adoptado recientemente dentro del área de la medicina regenerativa: la descelularización de tejidos. Este término se refiere a la eliminación del componente celular de un determinado tejido, obteniendo una matriz proteica acelular, e inmunológicamente inactiva, con la estructura y composición tridimensional similares a los descritos en el tejido nativo. La potencialidad clínica radica en la posibilidad de recolonizar estas estructuras inertes con células del propio paciente para favorecer los procesos de integración y viabilidad del tejido a largo plazo.

El camino comenzado no está exento de dificultades, pero las posibilidades que presenta este ámbito son tan amplias, que cada dificultad se transforma en reto y cada reto en una meta a alcanzar.

2- HIPÓTESIS

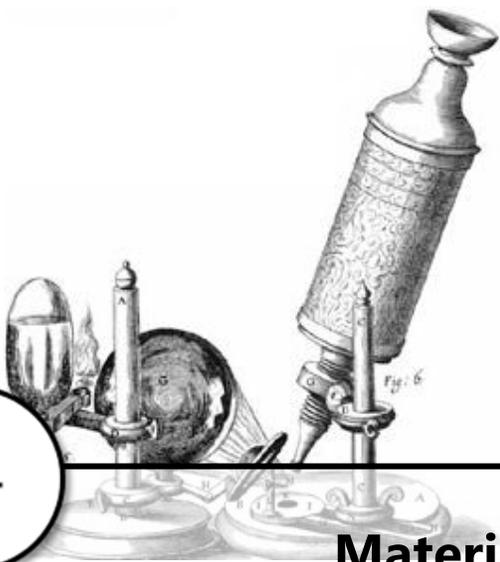
La combinación de choques osmóticos y choques de pH podría ser efectiva en la descelularización de válvulas cardíacas ovinas, preservando la estructura tisular y eliminando el componente celular sin generar residuos tóxicos.

3- OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Para demostrar la hipótesis planteada se establecieron los siguientes objetivos:

1. Analizar las combinaciones generadas a partir de las condiciones experimentales choques osmóticos y choques de pH.
2. Desarrollar y optimizar un protocolo de descelularización que preserve la estructura tridimensional y elimine los restos celulares presentes.
3. Caracterizar las estructuras acelulares obtenidas.
 - 3.1. Determinar la presencia/ausencia de células viables en el tejido con técnicas de microscopía y fluorimetría.
 - 3.2. Valorar el estado de la matriz extracelular con ensayos biomecánicos y bioquímicos.
4. Evaluar los efectos citotóxicos de las soluciones utilizadas y realizar un ensayo de biocompatibilidad.

IV-



Material y método

En el Anexo I se detalla todo el material empleado. Los protocolos utilizados en el presente estudio se encuentran descritos en el Anexo II.

Esta sección se ha estructurado acorde a los objetivos planteados, tratándose de un trabajo secuencial donde los resultados obtenidos en cada apartado se han utilizado como base para la planificación y realización del siguiente.

OBJETIVO 1: Se pretendió valorar las propiedades descelularizantes de una acción combinada de cambios en la tonicidad y el pH en las soluciones utilizadas. Se realizó un análisis semicuantitativo del grado de eliminación celular y preservación de la matriz tridimensional, permitiendo descartar gran parte de los protocolos de descelularización propuestos.

OBJETIVO 2: Con la información recabada sobre el efecto de la osmolaridad y el pH, se procedió al diseño de un protocolo de descelularización que fuese eficiente y reproducible. Se puso a punto un tratamiento enzimático, cuantificando los restos de ácidos nucleicos, y se añadió como una etapa a realizar en los protocolos más efectivos seleccionados del apartado anterior.

OBJETIVO 3: Tras la estandarización de los protocolos de descelularización, se propuso ampliar los datos en cuanto a la eficiencia del protocolo se refiere. Para ello se llevaron a cabo pruebas adicionales que permitieron cuantificar la presencia/ausencia de componentes celulares activos y la funcionalidad de la matriz acelular resultante, caracterizándola bioquímica y biomecánicamente.

OBJETIVO 4: Como finalización al trabajo realizado, se llevaron a cabo pruebas complementarias para estimar el posible efecto deletéreo de los reactivos utilizados durante el proceso de descelularización. Se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad con los lavados realizados al finalizar la descelularización. Además, se ensayó la biocompatibilidad del tejido descelularizado mediante contacto directo con el componente celular nativo evaluando su capacidad de supervivencia y adhesión.

OBTENCIÓN Y PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Se empleó un total de 305 injertos valvulares pulmonares procedentes de 305 corazones de cordero (*Ovis aries*) de entre 2 y 3 meses de edad, obtenidos en el Matadero Municipal de Pola de Gordón- León. Los corazones se recogieron utilizando recipientes plásticos y suero fisiológico estéril suplementado con antibiótico (bencilpenicilina sódica- 2,000.000 UI) donde se mantuvieron a temperatura ambiente (TªA) entre 1 y 2 horas hasta su procesamiento (Figura 19- A).

Las válvulas cardíacas pulmonares se extrajeron en condiciones de asepsia, bajo campana de flujo laminar vertical (CFL 475 EC, Clean Air). En primer lugar, se separaron las adherencias de tejido conectivo entre la arteria aorta y pulmonar hasta que se alcanzó el miocardio. Se incidió en el septo interventricular unos 2 centímetros y se separó la válvula pulmonar a 2-3 centímetros del anillo valvular (Figura 19- B). Para finalizar se retiró el tejido adiposo adyacente al miocardio del faldón muscular.

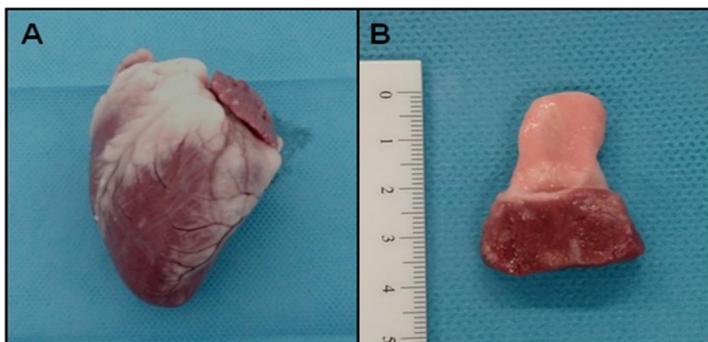


Figura 19: Aislamiento de la válvula pulmonar del corazón de cordero. Aspecto macroscópico del corazón (A) previo a la disección de la válvula. Tamaño de entre 3,5 y 4 cm de la válvula (B) tras la retirada del tejido adiposo adyacente.

Por último, las válvulas cardiacas se sometieron a un periodo de decontaminación entre 24-48 horas a TªA en suero fisiológico estéril suplementado con 640 µg/ml de tobramicina, en el rango de concentración entre 64 µg/ml- 320 µg/ml de sulfametoxazol-trimetoprima, 100 µg/ml de vancomicina, 20 µg/ml de anfotericina B y 16 µg/ml de colistimetato sódico.

De las 305 muestras obtenidas, 95 se utilizaron durante la realización del objetivo 1, 95 muestras se emplearon en el objetivo 2, y las 115 muestras restantes se necesitaron para el desarrollo de los estudios incluidos en los objetivos 3 y 4. Se consideraron 3 zonas de análisis: Velo, Arteria y Músculo (tejido miocárdico ventricular).

Para todas las soluciones que estuvieron en contacto con las muestras se consideró una proporción 10:1 (solución: muestra). Cada muestra se mantuvo independiente en frascos de urocultivo de 100 ml.

OBJETIVO 1: ANALIZAR LAS COMBINACIONES GENERADAS A PARTIR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES CHOQUES OSMÓTICOS Y CHOQUES DE PH

En este apartado se analizó el resultado de todas las combinaciones posibles entre la condición experimental *choques osmóticos*, con las variables solución hipotónica y solución hipertónica, y la condición experimental *choques de pH*, con las variables ácido, neutro y básico. El nombre asignado a cada protocolo se confeccionó en base al pH utilizado en cada solución, por ejemplo, el Protocolo N/N proviene de pH Neutro/pH Neutro (Tabla 3).

Se utilizaron 95 válvulas, considerándose un n=10 para cada una de las condiciones detalladas en la Tabla 3, se destinaron 90 válvulas para el desarrollo de los protocolos y 5 se utilizaron en Fresco como control al proceso.

Se comenzó el protocolo con un lavado de 24 horas con agua destilada estéril antes de introducir las muestras en la solución hipotónica (Anexo II- Protocolo I). Se ajustó el pH (KI 2.211, Hanna Instruments) a 7-7,5 en las soluciones neutras hipotónicas, entre 5-5,5 para las soluciones hipotónicas ácidas y entre 11-11,5 para las soluciones hipotónicas básicas (Figura 20) y se mantuvieron las muestras durante 48 horas. A continuación, se pusieron en contacto con la solución hipertónica (Anexo II- Protocolo II). Se ajustó el pH a 7-7,5 en las soluciones neutras hipertónicas, entre 5-5,5 para las soluciones hipertónicas ácidas y entre 11-11,5 para las soluciones hipertónicas básicas (Figura 20). Los tejidos estuvieron en contacto con esta solución hipertónica durante 72 horas.



Figura 20: Diagrama de los 9 protocolos de descelularización realizados. Se representa coloreado el líquido de las soluciones hipotónicas e hipertónicas dependiendo del pH utilizado: en naranja, pH Ácido, en verde, pH Neutro y en azul, pH Básico.

Para finalizar, se llevaron a cabo 3 ciclos de lavado con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) estéril de 10 minutos de duración, bajo agitación orbital a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) (Incubator Shaker HWM-200B, Lan Technics).

Todas las soluciones fueron preparadas en condiciones de asepsia y se mantuvieron a T^aA. Los ajustes de pH se alcanzaron con ácido clorhídrico (HCl) 1 M e hidróxido sódico (NaOH) 2 M. Las válvulas permanecieron en el último líquido de lavado a T^aA hasta su procesado.

Tabla 3: Combinaciones de las variables de estudio. Se obtuvieron 9 posibles protocolos de las diferentes asociaciones entre las variables de cada condición experimental.

CONDICIONES EXPERIMENTALES DE CHOQUES OSMÓTICOS Y CHOQUES DE pH		
ABREVIATURAS	SOLUCIÓN HIPOTÓNICA	SOLUCIÓN HIPERTÓNICA
PROTOCOLO N/N	pH Neutro	pH Neutro
PROTOCOLO N/A	pH Neutro	pH Ácido
PROTOCOLO N/B	pH Neutro	pH Básico
PROTOCOLO A/N	pH Ácido	pH Neutro
PROTOCOLO A/A	pH Ácido	pH Ácido
PROTOCOLO A/B	pH Ácido	pH Básico
PROTOCOLO B/N	pH Básico	pH Neutro
PROTOCOLO B/A	pH Básico	pH Ácido
PROTOCOLO B/B	pH Básico	pH Básico

1.1- MEDICIÓN DE LA OSMOLALIDAD

Se recogió una alícuota de 2ml de cada una de las 60 soluciones de descelularización preparadas para determinar su osmolalidad. Las muestras de líquido se mantuvieron a 4°C hasta su medición. Se tuvo en cuenta que podían ser hipotónicas ácidas, neutras y básicas e hipertónicas ácidas, neutras y básicas.

En primer lugar, se calibró el osmómetro con agua destilada a "0" osmol/kg y se atemperaron las muestras antes de la medición. Para la cuantificación se introdujeron 50 µl en microtubos de 0,5 ml y éstos a su vez en el osmómetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec) hasta alcanzar el punto de congelación. Una vez finalizado el proceso se recogieron los valores resultantes.

1.2- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Se analizaron 285 muestras procedentes de las 3 zonas objeto de estudio, Velo, Arteria y Músculo, de las 95 válvulas cardíacas utilizadas en las diferentes condiciones experimentales. Permanecieron en PBS estéril hasta que fueron procesadas en fragmentos representativos de menor tamaño.

Para obtener las muestras, se abrió la raíz pulmonar por la zona posterior, entre los velos semilunares, y se procedió a cortar fragmentos de cada zona de estudio en tamaños de aproximadamente 0,5 cm (Figura 21- A, B, C y D). Se colocaron en cassettes de histología, previamente rotulados con la identificación de cada muestra, y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante

un periodo mínimo de 72 horas previo al proceso de inclusión en parafina.

Se utilizó un procesador automático de tejidos (Shandon-Excelsior™, Thermo Scientific), en el que se deshidrataron a través de una serie de concentraciones crecientes de alcohol y xileno (alcohol de 70°, alcohol de 90°, alcohol de 96°, alcohol absoluto y xileno) durante 1 hora cada uno a TªA, hasta su inmersión final en parafina (3 ciclos de 1 hora a 61°C).



Figura 21: Procesamiento de la válvula cardíaca para su análisis histológico. (A) Aspecto de la válvula tras ser abierta por la zona posterior. Los Velos valvulares se consideraron muestras enteras escindidas del anillo valvular (B). Sin embargo, para el estudio de las zonas Arteria (C) y Músculo (D) se generaron fragmentos de 0,5 cm de longitud y 0,25 cm de ancho.

A continuación, se recuperaron las muestras del procesador y se embebieron en parafina líquida, en moldes metálicos específicos, en el inclusor (Leica EG1150M, Leica Microsystems). Posteriormente, se enfriaron los bloques en una placa refrigerada

(Microm CP60, Mikron Instruments, Inc.), y se realizaron secciones de 2,5 μm de grosor en un microtomo de rotación monitorizado (Leica RM2.255, Leica Microsystems).

Los cortes obtenidos se introdujeron en un baño termostático de flotación (Termofin, Selecta) a 37°C, recuperándose en un portaobjetos previamente rotulado.

Las secciones obtenidas se tiñeron con un protocolo estándar de hematoxilina- eosina (H-E) (Anexo II- Protocolo III), y se visualizaron con un microscopio óptico directo de campo claro (BX61, Olympus). Las fotografías se realizaron con una cámara anclada al microscopio (EC3, Leica) y se procesaron con un software específico (LAS V3.0, Leica).

Para la evaluación de las muestras se utilizó un ensayo ciego y éstas se clasificaron semicuantitativamente según los parámetros reflejados en la Tabla 4. El grado de celularidad se consideró como alto, medio o bajo según la presencia de núcleos celulares.

El análisis del estado de la matriz tridimensional se realizó en base a la diferenciación de las estructuras histológicas básicas y su conservación tras el tratamiento descelularizante, considerándose como estructurada, medianamente estructurada o desestructurada. Como control al proceso se utilizaron las preparaciones realizadas sobre tejido en Fresco.

Tabla 4: Valoración de la estructura obtenida tras los protocolos de descelularización. Se puntuó de menor (+) a mayor (+++) en base a los distintos parámetros descritos. La puntuación más elevada para el grado de celularidad se correspondió con la mayor visualización de células en la matriz. Para el estado de la estructura tridimensional se asignó la mayor puntuación a las matrices mejor preservadas.

EVALUACIÓN DE LAS MATRICES OBTENIDAS POR DESCELULARIZACIÓN			
GRADO DE CELULARIDAD	ALTO	MEDIO	BAJO
	Elevada presencia de núcleos (+++).	Presencia de núcleos inferior al control (++)	Escasa presencia o ausencia de núcleos (+).
	ESTRUCTURADA	MEDIANAMENTE ESTRUCTURADA	DESESTRUCTURADA
ESTADO DE LA MATRIZ	Matriz muy conservada, se diferencian las estructuras tisulares (+++).	Matriz deteriorada, pero se siguen diferenciando las estructuras tisulares (++)	Matriz poco conservada, no se diferencian las estructuras tisulares (+).

De la clasificación obtenida en este apartado, se seleccionaron los dos protocolos de descelularización más eficientes, es decir, los que permitieron una mayor eliminación de material celular junto con una mayor preservación de la estructura tridimensional.

OBJETIVO 2: DESARROLLAR Y OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN QUE PRESERVE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y ELIMINE LOS RESTOS CELULARES GENERADOS

Los resultados obtenidos tras la consecución del Objetivo 1 permitieron establecer dos protocolos óptimos en el proceso de descelularización: Protocolo A/B y Protocolo B/A.

En el diseño del protocolo de descelularización, tras establecer las variables más efectivas, se requirió la estandarización de un tratamiento enzimático para la eliminación de los restos celulares presentes.

Se comprobó el efecto de diferentes concentraciones de enzimas con el fin de optimizar el proceso y se consideraron varios tiempos de acción del tratamiento.

2.1- ESTANDARIZACIÓN DE UN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para optimizar la eliminación de los ácidos nucleicos residuales tras la acción del agente descelularizante, se analizaron tres concentraciones diferentes de enzima desoxirribonucleasa I (DNAsa I), con una actividad de 3.000 U/mg, y ribonucleasa A (RNAsa A), con una actividad de 70 U/mg (Tabla 5).

Se determinaron 3 puntos de análisis durante el tratamiento enzimático: previo al tratamiento (P), a las 2 horas de tratamiento (t2h), y tras las 7 horas de tratamiento (t7h).

Tabla 5: Concentración de DNAsa I y RNAsa A según el tratamiento a aplicar.

	TRATAMIENTO 1 (TTO1)	TRATAMIENTO 2 (TTO2)	TRATAMIENTO 3 (TTO3)
Concentración de DNAsa I	12 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
Concentración de RNAsa A	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml

Tabla 6: Descripción de las variables asociadas a cada condición experimental. Como control al proceso se consideró la extracción de los ácidos nucleicos del tejido en Fresco.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	VARIABLES		
TRATAMIENTO	TTO1	TTO2	TTO3
TIEMPO	Previo (P)	2 horas (t2h)	7 horas (t7h)
TEJIDO	Velo	Arteria	Músculo
PROTOCOLO	Protocolo A/B	Protocolo B/A	

Las condiciones experimentales y las variables de cada condición quedaron definidas como se muestra en la Tabla 6.

Se prepararon las soluciones *stock* para cada una de las enzimas y las soluciones de utilización para cada tratamiento (Anexo II- Protocolo IV). Para favorecer la acción enzimática se mantuvieron las muestras, durante todo el periodo de tratamiento, en una incubadora de cultivos celulares (Inc246, Memmert) a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

Tras la acción de los tratamientos enzimáticos se procesaron 95 válvulas, teniendo en cuenta un $n=5$ para cada una de las variables de estudio, de las que se obtuvieron 275 muestras. Éstas, aisladas de las tres zonas de estudio, se procesaron en fragmentos de 0,5 x 0,5 mm.

Se realizaron 3 ciclos de lavado en PBS estéril de 10 minutos de duración bajo agitación orbital a 12.000 rpm en condiciones de T^aA. Posteriormente se procedió a la extracción de los ácidos nucleicos (Anexo II- Protocolo V). Una vez aislado, se congelaron las muestras de ácido desoxirribonucleico de doble cadena (*double stranded Deoxyribonucleic Acid*, dsDNA) a -20°C hasta su utilización.

La cuantificación de dsDNA se realizó por fluorimetría utilizando un kit comercial (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA, Invitrogen). Para ello se descongelaron las muestras a T^aA, se le añadieron los componentes del kit y se realizó una recta patrón con un estándar de dsDNA (DNA- λ) (suministrado en el kit) según las instrucciones del fabricante.

Se midió la señal de las muestras en placas de 96 pocillos en un fluorímetro (Synergy HT, Bio-TEK) a una sensibilidad de 68 fmol, longitud de onda de excitación de 485/20 nm y longitud de onda de emisión de 528/20 nm. A la medida registrada se restó la obtenida para el blanco.

Tanto para la preparación de las muestras como para su medición, fue necesario trabajar en condiciones de oscuridad y se mantuvieron las muestras alejadas de fuentes lumínicas.

2.2- VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MATRIZ

Como complemento a la cuantificación descrita en el apartado anterior, se estableció un análisis cualitativo paralelo. De las mismas 275 muestras de válvulas utilizadas, se obtuvieron 275 muestras para histología. Se procesaron como se ha detallado en el punto 1.2.

2.3- DESCRIPCIÓN DE UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN ÓPTIMO

Los resultados relacionados con el apartado 2.1 nos permitieron definir los tratamientos enzimáticos más eficientes, por lo que se pudo continuar el diseño del protocolo y a continuación se muestran las etapas completas de los protocolos de descelularización más efectivos (Figura 22):

PASO 1: Lavado de 24 horas a T^aA con agua destilada estéril.

PASO 2: Se introdujeron las muestras en la solución hipotónica (Anexo II- Protocolo I). En el Protocolo A/B esta solución fue ácida y, por tanto, se ajustó el pH entre 5-5,5. Sin embargo en el Protocolo B/A esta solución fue básica y se ajustó el pH entre 11-11,5. Las muestras se mantuvieron en esta solución hipotónica durante 48 horas a T^aA.

PASO 3: Las muestras se pusieron en contacto con la solución hipertónica (Anexo II- Protocolo II). En este caso el pH se ajustó entre 11-11,5 para la solución hipertónica básica del Protocolo A/B y entre 5-5,5 para la solución hipertónica ácida correspondiente al

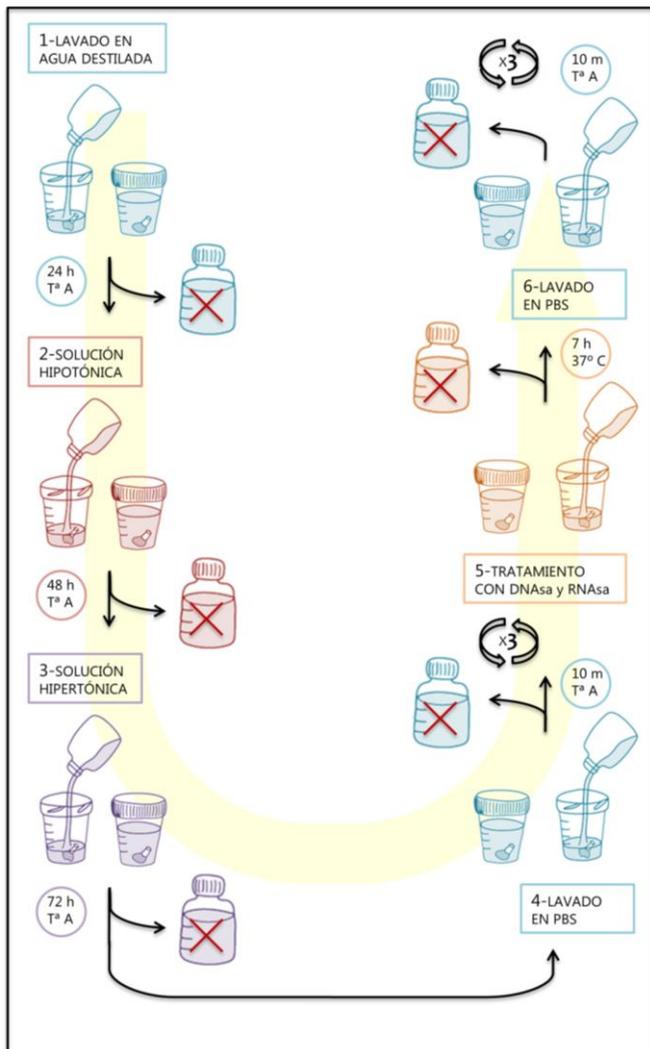


Figura 22: Diagrama esquemático de la optimización de un protocolo de descelerización. Se pueden apreciar las etapas constituyentes, los cambios y desechos de soluciones que se producen en cada paso así como las condiciones experimentales que las caracterizan.

Protocolo B/A. Las muestras se mantuvieron en esta solución hipertónica durante 72 horas a T^aA.

PASO 4: Se llevaron a cabo 3 ciclos de lavado con PBS estéril de 10 minutos de duración bajo agitación orbital a 12.000 rpm en condiciones de T^aA.

PASO 5: Se realizó un tratamiento enzimático con desoxirribonucleasa I (DNAsa I) (50 µg/ml) y ribonucleasa A (RNAsa A) (40 µg/ml) (Anexo II- Protocolo III). Se dejó actuar durante 7 horas en una incubadora de cultivos celulares a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

PASO 6: Por último, se finalizó con otra serie de 3 ciclos de lavado en PBS de 10 minutos de duración bajo agitación orbital a 12.000 rpm en condiciones de T^aA.

Los ajustes de pH se alcanzaron con HCl 1 M y NaOH 2 M y todas las soluciones fueron preparadas en condiciones de asepsia.

Como se puede observar, la diferencia principal entre el Protocolo A/B y el Protocolo B/A radica en la preparación de las soluciones hipotónicas e hipertónicas (Figura 23).

En el Protocolo A/B, la solución hipotónica fue ácida y, por tanto, se ajustó el pH entre 5-5,5 con HCl 1 M, y la solución hipertónica fue básica, ajustándose el pH a 11-11,5 con NaOH 2 M. El Protocolo B/A consistió en lo opuesto, por una parte la solución hipotónica fue básica, ajustándose el pH a 11-11,5 con NaOH 2 M, y la solución hipertónica fue ácida para lo que se ajustó el pH con HCl 1 M entre 5-5,5.



Figura 23: Esquema explicativo de las diferencias entre el protocolo A/B y el protocolo B/A. Éstas se centraron en la preparación de las soluciones hipotónicas, paso 2, y las soluciones hipertónicas, paso 3.

OBJETIVO 3: CARACTERIZAR LAS ESTRUCTURAS ACELULARES OBTENIDAS

Tras la estandarización de un protocolo de descelularización reproducible, en este caso de dos protocolos, se realizó un análisis exhaustivo sobre las estructuras acelulares obtenidas. Por una parte se realizaron más pruebas para evidenciar la ausencia de un componente celular viable y, por otro lado, se caracterizó cuantitativamente la matriz acelular tridimensional resultante.

3.1- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA/AUSENCIA DE CÉLULAS VIABLES EN EL TEJIDO

Como complemento a los estudios histológicos, se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM). Además se puso a punto un método de medición de viabilidad del tejido para la valoración de presencia de células viables tras la descelularización.

3.1.1- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Se utilizaron 15 muestras de válvulas cardíacas de las que se extrajeron un total de 45 muestras de Velo, Arteria y Músculo, para su procesamiento. Se consideró un $n=5$ para cada condición experimental: tejido en Fresco, descelularizado con el Protocolo A/B y descelularizado con el Protocolo B/A.

Para SEM se extrajeron fragmentos de 5 mm^2 y se fijaron químicamente en una solución de glutaraldehído al 2,5% durante 48 horas, en oscuridad y a 4°C . La visualización de las muestras, en el microscopio electrónico de barrido (JEOL 6.100), requirió una

preparación previa de deshidratación, desecación y recubrimiento (Anexo II- Protocolo VI). Para la toma de fotografías se utilizó el programa JSM 5.000.

3.1.2- ESTUDIOS DE VIABILIDAD TISULAR

Al no existir ningún trabajo previo sobre la medida de viabilidad en tejido utilizando Alamar Blue, se puso a punto un protocolo para su aplicación en estructuras tridimensionales. Dicho reagente ha sido ampliamente descrito para la determinación de viabilidad celular sobre cultivos celulares. Según las indicaciones del fabricante, se recomendaba una incubación a 37°C de una solución al 10% (v/v) de Alamar Blue durante 4 horas para células adheridas a superficies plásticas.

Se propuso un protocolo donde se realizó una toma de medidas a diferentes tiempos de las matrices obtenidas en el Protocolo A/B y el Protocolo B/A; considerando como control al proceso las muestras de tejido Fresco (n=5).

Se utilizaron un total de 15 válvulas cardíacas de las que se extrajeron 45 muestras de las 3 zonas de estudio, Velo, Arteria y Músculo.

Los tejidos en Fresco y las matrices descelularizadas se procesaron en fragmentos de 5 x 5 mm y se introdujeron en una placa de 24 pocillos en una solución de medio de cultivo base (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, DMEM) suplementada con Alamar Blue al 10% (v/v) y Penicilina/Estreptomina (P/E) al 10% (v/v). Tras añadir el medio, se introdujo en la incubadora de cultivos celulares a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa (Figura 24).

A tiempo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 24 horas de incubación se recuperaron 100 μ l de la solución y se midió la fluorescencia con una sensibilidad de 45 fmol, una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm, en el fluorímetro (Synergy HT, Bio-TEK). Para las mediciones se utilizaron placas de 96 pocillos. Cada vez que se recogió una alícuota de la solución para la medida de la fluorescencia, se añadió una cantidad idéntica, a la placa de 24 pocillos, para evitar una concentración en la señal. A la medida de fluorescencia se restó el valor obtenido en el blanco.

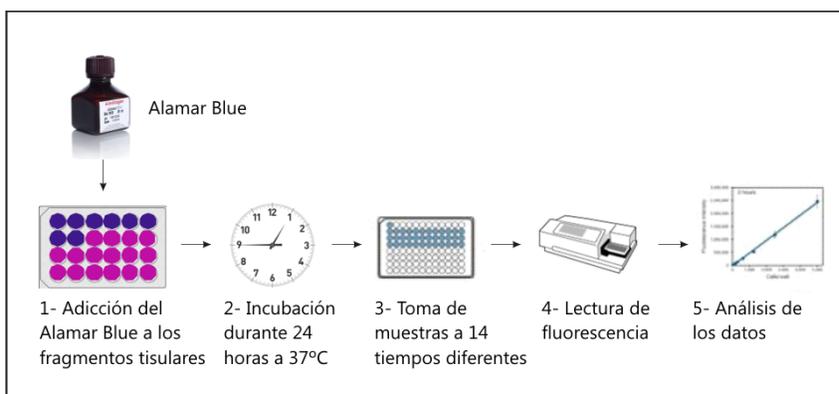


Figura 24: Representación esquemática del protocolo puesto a punto para la medida de viabilidad tisular. Se añadió la solución de cultivo base suplementada con Alamar Blue y se midieron, por fluorescencia, las muestras extraídas a 14 tiempos diferentes.

3.2- VALORACIÓN DEL ESTADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Se cuantificó el estado de la estructura tridimensional de la matriz acelular resultante por dos métodos complementarios: una caracterización biomecánica y una caracterización bioquímica.

3.2.1- CARACTERIZACIÓN BIOMECÁNICA

Con los ensayos biomecánicos se valoró un posible daño generado en la matriz extracelular tras el protocolo de descelularización. Para ello se realizó un test de tensión uniaxial con un tensiómetro (Imperial 1.000, Mecmesin) de carga 1.000 Newton (N).

Los ensayos se realizaron a T^ªA sobre fragmentos de Arteria y Músculo de 2 cm de longitud (n=5). Fue necesario el procesamiento de 15 válvulas cardíacas de las que se extrajeron 30 muestras para el estudio del tejido en Fresco, el tejido descelularizado con el Protocolo A/B y el tejido descelularizado con el Protocolo B/A.

Para homogeneizar la zona de extrusión fue necesario procesar las muestras con una morfología determinada (Figura 25- A). Previo al ensayo se midió el espesor de las muestras en tres zonas (e1: cerca de un extremo, e2: en la zona de extrusión, e3: en el extremo opuesto) con un calibre de precisión (Elecont 318-101, Mitutoyo). Posteriormente, los extremos del tejido se colocaron en las mordazas del tensiómetro bajo condiciones de cero estrés (Figura 25- B).

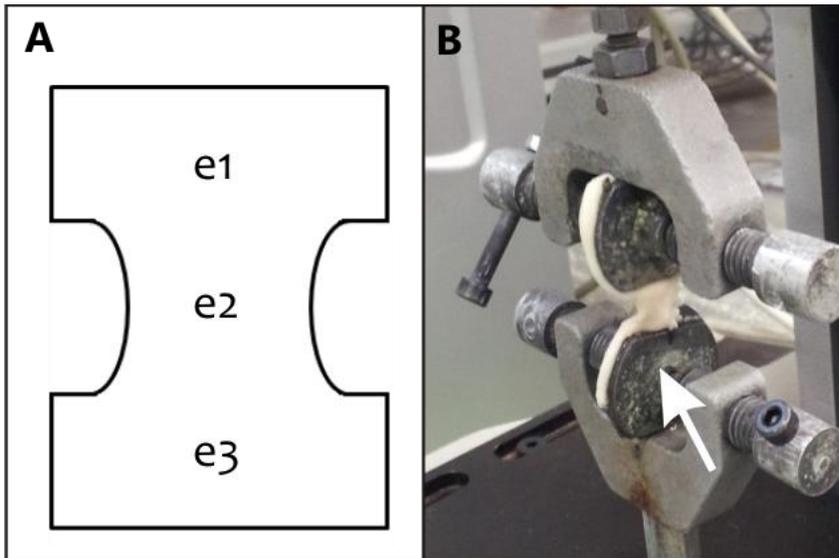


Figura 25: Realización de los ensayos biomecánicos. (A) Diseño realizado para homogeneizar la zona de ruptura o extrusión. Las muestras de Arteria y Músculo se procesaron con dicha morfología y se tomaron medidas del espesor en los tres puntos indicados: e1, e2 y e3. (B) Fotografía de la pared de la Arteria en el momento de toma de mediciones hasta precarga en el tensiómetro. La flecha blanca muestra las mordazas que aprisionaban el tejido durante el ensayo.

Al principio de las mediciones hasta precarga se utilizó una velocidad de avance de 75 mm/min. Una vez que se alcanzó el estado de precarga, la velocidad de avance hasta ruptura continuó a 75 mm/min. Se consideraron los datos de: Fuerza de rotura (N), Rigidez (N/mm), Tensión de rotura (MPa) y Módulo elástico, o de Young, (MPa).

3.2.2- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Se recogieron 135 muestras de 45 válvulas. Se extrajeron fragmentos de Velo, Arteria y Músculo (n=5), de las muestras en Fresco, las muestras descelularizadas por el Protocolo A/B y las descelularizadas por el Protocolo B/A.

En primer lugar, se determinó su peso seco; para ello, se cortaron fragmentos de papel de aluminio de 4 x 4 cm, se rotularon y pesaron en una báscula de precisión (ABZ100C, PCE). A continuación, se desecaron las muestras, sobre el papel de aluminio durante 1 hora a 60°C (1.500E, Shel Lab). Se pesaron, una vez desecadas, y se consideró el peso de la muestra como la diferencia entre los dos pesajes realizados.

Se utilizaron kits colorimétricos comerciales específicos para cada componente extracelular: colágeno, elastina y glucosaminoglicanos (GAG). Para la detección de colágeno se utilizó el kit Sircol (Anexo II- Protocolo VII), para la detección de la elastina se utilizó el kit Fastin (Anexo II- Protocolo VIII) y para la detección de GAG se utilizó el kit Blyscan (Anexo II- Protocolo IX).

Se midió la colorimetría obtenida por absorbancia, en el lector de placas (Multiskan EX, Labsystems), con los filtros recomendados por el fabricante. Se restó el blanco a la medida de absorbancia.

OBJETIVO 4: EVALUAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS Y REALIZAR UN ENSAYO DE BIOCOMPATIBILIDAD

Con objeto de conocer si los reactivos químicos empleados en la elaboración de las soluciones hipotónicas e hipertónicas de descelularización se pudiesen mantener en concentraciones residuales dentro de la matriz acelular se realizó un ensayo de citotoxicidad. Además se hizo imprescindible una valoración de la biocompatibilidad de la matriz acelular resultante, poniéndola en contacto con células del mismo origen tisular.

4.1- AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL COMPONENTE CELULAR

Se estableció un cultivo celular a partir de 5 muestras de válvulas en Fresco. Para ello se extrajeron sólo los Velos valvulares, se pesaron y se disgregaron mecánicamente con bisturí. Posteriormente se realizó una digestión enzimática con colagenasa tipo I (de *Clostridium histolyticum*), a una concentración de 2 mg/ml en DMEM en un tubo de polipropileno de 50 ml durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, parámetros definidos en la incubadora de cultivos celulares, hasta la completa disgregación de la muestra.

Finalizada la digestión, se centrifugó la muestra a 353 g (1.400 rpm) durante 10 minutos (5.804, Eppendorf) y se desechó el sobrenadante.

Se determinó el número de células obtenidas por el método de exclusión Azul Tripán. Para ello, se resuspendió el pellet obtenido en un volumen de medio conocido y, tras una homogeneización

de la muestra, se recogió una alícuota de 10 μ l en un microtubo de 0,5 ml. Se añadió un volumen conocido de Azul Tripán y se introdujeron 10 μ l de la mezcla en la cámara de contaje Neubauer.

El contaje celular de los 8 campos de la cámara, se realizó bajo microscopio óptico invertido (090, Leica Microsystems) a 10 aumentos.

Para el cálculo de las células en la suspensión original se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células totales} = (\text{N}^\circ \text{ células contadas}/8) \times \text{Factor de dilución} \times \text{Volumen de resuspensión} \times 10^4.$$

La población celular viable obtenida se sembró en superficies plásticas de poliestireno, pase 0 (P0), a una densidad celular inicial de 1×10^4 células/cm², en un medio de cultivo completo (DMEM + 10% suero bovino fetal (SBF) + 1% P/E + 2 mM L-Glutamina). Los cultivos se mantuvieron en la incubadora de cultivos celulares a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa hasta su utilización, realizándose cambios de medio cada 2-3 días.

Para la realización de los ensayos, se recuperaron las células en estado de preconfluencia con técnicas de tripsinización celular sobre las superficies plásticas donde permanecieron hasta su utilización. Para ello, en primer lugar, se retiró el medio de cultivo por aspiración, a continuación, se añadió una solución de Tripsina/EDTA 0,25% (*Trypsin/Ethylenediaminetetraacetic Acid*, T/E) para la separación de las células de la superficie de cultivo. Tras

una incubación durante 5 minutos a 37°C, se neutralizó la acción enzimática con un mismo volumen de medio de cultivo completo.

Se recuperó la solución a un tubo de polipropileno de 15 ml para su centrifugación a 353 g durante 10 minutos y se determinó el número de células viables por el método de exclusión Azul Tripán.

4.2- CITOTOXICIDAD DEL MEDIO DE DESCELULARIZACIÓN

En la evaluación de la posible citotoxicidad de los restos de las soluciones descelularizantes en las muestras, se utilizó el líquido del último lavado con PBS del protocolo de descelularización. El líquido de lavado se mezcló con medio de cultivo completo en una proporción 1:1 y se filtró por vacío. Simultáneamente, se recuperaron células del velo en P0, como se ha descrito en el apartado anterior, y se sembraron en cámaras de cultivo celular de 8 pocillos a una densidad inicial de 5×10^3 células/cm².

Se utilizó la mezcla de medio de cultivo- líquido de lavado, preparado anteriormente, para añadirlo a las células cada 2-3 días durante un periodo total de 11 días.

Se consideró la realización de dos controles: positivo y negativo. Como control positivo se realizó un cambio de medio, en uno de los 8 pocillos, sólo con medio de cultivo completo, es decir, como el mantenimiento llevado a cabo con las células en cultivo hasta su utilización. Como control negativo, se realizó el cambio de medio sólo con medio de cultivo completo y 24 horas antes de realizar el ensayo de viabilidad celular, se añadió dimetilsulfóxido (DMSO).

Transcurrido el tiempo de estudio, se procedió a la realización del kit *Life/Dead* para la visualización de células vivas y muertas. Se añadieron 200 μ l de los reactivos: 2 μ M de calceína AM y 4 μ M de etidio (Eth D-1), preparado sobre PBS, se incubó durante 1 hora a T^aA. Después de la incubación se realizó un lavado intenso con PBS y se añadió medio de cultivo completo a cada uno de los pocillos. La fluorescencia se visualizó con el microscopio TE2.000-U, Nikon Eclipse y se cuantificaron las células vivas y muertas obtenidas, así como el porcentaje de viabilidad.

4.3- BIOCMPATIBILIDAD DE LAS MATRICES ACELULARES

Como ensayo de biocompatibilidad de las matrices acelulares obtenidas se diseñó un modelo de siembra directa de las células en cultivo sobre el tejido descelularizado en condiciones de esterilidad (Figura 26).

Se utilizaron los velos de 20 válvulas cardíacas, 10 se descelularizaron con el Protocolo A/B y otros 10 se descelularizaron con el Protocolo B/A.

Para ello fue necesaria la realización de tres etapas: en un primer paso se fijó el velo descelularizado a la base de una placa de poliestireno de 24 pocillos con fibrina, un biomaterial natural que puede actuar como pegamento biológico, cuya obtención se explica más adelante; en un segundo paso se procedió a una siembra a alta densidad de las células aisladas del velo (consultar apartado 4.1) sobre el tejido fijado en el fondo del pocillo y para finalizar, se dejó evolucionar durante un determinado periodo.

PASO 1- FIJACIÓN DEL TEJIDO DESCELULARIZADO

Previamente se obtuvo plasma ovino a partir de 20 ml de sangre total extraída de vías periféricas de oveja. Para ello se utilizaron tubos de citrato trisódico donde se mezcló por inversión el citrato con la muestra de sangre.

La sangre se centrifugó (Eppendorf Modelo 5.804) a 1.620g (3.000 rpm) durante 10 minutos para la separación de la fracción plasmática. El plasma obtenido se alicuotó en crioviales de 2ml, manteniendo las condiciones de esterilidad, y se congeló a -40°C hasta su utilización.

Se retiró, con ayuda de una pinza y tijeras, el velo de las válvulas cardíacas tras su descelularización mediante el Protocolo A/B y el Protocolo B/A. Con ayuda de un bisturí se cortaron fragmentos (n=10) de 0,5 mm y se mantuvieron en placas Petri estériles con PBS hasta su utilización.

Se descongelaron las muestras de plasma, se agitaron en un vórtex y se atemperaron para su utilización. Sobre la mezcla de plasma fresco congelado (400 μ l/ml) y medio de cultivo completo se añadió ácido tranexámico (40 μ l/ml) para prevenir la fibrinólisis de la fibrina y, por último, se añadió cloruro cálcico (4 mg/ml) como activador del mecanismo de coagulación.

Se añadieron 500 μ l de la mezcla en cada pocillo de la placa de 24 y se introdujo en la incubadora de cultivos celulares a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

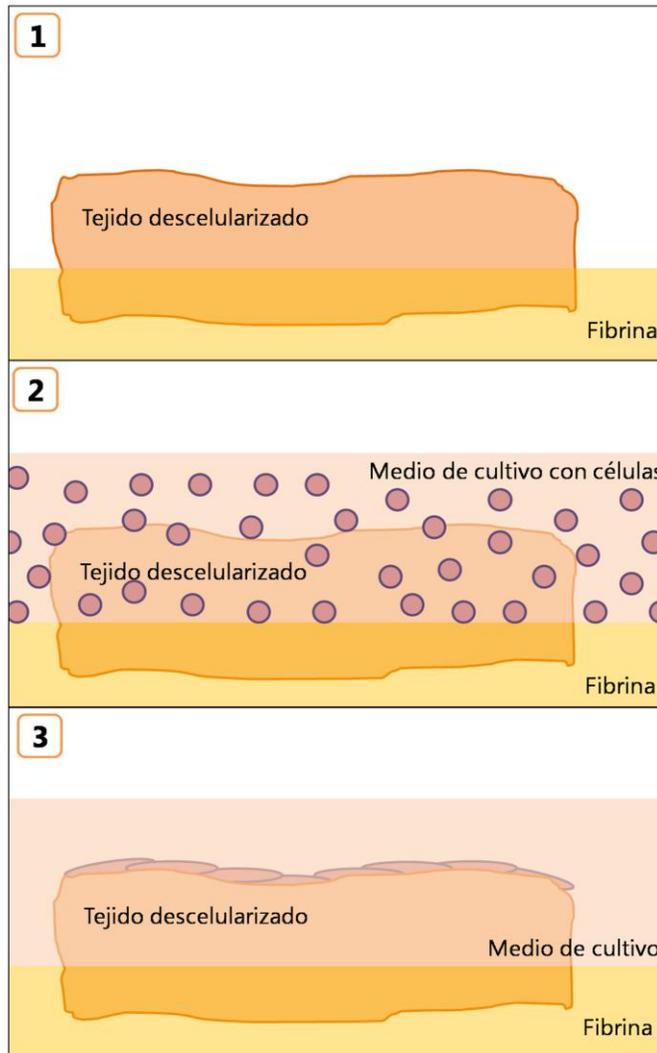


Figura 26: Representación esquemática del modelo de biocompatibilidad. En un primer paso (1) se fijó el tejido descelularizado sobre una base de fibrina coagulada y se dejó estabilizar durante 4 horas hasta que en un segundo paso se añadió el componente celular (2) a una alta densidad de siembra. Por último se asignó un periodo de 45 días de evolución (3).

Transcurridos 2 minutos se procedió a la colocación del tejido descelularizado sobre la base de fibrina en coagulación y se volvió a introducir en la incubadora de cultivos celulares a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa durante un periodo de 4 horas (Figura 26- 1).

PASO 2- SIEMBRA DEL COMPONENTE CELULAR

Una vez estabilizada la unión entre la fibrina y el tejido descelularizado, se realizó una siembra celular a alta densidad. Se tripsinizaron las células en cultivo del velo, en P0, y se sembraron directamente sobre el pocillo donde se encontraba fijado el tejido a una densidad de 40×10^3 células/cm² (Figura 26- 2). Se dejó estabilizar la siembra 48 horas para favorecer la posible adhesión del componente celular a la estructura.

PASO 3- EVOLUCIÓN DEL TEJIDO RECELULARIZADO

Se mantuvo el estudio durante un periodo de 45 días, con cambios de medio de cultivo cada 2-3 días. En todos los casos el medio de cultivo cubrió completamente la matriz acelular y se realizó un seguimiento por microscopía óptica invertida (Figura 26- 3) con cada cambio de medio.

Una vez finalizado el tiempo de evolución se fijaron las muestras para histología, como se detalla en el apartado 1.2.

5- MICROBIOLOGÍA

Para asegurar la esterilidad de las muestras durante el proceso, se realizaron una serie de controles microbiológicos. De cada válvula cardíaca procesada se cortó un pequeño fragmento de Arteria y se introdujo en caldo de tioglicolato. Se introdujo en una incubadora (31.111, Forma Scientific) a 37°C, 5% CO₂, durante 15 días. Asimismo, se inocularon hemocultivos aerobios y anaerobios con el último líquido de desecho del protocolo de descelerización. Los hemocultivos se introdujeron en un dispositivo especializado (BacT/Alert® 3DGO, Biomerieux) y se consideraron estériles todas las muestras que no mostraron un cambio en la turbidez del medio tras 7 días de incubación.

Como criterio de valoración de los análisis microbiológicos, se desecharon todas las muestras que presentaron crecimiento microbiano en cualquiera de los controles realizados.

6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La representación de los datos obtenidos se realizó como la media \pm error estándar de la media (EEM). Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico R (*R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*). Fue necesario descargar los paquetes estadísticos *car*⁸², *gvlma*⁴⁹ y *multcomp*.¹⁶⁴

Para el desarrollo del análisis estadístico de los datos se aplicó un modelo lineal generalizado y se comprobó la distribución normal de los residuos. Sobre el modelo lineal, se realizó un análisis de varianza (*ANalysis Of VAriance*, ANOVA) factorial, para evaluar el efecto de cada factor presente, y se aplicó un ajuste *white adjust* (localizado dentro del paquete estadístico *car*). La variabilidad y heterogeneidad características de datos obtenidos a partir de muestras biológicas pueden generar el no cumplimiento de alguna de las asunciones del modelo, por lo que el ajuste se aplicó en todos los casos para asegurar la homocedasticidad en los residuos. Una vez realizada la ANOVA, se realizó un análisis *post hoc* con el test de Tukey para todos los factores y así evaluar el grado de significación al realizar una comparación entre las clases del factor. Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

La puesta a punto de un protocolo de descelularización requiere definir los pasos a seguir para alcanzar el objetivo de generar una matriz acelular y estandarizar, dentro de cada etapa, las variables generadas por cada condición experimental. Es por ello, que su elaboración es un proceso secuencial donde cada resultado obtenido en cada fase, sustenta la realización de la siguiente.

A continuación, se presenta la descripción y caracterización de los objetivos llevados a cabo, teniendo en cuenta que se han encontrado separados temporalmente en su ejecución.

OBJETIVO 1: ANALIZAR LAS COMBINACIONES GENERADAS A PARTIR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES CHOQUES OSMÓTICOS Y CHOQUES DE PH

Para la condición experimental *choques de pH* se definieron 3 variables: pH ácido (entre 5 y 5,5), pH neutro (entre 7 y 7,5) y pH básico (entre 11 y 11,5).

La medición y ajuste de pH se realizó siempre después de la preparación de cada solución, con HCl y NaOH, asegurando que se registrase siempre en el rango anteriormente especificado.

A continuación se muestra el grado de alcalinidad y basicidad alcanzado en las soluciones en base a una escala de pH donde se consideró como valor de referencia el pH Neutro (7- 7,5) (Figura 27).

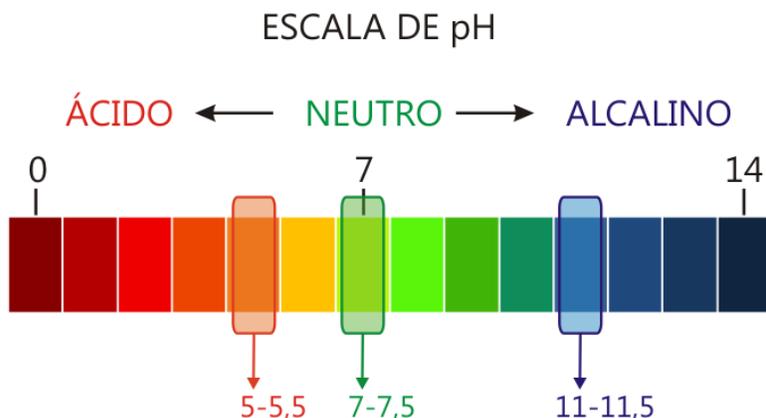


Figura 27: Escala de pH con las variables utilizadas. Se ha representado la escala de pH con los valores escogidos como variables para la condición experimental *choques de pH*. Como se puede observar el pH ácido no es muy ácido respecto a la escala de acidez, mientras que el pH básico es muy básico respecto a la escala de alcalinidad.

1.1- MEDICIÓN DE LA OSMOLALIDAD

Para la condición experimental *choques osmóticos* se consideró esencial la medición de la concentración de solutos en una solución susceptible de variar la presión osmótica de las células, también denominada osmolalidad (osmol/kg).

Tras el ajuste de pH, se midió la osmolalidad de las soluciones hipotónicas e hipertónicas y se comprobaron sus valores de tonicidad respecto al valor de referencia, la osmolalidad de la sangre (0,300 osmol/kg).

Como se puede observar, el ajuste de pH hacia valores más ácidos o más básicos no afectó a la tonicidad descrita para las soluciones hipotónicas e hipertónicas (Tabla 7).

Tabla 7: Valores de la osmolalidad de las soluciones de descelularización. Las medidas de las soluciones hipotónicas mostraron valores muy por debajo del valor de referencia, mientras que las soluciones hipertónicas fueron más elevadas que dicho valor. Se muestran las medias y el error estándar de la media (EEM).

	SOLUCIÓN HIPOTÓNICA			SOLUCIÓN HIPERTÓNICA		
	pH Ácido	pH Neutro	pH Básico	pH Ácido	pH Neutro	pH Básico
MEDIA	0,066	0,054	0,068	0,474	0,451	0,460
EEM	0,006	0,005	0,008	0,041	0,026	0,021

*Valor de referencia: se consideró la osmolalidad de la sangre (0,300 osmol/kg).

Al no existir interferencia en la preparación de una solución con ambas condiciones, se consideró que eran compatibles y que podían actuar combinadas incluyéndolas en una misma solución de descelularización.

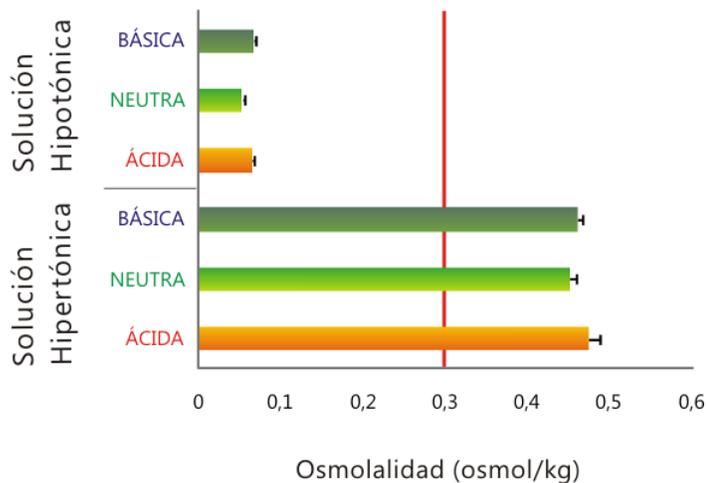


Figura 28: Representación de los valores de osmolalidad. Tanto los valores de hipotonicidad como los de hipertonicidad se encontraron alejados del valor de referencia (barra roja); n=10.

Los resultados mostraron que todas las soluciones utilizadas cumplieron con los criterios establecidos para su uso como agentes descelularizantes (Figura 28).

1.2- ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

A continuación, se procede a la descripción de los resultados histológicos, segregados por tipo de protocolo aplicado, de las 285 muestras analizadas.

Mediante la técnica de tinción H-E, se diferenció la presencia de componente celular teñido de morado intenso, por la acción del colorante básico, hematoxilina, y la matriz extracelular teñida de rosa al contrastar con el colorante ácido, eosina.

Se estableció un sistema de comparación de las tres zonas de la válvula en Fresco: Velo, Arteria y Músculo, con cada uno de los resultados obtenidos en esas mismas áreas tras el proceso de descelularización por cada combinación generada a partir de las variables experimentales descritas.

1.2.1- MUESTRAS EN FRESCO

En el grupo experimental Tejido en Fresco, considerado como control, cabe destacar una elevada presencia de componente celular en cada una de las zonas de estudio: Velo (Figura 29- AA), Arteria (Figura 29- AB) y Músculo (Figura 29- AC). Las muestras procedían de corderos de entre 75 ± 15 días de edad y, al tratarse de un tejido de edad temprana, se evidenció una gran concentración de células dentro del tejido.

VELO (Figura 29- AA). En los cortes teñidos se pudieron apreciar perfectamente las tres capas: fibrosa, esponjosa y ventricularis. La mayor intensidad cromática se correspondió con la capa fibrosa, constituida principalmente por fibras de colágeno densamente organizadas.

ARTERIA (Figura 29- AB). En esta zona también se pudieron diferenciar las capas constituyentes, capa íntima, capa media y capa adventicia. Se observó la integridad del endotelio vascular (capa íntima), donde se diferenció el componente celular. Los núcleos del epitelio estratificado plano, mostraron unos bordes redondeados, indicativo de la viabilidad de las células visualizadas. Las zonas de mayor coloración rosácea se correspondieron con zonas de mayor concentración de fibras de elastina (capa media) que conformaron membranas fenestradas altamente organizadas. También se detectaron células viables en la capa adventicia, constituyendo la estructura más laxa presente en la Arteria.

MÚSCULO CARDIACO (Figura 29- AC). Se diferenciaron las fibras musculares, ya fuese en disposición transversal o perpendicular, y tejido conectivo laxo como conector entre ambas. Se observaron núcleos celulares viables dentro de cada fibra muscular diferenciada.

1.2.2- PROTOCOLO N/N (NEUTRO/NEUTRO)

Tras la aplicación del Protocolo N/N se observó una reducción del componente celular en Velo y Músculo, no en Arteria, mientras que se mantuvo una buena estructuración tridimensional en las tres zonas.

VELO (Figura 29- AD). Se evidenció una gran cantidad de células viables y una preservación media de la estructura. La eliminación celular no fue homogénea, no se detectó presencia celular en la capa ventricularis, mientras que en la fibrosa y la esponjosa las células viables se encontraron repartidas homogéneamente por el tejido. Se pudieron diferenciar las 3 capas representativas, pero con dificultad puesto que la capa fibrosa y la esponjosa se encontraron muy unidas y tampoco se detectaron diferencias cromáticas entre ambas.

ARTERIA (Figura 29- AE). En esta zona no resultó evidente la eliminación del componente celular, ya que se encontró presente un endotelio vascular intacto. Sin embargo, la preservación de la matriz fue muy elevada presentándose similar a la estructura mostrada en la Arteria en Fresco (Figura 29- AB). Se mantuvo la organización de las fibras elásticas y de colágeno en las membranas fenestradas características de la capa media.

MÚSCULO (Figura 29- AF). Se observó una leve reducción del componente celular respecto al tejido en Fresco (Figura 29- AC), mientras que la matriz extracelular se mantuvo altamente estructurada, incluso se visualizó el tejido conectivo laxo que conectaba los haces de fibras.

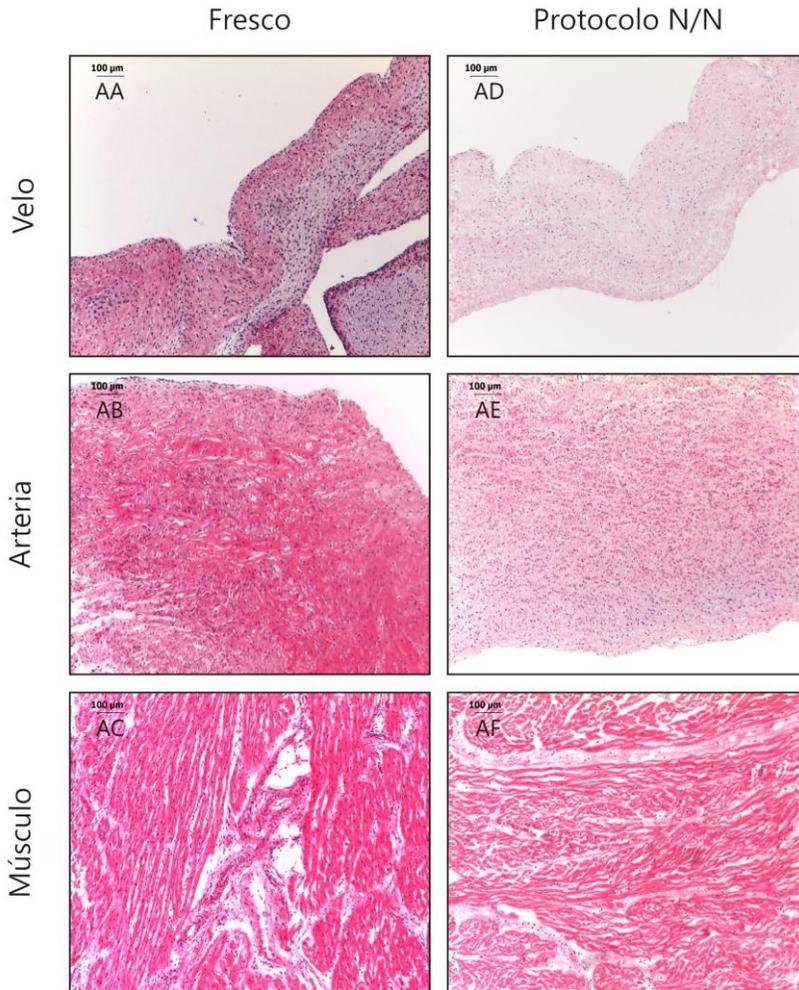


Figura 29: Comparación histológica del Protocolo N/N respecto al tejido en Fresco. Se evidenció una gran presencia de células viables y una matriz altamente estructurada en Arteria (AE) y Músculo (AF) respecto a los controles (AB y AC). Sin embargo, en Velo (AD) se observó una disminución en cuanto al contenido celular y la estructuración respecto al Fresco (AA). Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.3- PROTOCOLO N/A (NEUTRO/ÁCIDO)

Se redujo el componente celular, tras la realización del Protocolo N/A, en cada una de las zonas de estudio, pero no resultó suficiente puesto que se detectaron células viables. Se evidenció un elevado grado de desestructuración en Velo (Figura 30- AG) y Arteria (Figura 30- AH).

VELO. Se observó una eliminación de componente celular viable, pero permaneció un elevado número de células. El protocolo aplicado afectó considerablemente a la estructuración del Velo. Concretamente en la capa Fibrosa, se detectó una desintegración de las fibras de colágeno (Figura 30- AG). Al encontrarse más debilitada, fue susceptible de crear discontinuidades al realizar el corte con el microtomo.

ARTERIA (Figura 30- AH). No se apreció una reducción en la concentración de células respecto al control (Figura 30- AB). En esta zona, el protocolo también debilitó la estructura de la capa adventicia de la Arteria, dónde se observó una separación entre dicha capa y la capa media. Se evidenció una discontinuidad del endotelio vascular, aunque la lámina basal permaneció íntegra y la capa media se mantuvo muy estructurada.

MÚSCULO (Figura 30- AI). Resultó ser la estructura más preservada, tanto a nivel de matriz extracelular como de componente celular presente. Se apreció una disposición de las fibras, tanto transversal como longitudinalmente, similar a la observada en Fresco. Además se conservaron los vasos sanguíneos intercalados entre las fibras.

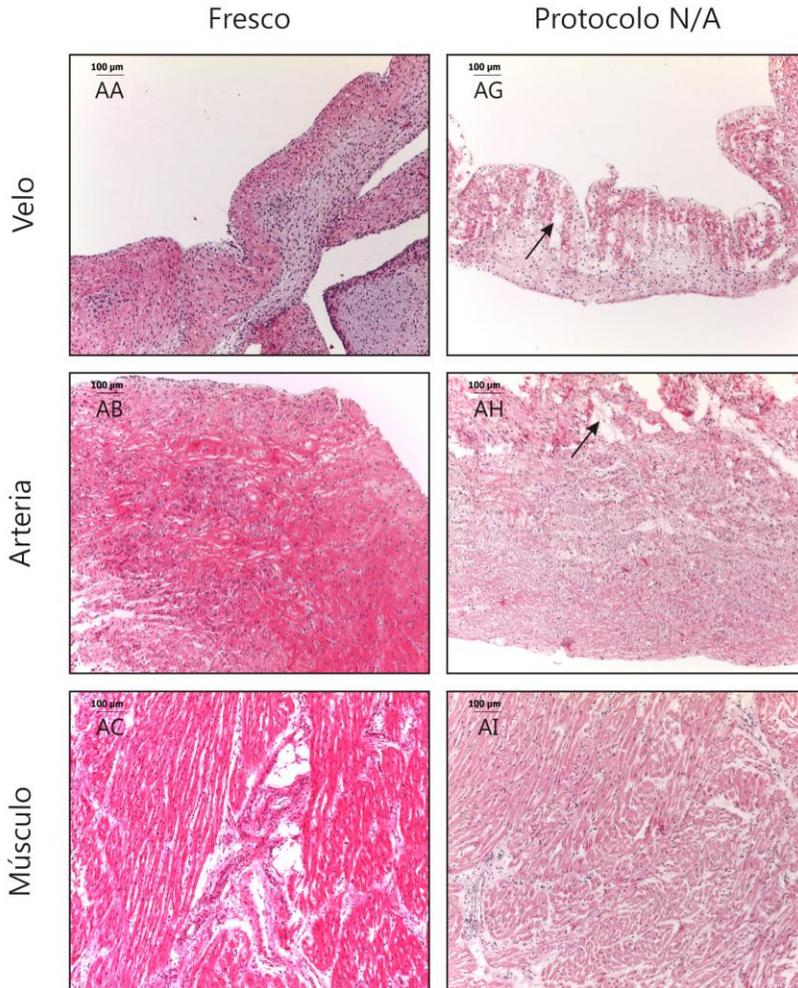


Figura 30: Comparación histológica del Protocolo N/A respecto al tejido en Fresco. Cabe destacar el alto grado de desestructuración (flechas negras) de la matriz en Velo (AG) y Arteria (AH). En el Velo sólo parece afectar a la capa fibrosa, mientras que en la Arteria afectó a la capa adventicia. El Músculo (AI) apareció altamente estructurado. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.4- PROTOCOLO N/B (NEUTRO/BÁSICO)

Tras la acción del Protocolo N/B, permanecieron células viables en todos los tejidos aunque se visualizó un elevado grado de desestructuración en la matriz extracelular en las tres zonas de estudio (Figura 31- AJ, AK y AL) respecto al tejido en Fresco (Figura 31- AA, AB y AC).

VELO. En cuanto al nivel de descelularización propiamente dicho, se observó una eliminación total de células en la capa ventricularis, mientras que en el resto de capas permanecieron células viables. La desestructuración fue evidente en esta zona (Figura 31- AJ), y resultó compleja la diferenciación de las estructuras propias del velo valvular.

ARTERIA (Figura 31- AK). Se detectaron células viables remanentes en la capa media y la capa adventicia aunque también se observó un alto grado de desestructuración, donde se perdió la conformación de membranas fenestradas elásticas. Se evidenció una pérdida tanto del endotelio vascular como de la membrana basal de sustento.

MÚSCULO (Figura 31- AL). Fue la zona tisular donde la eliminación del componente celular resultó más evidente. Se observaron fibras musculares completamente descelularizadas, aunque se siguieron detectando células en las zonas vascularizadas. En esta zona también se observó, pero en menor medida, una leve desestructuración en la disposición de las fibras musculares.

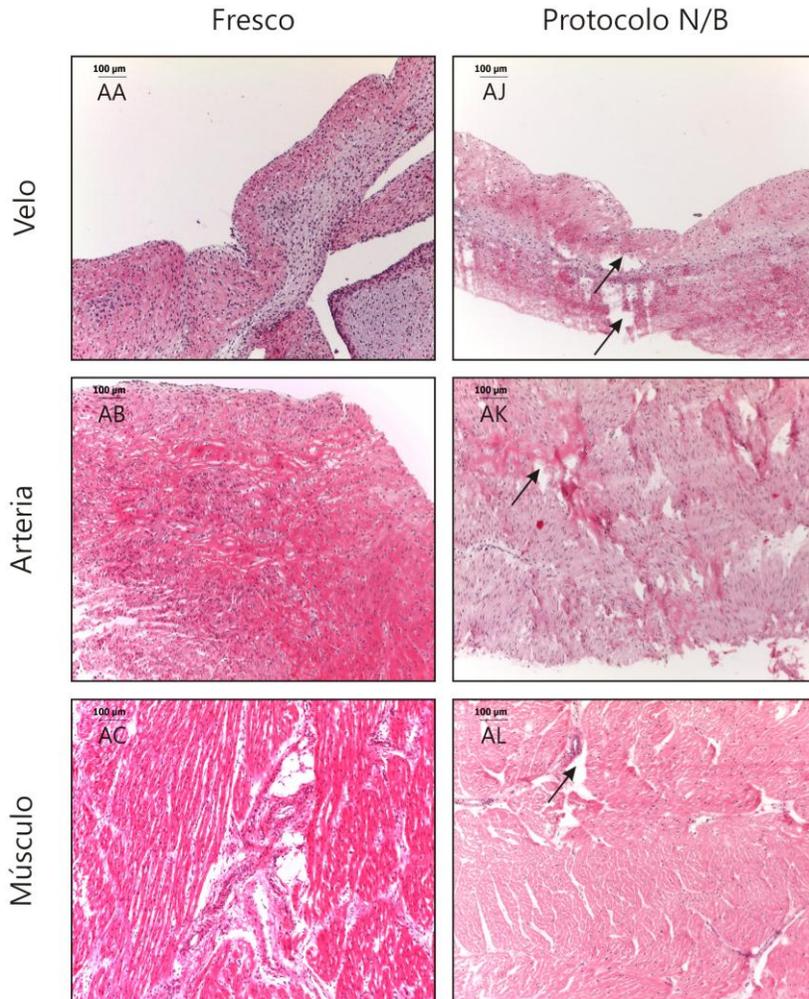


Figura 31: Comparación histológica del Protocolo N/B respecto al tejido en Fresco. Se observó un elevado grado de desestructuración (flechas negras) en todas las zonas de estudio, Velo (AJ), Arteria (AK) y Músculo (AL) aunque estuvo relacionado con una pérdida de células viables. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.5- PROTOCOLO A/N (ÁCIDO/NEUTRO)

El efecto del Protocolo A/N mostró una disminución en la concentración de componente celular viable, aunque se detectaron muchas células remanentes en todas las zonas de estudio (Figura 32- AM, AN, AO). El grado de estructuración se mantuvo muy elevado en todos los tejidos.

VELO (Figura 32- AM). Se detectó una gran concentración de células viables en todas las capas. Sin embargo, en esta zona la estructura permaneció intacta tras la acción del protocolo, diferenciándose claramente las tres capas del velo valvular.

ARTERIA (Figura 32- AN). El grado de eliminación celular fue medio, permaneciendo células viables en la matriz. Se observó un grado de estructuración tisular medio, ya que se detectaron pequeñas zonas de pérdida de componente celular. En el resto de la capa media se mantuvieron zonas más amplias con la conformación típica de membranas fenestradas. Además, se detectó desestructuración en la capa íntima, donde las fibras colágenas y elásticas se desprendieron de la capa media.

MÚSCULO. Se redujo la concentración de células viables presentes, pero aún así se detectó componente celular entre las fibras, el tejido conectivo y las zonas vascularizadas. La estructura tridimensional no se vio afectada (Figura 32- AO). La disposición transversal y longitudinal de fibras musculares se distinguió perfectamente en todas las zonas visualizadas.

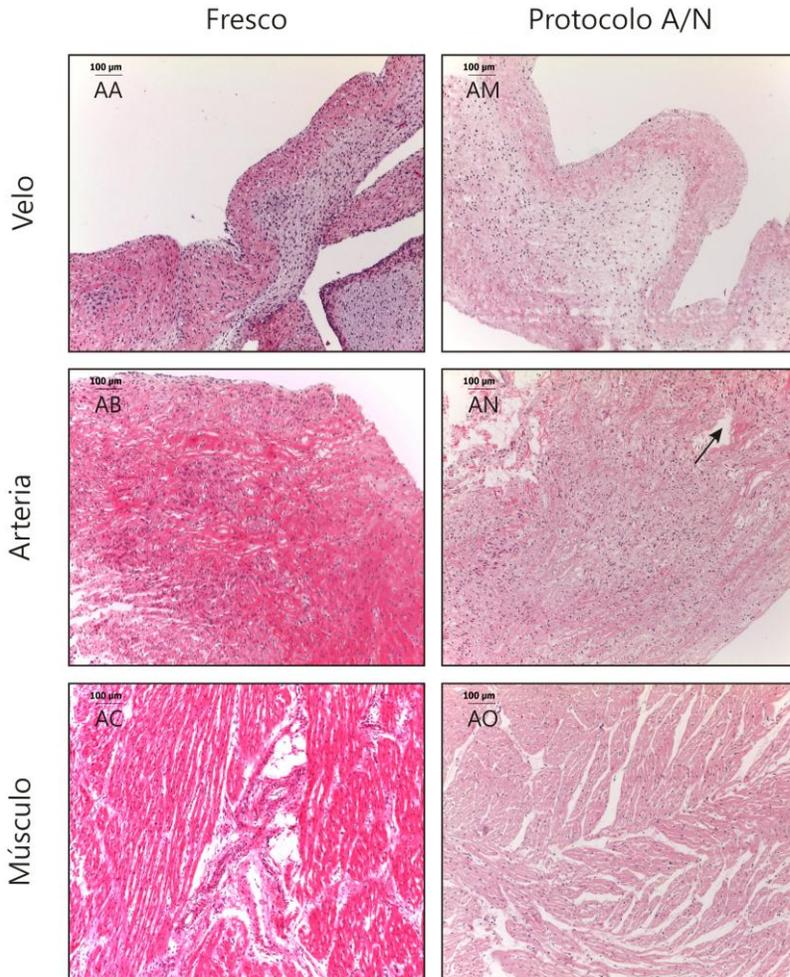


Figura 32: Comparación histológica del Protocolo A/N respecto al tejido en Fresco. En todos los casos de estudio (AM, AN y AO) se detectaron niveles elevados de células viables presentes. Se evidenciaron pérdidas en la estructura tridimensional (flecha negra) en la Arteria (AN). Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.6- PROTOCOLO A/A (ÁCIDO/ÁCIDO)

No se evidenció efectividad tras la acción del Protocolo A/A, en todos los casos (Figura 33- AP, AQ y AR) el grado de estructuración y el grado de celularidad fue muy similar al mostrado en las tres zonas del tejido en Fresco (Figura 33- AA, AB y AC).

VELO (Figura 33- AP). Fue la única zona tisular donde se pudieron observar pequeñas áreas sin componente celular. Sin embargo, la concentración de células remanentes fue muy elevada. Se distinguieron perfectamente las 3 capas del velo valvular, con la condensación de fibras de colágeno característica de la capa fibrosa.

ARTERIA (Figura 33- AQ). El grado de celularidad presente fue muy elevado, con una concentración de componente celular similar a la visualizada en el control (Figura 33- AB). Esta zona permaneció muy conservada, evidenciándose endotelio vascular viable. La estructura de membranas fenestradas permaneció homogénea a lo largo de toda la capa media.

MÚSCULO (Figura 33- AR). Tras la aplicación del protocolo, se mostró un gran número de células viables, visualizándose una gran concentración de componente celular entre las diferentes fibras del miocardio. En cuanto a la estructura, las fibras musculares longitudinales y transversales permanecieron muy conservadas. El tejido conectivo y la vascularización también se mostraron intactos, sin detectarse daño en su estructura.

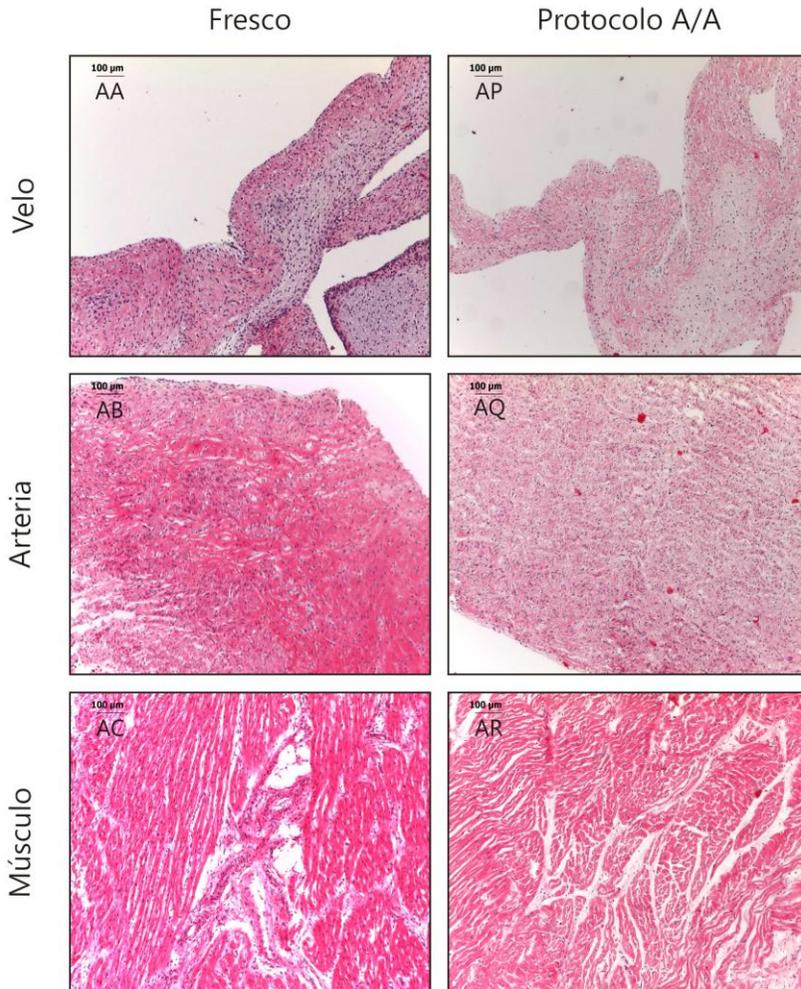


Figura 33: Comparación histológica del Protocolo A/A respecto al tejido en Fresco. Tanto para el grado de celularidad como para el grado de estructuración se detectaron niveles muy elevados en las tres zonas de estudio (AP, AQ y AR) respecto al tejido en Fresco (AA, AB y AC). Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.7- PROTOCOLO A/B (ÁCIDO/BÁSICO)

El protocolo A/B mostró una elevada eficiencia en la eliminación de componente celular en las tres zonas visualizadas (Figura 34- AS, AT y AU). Además, la estructuración tisular permaneció medianamente conservada en los tres tejidos.

VELO (Figura 34- AS). Resultó ser la zona donde se eliminó un mayor componente celular. Se observaron trazas de restos celulares, pero los bordes irregulares evidenciados podrían indicar la no viabilidad de los núcleos visualizados. La conservación de la estructura se consideró media, aunque la capa fibrosa no mostró una tinción intensa, por lo que la concentración de fibras de colágeno podría estar comprometida.

ARTERIA (Figura 34- AT). En la mayor parte del tejido no se encontraron células viables, aunque se detectaron zonas donde sí se observaron restos celulares. Asimismo, su estructura elástica se consideró medianamente conservada ya que resultó similar a la observada en el control (Figura 34- AB). Sin embargo, la disposición de las membranas fenestradas fue más longitudinal que la visualizada en el tejido en Fresco.

MÚSCULO (Figura 34- AU). La eliminación del componente celular resultó muy evidente en el tejido conectivo laxo. En las propias fibras musculares, la estructura se mantuvo muy conservada y se observó una considerable reducción del componente celular respecto al control, aunque se visualizaron células viables dentro de las propias fibras.

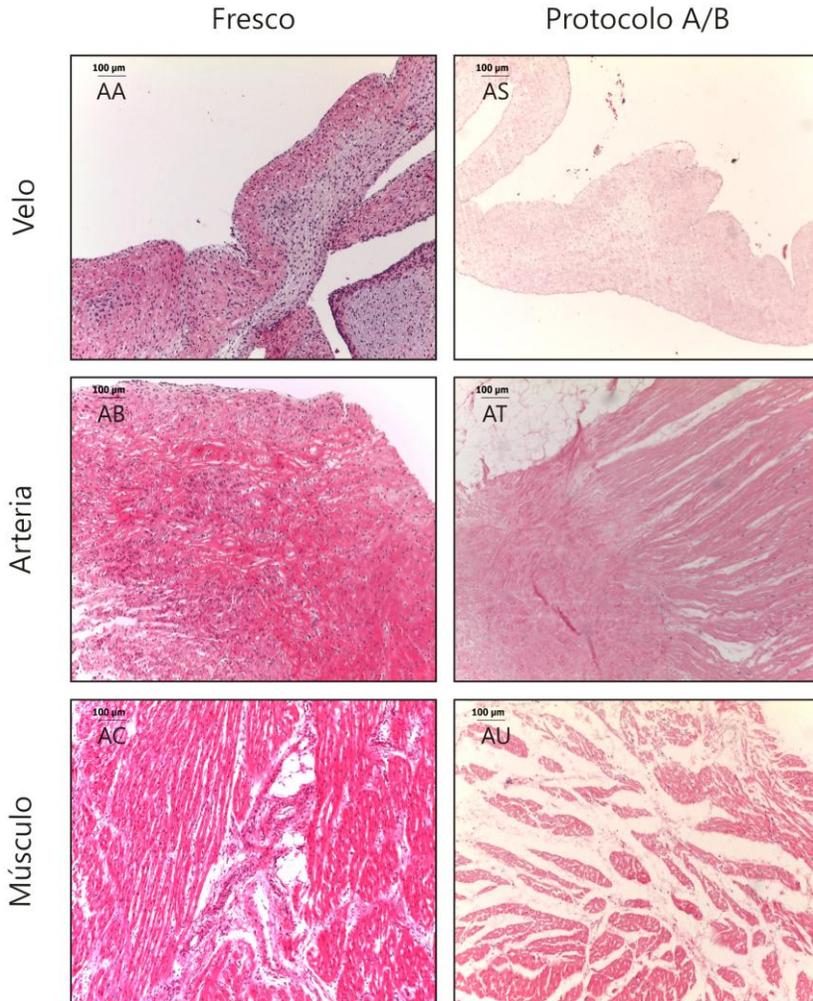


Figura 34: Comparación histológica del Protocolo A/B respecto al tejido en Fresco. El protocolo A/B mostró una elevada eficiencia en la eliminación del componente celular en las tres zonas de estudio (AS, AT y AU) respecto al tejido en Fresco (AA, AB y AC). Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.8- PROTOCOLO B/N (BÁSICO/NEUTRO)

Tras la aplicación del Protocolo B/N, no se observaron diferencias de eliminación celular respecto al control (Figura 35- AA, AB, y AC). Sin embargo, la preservación estructural resultó muy elevada en todas las zonas (Figura 35- AV, AW y AX).

VELO. Se detectó una gran reducción del componente celular (Figura 35- AV) respecto al tejido en Fresco (Figura 35- AA). Aún así, permanecieron remanentes células viables distribuidas homogéneamente por todo el tejido. El grado de preservación estructural resultó muy elevado, distinguiéndose todas las capas características del velo valvular.

ARTERIA (Figura 35- AW). No se evidenció una reducción del componente celular tras la aplicación del protocolo. Se visualizó una integridad del endotelio vascular junto con su componente celular. Se mantuvo la alta estructuración de las fibras elásticas en la capa media, sin embargo, el grado de descelularización no resultó apreciable, detectándose un gran número de células viables en la matriz.

MÚSCULO. El número de células viables se vio disminuido en esta zona (Figura 35- AX), pero no resultó suficiente puesto que se localizaron células viables a lo largo de todas las zonas visualizadas. A pesar de la reducción del número de células, la matriz extracelular permaneció altamente estructurada, distinguiéndose todas las conformaciones características de este tejido.

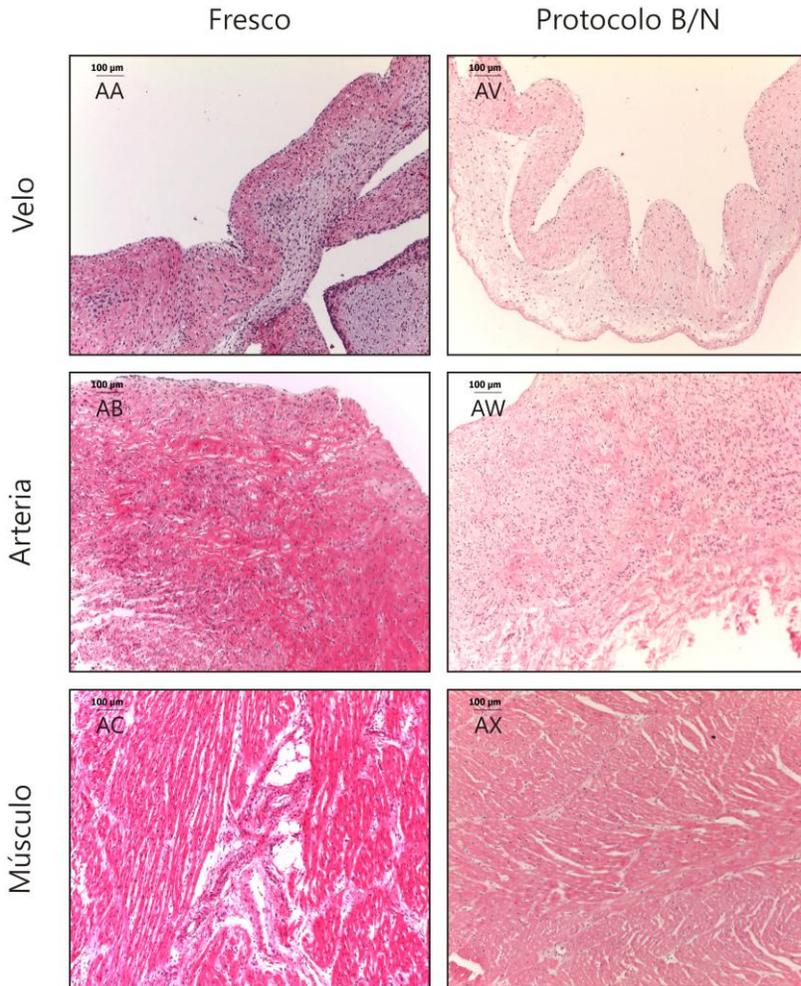


Figura 35: Comparación histológica del Protocolo B/N respecto al tejido en Fresco. El grado de estructuración obtenido tras la aplicación del Protocolo B/N fue muy elevado (AV, AW y AX) respecto al tejido en Fresco (AA, AB y AC), sin embargo, la eliminación celular no resultó tan efectiva. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.9- PROTOCOLO B/A (BÁSICO/ÁCIDO)

Se evidenció un elevado grado de descelularización en todas las zonas de estudio (Figura 36- AY, AZ y BA) tras aplicar el Protocolo B/A. Permanecieron restos de componentes celulares, pero al presentar bordes no definidos, se pudo considerar la no viabilidad de los mismos. La preservación de la matriz extracelular no resultó homogénea para cada tejido.

VELO (Figura 36- AY). Se consideró un elevado grado de eliminación celular en todas las capas, junto con un nivel elevado de preservación estructural. Se mantuvo la conformación de las diferentes fibras en cada capa y se visualizaron restos de material genético que, por la no definición de los bordes, podrían no mostrar viabilidad.

ARTERIA. La eliminación celular resultó evidente en todas las estructuras (Figura 36- AZ). Se detectaron restos de material nuclear en la zona de la capa media. El grado de estructuración se vio comprometido puesto que se perdió el endotelio vascular, no se diferenciaron las estructuras de membranas fenestradas y no se visualizó la presencia de la capa adventicia.

MÚSCULO. Se observó una eliminación homogénea del componente celular a lo largo de toda la estructura (Figura 36- BA). No se apreciaron restos de material nuclear entre las fibras musculares. El grado de estructuración fue adecuado en las propias fibras musculares, pero se perdió el tejido conectivo entre las mismas.

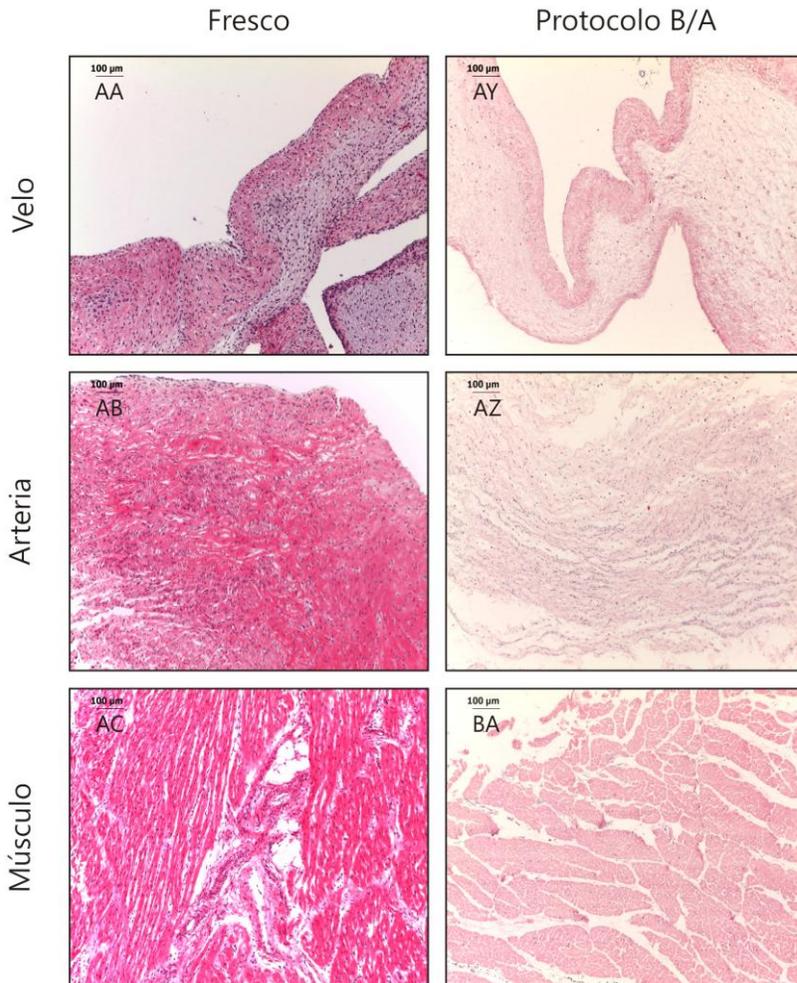


Figura 36: Comparación histológica del Protocolo B/A respecto al tejido en Fresco. En todas las zonas se consideró un elevado grado de eliminación celular (AY, AZ y BA) y el grado de estructuración se mantuvo elevado en Velo (AY), medianamente estructurado en Músculo (BA) y desestructurado en Arteria (AZ). Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.10- PROTOCOLO B/B (BÁSICO/BÁSICO)

Tras la aplicación del Protocolo B/B, permaneció un elevado número de células viables mientras que se obtuvo un alto grado de estructuración tridimensional en todas las zonas de estudio (Figura 37- BB, BC y BD).

VELO (Figura 37- BB). El contenido celular permaneció en niveles elevados en todas las capas. La estructura de la matriz extracelular se mantuvo prácticamente intacta tras el protocolo. Se diferenciaron perfectamente las tres zonas, valorando el alto grado de conservación de la capa ventricularis.

ARTERIA. En cuanto al grado de celularidad presente, se visualizaron niveles muy altos en todo el tejido, incluso se conservó el endotelio vascular (Figura 37- BC) tras la descelerización. Además, la estructura de la capa media y la capa ventricularis se encontraron intactas, diferenciándose todos sus componentes.

MÚSCULO (Figura 37- BD). El componente celular se vio reducido tras la acción del protocolo en comparación con las muestras en Fresco (Figura 37- AC). Sin embargo, en todos los campos visualizados se detectaron restos de núcleos celulares, aunque la no definición de los bordes indicó que podrían no ser viables. Se observó un nivel de conservación elevado en cuanto a matriz tridimensional, diferenciándose todos los haces de fibras musculares, tanto en disposición transversal como longitudinal.

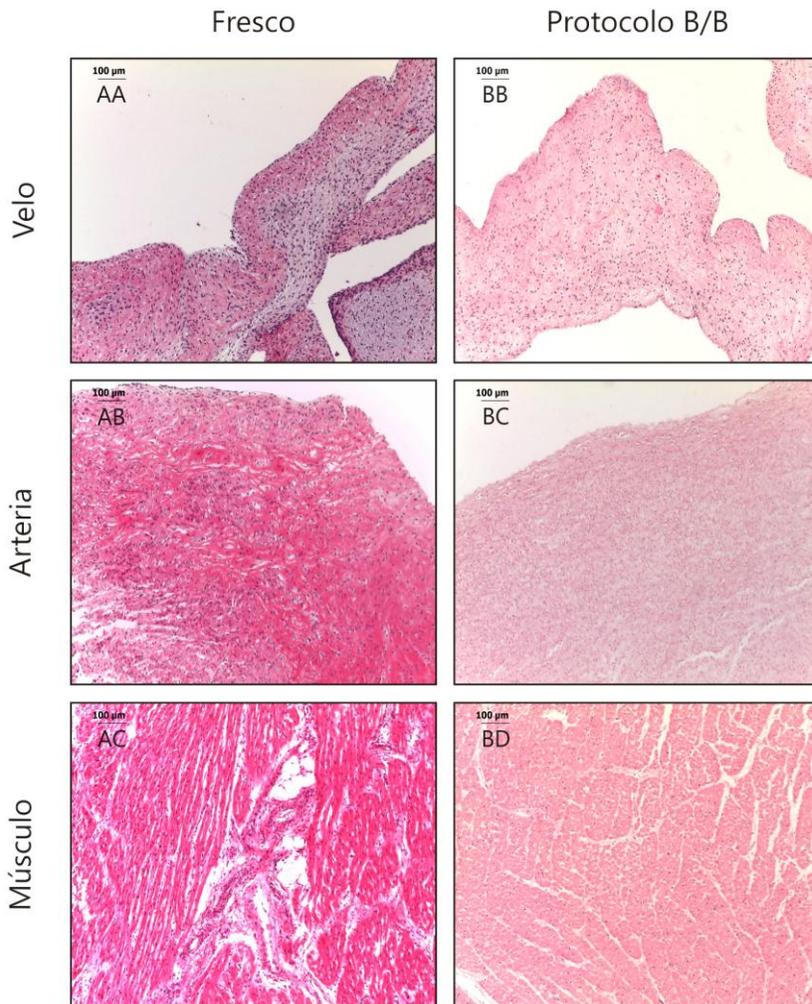


Figura 37: Comparación histológica del Protocolo B/B respecto al tejido en Fresco. Tras la aplicación del protocolo se observó un amplio grado de estructuración en todas las zonas (BB, BC y BD) aunque la reducción del componente celular no fue homogénea. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

1.2.11- ENSAYO CIEGO

Tras la descripción de las preparaciones histológicas por zona de estudio y protocolo aplicado, se procedió a la realización de un ensayo ciego. Al evaluador se le proporcionaron los cortes histológicos sin indicación del protocolo al que pertenecieron. La recopilación de los datos semicuantitativos se refleja en la Tabla 8.

Para la elección del mejor protocolo de descelularización, se consideró aquel que presentase un nivel bajo de celularidad junto con un nivel elevado de estructuración tridimensional.

El análisis de la clasificación realizada indicó la existencia de dos protocolos claramente diferenciados del resto. Por un lado, se seleccionó el Protocolo A/B donde se observó un elevado grado de eliminación celular y un nivel de preservación estructural medio. Otro de los protocolos considerados, el Protocolo B/A, también obtuvo un grado de celularidad mínimo, mientras que los niveles de estructuración de la matriz extracelular resultaron elevados.

La evaluación puso de manifiesto que los dos protocolos más eficientes fueron el Protocolo A/B y el Protocolo B/A. Se realizó una comparación histológica por tipo de tejido (Figuras 38, 39 y 40) donde se evidenciaron estos resultados. Como se ha tratado de una valoración semicuantitativa, se consideró que no se disponía de información suficiente para descartar un protocolo sobre otro y se utilizaron ambos en los siguientes objetivos, donde se pretendió realizar una caracterización más profunda.

Tabla 8: Ensayo ciego sobre los cortes histológicos analizados. Se utilizó una gradación; poco (+), medio (++) y mucho (+++), para clasificar los cortes histológicos obtenidos en función del grado de celularidad y estado de la matriz respecto al presentado en el tejido procesado en Fresco (no ha estado expuesto a ningún tipo de tratamiento). Se consideró que el proceso fue óptimo en cuanto al grado de celularidad si su puntuación resultó escasa (+) y en relación al estado de la matriz si su puntuación fue elevada (+++). Además, se mostraron los resultados separados por zonas de la válvula a considerar, Velo, Arteria y Músculo.

PROTOCOLO	GRADO DE CELULARIDAD			ESTADO DE LA MATRIZ		
	Velo	Arteria	Músculo	Velo	Arteria	Músculo
FRESCO	+++	+++	+++	+++	+++	+++
N/N	++	+++	+++	++	+++	+++
N/A	++	+++	+++	+	++	+++
N/B	++	++	++	+	++	++
A/N	++	++	++	+++	++	+++
A/A	++	+++	+++	+++	+++	+++
A/B	+	+	+	++	++	++
B/N	++	+++	++	+++	+++	+++
B/A	+	+	+	+++	+	++
B/B	++	+++	++	+++	+++	+++

N/N (Neutro/Neutro), N/A (Neutro/Ácido), N/B (Neutro/Básico), A/N (Ácido/Neutro), A/A (Ácido/Ácido), A/B (Ácido/Básico), B/N (Básico/Neutro), B/A (Básico/Ácido), B/B (Básico/Básico).

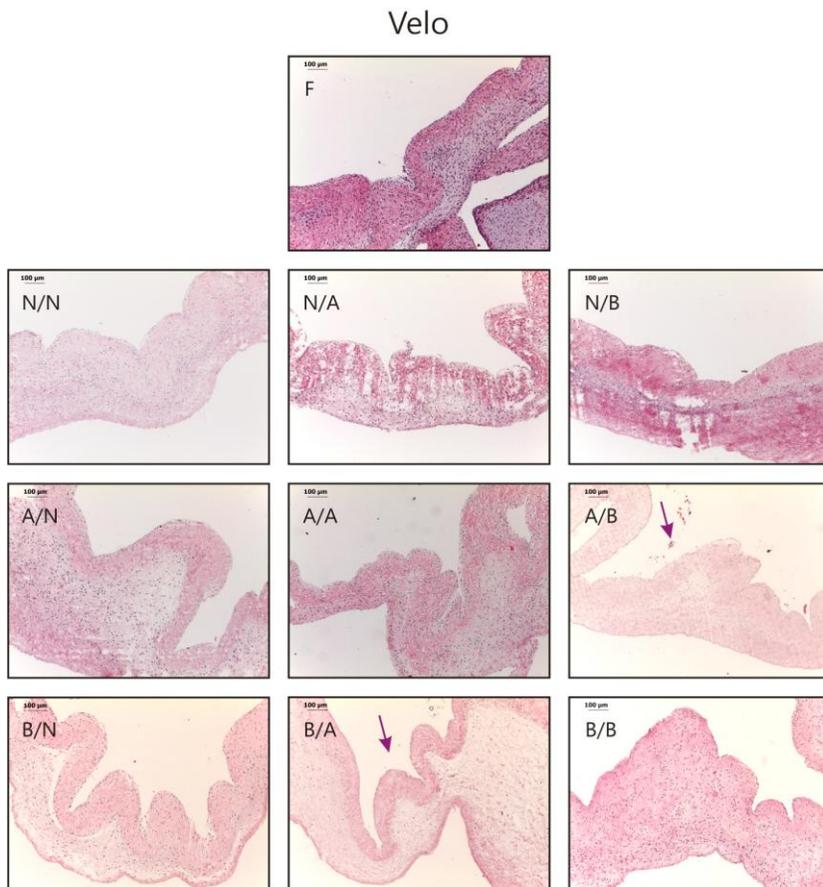


Figura 38: Comparación de las muestras de Velo en función del protocolo aplicado. Cabe destacar el grado de celularidad de la muestra en Fresco (F). Es evidente que todos los protocolos evaluados eliminaron componente celular en este tipo tisular. Concretamente, donde se detectó una mayor eliminación fue en los Velos A/B y B/A. Resultaron significativos los daños provocados en la estructura tridimensional con los protocolos N/A y N/B, mientras que la preservación con el resto de protocolos se consideró entre niveles medios y elevados. Para el Velo los protocolos más efectivos fueron el Protocolo A/B y el Protocolo B/A. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

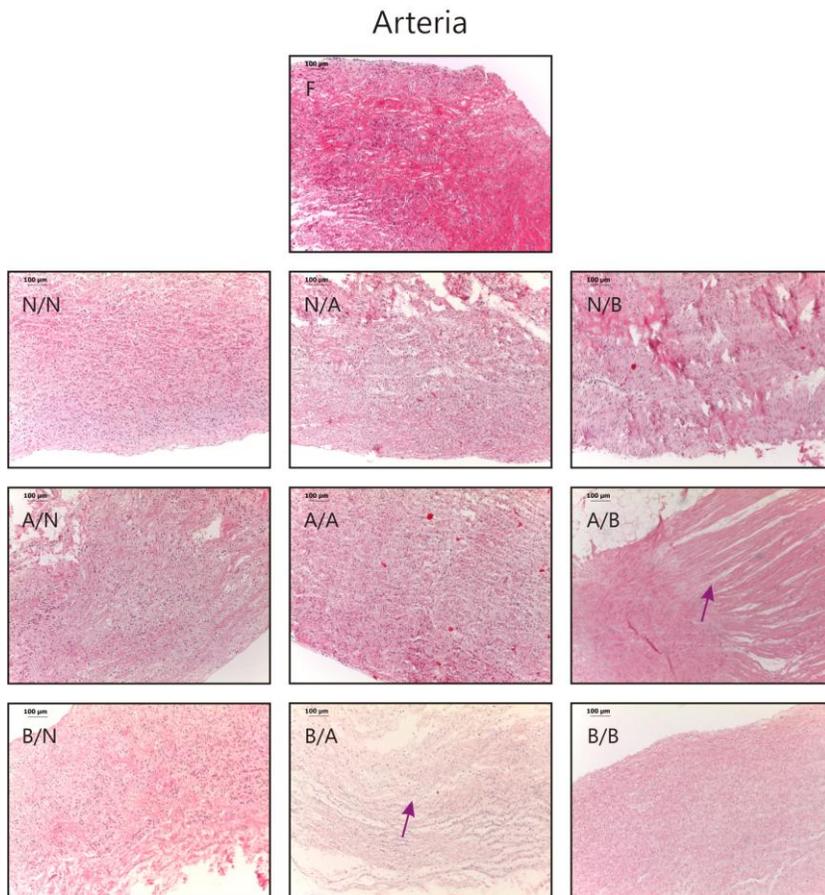


Figura 39: Comparación de las muestras de Arteria en función del protocolo aplicado. El grado de estructuración y celularidad se comparó con el tejido en Fresco (F). La eliminación celular no fue evidente en la mayor parte de protocolos aplicados, resaltando el Protocolo A/B y el B/A, como los únicos efectivos. El grado de estructuración resultó elevado en todos los protocolos aplicados excepto en Arteria A/B y B/A. Por tanto, los protocolos elegidos fueron el A/B y el B/A por su efectividad en la eliminación celular, aunque la conservación estructural fuese media. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

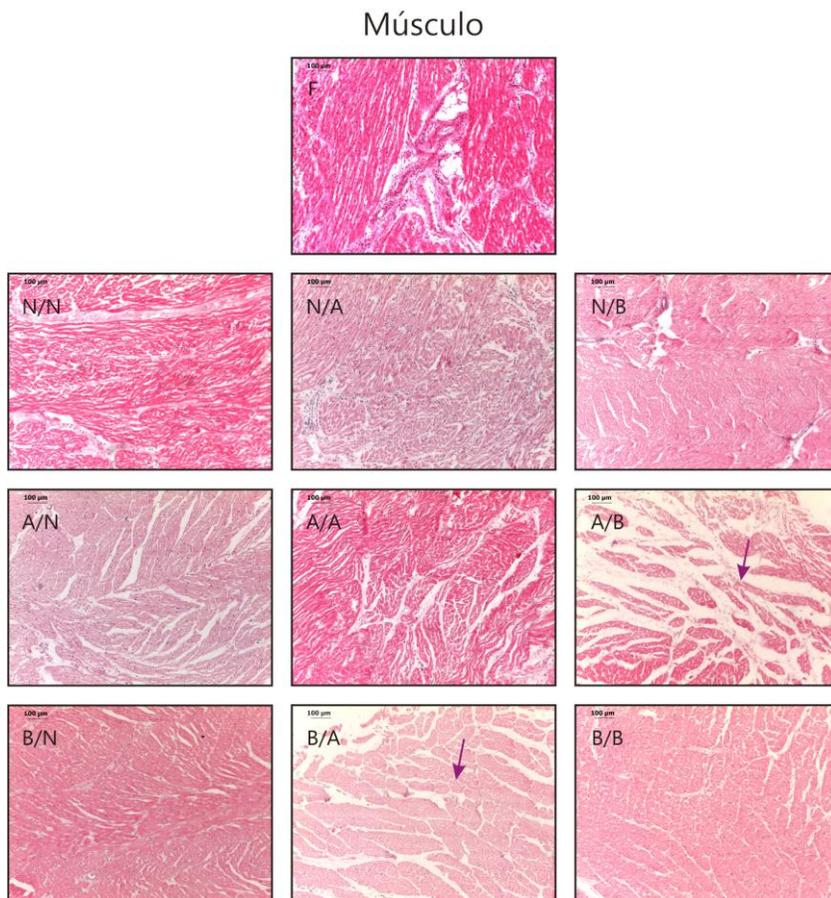


Figura 40: Comparación de las muestras de Músculo en función del protocolo aplicado. La efectividad mostrada con cada combinación experimental mostró sus niveles más elevados en cuanto a eliminación celular y estructuración en los Protocolos A/B y B/A. También se eliminó de forma efectiva el componente celular con el Protocolo A/N, B/N, B/B aunque permanecieron restos celulares en la matriz. En general, la estructura se conservó en todos los protocolos excepto para el Protocolo N/B. Se seleccionaron, como protocolos más efectivos para la descelularización de miocardio, el Protocolo A/B y el Protocolo B/A. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=10.

Los resultados obtenidos en el Objetivo 1 se pueden resumir en las siguientes observaciones.

1. Las variables de las condiciones experimentales consideradas cumplieron las premisas asignadas previamente. El pH utilizado fue ácido, neutro y básico; y las soluciones fueron hipotónicas e hipertónicas respecto a los valores de referencia. Además, la preparación de las dos variables conjuntas no causó interferencias entre ellas y se pudieron utilizar en una misma solución.
2. Las zonas de estudio, Velo, Arteria y Músculo, no se descelularizaron en el mismo grado. Hubo un mayor número de protocolos que eliminaron mediana y elevadamente el componente celular en el Velo, mientras que sólo hubo dos que alcanzasen esos resultados en Arteria y Músculo. Sin embargo, en Músculo y Arteria hubo un mayor número de protocolos que mantuvieron la estructura de la matriz extracelular muy conservada.
3. Se evidenció, por descripción histológica individual y comparación ente grupos, que la mayor eliminación del componente celular fue en el Protocolo A/B y en el Protocolo B/A para las tres zonas de estudio, Velo, Arteria y Músculo. La mayor preservación de la matriz se observó en los protocolos A/N, A/A, B/N, B/B y N/N, aunque fueron los protocolos que también presentaron un mayor componente celular.
4. El ensayo ciego confirmó que los protocolos más eficientes resultaron ser el Protocolo A/B y el Protocolo B/A, siendo, por tanto, los seleccionados para la continuación del estudio.

OBJETIVO 2: DESARROLLAR Y OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN QUE PRESERVE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y ELIMINE LOS RESTOS CELULARES GENERADOS

2.1- ESTANDARIZACIÓN DE UN TRATAMIENTO ENZIMÁTICO MEDIANTE LA CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Uno de los pasos clave en un protocolo de descelularización es la realización de un tratamiento enzimático para la eliminación de los posibles restos de ácidos nucleicos dentro de la matriz acelular. El análisis mediante fluorimetría permitió cuantificar la concentración de dsDNA y así estimar la eficiencia de la acción combinada de las enzimas DNAsa I y RNAsa A.

En la puesta a punto del Tratamiento enzimático se analizaron las siguientes condiciones experimentales:

- Tejido. Se mantuvo el análisis en las tres zonas de estudio, Velo, Arteria y Músculo.
- Se realizó sobre los protocolos de descelularización. Protocolo A/B y Protocolo B/A.
- Tratamiento enzimático. Se realizaron tres tratamientos a diferentes concentraciones de DNAsa I y RNAsa A, TTO1, TTO2 y TTO3.
- Tiempo. Se tuvieron en cuenta tres tiempos de toma de muestras durante el Tratamiento enzimático, definiendo las variables Previo (P), antes del Tratamiento, 2 horas de Tratamiento (t2h) y 7 horas de Tratamiento (t7h).

Como control al proceso, fue considerado el tejido en Fresco para todas las condiciones experimentales.

El Tratamiento enzimático se realizó justo después de que la válvula cardíaca estuviese en contacto con la solución hipertónica. Antes de introducir el tejido en la solución enzimática, se implementó un ciclo de 3 lavados con PBS (de 10 min de duración en cada ciclo). Los lavados se emplearon para retirar posibles restos de la solución hipertónica, puesto que el EDTA (soluta empleado en dicha solución) es un quelante del Mg^{2+} y Ca^{2+} , activadores de la DNasa I, y podría interferir con los resultados obtenidos.

2.1.1- ANÁLISIS GLOBAL DE LOS DATOS

Como análisis previo del conjunto de todos los valores de fluorescencia obtenidos, se representaron los datos en función del factor Tiempo y el factor Tejido. En esta primera aproximación, no se consideró ni el tipo de Tratamiento ni el Protocolo aplicado.

El diagrama de cajas y bigotes obtenido, mostró *a priori* diferencias en la concentración de dsDNA a lo largo del tiempo, disminuyendo con el Tiempo de Tratamiento enzimático en todos los Tejidos analizados (Figura 41). Los niveles más elevados de dsDNA se correspondieron con los tejidos en Fresco (Figura 41- VF, AF y MF). La disminución en el contenido de dsDNA fue más evidente en el Velo que en el resto de tejidos analizados (Figura 41- VP, Vt2, Vt7).

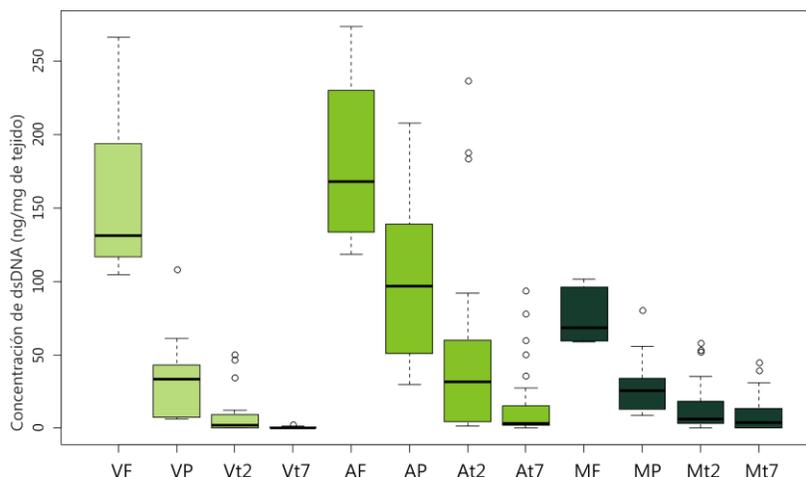


Figura 41: Representación de la concentración de dsDNA por Tejido y Tiempo. Concentración de dsDNA en las 275 muestras procesadas en función del Tiempo y el Tejido. VF: Velo en Fresco, VP: Velo Previo, Vt2: Velo a Tiempo 2h, Vt7: Velo a Tiempo 7h, AF: Arteria en Fresco, AP: Arteria Previo, At2: Arteria a 2h, At7: Arteria a 7h, MF: Músculo en Fresco, MP: Músculo Previo, Mt2: Músculo a 2h, Mt7: Músculo a 7h. Los círculos se correspondieron con valores atípicos.

Se realizaron histogramas con la media y el error estándar de la media (EEM) como representación dónde se considerasen las condiciones experimentales Tratamiento enzimático y Protocolo (Figura 42, 43 y 44).

Se pudo observar que en el Velo disminuyó considerablemente la concentración de dsDNA para todos los Tratamientos y Protocolos aplicados (Figura 42- 1, 2 y 3). Sin embargo, para Arteria y Músculo, se observaron unos niveles similares al Velo, tras la aplicación del Tratamiento 3, independientemente del Protocolo de descelerización aplicado anteriormente (Figura 43- 1, 2 y 3 y Figura 44- 1, 2 y 3).

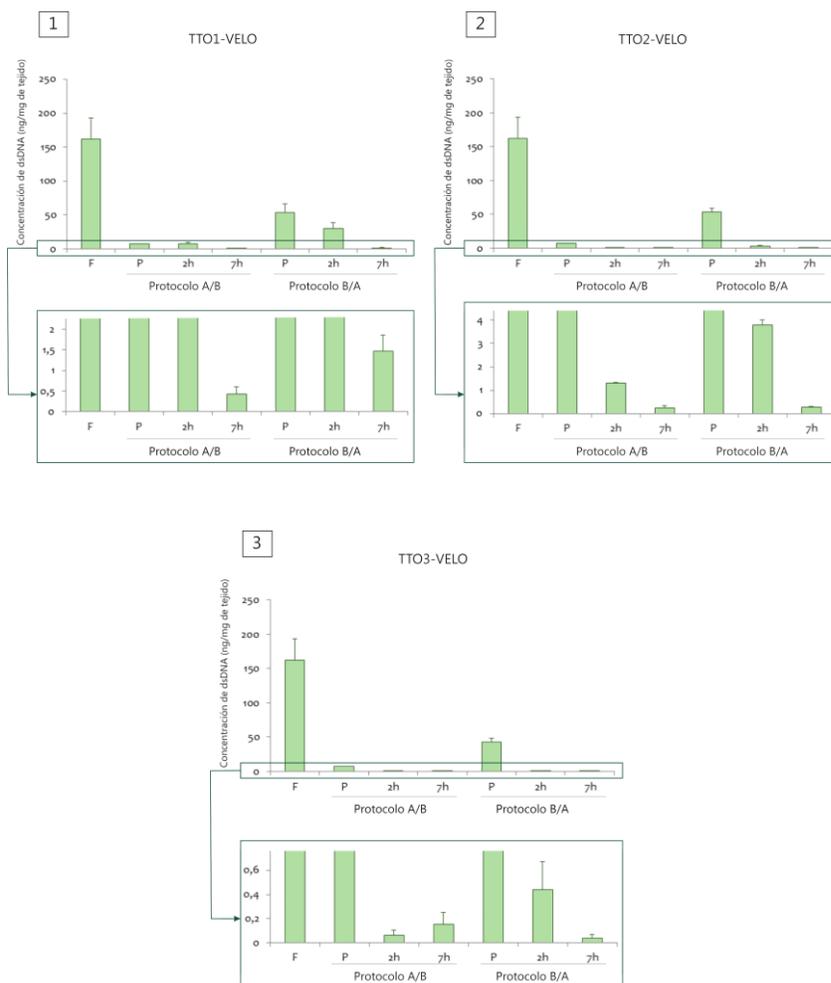


Figura 42: Representación de las medias y EEM de los diferentes Tratamientos enzimáticos realizados en Velo. Todos los tratamientos, TTO1 (1), TTO2 (2) y TTO3 (3), eliminaron dsDNA en Velo. Los recuadros incluyeron ampliaciones de las gráficas para las concentraciones de dsDNA más bajas, que se correspondieron con los valores a 2 y 7 horas de Tratamiento, muy inferiores a los obtenidos en Fresco y Previo. También se pudieron apreciar las diferencias entre los Protocolos en función del Tratamiento; n=5.

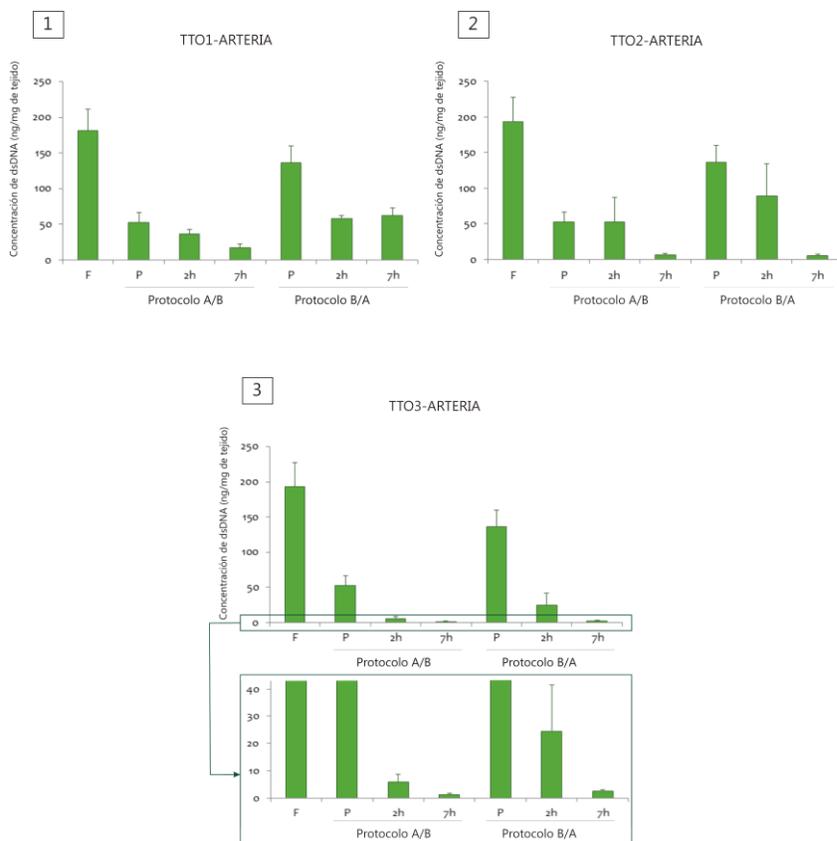


Figura 43: Representación de las medias y EEM de los diferentes Tratamientos enzimáticos realizados en Arteria. Concentración de dsDNA para el TTO1 (1), el TTO2 (2) y el TTO3 (3). Como se pudo observar a través de las tres gráficas, en el TTO3 se detectó una menor concentración de dsDNA respecto a la obtenida para el TTO1 y el TTO2. En la representación del TTO3 se requirió una ampliación (recuadro) de la gráfica en la zona cercana al eje "x" para poder apreciar la representación de los valores de fluorescencia en los tiempos t2h y t7h; n=5.

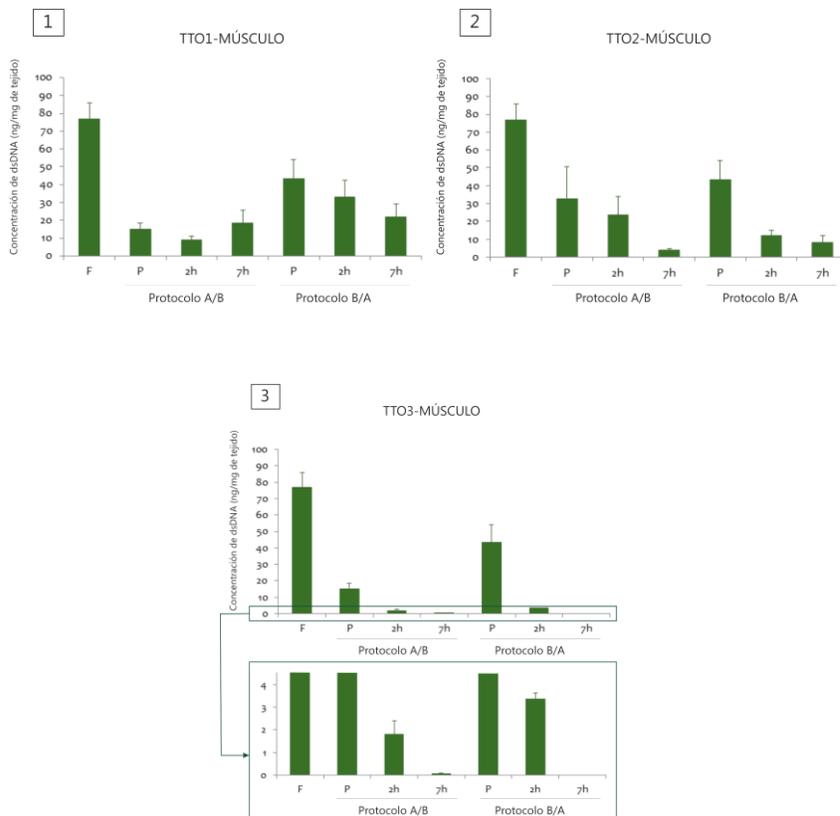


Figura 44: Representación de las medias y EEM de los diferentes Tratamientos enzimáticos realizados en Músculo. Histogramas resultantes del TTO1 (1), del TTO2 (2) y del TTO3 (3). En este tejido también se apreció una mayor disminución en la concentración de dsDNA con el TTO3. En dicha gráfica fue necesario ampliar la zona cercana al eje "x" (recuadro) para poder visualizar los valores obtenidos a t2h y a t7h, muy inferiores a los obtenidos para Fresco y Previo, no observándose dsDNA para el Protocolo B/A con el TTO3 a t7h; n=5.

Se procedió a realizar el análisis estadístico sobre todo el conjunto de datos. En primer lugar, se aplicó el modelo lineal generalizado, y tras observar la distribución de los residuos, se pudo comprobar si se ajustaba a una normal. A continuación, se realizó un análisis de varianza (*ANalysis Of VAriance*, ANOVA) factorial, sobre el modelo lineal generalizado, y se aplicó un ajuste *white adjust*. La heterogeneidad presente en las varianzas de las muestras biológicas pudo ser condicionante para que, en ocasiones, no se cumpliesen los requisitos de homocedasticidad, por lo que el ajuste se aplicó en todos los análisis. Tras la realización de la ANOVA se pudo observar el nivel de significación de los factores, pero para la comparación entre clases, dentro de cada factor, se llevó a cabo un análisis *post hoc* con el test de Tukey. De este modo se pudo determinar qué conjuntos de muestras resultaron estadísticamente diferentes.

Al aplicar el modelo lineal generalizado se comprobó que los residuos no se distribuyeron según una normal, representado en el gráfico cuantil-cuantil (*q-q plot*, Q-Q) (Figura 45). Los resultados se consideraron fiables porque el modelo es robusto aunque se hayan violado las asunciones. Además se detectó una falta de homocedasticidad entre las clases de cada factor que fue corregida con el ajuste *white adjust*.

Un análisis ANOVA, sobre el modelo lineal, permitió observar que todos los factores, Tejido, Protocolo, Tratamiento enzimático y Tiempo, afectaron de forma significativa ($p \leq 0,001$) a la concentración de dsDNA de las muestras (Tabla 9).

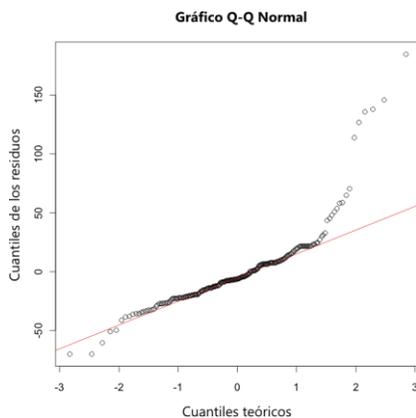


Figura 45: Gráfico Q-Q Normal de la distribución de los residuos estandarizados del modelo. Los residuos no se ajustaron a la normalidad, línea roja, reflejándose las diferencias entre cuantiles.

Al observar que todos los factores mostraron significación, se aplicó el test de Tukey. A continuación, se detallan los resultados obtenidos por factor de análisis.

Tabla 9: ANOVA para los diferentes factores presentes en el análisis global de los datos.

	GL	Valor F		P (>F)
Tejido	2	14,188	1,630e-06	***
Protocolo	2	26,574	4,863e-11	***
Tratamiento	1	11,271	2,213e-05	***
Tiempo	2	42,463	5,037e-10	***
Residuos	215			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. ***p<0,001.

TEJIDO. Los resultados mostraron diferencias muy significativas ($p \leq 0,001$) entre la Arteria y el resto de tejidos (Velo y Músculo) (Figura 46). Esto indicó que el contenido de ácidos nucleicos por miligramo (mg) de tejido analizado resultó más elevado en la Arteria. Sin embargo no existieron diferencias significativas entre el Músculo y el Velo ($p = 0,999$).

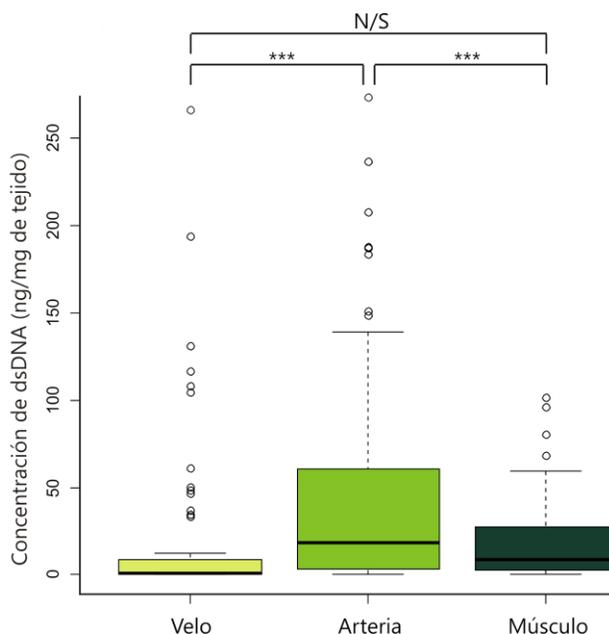


Figura 46: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Tejido. El contenido de dsDNA fue significativamente más elevado en las muestras de Arteria que en Velo y Músculo, sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre Velo y Músculo. Los círculos se correspondieron con valores atípicos. *** $p \leq 0,001$; N/S: No significación; $n = 5$.

PROTOCOLO. Tras analizar el efecto de este factor, se observaron diferencias muy significativas ($p \leq 0,001$) entre los tejidos en Fresco (grupo control) y los tejidos tratados con los Protocolos A/B y B/A (Figura 47). No sólo se observaron estas diferencias, también se detectó una cantidad significativamente mayor ($p \leq 0,01$) de dsDNA aislado en las muestras que se procesaron con el Protocolo B/A que el cuantificado para el Protocolo A/B. Ambos protocolos eliminaron ácidos nucleicos en los tejidos, pero mostró más efectividad el Protocolo A/B.

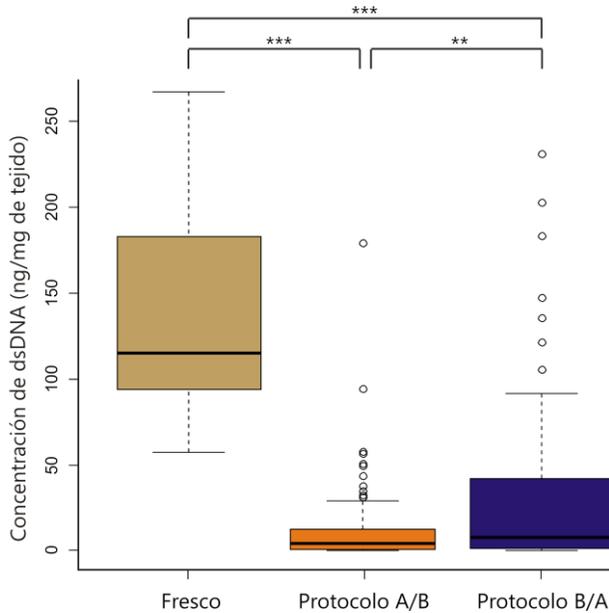


Figura 47: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Protocolo de descelularización aplicado. Se observó una concentración de dsDNA significativamente mayor en los tejidos en Fresco que en los tejidos descelularizados por el Protocolo A/B y el Protocolo B/A. Los círculos se correspondieron con valores atípicos. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $n=5$

TRATAMIENTO. Según se muestra en la Figura 48, todos los tratamientos disminuyeron muy significativamente ($p \leq 0,001$) los niveles de dsDNA respecto al tejido en Fresco (0- Sin Tratamiento). Entre los Tratamientos analizados, sólo se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el TTO1 y el TTO3. El TTO1 se correspondió con una menor concentración de enzima y el TTO3 fue el de mayor concentración. Se pudo observar una relación inversamente proporcional entre la disminución de dsDNA y la concentración de DNAsa I y RNAsa A.

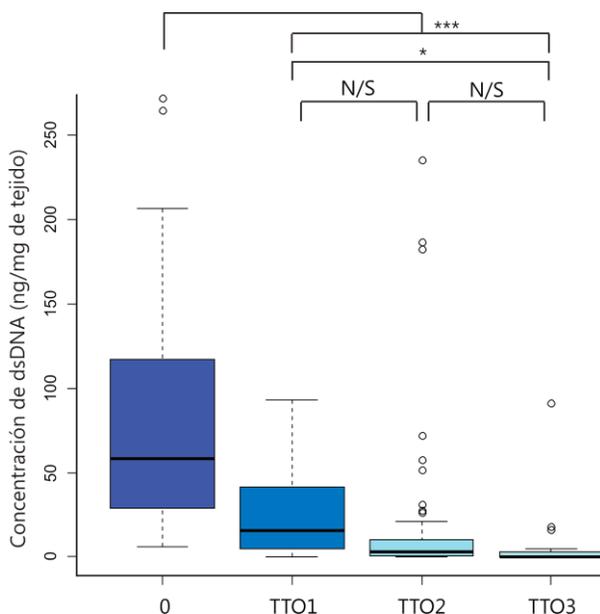


Figura 48: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Tratamiento enzimático. Los tratamientos más efectivos en la eliminación de dsDNA fueron el TTO2 y el TTO3. Los círculos se correspondieron con valores atípicos. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; N/S: No significación; $n=5$.

TIEMPO. Este factor puso de manifiesto un elevado nivel de significación ($p \leq 0,001$) entre el tejido en Fresco y los tres Tiempos de estudio (P, t2h y t7h) (Figura 49). Antes del Tratamiento enzimático (P) ya se había eliminado gran parte del componente celular. En este análisis también se observó una correlación entre el Tiempo de Tratamiento enzimático y la concentración de dsDNA. A mayor tiempo, menor concentración de ácidos nucleicos se detectó en los tejidos. El tiempo que mostró más efectividad fue, por tanto, el t7h.

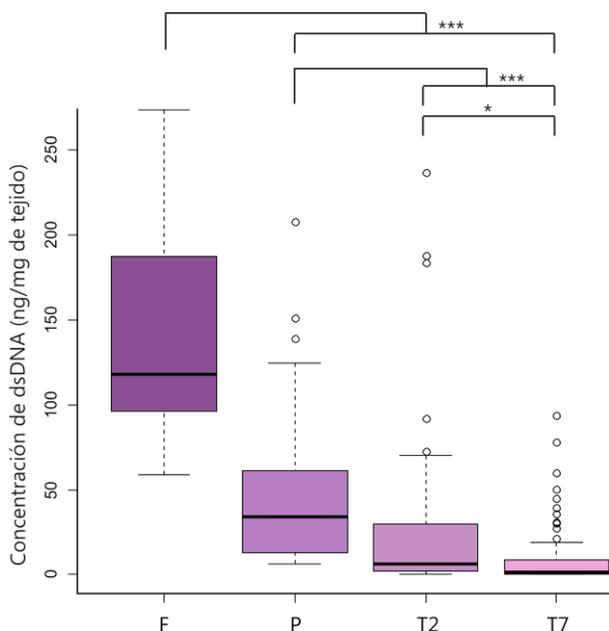


Figura 49: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Tiempo aplicado para el Tratamiento enzimático. Se observaron diferentes niveles de significación en las diferentes comparaciones realizadas entre grupos. Los círculos se correspondieron con valores atípicos. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; $n=5$.

2.1.2- ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Tiempo de tratamiento: 0-sin Tratamiento, P-Previo al Tratamiento, t2h-a las 2 horas de Tratamiento, t7h-a las 7 horas de Tratamiento.

TIEMPO 0. En este grupo experimental se englobaron sólo los datos en Fresco. Los valores de fluorescencia se ajustaron a una normal, al realizar una ANOVA unifactorial sólo se identificó el factor Tejido que presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre grupos. Se realizó un test de Tukey para observar la comparación entre las medias de los grupos determinados por el factor.

Este análisis permitió conocer la cantidad de dsDNA presente en los tejidos en Fresco. Se detectaron diferencias entre los distintos tipos de Tejido, siendo el músculo el que menor contenido de dsDNA presentó, $76,7 \pm 18,36$ ng dsDNA/mg tejido, frente a los valores de 162 ± 60 ng dsDNA/mg tejido para Velo y $181,7 \pm 58,12$ ng dsDNA/mg tejido para Arteria (Tabla 10). Las diferencias sólo resultaron significativas ($p \leq 0,05$) entre la Arteria y el Músculo (Figura 50).

Tabla 10: ANOVA del factor Tejido a Tiempo 0.

	GL	Valor F	P (>F)	
Tejido	2	5,944	0,0178	*
Residuos	11			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. * $p \leq 0,05$.

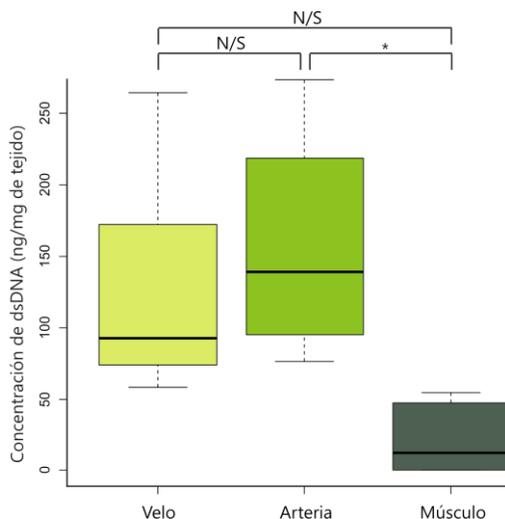


Figura 50: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos en Fresco. Sólo se observaron diferencias significativas entre el Músculo y la Arteria. * $p \leq 0,05$; N/S: No significación, $n=5$.

TIEMPO PREVIO. Se consideraron solamente los datos obtenidos Previo a la realización del Tratamiento enzimático. En este grupo, los valores se ajustaron a una normal y se realizó una ANOVA de dos factores: factor Tejido y factor Protocolo y ambos resultaron significativos ($p \leq 0,01$) (Tabla 11).

Tabla 11: ANOVA de los factores Tejido y Protocolo a Tiempo Previo.

	GL	Valor F	P (>F)	
Tejido	2	7,361	0,003	**
Protocolo	1	18,935	0,0002	***
Residuos	25			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Se realizó un test de Tukey para ambos factores. En primer lugar, tras la descelularización, se mantuvieron las diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre la cantidad de dsDNA en Arteria respecto a Velo y Músculo, indicando que fue el tejido que más concentración de ácidos nucleicos presentó antes del comienzo del tratamiento enzimático (Figura 51). Destacar la gran reducción de dsDNA en el Velo, encontrándose con la misma concentración de dsDNA que la observada para Músculo.

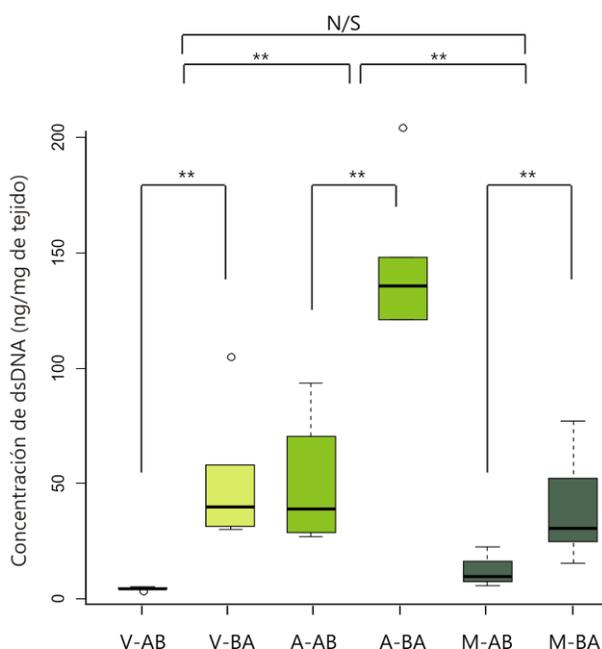


Figura 51: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos y Protocolos Previo al Tratamiento enzimático. V-AB: Velo Protocolo A/B, V-BA: Velo Protocolo B/A, A-AB: Arteria Protocolo A/B, A-BA: Arteria Protocolo B/A, M-AB: Músculo Protocolo A/B, M-BA: Músculo Protocolo B/A. Los círculos se correspondieron con valores atípicos. $**p \leq 0,01$; N/S: No significación; $n=5$.

Además, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre ambos protocolos de descelularización. Se eliminó una mayor cantidad de dsDNA con el Protocolo A/B que con el Protocolo B/A. Todos los tejidos tratados con el Protocolo A/B mostraron una mayor eliminación de componente celular antes del comienzo del Tratamiento enzimático (Figura 51).

TIEMPO 2 HORAS. En este grupo de valores, se cumplieron las asunciones de homocedasticidad del modelo y se realizó una ANOVA de dos factores: factor Tejido y factor Protocolo (Tabla 12).

Tabla 12: ANOVA de los factores Tejido y Protocolo a Tiempo 2 horas.

	GL	Valor F	P (>F)
Tejido	2	7,093	0,001 **
Protocolo	1	3,128	0,08
Residuos	87		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. ** $p \leq 0,01$.

El análisis de varianza mostró que existieron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) para el factor Tejido, pero las diferencias observadas para el factor Protocolo no resultaron significativas ($p = 0,078$). Por tanto, se realizó el test de Tukey solamente para el factor Tejido. Una vez más, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre la Arteria y el resto de tejidos (Figura 52).

Cabe destacar la gran reducción en la concentración de dsDNA para Velo y Músculo. Además, como ya se había reflejado en el análisis ANOVA, no se evidenciaron diferencias en función de los protocolos analizados. El hecho de haber encontrado diferencias significativas entre el Protocolo A/B y B/A en el apartado anterior, implicó que el tratamiento enzimático, tras 2 horas de incubación, fue suficientemente efectivo eliminando dsDNA en el Protocolo B/A, aun partiendo de mayor concentración inicial (Figura 52).

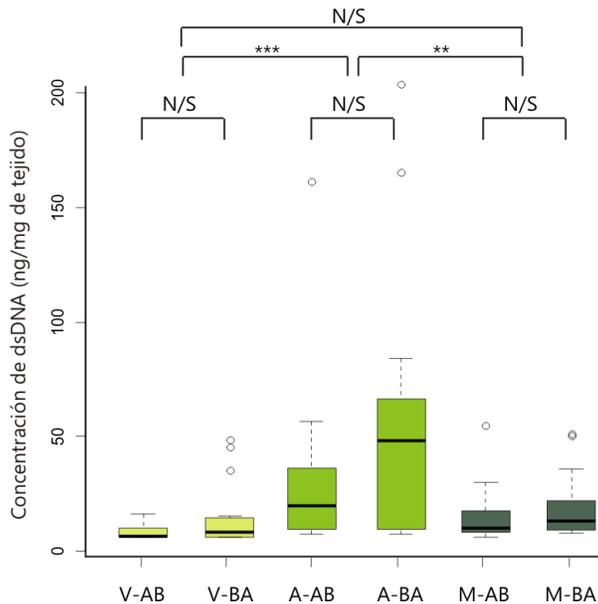


Figura 52: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos y Protocolos a las 2 horas del Tratamiento. V-AB: Velo Protocolo A/B, V-BA: Velo Protocolo B/A, A-AB: Arteria Protocolo A/B, A-BA: Arteria Protocolo B/A, M-AB: Músculo Protocolo A/B, M-BA: Músculo Protocolo B/A. Los círculos se correspondieron con valores atípicos. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; N/S: No significación; $n=5$.

TIEMPO 7 HORAS. Los datos obtenidos tras 7 horas de Tratamiento enzimático mostraron propiedades aptas de homocedasticidad. Se realizó una ANOVA de dos factores: factor Tejido y factor Protocolo. Los resultados mostraron relevancia ($p \leq 0,001$) para el factor Tejido y no se encontraron diferencias significativas para el factor Protocolo (Tabla 13).

Tabla 13: ANOVA de los factores Tejido y Protocolo a Tiempo 7 horas.

	GL	Valor F	P (>F)
Tejido	2	11,621	3,455e-05 ***
Protocolo	1	2,976	0,088
Residuos	85		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. *** $p \leq 0,001$.

Se realizó el test de Tukey para la comparación entre los grupos pertenecientes al factor Tejido. En la representación gráfica cabe destacar los niveles mínimos de dsDNA en las muestras de Velo (Figura 27). Sólo se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre la concentración de dsDNA en Arteria y en Velo, siendo más elevada en Arteria. Sin embargo, el contenido de dsDNA, tras 7 horas de tratamiento enzimático, no mostró diferencias entre Arteria y Músculo ($p = 0,296$). Tampoco existieron diferencias entre Músculo y Velo ($p = 0,093$).

A Tiempo 7 horas, al igual que lo observado para 2 horas, no se mostraron diferencias significativas en cuanto a la concentración de ácidos nucleicos entre los protocolos utilizados (Figura 53).

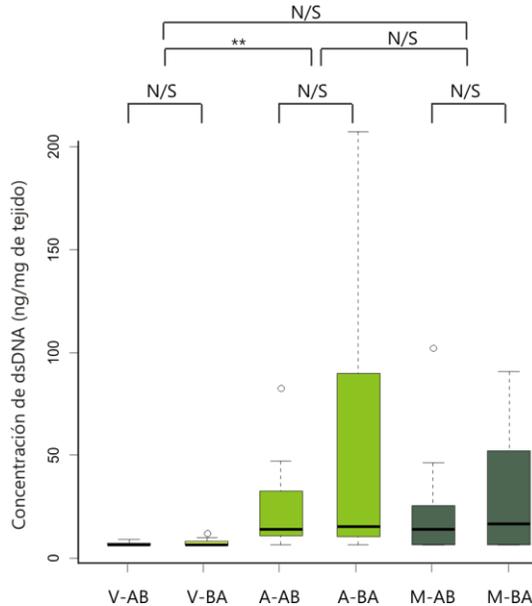


Figura 53: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos y Protocolos a las 7 horas del Tratamiento. V-AB: Velo Protocolo A/B, V-BA: Velo Protocolo B/A, A-AB: Arteria Protocolo A/B, A-BA: Arteria Protocolo B/A, M-AB: Músculo Protocolo A/B, M-BA: Músculo Protocolo B/A. Los círculos se corresponden con valores atípicos. ** $p \leq 0,01$; N/S: No significación; $n=5$.

2.1.3- ANÁLISIS INDIVIDUALIZADO EN FUNCIÓN DEL TEJIDO

En este apartado se realizó un análisis estadístico separando los datos en función del Tejido, Velo, Arteria y Músculo. Destacar que en este apartado se excluyeron los datos de Fresco y Previo al Tratamiento, para considerar solamente los del Tratamiento enzimático propiamente dicho, a Tiempo 2 horas y a Tiempo 7 horas.

VELO. Se seleccionaron solamente los datos referentes a este tejido y se realizó una ANOVA sobre el modelo lineal generalizado con los tres factores que pudieron afectar en la concentración de dsDNA: Protocolo, Tiempo y Tratamiento (Tabla 14).

Tabla 14: ANOVA de los factores Protocolo, Tiempo y Tratamiento en Velo.

	GL	Valor F	P (>F)	
Protocolo	1	3,37	0,071	
Tiempo	1	9,399	0,003	**
Tratamiento	1	9,353	0,003	**
Residuos	56			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. ** $p \leq 0,01$.

Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) para los factores Tiempo y Tratamiento y no se detectaron diferencias significativas para el factor Protocolo ($p = 0,071$), aunque se encontró en el umbral de significación.

Tras la realización del test de Tukey, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre el t2h y t7h (Figura 54- 2). Estas diferencias determinaron que a t7h, se eliminase la mayor parte del componente celular, reduciéndose al mínimo la concentración de dsDNA en el Velo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en cuanto al Protocolo utilizado (Figura 54- 1).

Al analizar los datos en función del Tratamiento enzimático aplicado, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el TTO1 y el resto de tratamientos (Figura 55). Tras la aplicación del

TTO1 los niveles detectados fueron de $9,98 \pm 15$ ng dsDNA/mg tejido, mientras que se redujeron significativamente para el TTO2, $1,52 \pm 2,23$ ng dsDNA/mg tejido, y el TTO3, $0,17 \pm 0,30$ ng dsDNA/mg tejido. Resultaron más efectivos el TTO2 y TTO3, no se observaron diferencias significativas entre ellos, en la eliminación de ácidos nucleicos que con la aplicación del TTO1 (Figura 55).

Los tratamientos estuvieron relacionados con la concentración de DNAsa y RNAsa presentes en las soluciones, y se detectó una correlación entre el aumento de concentración de enzima con la disminución de dsDNA en Velo.

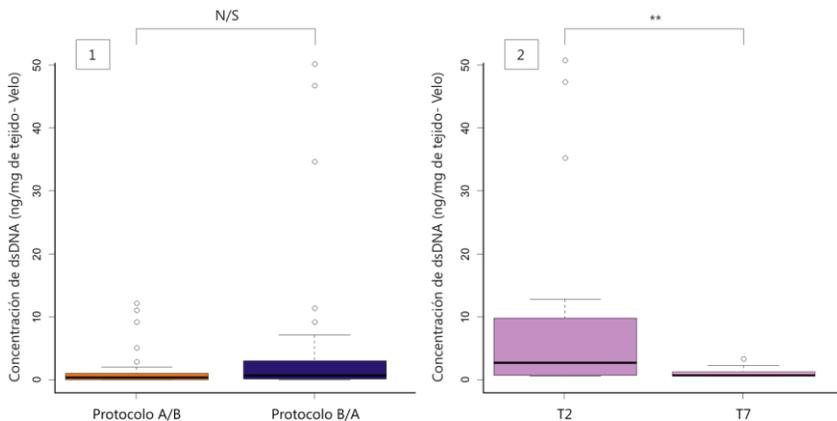


Figura 54: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Velo según el Protocolo y el Tiempo. (1) Concentración de dsDNA dependiendo del Protocolo aplicado. (2) Concentraciones obtenidas para los diferentes Tiempos de Tratamiento. Los círculos se corresponden con valores atípicos. $**p \leq 0,01$; N/S: No significación; $n=5$.

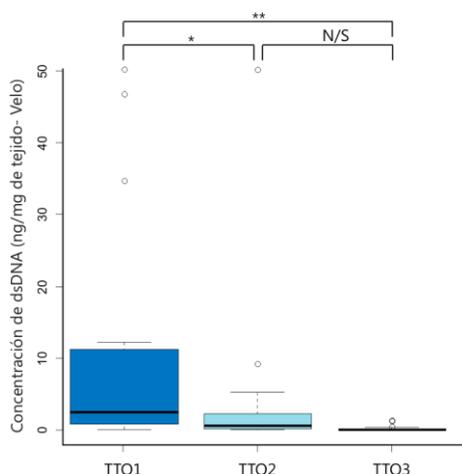


Figura 55: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Velo según el Tratamiento enzimático. En el TTO3 se observaron unos valores mínimos de concentración de dsDNA, es decir, se detectaron ácidos nucleicos de forma residual. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; N/S: No significación; $n=5$.

ARTERIA. Para el conjunto de datos seleccionados en este tejido, tras realizar la ANOVA sobre el modelo lineal generalizado de tres factores (Tabla 15), Protocolo, Tiempo y Tratamiento, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) para los factores Tiempo y Tratamiento. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para el factor Protocolo, aunque se encontró una vez más en el límite de significación.

Tras realizar el test de Tukey de comparación entre grupos, se pudieron evidenciar diferencias significativas ($p \leq 0,01$) entre t2t y t27 (Figura 56- 2). Se detectó una mayor eliminación de dsDNA a un mayor Tiempo en contacto directo del tejido con la enzima.

Tabla 15: ANOVA de los factores Protocolo, Tiempo y Tratamiento en Arteria.

	GL	Valor F	P (>F)	
Protocolo	1	3,637	0,061	
Tiempo	1	8,01	0,006	**
Tratamiento	1	23,836	8,591e-06	***
Residuos	58			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

En la comparación entre grupos para el factor Tratamiento, se pudo comprobar que existieron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el TTO1 y el TTO3 (Figura 57). El contenido de dsDNA tras el TTO1 fue de $43,59 \pm 23,16$ ng dsDNA/mg tejido, $39,22 \pm 69,40$ ng dsDNA/mg tejido para el TTO2 y $8,55 \pm 19,74$ ng dsDNA/mg tejido para el TTO3. Aunque la mayor eliminación de ácidos nucleicos se produjo con el TTO3, las diferencias respecto al TTO2 no fueron significativas ($p=0,079$).

En este tejido también se pudo correlacionar el aumento de concentración de enzima, en el Tratamiento enzimático, con una eliminación de los ácidos nucleicos en las estructuras acelulares.

Tras el análisis de los datos, no se evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0,56$) por Protocolo de descelularización aplicado. (Figura 56- 1).

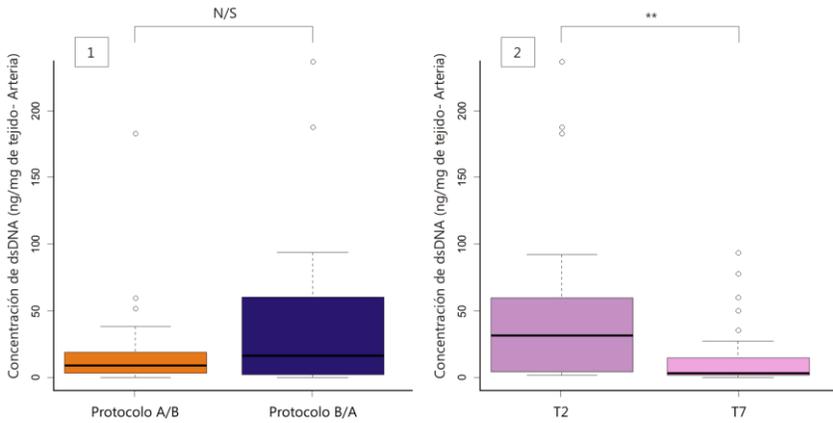


Figura 56: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Arteria según el Protocolo y el Tiempo. Concentración de dsDNA según el Protocolo (1) y el Tiempo de Tratamiento enzimático aplicados (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. ** $p \leq 0,01$; N/S: No significación; $n=5$.

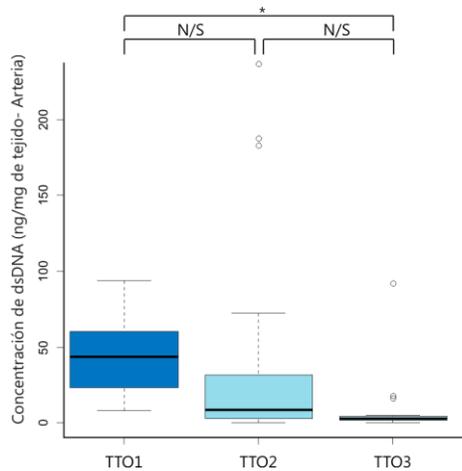


Figura 57: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Arteria según el Tratamiento enzimático. Se encontraron diferencias significativas entre el TTO1 y el TTO3, pero no entre el TTO2 y el resto de tratamientos. * $p \leq 0,05$; N/S: No significación; $n=5$.

MÚSCULO. En el análisis realizado sólo con los datos de Músculo se pudo observar que existieron 3 factores a considerar: Protocolo, Tiempo y Tratamiento. Los resultados de la ANOVA mostraron la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,001$) solamente para el factor Tratamiento (Tabla 16).

Tabla 16: ANOVA de los factores Protocolo, Tiempo y Tratamiento en Músculo.

	GL	Valor F	P (>F)
Protocolo	1	1,016	0,318
Tiempo	1	2,104	0,153
Tratamiento	1	30,035	1,144e-06 ***
Residuos	54		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. *** $p \leq 0,001$.

La representación de los factores Protocolo y Tiempo, mostró gráficamente la ausencia de diferencias significativas entre los grupos presentes dentro de cada factor de estudio (Figura 58). Sin embargo, el test de Tukey para el factor Tratamiento, evidenció diferencias muy significativas ($p \leq 0,001$), entre el dsDNA aislado para el TTO1, $20,65 \pm 16,43$ ng dsDNA/mg tejido y el dsDNA aislado para el TTO3, $1,31 \pm 1,54$ ng dsDNA/mg tejido (Figura 59). El TTO2, del que se aislaron $12,44 \pm 13,66$ ng dsDNA/mg tejido, no mostró diferencias significativas con el TTO1, pero sí con el TTO3 ($p \leq 0,05$). Se pudo reiterar la relación entre el aumento de concentración enzimática y la efectividad del Tratamiento.

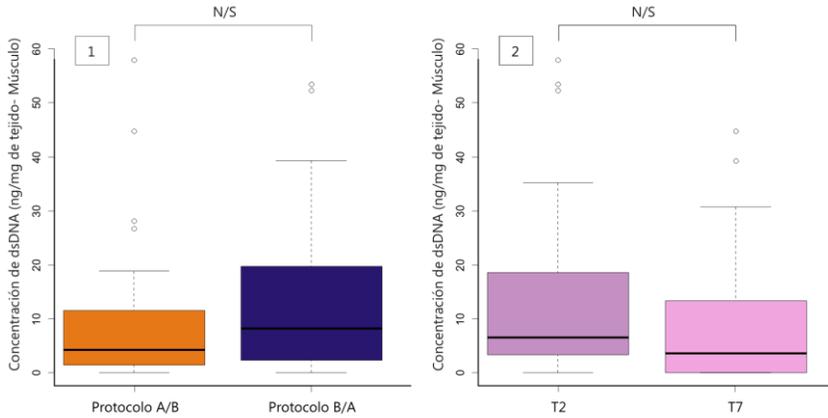


Figura 58: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Músculo según el Protocolo y el Tiempo. No se detectó significación para el factor Protocolo (1) ni para el factor Tiempo (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

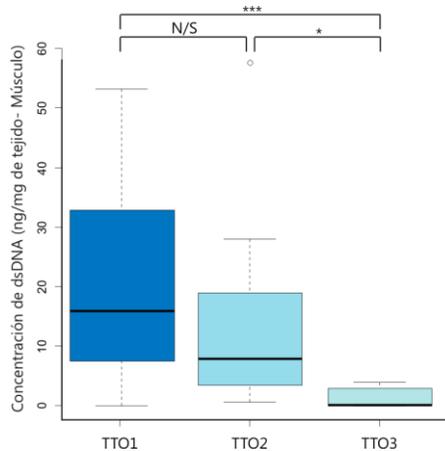


Figura 59: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Músculo según el Tratamiento enzimático. Se observó una elevada significación entre el TTO1 y el TTO3, pero no entre el TTO1 y TTO2. Entre el TTO2 y el TTO3 también hubo diferencias significativas. Los círculos se corresponden con valores atípicos. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$; N/S: No significación; n=5.

2.1.4- PORCENTAJE DE REDUCCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para cuantificar el grado de reducción de dsDNA, se consideraron las medias de los datos obtenidos a Tiempo 7, tanto para el Protocolo A/B como para el Protocolo B/A, de los tratamientos TTO1, TTO2 y TTO3.

Con estos datos, se calculó el porcentaje de reducción de ácidos nucleicos respecto al contenido de dsDNA en Fresco (Tabla 17). Como se pudo observar, todos los tratamientos, redujeron considerablemente el dsDNA en Velo. En el TTO1, en la Arteria y el Músculo se redujo hasta un 70%, pero fue en el TTO2 y TTO3 cuando alcanzaron una reducción de más de un 90%. Se pudo apreciar que con el TTO3, a Tiempo 7 horas, se eliminaron prácticamente todos los ácidos nucleicos en todos los tejidos, llegando a niveles de más de un 98,9%.

Como los niveles de descelularización no resultaron homogéneos para todas las zonas tisulares y, ante una futura aplicación la válvula es indivisible, se consideró más adecuado el TTO 3 a 7 horas como el óptimo para obtener una matriz acelular donde se elimine la mayor parte de los ácidos nucleicos.

Tabla 17: Porcentaje de reducción de dsDNA, a Tiempo 7 horas para el TTO1, TTO2 y TTO3.

	% Reducción dsDNA TTO1	% Reducción dsDNA TTO2	% Reducción dsDNA TTO3
Velo	99,41%	99,84%	99,94%
Arteria	78,15%	96,82%	98,94%
Músculo	73,65%	98,94%	99,96%

2.2- VALORACIÓN DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA ESTRUCTURA DE LA MATRIZ

Se realizó el análisis cualitativo de las mismas muestras utilizadas para la extracción de los ácidos nucleicos en el apartado 2.1. Como se pudo observar anteriormente, tras la acción de los Protocolos de descelularización A/B y B/A, se eliminó la mayor parte del componente celular de los tejidos, pero la tinción H-E mostró restos de material genético dentro de la matriz tridimensional (Figuras 38, 39 y 40). En este apartado se pretendió corroborar visualmente la pérdida del material genético demostrada en el apartado anterior.

Los resultados de histología para las muestras de Velo con el Protocolo A/B, mostraron la elevada eficiencia de todos los tratamientos (TTO1, TTO2 y TTO3) a las 2 y 7 horas de Tratamiento enzimático pese a haber presentado una celularidad elevada en el Tejido en Fresco (Figura 60). En los cortes correspondientes al Protocolo B/A, se visualizaron los mismos resultados obtenidos para el Protocolo A/B (Figura 61). La fácil eliminación del componente celular pudo haber estado relacionada con la laxitud característica de su estructura tridimensional.

Además se pudo comprobar cómo el Tratamiento enzimático aplicado y su duración en el Tiempo no afectaron a la estructuración característica del Velo. Permaneció la disposición de 3 capas y se conservaron las fibras de colágeno y elastina dentro de cada una de ellas.

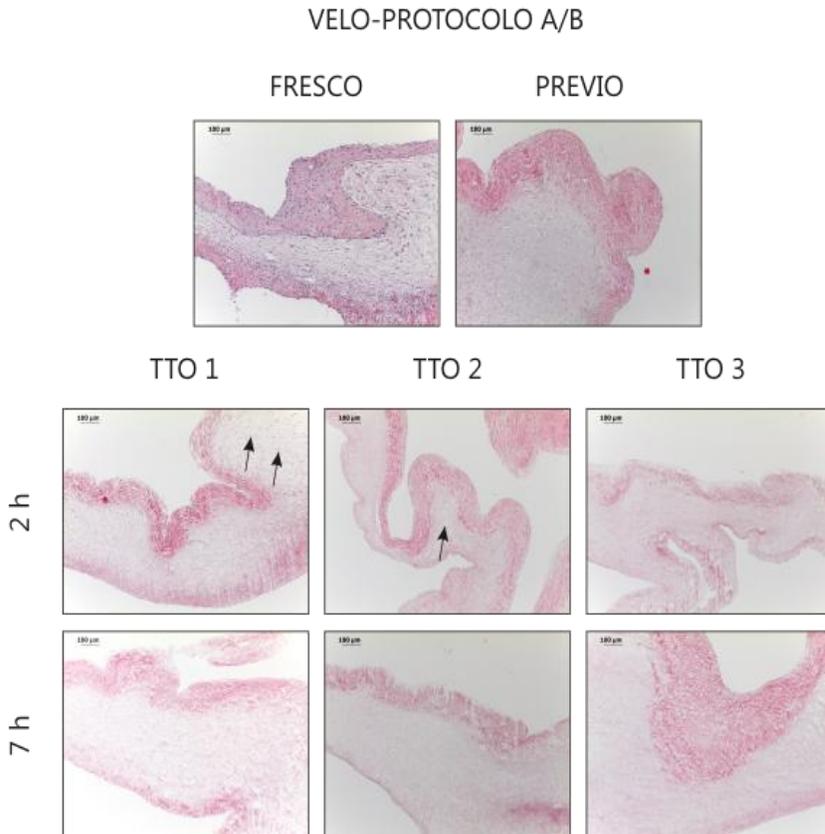


Figura 60: Resultados histológicos de Velo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo A/B. Se mostró una elevada celularidad en el Tejido en Fresco, sin embargo, Previo al Tratamiento enzimático se pudo observar una gran eliminación del componente celular. Tras los Tratamientos enzimáticos, sólo se detectaron restos de material genético (flechas negras) a las 2 horas de Tratamiento con el TTO1 y el TTO2. Se observó una completa descelularización y preservación de la estructura a tiempo 7 horas en todos los tratamientos enzimáticos realizados. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=5.

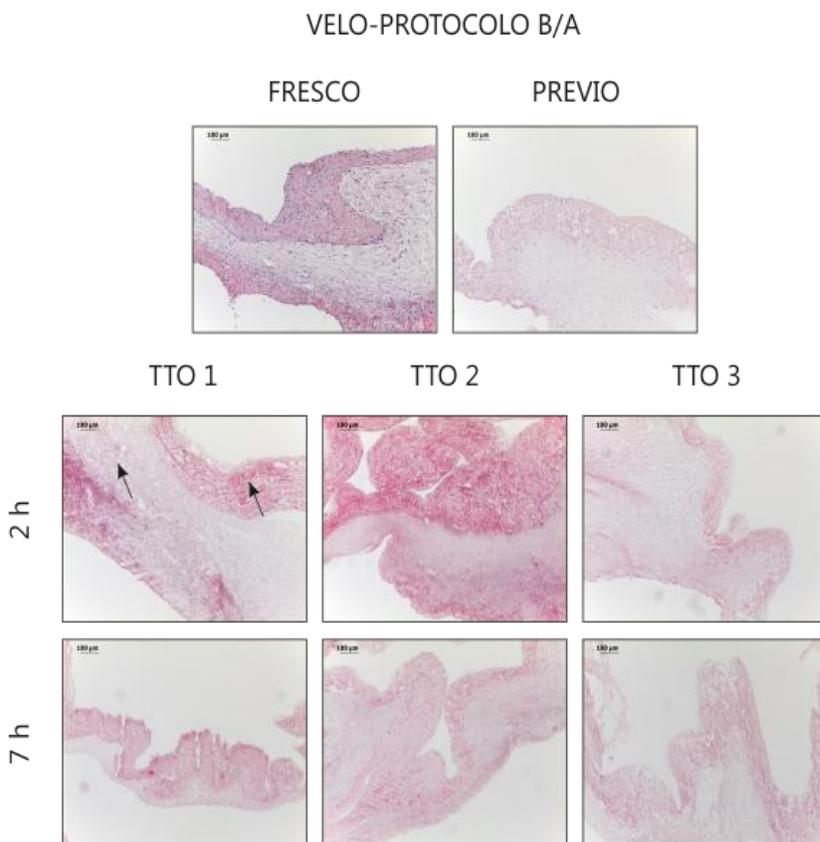


Figura 61: Resultados histológicos de Velo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo B/A. Previo al Tratamiento enzimático también se pudo observar una gran eliminación de componente celular. En estas muestras sólo se detectaron restos de material genético a las 2 horas con el TTO1 (flechas negras). Para el TTO2 y TTO3 a las 2 horas y para el TTO1, TTO2 y TTO3 a las 7 horas, se observó una completa descelularización de las estructuras, así como una elevada conservación de la estructura del Velo. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=5.

En Arteria se pudo observar la dificultad en la eliminación celular para ambos protocolos de descelularización, tras la visualización de la secuencia de cortes histológicos. Asimismo, el grado de eliminación celular tanto para el factor Tiempo como para el factor Tratamiento, fue similar para el Protocolo A/B y el Protocolo B/A no reflejándose diferencias en cuanto al protocolo de descelularización empleado (Figura 62 y 63). La completa eliminación de restos de material nuclear en la matriz se consiguió con el TTO3, tras 7 horas de acción enzimática. El hecho más importante resultó en que dicho tratamiento no afectó a la estructura tridimensional del tejido, donde se pudieron diferenciar las 3 capas características, con su particular disposición de fibras de colágeno y elásticas en cada una.

Por otra parte, en el Músculo sí que se apreciaron diferencias en cuando al grado de eliminación de material genético entre el Protocolo A/B y el Protocolo B/A, no correspondiéndose con los resultados obtenidos en la cuantificación (Figura 64 y 65). Aún así, se pudo corroborar que el Músculo presentaba menor contenido celular en un principio, pero resultó compleja su descelularización y eliminación del material genético debido a su disposición tridimensional, mucho más compacta que el Velo. Sin embargo, cuando se alcanzó la completa eliminación de componente celular, con el TTO3 y a Tiempo 7 horas, se pudo observar una elevada preservación de la matriz tridimensional. Se mantuvo la estructura de fibras, tanto longitudinales como transversales con el característico tejido conectivo laxo entre ellas, como nexo de unión entre los diferentes componentes.

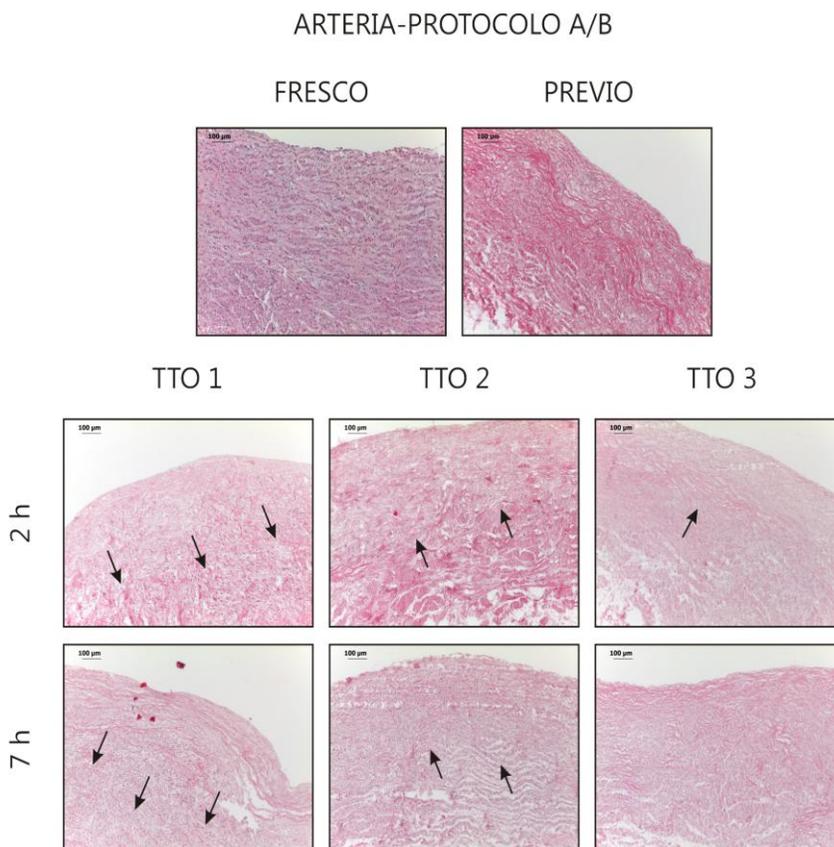


Figura 62: Resultados histológicos de Arteria en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo A/B. En este tejido no resultó tan evidente la descelularización como en el Velo previo al Tratamiento enzimático. Pudo ser debido al elevado contenido de células propio del Tejido en Fresco. Tras el TTO1, permanecieron multitud de restos nucleares tanto a las 2 como a las 7 horas (flechas negras). Se pudo apreciar una reducción de celularidad con el TTO2, pero esta reducción fue similar en los dos tiempos de Tratamiento. Con el TTO3 ya resultó dificultosa la localización de restos nucleares, siendo imperceptibles para el tiempo 7 horas. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=5.

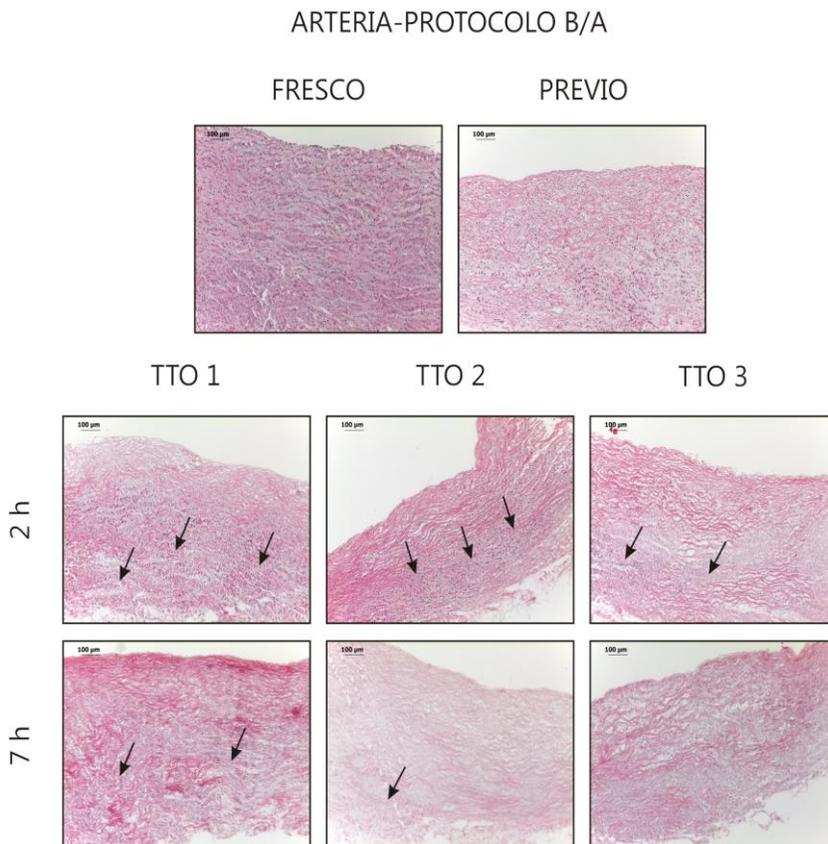


Figura 63: Resultados histológicos de Arteria en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo B/A. Al igual que lo valorado para el Protocolo A/B, previo al Tratamiento se visualizaron multitud de restos nucleares que se vieron reducidos considerablemente tras la aplicación del tratamiento enzimático (flechas negras). El TTO1 mostró que tampoco fue eficaz en descelularizar este tejido, mientras que con la aplicación del TTO2 y TTO3, no se observaron células viables a Tiempo 7 horas. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=5.

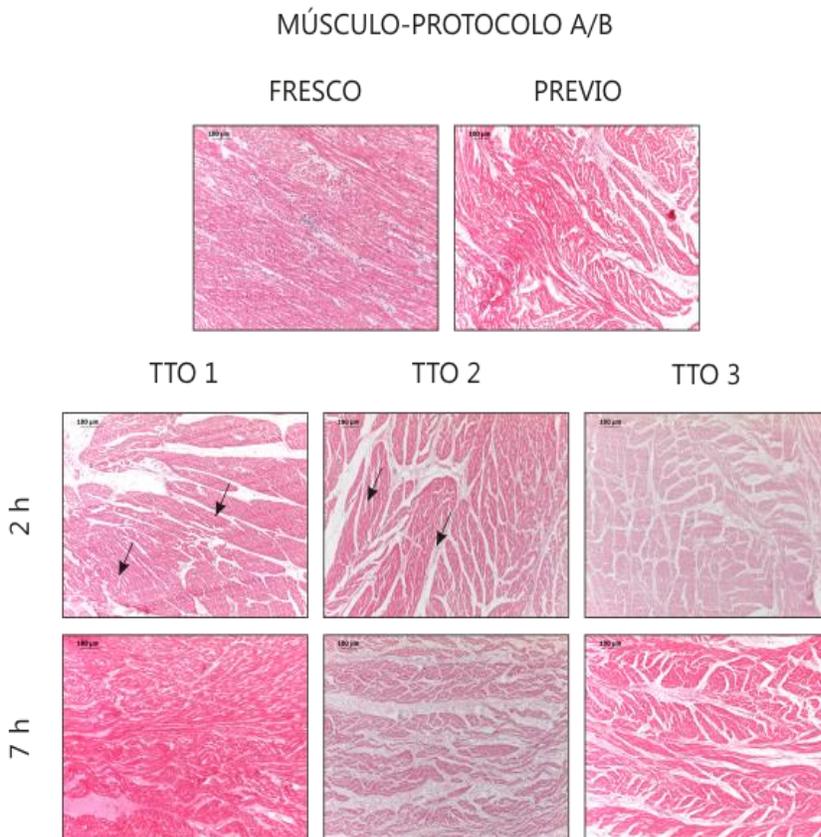


Figura 64: Resultados histológicos de Músculo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo A/B. Se pudieron detectar restos de células viables antes del comienzo del Tratamiento enzimático. En los Tratamientos enzimáticos se observó una elevada eliminación del componente celular a las 7 horas de incubación. A las 2 horas de TTO1 y TTO2 sí que se pudieron detectar núcleos celulares en el tejido (flechas negras). Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=5.

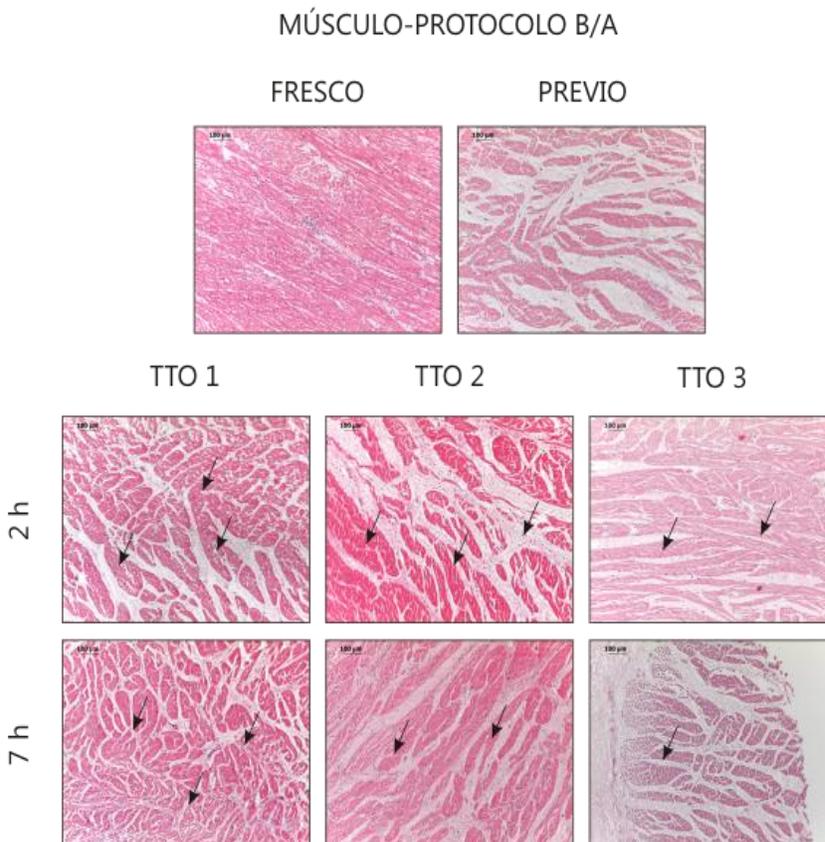


Figura 65: Resultados histológicos de Músculo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo B/A. Se observó gran cantidad de células remanentes en la matriz extracelular para el TTO1 y TTO2, en ambos tiempos de acción, tanto a Tiempo 2 horas como Tiempo 7 horas (flechas negras). La mayor eliminación se mostró con el TTO3, sobre todo a las 7 horas de acción, donde no se detectaron prácticamente restos de material genético. Visualizado a 10x en microscopio óptico de campo claro; n=5.

En resumen, se encontraron los siguientes resultados vinculados al desarrollo del Objetivo 2.

1. Se pudo comprobar que los tejidos en Fresco que más concentración celular presentaron en su matriz extracelular eran el Velo y la Arteria, siendo menor para el Músculo.
2. Los protocolos de descelularización, tanto el Protocolo A/B como el Protocolo B/A, eliminaron un gran porcentaje de células viables antes del Tratamiento enzimático, siendo el Protocolo A/B el más efectivo para todos los tejidos analizados.
3. Tras la aplicación de los tratamientos enzimáticos, se pudo comprobar que en el Velo se eliminó prácticamente todo el contenido de dsDNA para todos los Tratamientos y Tiempos, sin embargo, para Arteria y Músculo, fue necesario aplicar mayor concentración de enzima, TTO2 y TTO3, con un mayor tiempo de incubación (7 horas).
4. La zona limitante resultó ser el Músculo y, por tanto, fue la que determinó el Tiempo y concentración de enzima necesaria.
5. Los resultados histológicos corroboraron los resultados en cuanto a eficiencia en la eliminación de restos nucleares y, además, se pudo comprobar que el Tratamiento enzimático no afectó a la estructura tisular.
6. El Tratamiento enzimático seleccionado como etapa dentro del Protocolo de descelularización fue el TTO3 (50 µg/ml DNAsa I–40 µg/ml RNAsa A) con 7 horas de incubación, donde se eliminó más del 98% de los ácidos nucleicos en los tres tejidos analizados.

OBJETIVO 3: CARACTERIZAR LAS ESTRUCTURAS ACELULARES OBTENIDAS

3.1- DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA/AUSENCIA DE CÉLULAS VIABLES EN EL TEJIDO

3.1.1- ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Las 45 imágenes obtenidas por SEM, proporcionaron otra visión, complementaria a la histológica, de la microestructura de los tejidos.

La visualización permitió comprobar que todos los tejidos en Fresco mostraron células en su superficie, como era lo esperado (Figura 66- A, D y G). Tras la acción de los protocolos de descelularización no se evidenció ningún componente celular en la superficie de los tejidos analizados (Figura 66- B, C, E, F, H e I). Tampoco se detectaron restos celulares que pudiesen estar vinculados al proceso de eliminación celular.

Asimismo se pudo observar el estado estructural de la matriz tras el proceso descelularizante. La disposición tridimensional de los componentes mayoritarios de las estructuras extracelulares, el colágeno y la elastina, tanto en Velo, Arteria y Músculo, se encontraron altamente conservados (Figura 66- B, C, E, F, H e I). En ninguno de los casos se observaron fibras disgregadas adyacentes al tejido, como se evidenció en alguna muestra del análisis histológico, ni discontinuidades en la matriz estructural, por lo que se pudo comprobar que los Protocolos de descelularización no contribuyeron a una desestructuración de los tejidos analizados.

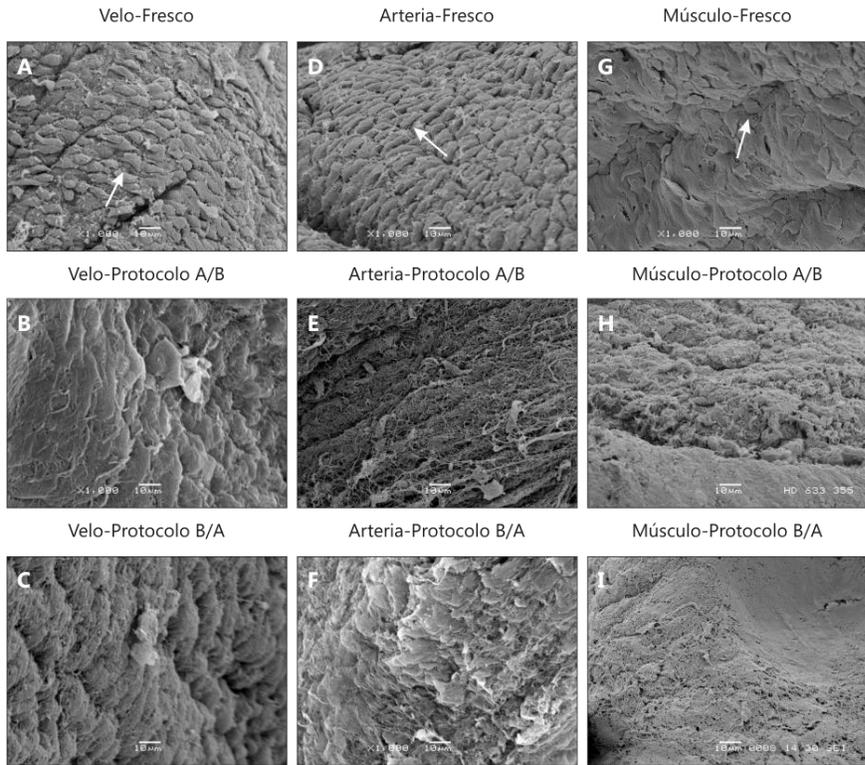


Figura 66: Imágenes de SEM para Velo, Arteria y Músculo en Fresco y tras la acción del Protocolo A/B y el Protocolo B/A. Los tejidos en Fresco (A, D y G) mostraron presencia de células en su superficie (flechas blancas). Por el contrario, en los tejidos descelularizados con el Protocolo A/B (B, E y H) no se detectó presencia celular. De igual forma, la descelularización con el Protocolo B/A resultó efectiva en cuanto a eliminación celular. Con ambos protocolos se pudo visualizar un alto grado de conservación de la estructura tridimensional. Visualizado a 1.000 aumentos en el microscopio de barrido; n=5.

3.1.2- ESTUDIOS DE VIABILIDAD TISULAR

La detección de viabilidad se basa en el principio activo del Alamar Blue, la resazurina. Se trata de un compuesto químico de color azul, no tóxico, permeable a las células y que no presenta fluorescencia. Si la célula es metabólicamente viable, las enzimas mitocondriales reducen este compuesto a resorufina, un compuesto fluorescente de color rosa, que puede ser fácilmente detectado y cuantificado.

En primer lugar, aunque esta técnica se haya descrito ampliamente para cultivos celulares, ha resultado constituir una excelente herramienta aplicada a los tejidos. Como muestran las gráficas de la Figura 67, los niveles de fluorescencia detectados mostraron un aumento lineal para el Velo y un aumento exponencial para la Arteria y el Músculo en Fresco. Sin embargo, no se detectó fluorescencia para las muestras de Velo, Arteria y Músculo que habían resultado del Protocolo A/B y el Protocolo B/A.

Los valores de fluorescencia, para el tejido en Fresco, mostraron que el agente químico tarda en penetrar en la matriz extracelular ya que aumenta la señal hasta las 24 horas. Aunque se consideró que, tras las 24 horas de incubación, el agente ya habría penetrado en todas las estructuras tisulares. Como no se detectaron niveles de fluorescencia para ambos protocolos en las 3 zonas de estudio, se pudo determinar que no existieron restos celulares viables dentro de la matriz descelularizada.

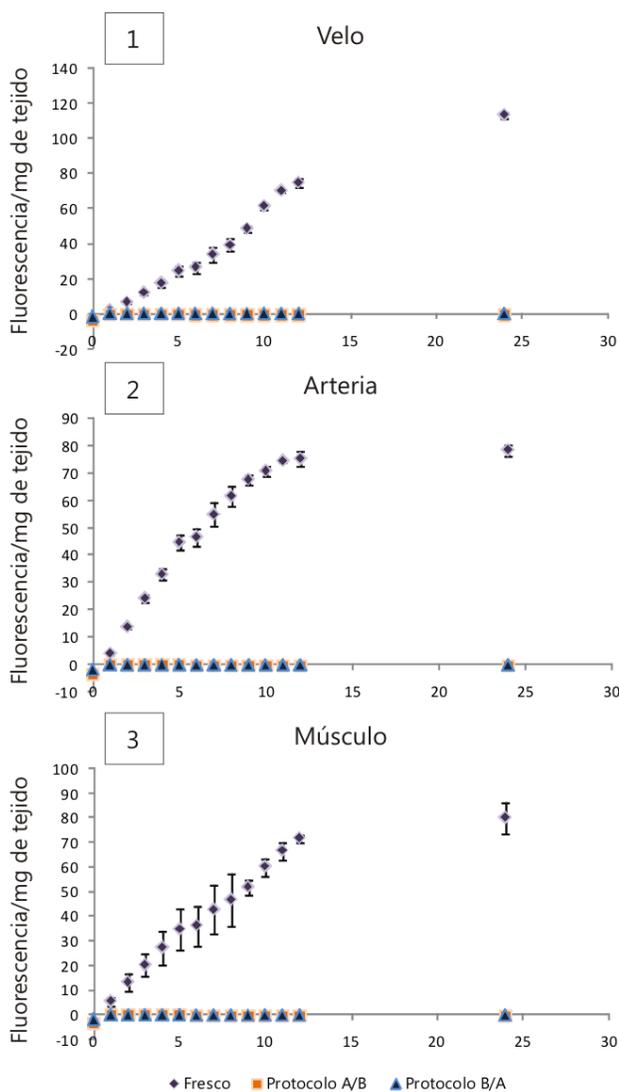


Figura 67: Viabilidad obtenida del ensayo Alamar Blue. Fluorescencia del Velo (1), la Arteria (2) y el Músculo (3). A medida que transcurrió el tiempo (eje "x") aumentaron los valores de fluorescencia sólo para las muestras en Fresco; n=5.

3.2- VALORACIÓN DEL ESTADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

3.2.1- CARACTERIZACIÓN BIOMECÁNICA

Los ensayos biomecánicos se realizaron sólo en las zonas Arteria y Músculo. En un futuro implante, serían las zonas suturables, en contacto con el tejido receptor, por lo que se consideró el estudio de sus propiedades biomecánicas tras la descelularización.

La toma de datos hasta ruptura del tejido, en los ensayos uniaxiales realizados, generó dos gráficas por muestra (Figura 68). La gráfica fuerza vs desplazamiento, donde se obtuvieron los datos de fuerza de rotura (N) y rigidez (N/mm), pendiente de la curva. Por otro lado, se obtuvo la gráfica tensión vs deformación, donde se consideró la fuerza por área, es decir, el grosor del tejido. Esta gráfica permitió obtener los datos de tensión de rotura (MPa) y el módulo elástico, o de Young (MPa), pendiente de la curva tensión vs deformación.

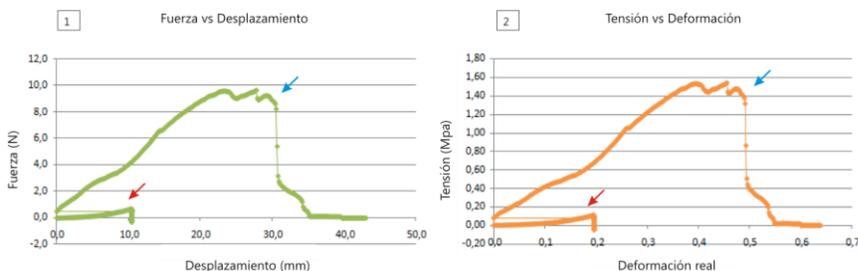


Figura 68: Ejemplo de gráficas obtenidas tras la realización del ensayo uniaxial. (1) Gráfica fuerza vs desplazamiento. (2) Gráfica tensión vs. deformación. Se pudieron apreciar los datos obtenidos hasta precarga (flecha roja) y cuando se produjo la rotura del tejido (flecha azul).

RIGIDEZ: en los datos recopilados, se pudieron reflejar los valores para la fuerza de rotura, siendo ésta de $4,28 \pm 1,96$ N para la Arteria en Fresco y de $3,34 \pm 2,025$ N para el Músculo en Fresco. Se pudieron observar valores de rotura más elevados para la Arteria respecto al Músculo, ya que fisiológicamente es un tejido que soporta más presión. Sin embargo, el punto de rotura para los tejidos descelularizados no varió respecto a estos datos en los tejidos en Fresco.

La fuerza de rotura fue de $6,06 \pm 1$ N, para la Arteria descelularizada por el Protocolo A/B, y de $5,88 \pm 1,48$ N, para la Arteria descelularizada por el Protocolo B/A. En el Músculo tampoco se observaron diferencias, con una Fuerza de $2,6 \pm 0,81$ N para el Protocolo A/B y una Fuerza de $2,78 \pm 0,81$ N para el Protocolo B/A.

A través de la fuerza se pudieron obtener los datos de rigidez. En éstos, se aplicó un análisis estadístico para el conjunto de datos y se realizó un análisis ANOVA de dos factores: Tejido y Protocolo.

Se encontraron (Tabla 18) diferencias significativas ($p \leq 0,001$) para el factor Tejido, pero no para el factor Protocolo.

Tabla 18: ANOVA para la rigidez con los factores Tejido y Protocolo.

	GL	Valor F	P (>F)
Tejido	1	24,2	4,158E-05 ***
Protocolo	2	1,497	0,243
Residuos	26		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. *** $p \leq 0,001$.

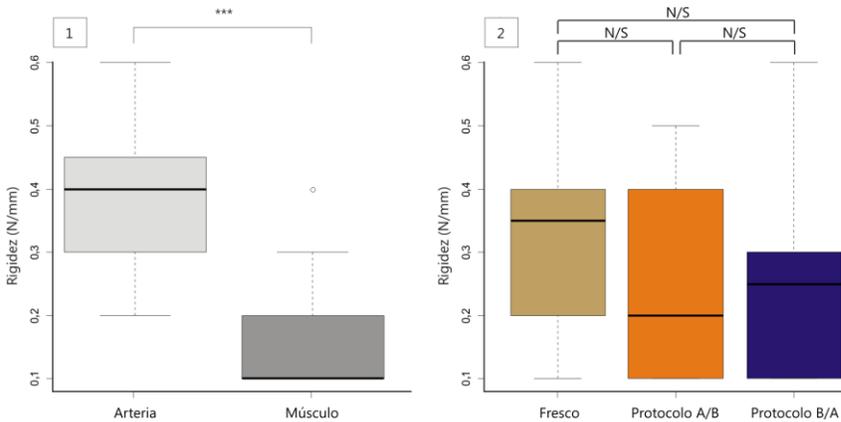


Figura 69: Representación en cajas y bigotes de rigidez según el factor Tejido y factor Protocolo. Valores obtenidos en función del Tejido (1) y el Tratamiento (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. *** $p \leq 0,001$; N/S: No significación; $n=5$.

Como se muestra en la Figura 69- 1, la Arteria mostró mayores valores de rigidez que el Músculo, y las diferencias fueron muy significativas ($p \leq 0,001$). Los datos de Fuerza de rotura ya habían mostrado que la Arteria es un tejido más resistente que el Músculo. Sin embargo, en las comparaciones entre grupos para el factor Protocolo, como ya se había visto en la ANOVA, no se encontraron diferencias significativas entre los protocolos, es decir, para el conjunto de datos, no existieron diferencias biomecánicas entre los tejidos en Fresco y los tejidos descelularizados (Figura 69- 2).

A continuación, se procedió a realizar el mismo análisis estadístico pero seleccionando los datos por tipo de Tejido, para comprobar si se mantuvieron no significativas las comparaciones entre el tejido en Fresco y los tejidos descelularizados.

Al realizar el análisis ANOVA sobre el tejido Arteria, sólo con el factor Protocolo, no se encontraron diferencias significativas ($p=0,795$) (Figura 70- 1). Sin embargo, cuando se realizó el mismo análisis sobre los datos de Músculo, se observaron diferencias significativas ($p\leq 0,03$) para dicho factor (Figura 70- 2). Cuando se aplicó el test de Tukey, se observó que esas diferencias ($p\leq 0,05$) se produjeron entre el Tejido en Fresco y el Tejido descelularizado por el Protocolo A/B.

Se pudo evidenciar que el Protocolo A/B en Músculo generó una pérdida de rigidez, mientras que el Protocolo B/A mantuvo éstas características biomecánicas respecto al control en Fresco.

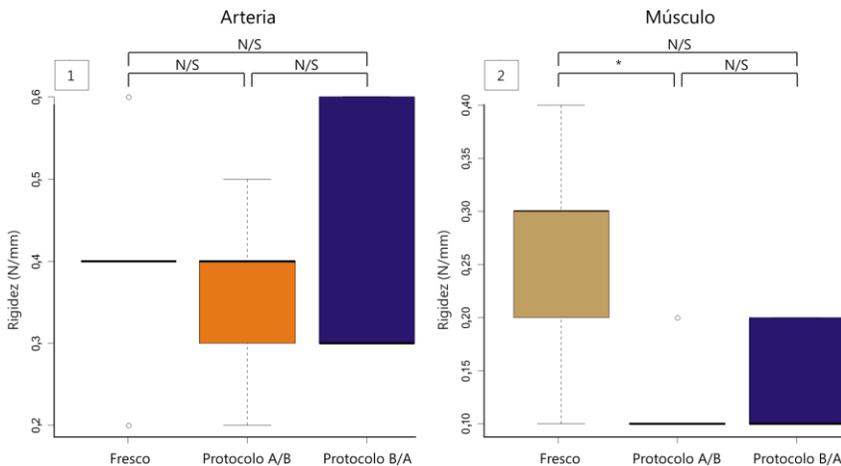


Figura 70: Representación en cajas y bigotes de rigidez según el factor Protocolo para la Arteria y el Músculo. Valores de rigidez obtenidos para la Arteria (1) y el Músculo (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. * $p\leq 0,05$, N/S: No significación, $n=5$. Nótese la diferencia de escala entre los tejidos.

MÓDULO ELÁSTICO. Tras la obtención de los valores de fuerza (N) del tejido a lo largo de la realización del ensayo uniaxial, se consideró esa fuerza por unidad de superficie del tejido (o sección) para la obtención de los datos de tensión. Se pudo observar que la tensión de rotura se produjo a los $0,74 \pm 0,22$ MPa para la Arteria en Fresco, sin embargo, en el Músculo en Fresco se produjo mucho antes ($0,16 \pm 0,09$ MPa). Para los tejidos descelularizados se observaron unos valores similares a los medidos en Fresco. En la Arteria descelularizada por el Protocolo A/B se obtuvieron unos valores de $1,08 \pm 0,27$ MPa, mientras que fueron muy similares, $0,98 \pm 0,36$ MPa, para las muestras del Protocolo B/A. En Músculo también se evidenciaron valores similares a los medidos en Fresco tanto para el Protocolo A/B, $0,12 \pm 0,04$ MPa, como para el Protocolo B/A, $0,22 \pm 0,16$ MPa.

Se realizó una ANOVA sobre la totalidad de datos correspondientes con los valores obtenidos de módulo elástico y se analizó la influencia de dos factores: Tejido y Protocolo.

El análisis de varianzas nos muestra que existieron diferencias muy significativas ($p \leq 0,001$) para el factor Tejido, pero no se detectaron diferencias en el factor Protocolo (Tabla 19). Tras aplicar el test de Tukey, se pudo corroborar que los valores de elasticidad para la Arteria fueron más elevados que en Músculo (Figura 71- 1). Estos resultados indicaron que, debido a la funcionalidad del tejido, la Arteria presentó mayores niveles de elasticidad que los detectados en el Músculo miocárdico.

Tabla 19: ANOVA para el módulo elástico con los factores Tejido y Protocolo.

	GL	Valor F	P (>F)
Tejido	1	52,762	1,029e-07 ***
Protocolo	2	0,122	0,885
Residuos	26		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. *** $p \leq 0,001$.

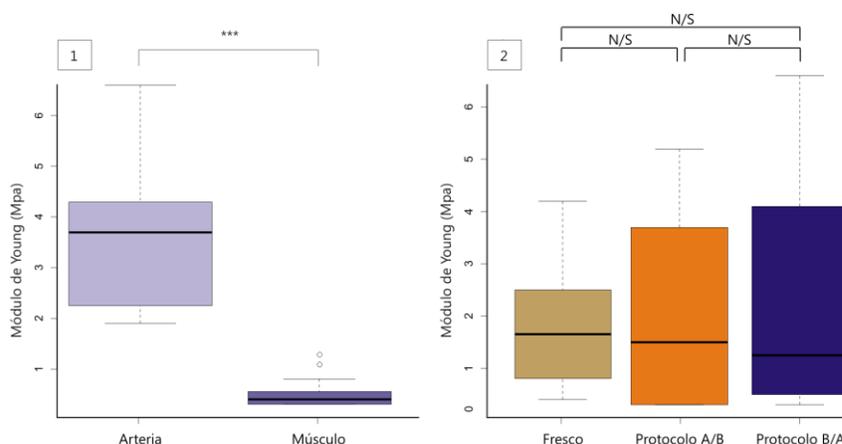


Figura 71: Representación en cajas y bigotes del módulo elástico según el factor Tejido y el factor Protocolo. Valores obtenidos en función del factor Tejido (1) y el factor Protocolo (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. *** $p \leq 0,001$; N/S: No significación; $n=5$.

Sin embargo, en el análisis entre grupos, no se encontraron diferencias entre la elasticidad de los tejidos en Fresco y la elasticidad de los tejidos descelularizados por el Protocolo A/B y el B/A (Figura 71- 2). A continuación, se procedió a analizar los datos por tipo de Tejido. En primer lugar, se consideró el análisis de la Arteria, cuyos valores se distribuyeron conforme a las asunciones

de normalidad. El análisis ANOVA mostró que no existieron diferencias significativas ($p=0,587$) para el factor Protocolo (Figura 72- 1). Sin embargo, cuando se analizaron los datos para el Músculo se pudo comprobar, tras el análisis de varianza, la existencia de diferencias significativas ($p\leq 0,05$) para el factor Protocolo. Tras realizar el test de comparación entre grupos, se pudo corroborar que las diferencias existentes fueron entre el Tejido en Fresco y el Tejido descelularizado por el Protocolo A/B. Se pudo observar cómo para el Protocolo A/B se redujeron significativamente ($p\leq 0,05$) los valores de elasticidad para el Músculo (Figura 72- 2).

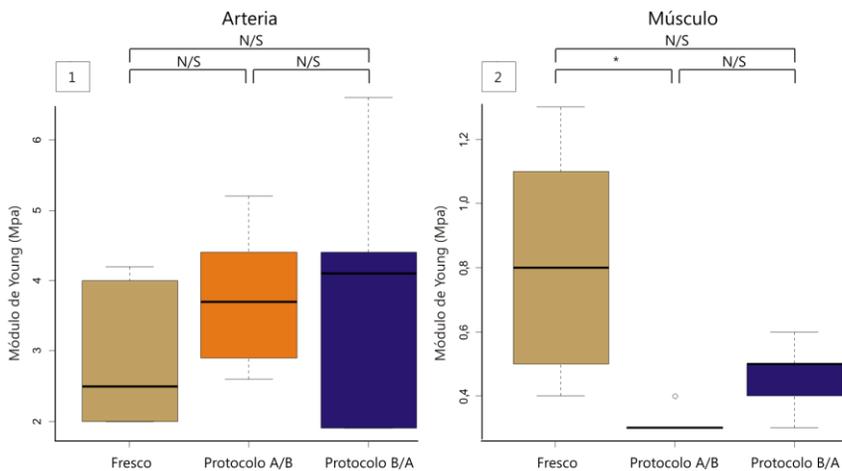


Figura 72: Representación en cajas y bigotes del módulo elástico según el Protocolo para la Arteria y el Músculo. Comparación de elasticidad entre protocolos para la Arteria (1) y el Músculo (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. $*p\leq 0,05$; N/S: No significación; $n=5$. Nótese la diferencia de escala entre los tejidos.

3.2.2- CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Las principales proteínas constituyentes de la matriz extracelular son el colágeno, la elastina y los GAG. La cuantificación de su concentración en los tejidos permitió comparar las muestras en Fresco y las muestras descelularizadas, considerando su mantenimiento o pérdida tras la aplicación del protocolo de descelularización.

DETECCIÓN DE COLÁGENO: tras la extracción con el kit comercial Sircol, se obtuvo una reacción colorimétrica, de tonos rojizos, cuando se detectó presencia de colágeno. Se analizaron los valores de absorbancia obtenidos y se aplicó un análisis estadístico en base al modelo lineal generalizado.

En el análisis ANOVA se encontraron diferencias significativas para el factor Protocolo ($p \leq 0,05$), pero no para el factor Tejido (Tabla 20). El test de Tukey mostró que las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en el factor Protocolo se encontraron entre el Protocolo A/B y el Tejido en Fresco (Figura 73-2).

Tabla 20: ANOVA para la concentración de colágeno.

	GL	Valor F	P (>F)
Tejido	2	2,609	0,087
Protocolo	2	3,272	0,049 *
Residuos	38		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. * $p \leq 0,05$.

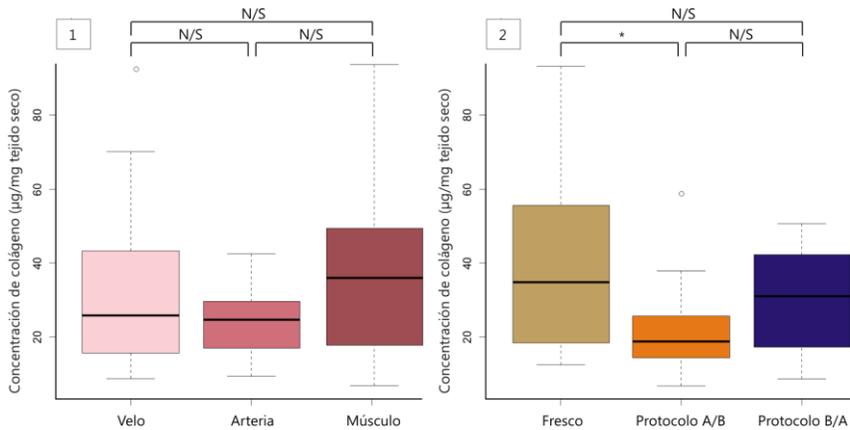


Figura 73: Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno según el Tejido y el Protocolo. Comparación de la concentración de colágeno por tipo de Tejido (1) y Protocolo (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. * $p \leq 0,05$; N/S: No significación; $n=5$.

La concentración de colágeno fue similar entre el Velo ($48,76 \pm 32,52 \mu\text{g/mg}$ tejido seco), Arteria ($27,11 \pm 11,03 \mu\text{g/mg}$ tejido seco) y Músculo ($50,84 \pm 32,48 \mu\text{g/mg}$ tejido seco), no detectándose diferencias significativas entre ellos (Figura 73- 1). Se observó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) de la concentración de colágeno en los tejidos procesados con el Protocolo A/B.

Se realizó un análisis estadístico por tipo de tejido, para comprobar en qué tejidos el Protocolo A/B produjo una reducción en los niveles de colágeno. Cuando se tuvieron en cuenta solamente los datos para el Velo, se pudo comprobar, en el análisis de varianzas, que no existieron diferencias significativas ($p=0,237$) entre el Velo en Fresco y el Velo descelerizado por los Protocolos A/B y B/A (Figura 74- 1).

En el análisis realizado, teniendo en cuenta los datos de la Arteria (Figura 75- 1), tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=0,506$) en cuanto al Protocolo aplicado (Figura 74- 2).

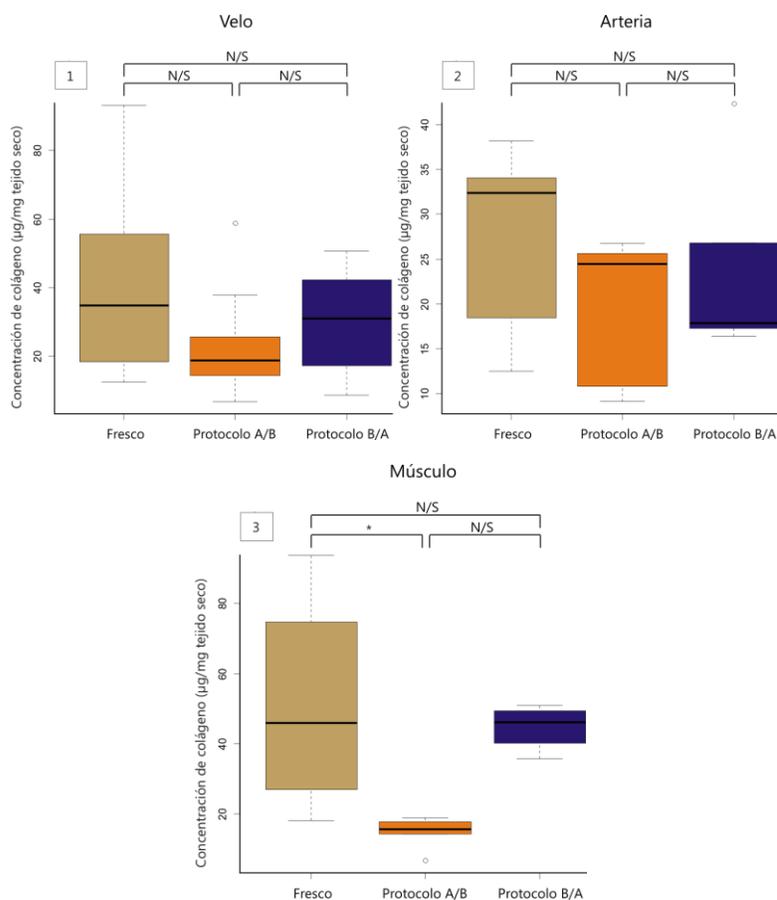


Figura 74: Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno para Velo, Arteria y Músculo. Concentración de colágeno para Velo (1), Arteria (2) y Músculo (3). Los círculos se corresponden con valores atípicos. $*p \leq 0,05$; N/S: No significación; $n=5$. Nótese la diferencia de escala entre los tejidos.

Por último, el análisis de los datos aislados para Músculo, tras aplicar la ANOVA sobre el modelo lineal, mostró diferencias significativas para el factor Protocolo ($p \leq 0,05$). Esta significación se mantuvo en el test de Tukey para la comparación entre el tejido en Fresco y el tejido descelularizado con el Protocolo A/B (Figura 74-3). Dicho protocolo redujo significativamente ($p \leq 0,05$) en un 70% la concentración de colágeno en el Músculo ($14,53 \pm 4,80 \mu\text{g}/\text{mg}$ tejido seco).

Por tanto, las diferencias observadas en el tratamiento conjunto de los datos, fueron debidas a las diferencias existentes en la concentración de colágeno entre el Músculo en Fresco y el Músculo descelularizado por el Protocolo A/B.

DETECCIÓN DE ELASTINA: cuando se detectó elastina en las muestras, con el protocolo de extracción del kit comercial Fastin, se obtuvo una reacción colorimétrica de tonos amarillentos. Se realizó el análisis estadístico sobre los valores de absorbancia obtenidos.

Se realizó un análisis con todo el conjunto de datos obtenidos, donde se comprobó que los residuos se ajustaron a una distribución normal, y el análisis de varianzas, ANOVA, mostró la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,001$) para el factor Tejido, pero no para el factor Protocolo (Tabla 21).

Cuando se aplicó el test de Tukey, para la comparación entre grupos, se pudo observar que el Músculo presentó una concentración de elastina, $141,11 \pm 13 \mu\text{g}/\text{mg}$ tejido seco,

significativamente mayor ($p \leq 0,001$) que la detectada en Arteria, $99,99 \pm 7,79 \mu\text{g}/\text{mg}$ tejido seco, y en Velo, $121,9 \pm 29,15 \mu\text{g}/\text{mg}$ tejido seco.

Tabla 21: ANOVA para la concentración de elastina.

	GL	Valor F	P (>F)	
Tejido	2	9,956	0,0003	***
Protocolo	2	0,202	0,818	
Residuos	40			

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. *** $p \leq 0,001$.

Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas entre los Protocolos aplicados, ambos preservaron los niveles de elastina (Figura 75- 2).

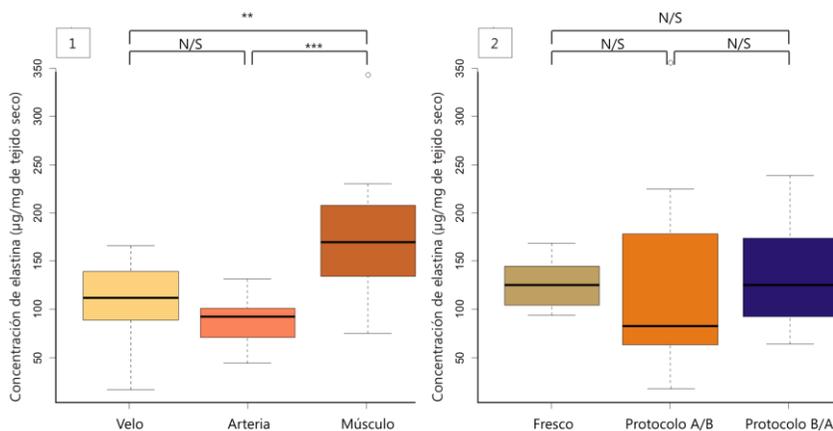


Figura 75: Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina según el Tejido y el Protocolo. Concentración de elastina según el factor Tejido (1) y Protocolo (2). Los círculos se corresponden con valores atípicos. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; N/S: No significación; $n=5$.

Como comprobación, se procedió a analizar el efecto del factor Protocolo por tipo de Tejido. En todos los tejidos: Velo, Arteria y Músculo no se detectaron diferencias significativas en el análisis ANOVA.

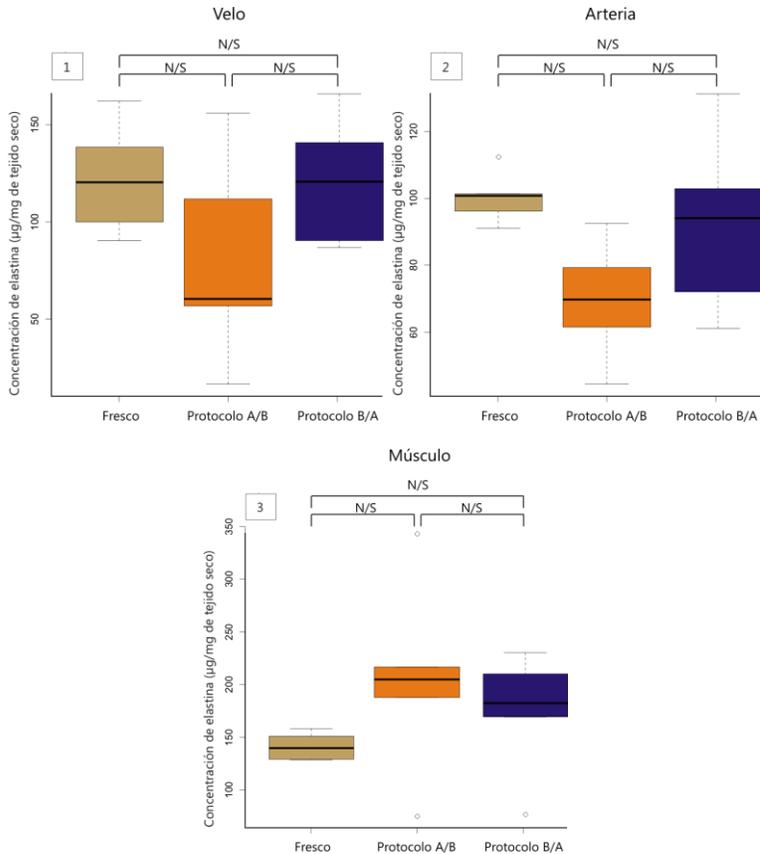


Figura 76: Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina para Velo, Arteria y Músculo. Concentración de elastina para Velo (1), Arteria (2) y Músculo (3). Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación, $n=5$. Nótese la diferencia de escala entre los tejidos.

En todos los tejidos analizados, Velo, Arteria y Músculo, los protocolos de descelularización preservaron la concentración de elastina en la matriz extracelular respecto a la detectada en los tejidos en Fresco (Figura 76-1, 2 y 3).

DETECCIÓN DE GAG: este ensayo se realizó solamente en el Velo al presentar una capa estructural conformada únicamente por glucosaminoglicanos, la capa esponjosa. Para la extracción de GAG se utilizó el kit comercial Blyscan, que permitió detectar su presencia con una coloración azulada que se midió por absorbancia.

En este caso, como sólo se trabajó con un tejido, Velo, en el análisis estadístico sólo se analizó el efecto del factor Protocolo. En primer lugar, se comprobó que los residuos de los datos se ajustaron a una distribución normal y, posteriormente, se realizó un análisis de varianza o ANOVA. Los resultados mostraron que no existieron diferencias significativas para el factor Protocolo (Tabla 22). Se mantuvo la concentración de GAG detectados tanto para los Velos en Fresco como para los Velos descelularizados.

Tabla 22: ANOVA para la concentración de GAG.

	GL	Valor F	P (>F)
Protocolo	2	3,23	0,088
Residuos	9		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad.

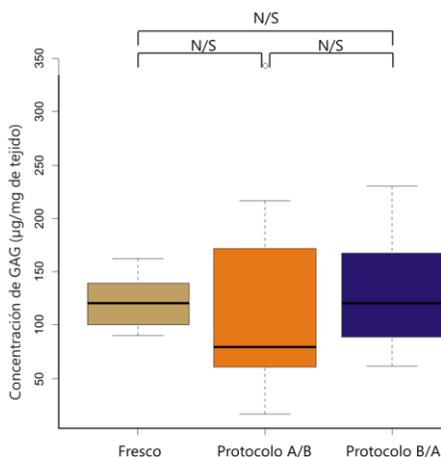


Figura 77: Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG según el Protocolo. Los círculos se corresponden con valores atípicos. N/S: No significación; n=5.

La concentración de GAG fue similar en todos los grupos para el Velo en Fresco, $281,55 \pm 45,87$ µg/mg tejido seco, con el Protocolo A/B, $179,92 \pm 53,26$ µg/mg tejido seco, y con el Protocolo B/A $262,02 \pm 88,13$ µg/mg tejido seco (Figura 77).

Como resumen, en el transcurso del Objetivo 3 se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El análisis de imágenes por SEM mostró una completa descelularización y preservación de las matrices a un nivel microestructural.
2. Se puso a punto un nuevo procedimiento con Alamar Blue para el análisis de viabilidad en tejido, no detectándose células viables en los tejidos descelularizados.
3. La Arteria mostró mayores niveles de rigidez y elasticidad que el Músculo. Las propiedades biomecánicas, tanto de rigidez como de elasticidad, se mantuvieron para los Protocolos A/B y B/A en Arteria. Sin embargo, se observó una pérdida de las propiedades biomecánicas en el Músculo tratado con el Protocolo A/B.
4. La concentración de colágeno fue similar en todos los tejidos y se mantuvo tras la descelularización con los Protocolos A/B y B/A para Velo y Arteria. Se detectó una reducción de colágeno para el Músculo tratado con el Protocolo A/B. La concentración de elastina fue diferente para los tejidos estudiados siendo más elevada en Músculo. Los niveles de elastina se mantuvieron en todos los tejidos y para todos los protocolos aplicados. La concentración de GAG en Velo también se mantuvo tras los protocolos de descelularización empleados.

OBJETIVO 4: EVALUAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS Y REALIZAR UN ENSAYO DE BIOCOMPATIBILIDAD

4.1- AISLAMIENTO Y CULTIVO DEL COMPONENTE CELULAR

Se logró aislar con éxito el componente celular de los velos valvulares en el 100% de las digestiones enzimáticas realizadas. El rendimiento celular obtenido fue de $5.349,6 \pm 573,2$ células/mg de tejido. Las células aisladas fueron capaces de adherirse a las superficies plásticas y proliferar (Figura 78). Se observó una morfología fusiforme y con multitud de prolongaciones. Esta población celular mostró una gran capacidad proliferativa, alcanzando el estado de preconfluencia en 8 días para un P0.

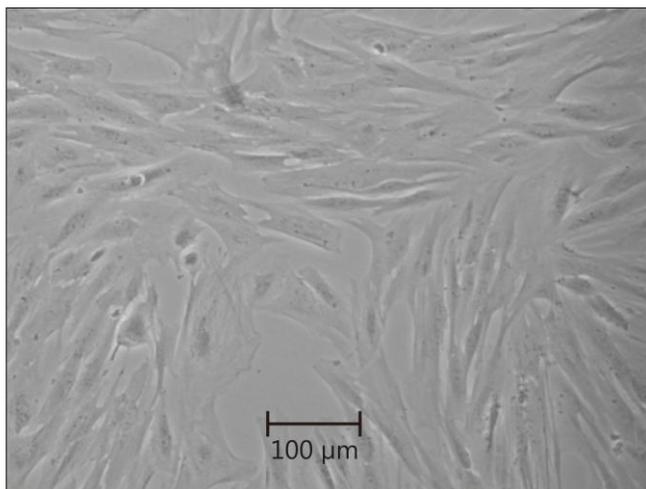


Figura 78: Población celular en cultivo aislada de Velo valvular. Se pudo apreciar la morfología de las células en preconfluencia. Visualizado a 10x en microscopio invertido de campo claro; n=5.

4.2- CITOTOXICIDAD DEL MEDIO DE DESCELULARIZACIÓN

La tinción Life/Dead permitió discriminar colorimétricamente entre células vivas y muertas. Por una parte, la calceína mostró fluorescencia verde si existía actividad esterasa, es decir, si las células permanecieron viables (Figura 79).

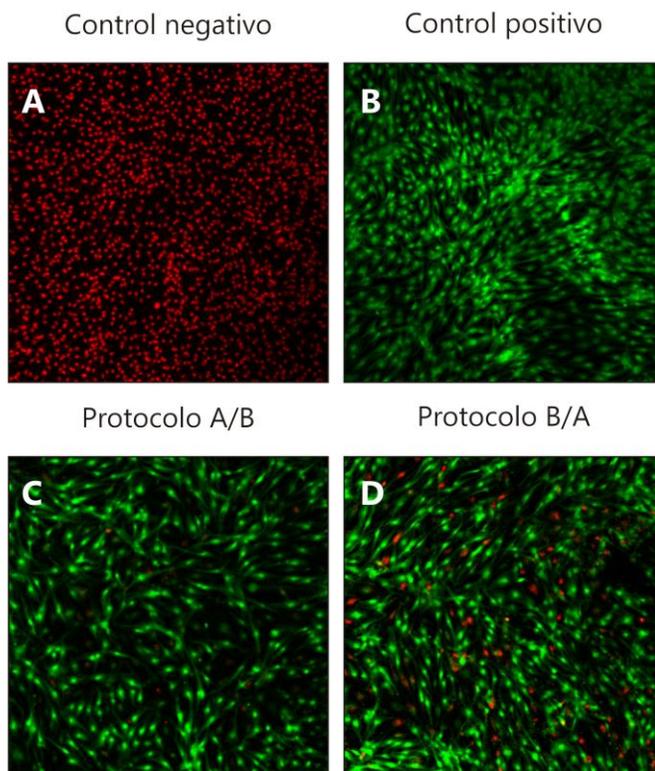


Figura 79: Resultados del ensayo de citotoxicidad sobre las células de velo. El DMSO produjo la muerte celular en el 100% de las células (fluorescencia roja) (A). Por contra, en el control positivo (B), se visualizaron un 100% de células viables. En ambos protocolos, A/B (C) y B/A (D), se detectó la presencia de células muertas, aunque existió un elevado grado de viabilidad respecto al Control negativo. Visualizado a 10x en un microscopio de fluorescencia, n=5.

Con la acción combinada del etidio, colorante incapaz de penetrar en células con la membrana plasmática intacta, se observó fluorescencia roja en las células muertas.

En las muestras de células que se mantuvieron los 11 días con una mezcla de medio de cultivo base y la solución de lavado tras la aplicación del Protocolo A/B (1:1), se observó una viabilidad de un $96,8 \pm 1,6$ %.

Para las células en cultivo donde se aplicó la mezcla de medio de cultivo base y la solución de lavado del Protocolo B/A (1:1), se detectó fluorescencia verde en el $90,3 \pm 3,16$ %.

En el análisis estadístico sobre los datos recopilados, se aplicó un modelo lineal generalizado y se realizó una ANOVA. Los resultados mostraron que existieron diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre la aplicación de las diferentes soluciones de lavado de los Protocolos sobre las células de velo en cultivo (Tabla 23).

El análisis del test de Tukey reflejó la existencia de diferencias significativas ($p \leq 0,001$) entre el Protocolo A/B y B/A, mientras que no se detectaron diferencias significativas entre el Protocolo A/B y el Control positivo ($p = 0,059$).

Se consideró que la solución de lavado del Protocolo A/B no presentó citotoxicidad sobre las células en cultivo, mientras que la solución de lavado proveniente del Protocolo B/A mostró positividad para el ensayo de citotoxicidad (Figura 79).

Los restos de solución de descelularización presentes, tras el lavado de las muestras procesadas con el Protocolo B/A, provocaron la muerte de numerosas células en cultivo.

Tabla 23: ANOVA de los porcentajes de viabilidad celular en el ensayo Life/Dead.

	GL	Valor F	P (>F)
Protocolo	3	2610	<2,2e-16 ***
Residuos	26		

GL: Grados de libertad; P: Probabilidad. *** $p \leq 0,001$.

4.3- BIOCMPATIBILIDAD DE LAS MATRICES ACELULARES

El diseño del ensayo de biocompatibilidad, descrito en el apartado 4.3 de Material y Método, proporcionó un modelo sencillo y reproducible para testar la eficiencia de los protocolos de descelularización descritos, en cuanto a preservación de la biocompatibilidad se refiere.

Tras 45 días de evolución, la tinción H-E reveló presencia de componente celular viable en la estructura (Figura 80- A y C). En las matrices descelularizadas por el Protocolo A/B, se pudo observar la formación de un epitelio en la superficie de las mismas. A un mayor aumento se pudo observar cómo las células se adhirieron a la superficie de la matriz acelular y formaron una capa celular continuada (Figura 80- B y D). También se visualizaron células viables embebidas en la matriz tridimensional descelularizada con el Protocolo B/A.

Aunque anteriormente se ha demostrado que la solución de lavado de este protocolo provocaba citotoxicidad sobre estas mismas células en cultivo, se ha podido comprobar que las células son capaces de adherirse y recolonizar dicha estructura celular.

Como se ha utilizado una población heterogénea, aislada del velo valvular, se ha podido observar cómo las células han crecido tanto dentro como fuera de las matrices obtenidas en los protocolos de descelularización. Se tuvo en consideración que dichas matrices podrían ser favorables en un futuro proceso de recolonización celular.

Como resumen del Objetivo 4 se podría considerar la realización del aislamiento, cultivo y proliferación de una población celular del Velo valvular; el ensayo de citotoxicidad realizado sobre las células en cultivo mostró la inocuidad de las soluciones empleadas para la descelularización con el Protocolo A/B y una mayor toxicidad en las aplicadas con el Protocolo B/A; sin embargo, con ambos protocolos se obtuvieron matrices acelulares biocompatibles donde las células en cultivo fueron capaces de adherirse, proliferar y recolonizar el tejido.

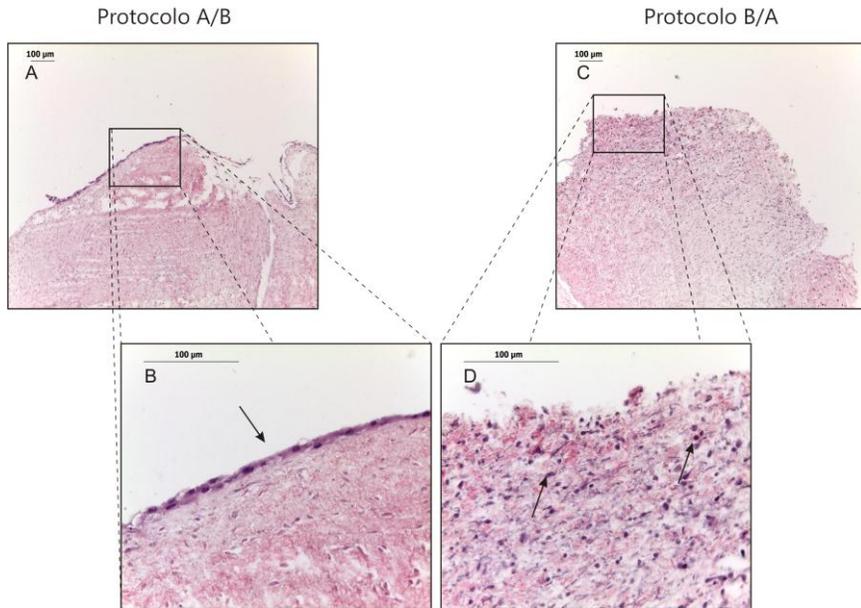
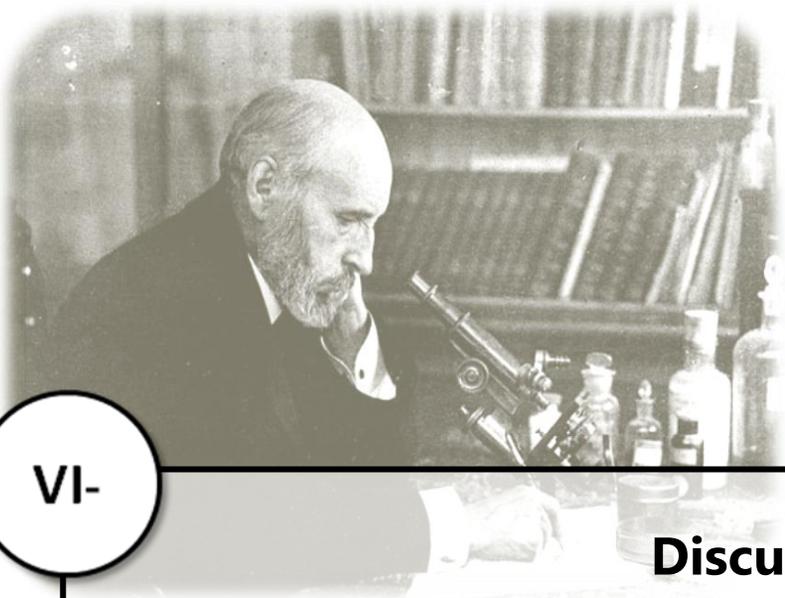


Figura 80: Resultados del ensayo de biocompatibilidad. Tanto los Velos descelularizados por el protocolo A/B (A-B) como los descelularizados por el protocolo B/A (C-D), mostraron ser biocompatibles al existir células integradas (flechas negras) en la matriz acelular. Las imágenes A y C están obtenidas con un aumento de 10x. Las imágenes B y D están obtenidas con un aumento de 40x; n=10



VI-

Discusión

En el presente trabajo se propone un novedoso protocolo de descelularización que ha demostrado efectividad tras su aplicación en tejido valvular ovino.

De los 107 trabajos consultados (Tabla 1), un 56% tomaron como tejido de referencia la válvula cardíaca. Se podría decir que desde la publicación de *Bader y col.* en 1998,⁹ la válvula cardíaca ha constituido el tejido de referencia en la descelularización de tejidos debido a su complejidad estructural.^{53,55,112,113} Considerando solamente los trabajos publicados en este tejido, se pudo observar que el animal experimental de referencia ha sido el cerdo, modelo utilizado en el 70% de los trabajos realizados (Tabla 2). Minoritariamente, se ha utilizado la rata/ ratón, en un 14% de las publicaciones, y la oveja sólo en un 8%. Otros trabajos, el 8% restante, se han realizado directamente sobre tejido humano.

Sin embargo, la Agencia estadounidense de alimentos y medicamentos (*US Food and Drug Administration*, US-FDA) ha recomendado la oveja como modelo experimental para la prueba de tejido cardiovascular.⁹⁴ El corazón ovino es comparable al humano en tamaño y constituye un modelo idóneo para la evaluación del proceso de calcificación.^{2,94} Además, fue el primer modelo experimental donde se implantó una válvula cardíaca y se observó que presentaba un potencial de endotelización superior al descrito en humanos.¹⁶²

*Schenke-Layland y col.*¹⁵⁰ demostraron que las válvulas porcinas resultaron más resistentes que las válvulas ovinas. Aunque las válvulas porcinas presenten mejores propiedades biomecánicas, el interés de probar la funcionalidad in vivo de válvulas

descelularizadas ovinas radica en el desarrollo de un modelo más sensible a los cambios biomecánicos que se produzcan en las válvulas tras la eliminación del componente celular. Teniendo también en cuenta los periodos que este tejido permanece implantado en el modelo experimental, 9 meses en el trabajo de *Baraki y col.*,¹⁰ la oveja se ha planteado como un modelo sencillo por su mantenimiento y estabulación, debido a su carácter dócil y su peso, no tan elevado como en el modelo porcino. En base a los trabajos anteriormente realizados,^{10,44,95,150,152,162} se ha considerado el modelo experimental ovino como el más adecuado para la realización del presente trabajo de investigación.

La selección de un protocolo de descelularización, en base a la bibliografía de referencia (Tabla 1), resultó un proceso complejo. Durante 15 años de desarrollo en técnicas de descelularización, prácticamente se ha utilizado el mismo agente descelularizante, el detergente, un 81% de los 139 protocolos consultados lo utilizaron en alguna etapa. Aún así, no es un protocolo que actualmente esté estandarizado y que presente unos criterios de calidad definidos.⁵³ Se ha descrito que el uso de detergentes es muy eficiente en la solubilización de los fosfolípidos de la membrana plasmática celular, aunque pueden alterar la estructura tisular nativa, eliminando los GAG y dañando el colágeno.^{38,59}

*Rieder y col.*¹⁴⁰ describieron que, tras recelularizar un tejido descelularizado con detergente, se producía una lisis celular masiva debido a los restos de detergente remanentes en la matriz. Aunque este hecho ha sido confirmado,²¹ también se ha demostrado que tras una serie de 10 lavados intensivos todavía se

detectan restos de detergente en la matriz, pero a unas concentraciones que no resultan tóxicas para el componente celular.²⁵ Recientemente *Anilkumar y col.* concluyeron que el uso de detergentes en un proceso de descelularización es un paso que se puede evitar, sustituyéndolo por métodos menos agresivos.⁵

Se ha descrito que los protocolos más efectivos son aquellos que combinan más de una variable,⁵⁹ por lo que se ha propuesto el estudio y análisis de dos condiciones experimentales, el pH y la osmolaridad, descritas y clasificadas como agentes potencialmente descelularizantes dentro de los métodos químicos.^{38,53}

Si se analizan todos los trabajos que han utilizado algún agente ácido o básico en la sección de material y método,^{29,56,60,114,127,139,166} se ha podido comprobar que el uso de agentes básicos^{29,114,127,139,166} ha sido más amplio que el de los agentes ácidos.^{56,60}

Concretamente, *Mendoza y col.*¹¹⁴ evaluaron el efecto de una solución alcalina para descelularizar pericardio. Concluyeron que las soluciones alcalinas producen un aumento del volumen debido al acumulo de agua en el interior de los tejidos, pero fue temporal y se produjo sólo durante la realización del tratamiento. En los trabajos de *Orabi y col.*¹²⁷ y *Choi y col.*²⁹ se utilizó una combinación del detergente no iónico Tritón X-100 con hidróxido amónico (NH₄OH). En ambos casos, la combinación fue efectiva en la eliminación del componente celular y no se consideró que produjese toxicidad en el tejido, porque el proceso de recelularización se realizó con éxito tanto en los segmentos uretrales,¹²⁷ como en las córneas.²⁹ En el caso de *Reing y col.* utilizaron una mezcla química, incluyendo la base de hidróxido

cálcico $\text{Ca}(\text{OH})_2$, para eliminar los folículos pilosos de la dermis antes de la descelularización.¹³⁹

En los trabajos realizados por *Freytes y col.*⁵⁶ y *Gilbert y col.*⁶⁰ utilizaron ácido peracético $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$ para la desinfección del tejido. Solamente *Gilbert y col.* describieron también un efecto descelularizante en su aplicación.⁶⁰

En ninguno de los trabajos anteriormente analizados se indica el grado de acidez o alcalinidad de los agentes utilizados, solamente se ha encontrado una publicación donde se haya descrito la medida de pH en las soluciones y se haya evaluado el punto de pH más eficiente. *Tsuchiya y col.*¹⁶⁶ evaluaron una solución descelularizante compuesta por detergentes zwitteriónicos a tres pH alcalinos diferentes: 8, 10 y 12. El pH 8 fue el idóneo para la descelularización de pulmones de rata, ya que conservó la elastina, fibronectina, laminina y GAG en la matriz tridimensional.¹⁶⁶

Si tenemos en cuenta el factor de los choques osmóticos, se puede observar que han sido ampliamente aplicados y descritos, ya sea como condición aislada,^{116,148,190} o en combinación con otros agentes descelularizantes (diferentes clases de detergentes).^{32,70,78,83,91,92,95,102,107,115,116,121-123,128,167,178,192} Se ha demostrado que es un agente químico muy efectivo en la preservación de la matriz extracelular, ya que no presenta toxicidad ni genera daños en la estructura tridimensional, aunque no es capaz de eliminar todo el componente celular *per se*.^{38,53,59,116}

Tras la revisión bibliográfica, se detectó una falta de protocolos de descelularización alternativos, sólo un 9% de los protocolos analizados no utilizaron agentes enzimáticos ni detergentes. Se consideró la selección de los choques osmóticos como agente descelularizante por su inocuidad,^{38,53,59} y la modificación del pH como otro posible agente a combinar pero sin advertir los efectos que pudiese tener en el tejido ya que no ha sido descrito anteriormente. Sin embargo, sí que se conoce que el pH constituye un parámetro importante en el mantenimiento de la viabilidad celular.¹⁸³

En la presente tesis doctoral, se ha hipotetizado sobre el posible efecto descelularizante de una combinación de choques osmóticos y de pH, un nuevo concepto a analizar dentro del área de la descelularización de tejidos.

OBJETIVO 1: ANALIZAR LAS COMBINACIONES GENERADAS A PARTIR DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES CHOQUES OSMÓTICOS Y CHOQUES DE PH

En el presente objetivo, se evaluó el resultado de la combinación entre las variables de pH, *ácido, neutro y básico* y las variables de osmolaridad, *solución hipotónica e hipertónica*. En la elaboración de las soluciones para la generación de choques osmóticos, se utilizó como referencia la descrita por Meyer y col.,^{95,115,116} donde la única modificación que se ha incluido es el uso de cloruro sódico en la solución hipertónica⁸³ en vez de cloruro potásico.

La lisis celular puede dañar las proteínas de la matriz extracelular porque se liberan indiscriminadamente proteasas citoplasmáticas, siendo esencial incluir en el protocolo de descelularización un inhibidor de las mismas con el fin de reducir la degradación que éstas puedan generar en la estructura.^{38,59} Los inhibidores más utilizados han sido la aprotinina⁸³ y el PMSF,^{115,116} en este caso se seleccionó el PMSF al estar descrita su aplicación en tejido valvular ovino.⁹⁵

Varios autores han recomendado un ajuste de las soluciones a pH 8, ajuste que no se ha aplicado en el presente trabajo ya que el pH fue la otra variable a modificar dependiendo de las condiciones experimentales definidas.^{83,91,192}

En la preparación de todas las soluciones utilizadas se midió el pH y la osmolaridad como comprobación que realmente se correspondiesen con las variables teóricas propuestas. En la medición de pH se consideró como pH de referencia el pH neutro 7-7,5,¹⁸³ se determinó como pH ácido el pH entre 5-5,5 y el pH básico fue el correspondiente a las mediciones 11-11,5.

Para la medición de la osmolaridad (osmol/litro), se tuvieron en cuenta los valores de osmolalidad (osmol/kg), igual que la osmolaridad pero se expresa frente a una unidad de peso en vez de capacidad.

Como no se ha encontrado información previa sobre mediciones de osmolalidad en soluciones de descelularización, se consideró como valor de referencia la osmolalidad de la sangre.^{1,11,28}

En todos los casos, independientemente del pH de la solución, el valor de la tonicidad se encontró por debajo del valor de referencia en las soluciones hipotónicas y más elevado en las soluciones hipertónicas. Por tanto, se demostró que el factor pH no varió las condiciones de osmolaridad definidas, mostrándose como dos agentes descelularizantes de fácil combinación para su uso en un mismo protocolo y a un mismo tiempo de acción.

En primer lugar, tras la evaluación de los cortes histológicos se ha demostrado que es posible descelularizar las válvulas cardíacas ovinas empleando una combinación choques osmóticos y choques de pH.

Se ha observado que el grado de descelularización, en la mayor parte de los protocolos descritos, no ha sido homogéneo en las tres zonas de estudio descritas dentro de la raíz valvular.

Ya se había descrito previamente una mayor concentración celular presente en los cortes histológicos en Arteria respecto al Velo.^{20,83} Se comprobó que hubo un mayor número de protocolos que eliminaron el componente celular en Velo, esto es debido a la disposición tridimensional característica de las proteínas extracelulares, confiriendo una mayor porosidad a la estructura.¹¹³ Sin embargo, en Arteria y Músculo resultó más compleja la eliminación celular, sobre todo en las zonas más internas, donde los agentes descelularizantes profundizaron peor al presentar estructuras proteicas más densamente interconectadas. Se ha podido corroborar la correlación entre la eficiencia en la eliminación de las células con un daño asociado al grado de estructuración.³⁸

En cuanto a los protocolos utilizados destacar el protocolo N/N, porque en esta combinación el pH fue neutro siendo los choques osmóticos la única variable presente. Se ha demostrado que el uso individualizado de choques osmóticos es efectivo en la eliminación de células endoteliales y en la preservación eficaz de la morfología, pero no es efectivo en la total eliminación de células embebidas en el tejido. Se ha podido corroborar que los choques osmóticos per se, han podido eliminar un porcentaje del componente celular presente y preservar la estructura de la matriz en Velo, Arteria y Músculo, pero se pudieron observar restos de células viables en las zonas más internas de los tejidos.¹¹⁶

Tras la evaluación obtenida en el ensayo ciego se agruparon los protocolos con una clasificación similar en cuanto a eliminación celular y preservación de la matriz extracelular se refiere. Se incluyeron los protocolos A/N, A/A B/N y B/B dentro de un mismo grupo ya que en todos los casos se observó que la descelularización no fue completa y se pudieron visualizar restos de células viables en todas las zonas de estudio. Se descartaron todos estos protocolos puesto que la efectividad no había resultado la idónea.

Los protocolos N/B y N/A produjeron un daño en la matriz extracelular visible en los cortes histológicos, por lo que la modificación de pH, respecto al pH de referencia, en la solución hipertónica, cuando la hipotónica era neutra, no resultó una alternativa a considerar para la creación de un protocolo de descelularización.

Los protocolos que eliminaron la mayor parte del componente celular y que preservaron medianamente la estructura tridimensional fueron los protocolos A/B y B/A. Es decir, la combinación de choques de pH junto con los choques osmóticos, resultó en la obtención de dos potenciales protocolos con capacidad descelularizante.

La conservación de las tres capas histológicas y la evidente pérdida celular resultaron similares a las obtenidas para Velo con otros protocolos de descelularización.^{44,150,152} En oveja sólo se han realizado estudios sobre el Velo valvular, por lo que el resto de estructuras se han comparado con trabajos realizados en otros modelos histológicamente similares, como son las muestras de válvulas porcinas.

Para una comparación histológica de descelularización en Arteria se han considerado trabajos realizados en cerdo.^{83,148,192} Se ha comprobado el mantenimiento de las láminas fenestradas características de la capa media, aunque también ha resultado ser la capa donde se han detectado restos celulares no viables debido al grosor de la estructura, como se ha descrito previamente.¹⁹²

No se ha localizado ningún trabajo donde se haya analizado la descelularización en el Músculo, por lo que se ha realizado su evaluación en función a una exhaustiva comparación con el tejido en Fresco e información de histología básica sobre el tejido miocárdico.^{13,31,145,187}

Con el desarrollo de este objetivo, se ha podido demostrar que una combinación de choques osmóticos y choques de pH es efectiva en la descelularización de válvulas cardíacas ovinas. Se obtuvieron dos protocolos efectivos, el Protocolo A/B y el Protocolo B/A. Antes de descartar ninguno de los dos protocolos en esta etapa, se seleccionaron ambos para un análisis más profundo.

OBJETIVO 2: DESARROLLAR Y OPTIMIZAR UN PROTOCOLO DE DESCELULARIZACIÓN QUE PRESERVE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL Y ELIMINE LOS RESTOS CELULARES GENERADOS

Tras la consecución del Objetivo 1, se seleccionó el Protocolo A/B y el Protocolo B/A como los más idóneos en la descelularización de válvulas cardíacas ovinas.

Recientemente se han establecido los criterios para considerar un tejido completamente descelularizado. Se ha estimado en la presencia de menos de 50 ng de dsDNA, fragmentos de ácidos nucleicos presentes, si los hubiese, de menos de 200 pb y que no se detecten restos de material nucleico en los tejidos con técnicas histológicas o tinción fluorescente.⁵³ Para alcanzar este grado de descelularización no resulta suficiente con el uso de los agentes descelularizantes, siendo necesario aplicar un tratamiento enzimático que degrade los restos de ácidos nucleicos presentes en la matriz.^{38,24} La importancia de una eliminación de todos los posibles restos de ácidos nucleicos radica en su correlación con una generación de respuesta inflamatoria en el organismo receptor.⁸⁷

Los tratamientos enzimáticos constituyen una etapa indispensable en todos los protocolos de descelularización analizados, si bien es cierto, no se ha encontrado un criterio en base a su utilización. Es por ello que se ha propuesto un estudio en profundidad de cómo los tratamientos enzimáticos eliminan los ácidos nucleicos presentes en el tejido dependiendo de la concentración enzimática, el tiempo de incubación, la zona del tejido y el protocolo utilizado.

Para la eliminación de los ácidos nucleicos presentes en la matriz, se han utilizado como enzimas de referencia la DNAsa I y la RNAsa A. En trabajos anteriores se han utilizado rangos entre 25 y 200 µg/ml de DNAsa I y entre 10 y 20 µg/ml de RNAsa A.^{116,192} Asimismo, también se ha encontrado variabilidad entre los tiempos de incubación enzimática, comprendidos entre las 5 y las 48 horas.^{116,192} En el presente estudio se han contemplado concentraciones entre 12- 50 µg/ml de DNAsa I, entre 10- 40 µg/ml de RNAsa A, y entre 2- 7 horas de incubación.

Entre los métodos de detección de ácidos nucleicos en matrices acelulares, se han podido clasificar en cualitativos, como la tinción H-E o tinciones fluorescentes anteriormente mencionadas; y los cuantitativos, que han permitido la obtención de una concentración numérica de ácidos nucleicos presentes.⁵³ Como método cualitativo se ha utilizado la tinción H-E y entre todos los métodos descritos,^{32,61,150} se ha seleccionado el método fluorimétrico Picogreen[®], por su alta sensibilidad en la detección de dsDNA.⁶¹

El análisis de dsDNA en Velo, Arteria y Músculo en Fresco mostró que los tejidos con un mayor contenido en ácidos nucleicos, y por tanto células, fueron el Velo y la Arteria. Histológicamente ya se había descrito la Arteria como un tejido altamente celularizado,^{20,83} sin embargo, se consideraba el Velo como un tejido con menor concentración celular⁸³ y los resultados obtenidos mostraron que no existieron diferencias significativas en contenido de dsDNA entre ambos tejidos. Por otro lado, el Músculo resultó ser un tejido con un menor contenido celular respecto al Velo y a la Arteria.

Se determinaron 3 puntos de toma de muestras, después de la acción de los agentes descelularizantes (previo al tratamiento enzimático), tras 2 horas de incubación enzimática y a las 7 horas, una vez finalizado el tratamiento. La representación general de los datos mostró una disminución muy significativa de ácidos nucleicos en los Tejidos descelularizados respecto a la cantidad de dsDNA aislada en los Tejidos en Fresco.

El análisis de los resultados, Previo al tratamiento enzimático, mostró que los agentes descelularizantes del Protocolo A/B y del Protocolo B/A eliminaron un gran porcentaje de ácidos nucleicos, lo que ratifica que la combinación de choques osmóticos y de pH reducen el componente celular presente en los tejidos.³⁸ Sin embargo, el Protocolo A/B fue más eficaz en esta eliminación que el Protocolo B/A para las tres zonas de estudio. Destacar que en el Velo se alcanzaron niveles de dsDNA por debajo de los 50 ng⁵³ con el Protocolo A/B, por lo que no sería necesario aplicar un tratamiento enzimático que pudiese ocasionar más daño en la matriz extracelular.

La no indivisibilidad de los tejidos, puesto que en un futuro implante se implantaría la raíz valvular completa, precisa aplicar un tratamiento enzimático para eliminar los restos detectados en Arteria y Músculo.

Un hecho importante, antes de la aplicación del tratamiento enzimático, resultó en la introducción de una serie de lavados con PBS. La hoja de especificación de la DNAsa I describió que la presencia de EDTA, utilizado en las soluciones hipo e hipertónicas, podría inducir la inhibición de la enzima puesto que es un agente quelante capaz de capturar los iones activadores de la misma. La realización de 3 ciclos de lavado ha permitido asegurar una mayor eliminación de los posibles restos, dentro del tejido, de los reactivos utilizados en la preparación de las soluciones de descelularización.

Tras las 2 horas de tratamiento enzimático, se observó en primer lugar que los niveles de dsDNA detectados para todos los tejidos no fueron significativos entre ambos protocolos de descelularización. Por una parte se demostró que, con una acción previa del Protocolo B/A y tras 2 horas de incubación enzimática, se alcanzaron los mismos niveles de eliminación de dsDNA que los obtenidos con el Protocolo A/B. En Velo se cuantificaron cantidades residuales de ácidos nucleicos, mientras que en Arteria y Músculo todavía se detectaron niveles por encima del umbral de 50 ng.⁵³

A las 7 horas de tratamiento, se localizaron cantidades ínfimas de ácidos nucleicos en Velo y se demostró la presencia de dsDNA a niveles por debajo de los 50 ng para Arteria y Músculo. Destacar

que el Músculo, como tejido con menor componente celular antes del comienzo del tratamiento enzimático, fue uno de los tejidos donde resultó más dificultoso bajar el límite de 50 ng de dsDNA. La compacta estructura de las fibras musculares^{2,3} no facilitó la eliminación de restos celulares presentes en el tejido. Por ello resultó la zona limitante, ya que a un menor tiempo y a una menor concentración enzimática se alcanzaron niveles óptimos para Velo y Arteria, sin embargo, para Músculo el tratamiento más óptimo fue el Tratamiento 3, de mayor concentración enzimática, a las 7 horas de incubación.

Se observó una correlación entre el tratamiento enzimático y la eliminación de ácidos nucleicos, a mayor concentración de enzima, mayor eliminación de dsDNA para las tres zonas de estudio y los dos protocolos analizados. También se pudo comprobar que a mayor tiempo de incubación enzimática, mayor efectividad en la acción de la DNasa I y la RNasa A, ya descrito con anterioridad por *Schenke-Layland y col.*¹⁵¹

Tras el análisis, se seleccionó el Tratamiento enzimático 3 con 7 horas de incubación para la obtención de más de un 98% de eliminación de dsDNA, niveles muy inferiores a 50 ng, en todos los tejidos analizados.

Los resultados obtenidos con este tratamiento para la Arteria fueron comparables a los descritos por *Böer y col.*¹⁷ en arterias equinas y la concentración de dsDNA residual en Velo fue similar a la publicada por *Schenke-Layland y col.*¹⁵⁰

En la visualización de las pruebas cualitativas por tinción H-E, se corroboraron los resultados obtenidos en la cuantificación. No se detectaron restos de material genético para todos los tiempos y tratamientos analizados en Velo, mientras que en Arteria y Músculo, se observó una total descelularización a mayores tiempos de incubación y a una mayor concentración de enzima.

Se ha podido considerar que el tratamiento enzimático se ha optimizado según los estándares establecidos recientemente,⁵³ para obtener un tejido descelularizado sin restos de material genético que pueda ser deletéreo ante una futura aplicación. Además los resultados son comparables a los obtenidos por otros grupos de investigación donde también han cuantificado la eliminación de dsDNA por el mismo método fluorimétrico.^{17,150}

OBJETIVO 3: CARACTERIZAR LAS ESTRUCTURAS ACELULARES OBTENIDAS

Una vez estandarizados ambos protocolos de descelularización, se realizó un análisis exhaustivo de caracterización en la matriz acelular resultante.

Las imágenes obtenidas por SEM permitieron tener una visión más amplia de la microestructura de las diferentes zonas de la raíz pulmonar. Por una parte, se evidenció la presencia de células viables en los tejidos en Fresco, mostrando una continuidad del endotelio en toda la superficie del Velo y la Arteria.

Este mismo análisis, aplicado a las matrices acelulares obtenidas por descelularización, mostró la ausencia tanto de células como de

restos que evidenciasen una presencia celular previa tanto para el Protocolo A/B como para el Protocolo B/A.

Además, con esta técnica se pudo obtener una visión más tridimensional de la distribución de fibras de colágeno y elastina que se pusieron de manifiesto tras la eliminación del endotelio y del resto de células embebidas en el tejido.¹⁹² En ambos protocolos la matriz acelular resultante mostró una estructura de fibras organizadas y no se observaron daños relevantes, como discontinuidades o rupturas de las proteínas extracelulares.

Se ha considerado imprescindible la realización de un ensayo de viabilidad tisular para determinar si algún resto celular remanente en la matriz pudiese mostrar una actividad metabólica. Como se ha descrito en el Objetivo 3, se han podido detectar restos de ácidos nucleicos en la matriz extracelular, y esta técnica ha servido como descarte ante la posibilidad que dichos restos de ácidos nucleicos pudiesen haber sido aislados a partir de células viables.

El primer reto para un análisis de viabilidad en una estructura tridimensional resultó en la selección de un método de detección. *Csöngé y col.*³⁹ describieron un método para la determinación de viabilidad tisular en injertos osteocondrales con el agente MTT. Sin embargo, la toxicidad de dicho agente no permitió realizar mediciones a lo largo del tiempo.

En el área de cultivos celulares, la medida de la viabilidad celular es imprescindible y es el campo donde más técnicas se han descrito y puesto a punto, entre ellas el Alamar Blue.⁶³

Se trata de un agente de fácil uso, proporcionando sensibilidad en las medidas puesto que se puede detectar por fluorimetría, y además es inocuo para las células, pudiendo realizarse mediciones a lo largo del tiempo sobre una misma muestra o reutilizarla para otro tipo de ensayos. La hoja de especificaciones del producto aconseja la dilución del reagente Alamar Blue, a un 10% en un medio de cultivo base, y su incubación con las células durante 4 horas a 37°C.

En los trabajos de *Sajesh y col.*¹⁴⁶ y *Moharamzadeh y col.*¹¹⁹ se ha descrito su uso en matrices tridimensionales utilizando el reagente con las condiciones descritas para células en cultivo celular. Se midió la viabilidad en estructuras tridimensionales sintéticas¹⁴⁶ y en estructuras biológicas obtenidas por técnicas de ingeniería tisular.¹¹⁹

En base a la no toxicidad del Alamar Blue sobre las células, en el presente estudio se determinó la realización de una toma de medidas desde las 0 hasta las 24 horas de incubación con el reagente. Los resultados mostraron que, a medida que aumentaba el tiempo de incubación, se incrementaba la señal de fluorescencia, indicativa de viabilidad en los tejidos en Fresco. Los datos de fluorescencia para el Velo siguieron un modelo de crecimiento lineal hasta las 24 horas, mientras que en Arteria y Músculo resultó exponencial. Esto demostró que para la medición de viabilidad en un tejido tridimensional son necesarios tiempos de incubación mayores a 4 horas^{119,146} puesto que el Alamar Blue tarda en penetrar en la estructura.

Al igual que se evidenció un aumento de señal con el tiempo de incubación para los tejidos en Fresco, se pudo demostrar que, tras 24 horas de incubación, no se detectaron células viables en los tejidos descelularizados con el Protocolo A/B y el Protocolo B/A.

Como se ha mencionado anteriormente, cualquier protocolo de descelularización sólo por eliminar el componente celular del tejido está causando un mínimo daño en la estructura tridimensional.⁶⁴ Lo importante es reducir el posible efecto deletéreo de los agentes descelularizantes sobre las proteínas extracelulares y controlar que las propiedades biomecánicas de la matriz acelar resulten similares a las observadas en los tejidos en Fresco.^{78,121}

Se llevaron a cabo ensayos uniaxiales donde se ejerció una fuerza progresiva en una sola dirección sobre la Arteria y el Músculo, zonas suturables en el implante in vivo. Dicha fuerza se aplicó hasta la ruptura de los mismos, donde los datos permitieron obtener los valores de rigidez y elasticidad de cada tejido tanto en Fresco como los descelularizados por el Protocolo A/B y el Protocolo B/A.

El análisis de elasticidad y rigidez mostró que, en Fresco, la Arteria presentaba mayores niveles que en Músculo. Las condiciones fisiológicas de ambos tejidos no son comparables y la elasticidad y rigidez evidenciadas en la Arteria son más elevadas debido a su funcionalidad in vivo.¹³

Dichos niveles de elasticidad y rigidez descritos para la Arteria en Fresco se mantuvieron en la Arteria descelularizada mediante los

Protocolos A/B y B/A, lo que demostró que ambos protocolos no afectaron a las propiedades biomecánicas características de este tejido. Además se pudieron corroborar los resultados obtenidos en otros trabajos de investigación, donde se evidenció que la descelularización no dañaba las propiedades biomecánicas de la Arteria.^{78,121}

Sin embargo en Músculo, los niveles de rigidez y elasticidad se vieron comprometidos para las muestras descelularizadas mediante el Protocolo A/B. Con el Protocolo B/A se mantuvieron los mismos valores que los resultantes para el tejido en Fresco, sin embargo se ha demostrado que el Protocolo A/B produjo un daño en la estructura tridimensional del Músculo disminuyendo significativamente sus propiedades biomecánicas respecto al control. Estos resultados no se pudieron comparar con otros similares porque no se ha encontrado ningún trabajo donde se analizase el Músculo como una zona a considerar dentro de la raíz valvular.

Normalmente, los estudios biomecánicos se han complementado con ensayos bioquímicos donde se ha cuantificado la concentración de proteínas estructurales presentes, responsables de generar esas propiedades de rigidez y elasticidad características.^{32,116,122,150,151}

Para ello se han utilizado kits colorimétricos que han facilitado la detección de las principales proteínas extracelulares, colágeno, elastina y GAG.

En cuanto al contenido en colágeno, se han podido evidenciar unos niveles equivalentes para todos los tejidos en Fresco, Velo, Arteria y Músculo. En el Velo Fresco se ha obtenido una concentración de colágeno similar a la descrita anteriormente en oveja por *Schenke-Layland y col.*¹⁵⁰ aunque en otros trabajos se han obtenido valores más reducidos³² y más elevados.¹¹⁶ Asimismo, se ha constatado que la concentración de colágeno en el Velo de oveja es similar a la descrita para las válvulas porcinas.^{122,151}

Los datos obtenidos para Arteria y Músculo no se han podido comparar con otros trabajos realizados, puesto que el Velo siempre ha sido el tejido de referencia en todos los análisis anteriormente publicados.^{32,116,122,150,151}

Por otra parte, la concentración de elastina detectada en el Velo Fresco ha resultado muy superior a la descrita previamente tanto para tejido ovino^{150,151} como para tejido porcino.¹²² Además, los resultados obtenidos han mostrado una mayor concentración de elastina presente en la zona del Músculo que la observada para Velo y Arteria en Fresco.

Previamente se ha descrito la importancia de la concentración de GAG en la estructura del velo valvular.¹¹³ La capa esponjosa, constituida principalmente por esta familia de proteínas, constituye una estructura más laxa y si existe un daño evidente tras la descelularización, es la zona donde antes se detecta un daño asociado con la pérdida de GAG.³² Es por ello que la determinación de GAG se ha realizado solamente en la zona de Velo, como principal indicador del daño generado tras la descelularización. Los

niveles de GAG detectados en Fresco han resultado ser muy elevados respecto los descritos anteriormente para este mismo tejido.^{32,150,151}

Quando se realizó un análisis comparando la concentración proteica de los tejidos descelularizados con los tejidos en Fresco se observó una disminución significativa de colágeno en los tejidos obtenidos por el Protocolo de descelularización A/B.

Al desglosar los datos por tipo de tejido, se observó que las diferencias observadas se correspondieron con la zona del Músculo, es decir, se demostró que el Protocolo A/B disminuyó significativamente la concentración de colágeno solamente en esta zona. Sin embargo, la concentración de elastina se mantuvo en todas las zonas y para todos los protocolos aplicados. También se observó que la concentración de GAG, importante en el mantenimiento de la estructura valvular, se preservó tras la aplicación de ambos protocolos de descelularización.

Se ha podido relacionar esta disminución de colágeno en la zona del Músculo, con una disminución de las propiedades biomecánicas, anteriormente descritas para esta zona. Por tanto, el Protocolo A/B ha ocasionado un daño significativo en la estructura y propiedades biomecánicas del Músculo, pero no en el resto de las zonas analizadas.

Los ensayos bioquímicos han proporcionado una mayor robustez a los resultados obtenidos al estar correlacionados con los resultados descritos en los ensayos biomecánicos.

OBJETIVO 4: EVALUAR LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS Y REALIZAR UN ENSAYO DE BIOCOMPATIBILIDAD

Como ya se ha descrito previamente,¹⁶³ ha resultado posible aislar y cultivar células a partir de velos valvulares. Los resultados de la digestión enzimática con colagenasa evidenciaron altos rendimientos de obtención celular por miligramo de tejido. Además se pudo demostrar que la población aislada fue capaz de adherirse, crecer y proliferar en superficies plásticas, constituyendo un origen celular óptimo para la realización de los ensayos de citotoxicidad y biocompatibilidad.

Ha resultado fundamental la implementación de ensayos de citotoxicidad y biocompatibilidad en el presente estudio. Aunque se hubiesen obtenido tejidos perfectamente descelularizados y todos los ensayos de caracterización anteriormente realizados hayan resultado exitosos, no se puede determinar que un protocolo de descelularización se pueda aplicar en otros trabajos si no se ha demostrado que los posibles residuos remanentes en la estructura no resultan tóxicos en la futura recolonización del tejido, ya sea autóloga o heteróloga.

*Stapleton y col.*¹⁶¹ definieron la realización de ensayos de citotoxicidad por contacto o desarrollando pruebas sobre los líquidos de lavados obtenidos tras las descelularizaciones realizadas. En el presente trabajo se han llevado a cabo las dos opciones, el ensayo de citotoxicidad de los lavados de descelularización y por contacto directo con el tejido, también denominado ensayo de biocompatibilidad.^{87,91,117,128,178}

En el ensayo de citotoxicidad se obtuvieron resultados similares a los descritos con anterioridad,^{156,178} donde se consiguió una muerte celular del 100% con el DMSO como control negativo. La tinción Life/Dead mostró un 100% de viabilidad en las células que habían estado en contacto solamente con el medio de cultivo, representando el control positivo.¹⁵⁶

Los resultados para las soluciones obtenidas de los lavados de los tejidos descelularizados con el Protocolo A/B y con el Protocolo B/A, mostraron indicios de una leve toxicidad para el Protocolo B/A respecto al control positivo, sin embargo el Protocolo A/B se mostró completamente inocuo.

Para la realización del ensayo de biocompatibilidad, un primer paso fue la fijación del tejido a una superficie plástica para poder ponerlo en contacto con el componente celular. En otros trabajos previos, el biomaterial utilizado en la realización de esta fijación fue el colágeno y pegamentos comerciales.^{117,128} Debido a la experiencia de nuestro grupo de investigación con la manipulación de fibrina, se consideró su utilización como adhesivo. Además, al ser fibrina obtenida directamente de un modelo experimental ovino, se evitaron posibles interferencias con el componente celular utilizado.

La siembra celular sobre el tejido fijado al pocillo se realizó a concentraciones similares descritas para diferentes ensayos de biocompatibilidad.^{91,178} Tras un periodo de evolución de 45 días, se pudo demostrar que ambas matrices, tanto las descelularizadas con el Protocolo A/B como las descelularizadas con el Protocolo B/A, mostraron ser biocompatibles al encontrarse células viables

dentro de la estructura previamente descelularizada. Este hecho confiere validez al uso de estas matrices en un modelo experimental in vivo, puesto que constituyen unas estructuras biocompatibles donde las células originarias del propio tejido son capaces de adherirse, crecer y proliferar, recolonizando las fibras proteicas remanentes.

Los resultados nos muestran que ambos protocolos, tanto el Protocolo A/B como el Protocolo B/A, son idóneos para su uso en el área de ingeniería tisular y han mostrado ser eficientes en la creación de matrices acelulares a partir de válvulas cardíacas ovinas.

Si se tuviese que determinar cuál de los dos protocolos estaría más indicado para su prueba in vivo en un modelo experimental ovino, se podría considerar que el Protocolo A/B sería el más apto. Aunque se ha demostrado que dicho protocolo produce efectos deletéreos sobre el músculo de la raíz valvular, realmente es una zona que no se utiliza en el implante ortotópico y ha sido el protocolo que mejores resultados obtuvo con las pruebas de citotoxicidad, aunque la recolonización fue posible en ambos protocolos, el Protocolo A/B ha resultado ser el protocolo de elección en futuros trabajos.



VII-

Conclusiones

1. De las 9 posibles combinaciones entre choques osmóticos y choques de pH, se comprobó que los dos protocolos más eficaces, tanto en la disminución del componente celular como en el mantenimiento de la estructura tridimensional característica para cada tejido (Velo, Arteria y Músculo), fueron el Protocolo A/B (Ácido/Base) y el Protocolo B/A (Base/Ácido).
2. Tras 7 horas de incubación con el Tratamiento enzimático 3 (alta concentración de enzima), se eliminó un alto porcentaje de dsDNA en las 3 zonas de estudio (Velo, Arteria y Músculo) en ambos protocolos de descelularización.
3. En ninguno de los dos protocolos evaluados se detectaron residuos o actividad relacionada con la presencia de células viables. En todos los casos analizados, se conservaron las propiedades bioquímicas y biomecánicas, excepto en el Músculo descelularizado con el Protocolo A/B donde una pérdida de colágeno implicó una disminución significativa en la rigidez y la elasticidad.
4. Ambos protocolos mostraron ser biocompatibles en el Velo tras su previa recelularización con una población aislada del mismo origen tisular. Se detectó un bajo nivel de citotoxicidad asociado a la aplicación de lavados procedentes del Protocolo B/A en células en cultivo.
5. Se ha demostrado que la combinación de choques osmóticos y de pH es efectiva en la descelularización de válvulas cardíacas ovinas, preservando la estructura tisular y eliminando el componente celular sin generar residuos tóxicos.



VIII-

Perspectivas futuras

El esfuerzo y el trabajo invertidos en la presente tesis doctoral se han visto recompensados con la oportunidad de poder continuar la línea de investigación por dos vertientes bien diferenciadas:

1. El implante de la válvula cardíaca descelularizada en un modelo experimental ovino adulto.
2. La prueba y validación del protocolo de descelularización en otros tejidos que puedan resultar de interés en otros ámbitos clínicos como la traumatología o la oftalmología.

1- MODELO EXPERIMENTAL OVINO

En colaboración con el Servicio de Cirugía Cardíaca del Complejo Asistencial Universitario de León (CAULE) y el Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Facultad de Veterinaria de León y, gracias a la financiación obtenida a través de la ayuda concedida por la Gerencia Regional de Salud de Castilla y León, se ha podido evaluar la funcionalidad *in vivo* de las válvulas cardíacas descelularizadas.

El objetivo de este proyecto fue el desarrollo de una bioprótesis valvular acelular y la valoración de su respuesta antigénica *in vivo* en un modelo experimental ovino.

Se seleccionó el Protocolo A/B de descelularización y se aplicó sobre una válvula cardíaca adulta ovina. Al presentar un menor contenido celular, se pudo modular el protocolo y reducir los tiempos de tratamiento para mejorar los resultados.

Una vez verificada la reproducibilidad y eficiencia del protocolo de descelularización, se propuso el implante en posición ortotópica durante un periodo de evolución de 6 meses.

Los resultados previos han mostrado que las válvulas cardíacas acelulares implantadas son funcionales y no producen reacción antigénica. En el estudio post mortem, se evidenció una recolonización de la válvula descelularizada con células procedentes del propio receptor, confirmando las cualidades de biocompatibilidad descritas in vitro.

2- APLICACIÓN EN OTRAS ÁREAS DE INTERÉS

En muestras de tendón, córnea y conjuntiva, se aplicaron los protocolos de descelularización y las técnicas de caracterización descritas en el presente trabajo.

Los resultados mostraron una efectividad similar a la observada en válvulas para los Protocolos A/B y B/A. Se consiguió una eliminación de todo el componente celular y ácidos nucleicos dentro de las estructuras tisulares. En los ensayos de caracterización bioquímicos y biomecánicos se mostró la conservación en cuanto a la composición y funcionalidad. Además las células propias de cada tejido fueron capaces de adherirse a la matriz descelularizada en los ensayos de biocompatibilidad llevados a cabo.

Tras estos estudios, se confirió robustez a la hipótesis basada en una combinación de choques de pH y choques osmóticos es potencialmente descelularizante en tejidos sin generar residuos tóxicos. Además el protocolo descrito puede ser modulado dependiendo del grado de laxitud de los tejidos, acortando tiempos de acción para tejidos más laxos y ampliando tiempos en tejidos más densos.

3- PERSPECTIVAS FUTURAS

En el área de Cirugía Cardíaca, se propone dar un paso más e intentar recelularizar las válvulas acelulares obtenidas. El objetivo sería comprobar si la introducción de un componente celular mejora los resultados obtenidos para las válvulas cardíacas descelularizadas, y así poder determinar cuál sería la válvula ideal antes de plantearse la realización de un ensayo clínico en humano.

La potencialidad de los protocolos, demostrada en otros tejidos, demuestra que se pueden desarrollar más modelos experimentales, al menos en traumatología y oftalmología, para continuar la evaluación de las propiedades in vivo de las estructuras acelulares, como paso previo a su aplicación en clínica humana.



IX-

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Abbadi A, El-Khoury JM, Wang S. Stability of serum and plasma osmolality in common clinical laboratory storage conditions. *Clin Biochem.* 2014;47(7-8):686–7.
- 2- Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K, Duran CM. The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovasc Surg.* 1996;4(4):543–9.
- 3- Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel J-B. Cell-free arterial grafts: Morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg.* 1994;19(3):446–456.
- 4- Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N₂ gas. *Mol Vis.* 2008;14:878–82.
- 5- Anilkumar TV, Vineetha VP, Revi D, Muhamed J, Rajan A. Biomaterial properties of cholecyst-derived scaffold recovered by a non-detergent/enzymatic method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014. doi:10.1002/jbm.b.33131.
- 6- Ashrafian H, Harling L, Athanasiou T. Leonardo da Vinci and the first portrayal of quadricuspid semilunar valves and the nodules of Arantius. *Int J Cardiol.* 2013;165(3):560–1.
- 7- Assmann A, Delfs C, Munakata H, et al. Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials.* 2013;34(25):6015–26.

- 8- Assmann A, Zwirnmann K, Heidelberg F, et al. The degeneration of biological cardiovascular prostheses under pro-calcific metabolic conditions in a small animal model. *Biomaterials*. 2014. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.05.034.
- 9- Bader A, Schilling T, Teebken OE, et al. Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998;14(3):279–84.
- 10- Baraki H, Tudorache I, Braun M, et al. Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials*. 2009;30(31):6240–6.
- 11- Barrera-Ramirez J, McGinn R, Carter MR, Franco-Lopez H, Kenny GP. Osmoreceptors do not exhibit a sex-dependent modulation of forearm skin blood flow and sweating. *Physiol Rep*. 2014;2(2):e00226.
- 12- Bastian F, Stelzmüller M-E, Kratochwill K, Kasimir M-T, Simon P, Weigel G. IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue. *Biomaterials*. 2008;29(12):1824–32.
- 13- Berridge BR, Van Vleet JF, Herman E. Cardiac, Vascular and Skeletal Muscle Systems. En *Handbook of Toxicologic Pathology*. 3ª edición. Elsevier; 2013:1567-1665.
- 14- Bertanha M, Moroz A, Jaldin RG, et al. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. *Exp Cell Res*. 2014. doi:10.1016/j.yexcr.2014.05.023.

- 15- Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, et al. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO Project (Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur). *Ann Thorac Surg.* 2003;75(4):1274–82.
- 16- Billiar KL, Sacks MS. Biaxial mechanical properties of the natural and glutaraldehyde treated aortic valve cusp--Part I: Experimental results. *J Biomech Eng.* 2000;122(1):23–30.
- 17- Böer U, Lohrenz A, Klingenberg M, Pich A, Haverich A, Wilhelmi M. The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts. *Biomaterials.* 2011;32(36):9730–7.
- 18- Breuer CK, Mettler BA, Anthony T, Sales VL, Schoen FJ, Mayer JE. Application of tissue-engineering principles toward the development of a semilunar heart valve substitute. 2004 Nov-Dec;10(11-12):1725-36
- 19- Brody S, Pandit A. Approaches to heart valve tissue engineering scaffold design. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;83(1):16–43.
- 20- Butcher JT, Mahler GJ, Hockaday LA. Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(4-5):242–68.
- 21- Caamaño S, Shiori A, Strauss SH, Orton EC. Does sodium dodecyl sulfate wash out of detergent-treated bovine pericardium at cytotoxic concentrations? *J Heart Valve Dis.* 2009;18(1):101–5.
- 22- Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet.* 2009;373(9667):956–66.

- 23- Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, et al. Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation*. 2002;106(12 Suppl 1):I63–I68.
- 24- Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I132–7.
- 25- Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, et al. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*. 2010;34(3):206–10.
- 26- Chan LKY, Leung VYL, Tam V, Lu WW, Sze KY, Cheung KMC. Decellularized bovine intervertebral disc as a natural scaffold for xenogenic cell studies. *Acta Biomater*. 2013;9(2):5262–72.
- 27- Chen C-W, Corselli M, Péault B, Huard J. Human blood-vessel-derived stem cells for tissue repair and regeneration. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:597439.
- 28- Chevront SN, Kenefick RW, Heavens KR, Spitz MG. A Comparison of Whole Blood and Plasma Osmolality and Osmolarity. *J Clin Lab Anal*. 2014. doi:10.1002/jcla.21695.
- 29- Choi JS, Williams JK, Greven M, et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials*. 2010;31(26):6738–45.
- 30- Cicha I, Rüffer A, Cesnjevar R, et al. Early obstruction of decellularized xenogenic valves in pediatric patients: involvement of inflammatory and fibroproliferative processes. *Cardiovasc Pathol*. 2011;20(4):222–31.

- 31- Clark RK. Anatomy and Physiology of the cardiovascular system. En Anatomy and Physiology: Understanding the human body. 1ª Edición. Jones & Bartlett Learning; 2005:35-51.
- 32- Converse GL, Armstrong M, Quinn RW, et al. Effects of cryopreservation, decellularization and novel extracellular matrix conditioning on the quasi-static and time-dependent properties of the pulmonary valve leaflet. *Acta Biomater.* 2012;8(7):2722-9.
- 33- Costa FDA, Dohmen PM, Duarte D, et al. Immunological and echocardiographic evaluation of decellularized versus cryopreserved allografts during the Ross operation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;27(4):572-8.
- 34- Costa FDA, Pereira EWL, Barboza LE, et al. Ten-year experience with the Ross operation. *Arq Bras Cardiol.* 2006;87(5):583-91.
- 35- Costa FDA, Dohmen P, Vieira E, et al. Ross Operation with decellularized pulmonary allografts: medium-term results. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2007;22(4):454-62.
- 36- Costa FDA, Takkenberg JJM, Fornazari D, et al. Long-term results of the Ross operation: an 18-year single institutional experience. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014. doi:10.1093/ejcts/ezu013.
- 37- Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, McComb D, Lee JM, Wilson GJ. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J Biomed Mater Res.* 1994;28(6):655-66.
- 38- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233-3243.

- 39- Csöngé L, Bravo D, Newman-Gage H, et al. Banking of osteochondral allografts. Part I. Viability assays adapted for osteochondrol and cartilage studies. *Cell Tissue Bank*. 2002;3(3):151–9.
- 40- David Merryman W. Mechano-potential etiologies of aortic valve disease. *J Biomech*. 2010;43(1):87–92.
- 41- de la Fuente Cid R, Hermida Ameijeiras A, Pazo Núñez M, Lado Lado F. [Epidemiology of heart failure. Ratio of epidemic]. *An Med Interna*. 2007;24(10):500–4.
- 42- Dijkman PE, Driessen-Mol A, Frese L, Hoerstrup SP, Baaijens FPT. Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. *Biomaterials*. 2012;33(18):4545–54.
- 43- Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H, Kivelitz D, Konertz WF. Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg*. 2002;74(5):1438–42.
- 44- Dohmen PM, da Costa FDA, Yoshi S, et al. Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding? *J Heart Valve Dis*. 2006;15(6):823–9.
- 45- Dohmen PM, Hauptmann S, Terytze A, Konertz WF. In-vivo repopularization of a tissue-engineered heart valve in a human subject. *J Heart Valve Dis*. 2007;16(4):447–9.
- 46- Dong J, Li Y, Mo X. The study of a new detergent (octyl-glucopyranoside) for decellularizing porcine pericardium as tissue engineering scaffold. *J Surg Res*. 2013;183(1):56–67.

- 47- Dunne LW, Huang Z, Meng W, et al. Human decellularized adipose tissue scaffold as a model for breast cancer cell growth and drug treatments. *Biomaterials*. 2014;35(18):4940–9.
- 48- Durbin AD, Gotlieb AI. Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovasc Pathol*. 2002;11(2):69–77.
- 49- Edsel A. Pena and Elizabeth H. Slate. 2010. gvlma: Global Validation of Linear Models Assumptions. R package version 1.0.0.1. <http://CRAN.R-project.org/package=gvlma>
- 50- El-Hamamsy I, Poirier NC. What is the role of the Ross procedure in today's armamentarium? *Can J Cardiol*. 2013;29(12):1569–76.
- 51- Elkins RC, Dawson PE, Goldstein S, Walsh SP, Black KS. Decellularized human valve allografts. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(5 Suppl):S428–32.
- 52- Faulk DM, Carruthers CA, Warner HJ, et al. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater*. 2014;10(1):183–93.
- 53- Faulk DM, Wildemann JD, Badylak SF. Decellularization and Cell Seeding of Whole Liver Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix. *J Clin Exp Hepatol*. 2014. doi:10.1016/j.jceh.2014.03.043.
- 54- Ferrari G, Sainger R, Beckmann E, et al. Validation of plasma biomarkers in degenerative calcific aortic stenosis. *J Surg Res*. 2010;163(1):12–7.
- 55- Flanagan TC, Pandit A. Living artificial heart valve alternatives: a review. *Eur Cell Mater*. 2003;6:28–45; discussion 45.

- 56- Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(12):2353–2361.
- 57- Friedrich LH, Jungebluth P, Sjöqvist S, et al. Preservation of aortic root architecture and properties using a detergent-enzymatic perfusion protocol. *Biomaterials*. 2014;35(6):1907–13.
- 58- Funamoto S, Nam K, Kimura T, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials*. 2010;31(13):3590–5.
- 59- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675–83.
- 60- Gilbert TW, Wognum S, Joyce EM, Freytes DO, Sacks MS, Badylak SF. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix. *Biomaterials*. 2008;29(36):4775–82.
- 61- Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in biologic scaffold materials. *J Surg Res*. 2009;152(1):135–9.
- 62- Gilpin SE, Guyette JP, Ren X, et al. Up-Scaling Decellularization and Whole Organ Culture for Human Lung Regeneration. *J Hear Lung Transplant*. 2013;32(4):S69–S70.
- 63- Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke H-D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *J Immunol Methods*. 2001;252(1-2):131–138.

- 64- Goh S-K, Bertera S, Olsen P, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013;34(28):6760–72.
- 65- Gonçalves AC, Griffiths LG, Anthony R V, Orton EC. Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(2):212–7.
- 66- Grauss RW, Hazekamp M, van Vliet S, Gittenberger-de Groot A, DeRuiter M. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126(6):2003–2010.
- 67- Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(4):566–71.
- 68- Gross L, Kugel MA. Topographic anatomy and histology of the valves in the human heart. *Am J Path*. 1931;7:445-456.
- 69- Hamirani YS, Dietl CA, Voyles W, Peralta M, Begay D, Raizada V. Acute aortic regurgitation. *Circulation*. 2012;126(9):1121–6.
- 70- Haykal S, Zhou Y, Marcus P, et al. The effect of decellularization of tracheal allografts on leukocyte infiltration and of recellularization on regulatory T cell recruitment. *Biomaterials*. 2013;34(23):5821–32.
- 71- Hofmann AD, Hilfiker A, Haverich A, Andree B, Kuebler J, Ure B. BioVaM in the Rat Model: A New Approach of Vascularized 3D Tissue for Esophageal Replacement. *Eur J Pediatr Surg*. 2014. doi:10.1055/s-0034-1370778.

- 72- Hopkins RA. From cadaver harvested homograft valves to tissue-engineered valve conduits. *Prog Pediatr Cardiol.* 2006;21(2):137–152.
- 73- Hopkins RA. State of the art and science for clinical translation of regenerative cardiac surgery. *Prog Pediatr Cardiol.* 2013;35(2):79–85.
- 74- Hose DR, Narracott AJ, Penrose JMT, Baguley D, Jones IP, Lawford P V. Fundamental mechanics of aortic heart valve closure. *J Biomech.* 2006;39(5):958–67.
- 75- Huang S-D, Liu X-H, Bai C-G, et al. Synergistic effect of fibronectin and hepatocyte growth factor on stable cell-matrix adhesion, re-endothelialization, and reconstitution in developing tissue-engineered heart valves. *Heart Vessels.* 2007;22(2):116–22.
- 76- Hung S-H, Su C-H, Lee F-P, Tseng H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J Voice.* 2013;27(3):289–94.
- 77- Iop L, Renier V, Naso F, et al. The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. *Biomaterials.* 2009;30(25):4104–16.
- 78- Iwai S, Torikai K, Coppin CM, Sawa Y. Minimally immunogenic decellularized porcine valve provides in situ recellularization as a stentless bioprosthetic valve. *J Artif Organs.* 2007;10(1):29–35.
- 79- Jana S, Tefft BJ, Spoon DB, Simari RD. Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. *Acta Biomater.* 2014;10(7):2877–2893.
- 80- Jian B, Narula N, Li Q, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes

aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(2):457–65; discussion 465–6.

81- Jiang W-C, Cheng Y-H, Yen M-H, Chang Y, Yang VW, Lee OK. Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. *Biomaterials.* 2014;35(11):3607–17.

82- John Fox and Sanford Weisberg. 2011. An {R} Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>

83- Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, et al. Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131(4):843–52.

84- Kajbafzadeh A-M, Masoumi A, Hosseini M, Borjian MA, Akbarzadeh A, Mohseni MJ. Sheep colon acellular matrix: Immunohistologic, biomechanical, scanning electron microscopic evaluation and collagen quantification. *J Biosci Bioeng.* 2014;117(2):236–41.

85- Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2006;15(2):278–86; discussion 286.

86- Kawashima T, Sasaki H. Gross anatomy of the human cardiac conduction system with comparative morphological and developmental implications for human application. *Ann Anat.* 2011;193(1):1–12.

87- Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials.* 2012;33(6):1771–81.

88- Keane TJ, Londono R, Carey RM, et al. Preparation and characterization of a biologic scaffold from esophageal mucosa. *Biomaterials*. 2013;34(28):6729–37.

89- Khan SS, Trento A, DeRobertis M, et al. Twenty-year comparison of tissue and mechanical valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122(2):257–69.

90- Kim GB, Lim H-G, Kim YJ, Choi EY, Kwon BS, Jeong S. Novel self-expandable, stent-based transcatheter pulmonic valve: a preclinical animal study. *Int J Cardiol*. 2014;173(1):74–9.

91- Knight RL, Booth C, Wilcox HE, Fisher J, Ingham E. Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(6):806–13.

92- Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Ingham E, Fisher J. In-vitro assessment of the functional performance of the decellularized intact porcine aortic root. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(3):408–21; discussion 422.

93- Lai W, Li Y, Mak S, et al. Reconstitution of bone-like matrix in osteogenically differentiated mesenchymal stem cell-collagen constructs: A three-dimensional in vitro model to study hematopoietic stem cell niche. *J Tissue Eng*. 2013;4:2041731413508668.

94- Lehr EJ, Rayat GR, Desai LS, Coe JY, Korbitt GS, Ross DB. Inbred or outbred? An evaluation of the functional allogenicity of farm sheep used in cardiac valve studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132(5):1156–61.

- 95- Lehr EJ, Hermary S, McKay RT, et al. NMR assessment of Me₂SO in decellularized cryopreserved aortic valve conduits. *J Surg Res.* 2007;141(1):60–7.
- 96- Li C, Xu S, Gotlieb AI. The progression of calcific aortic valve disease through injury, cell dysfunction, and disruptive biologic and physical force feedback loops. *Cardiovasc Pathol.* 2013;22(1):1–8.
- 97- Liao J, Joyce EM, Sacks MS. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. *Biomaterials.* 2008;29(8):1065–74.
- 98- Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, et al. In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials.* 2006;27(23):4221–9.
- 99- Linefsky JP, Otto CM. Aortic valve disease. *Medicine (Baltimore).* 2010;38(10):541–544.
- 100- Lü W-D, Zhang M, Wu Z-S, Hu T-H. Decellularized and photooxidatively crosslinked bovine jugular veins as potential tissue engineering scaffolds. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2009;8(3):301–5.
- 101- Luo J-C, Chen W, Chen X-H, et al. A multi-step method for preparation of porcine small intestinal submucosa (SIS). *Biomaterials.* 2011;32(3):706–13.
- 102- Luo J-C, Korossis SA, Wilshaw S-PP, Jennings LM, Fisher J, Ingham E. Development and characterization of acellular porcine pulmonary valve scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2014. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0573.

103- Ma R, Li M, Luo J, et al. Structural integrity, ECM components and immunogenicity of decellularized laryngeal scaffold with preserved cartilage. *Biomaterials*. 2013;34(7):1790–8.

104- Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*. 2008;372(9655):2023–30.

105- Maghsoudlou P, Georgiades F, Tyraskis A, et al. Preservation of micro-architecture and angiogenic potential in a pulmonary acellular matrix obtained using intermittent intra-tracheal flow of detergent enzymatic treatment. *Biomaterials*. 2013;34(28):6638–48.

106- Mahadevan V. Anatomy of the heart. *Surg*. 2012;30(1):5–8.

107- Mallis P, Gontika I, Poulougiannopoulos T, et al. Human umbilical cord arteries as potential arterial grafts: a proteomic validation of decellularization protocols. *Cytotherapy*. 2014;16(4):S38–S39.

108- Marron K, Yacoub MH, Polak JM, et al. Innervation of human atrioventricular and arterial valves. *Circulation*. 1996;94(3):368–75.

109- Mathapati S, Bishi DK, Guhathakurta S, et al. Biomimetic acellular detoxified glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(3):1561–72.

110- Mathieu P, Voisine P, Pépin A, Shetty R, Savard N, Dagenais F. Calcification of human valve interstitial cells is dependent on alkaline phosphatase activity. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(3):353–7.

111- Matsushima R, Nam K, Shimatsu Y, Kimura T, Fujisato T, Kishida A. Decellularized dermis-polymer complex provides a platform for soft-to-hard tissue interfaces. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;35:354–62.

- 112- Maxfield MW, Cleary MA, Breuer CK. Tissue-Engineering Heart Valves. En Principles of Tissue Engineering. 4ª Edición. Elsevier; 2014:813–833.
- 113- Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. Ann Biomed Eng. 2006;34(12):1799–819.
- 114- Mendoza-Novelo B, Avila EE, Cauich-Rodríguez J V, et al. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. Acta Biomater. 2011;7(3):1241–8.
- 115- Meyer SR, Nagendran J, Desai LS, et al. Decellularization reduces the immune response to aortic valve allografts in the rat. J Thorac Cardiovasc Surg. 2005;130(2):469–76.
- 116- Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JRT, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. J Biomed Mater Res A. 2006;79(2):254–62.
- 117- Mirsadraee S, Wilcox HE, Watterson KG, et al. Biocompatibility of acellular human pericardium. J Surg Res. 2007;143(2):407–14.
- 118- Mohammadi H, Mequanint K. Prosthetic aortic heart valves: modeling and design. Med Eng Phys. 2011;33(2):131–47.
- 119- Moharamzadeh K, Brook IM, Scutt AM, Thornhill MH, Van Noort R. Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model. J Dent. 2008;36(5):331–6.

120- Murtada S-I, Holzapfel GA. Investigating the role of smooth muscle cells in large elastic arteries: A finite element analysis. *J Theor Biol.* 2014;358C:1–10. doi:10.1016/j.jtbi.2014.04.028.

121- Narine K, Ing EC, Cornelissen M, et al. Readily available porcine aortic valve matrices for use in tissue valve engineering. Is cryopreservation an option? *Cryobiology.* 2006;53(2):169–81.

122- Naso F, Gandaglia A, Formato M, et al. Differential distribution of structural components and hydration in aortic and pulmonary heart valve conduits: Impact of detergent-based cell removal. *Acta Biomater.* 2010;6(12):4675–88.

123- Naso F, Gandaglia A, Iop L, Spina M, Gerosa G. First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Biomater.* 2011;7(4):1728–34.

124- Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. Burden of valvular heart diseases: a population-based study. *Lancet.* 2006;368(9540):1005–11.

125- Nonaka PN, Uriarte JJ, Campillo N, et al. Mechanical properties of mouse lungs along organ decellularization by sodium dodecyl sulfate. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014. doi:10.1016/j.resp.2014.04.008.

126- Numata S, Fujisato T, Niwaya K, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Kitamura S. Immunological and histological evaluation of decellularized allograft in a pig model: comparison with cryopreserved allograft. *J Heart Valve Dis.* 2004;13(6):984–90.

127- Orabi H, AbouShwareb T, Zhang Y, Yoo JJ, Atala A. Cell-seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: a preclinical study. *Eur Urol.* 2013;63(3):531–8.

128- Oswal D, Korossis S, Mirsadraee S, et al. Biomechanical characterization of decellularized and cross-linked bovine pericardium. *J Heart Valve Dis.* 2007;16(2):165–74.

129- Ota T, Sawa Y, Iwai S, et al. Fibronectin-hepatocyte growth factor enhances reendothelialization in tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(5):1794–801.

130- Ota T, Taketani S, Iwai S, et al. Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation. *Ann Thorac Surg.* 2007;83(4):1501–7.

131- Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.* 2008;14(2):213–21.

132- Pan MX, Hu PY, Cheng Y, et al. An efficient method for decellularization of the rat liver. *J Formos Med Assoc.* 2013. doi:10.1016/j.jfma.2013.05.003.

133- Pang K, Du L, Wu X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials.* 2010;31(28):7257–65.

134- Park KM, Woo HM. Systemic decellularization for multi-organ scaffolds in rats. *Transplant Proc.* 2012;44(4):1151–4.

135- Partington L, Mordan NJ, Mason C, et al. Biochemical changes caused by decellularization may compromise mechanical integrity of tracheal scaffolds. *Acta Biomater.* 2013;9(2):5251–61.

136- Ponce Márquez S, Martínez VS, McIntosh Ambrose W, et al. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2009;5(6):1839–47.

137- Prodrómo J, D'Ancona G, Amaducci A, Pilato M. Aortic valve repair for aortic insufficiency: a review. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2012;26(5):923–32.

138- Qu J, Van Hogezaand RM, Zhao C, Kuo BJ, Carlsen BT. Decellularization of a Fasciocutaneous Flap for Use as a Perfusable Scaffold. *Ann Plast Surg.* 2014. doi:10.1097/SAP.000000000000157.

139- Reing JE, Brown BN, Daly KA, et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials.* 2010;31(33):8626–33.

140- Rieder E, Kasimir M-T, Silberhumer G, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(2):399–405.

141- Rieder E, Seebacher G, Kasimir M-T, et al. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation.* 2005;111(21):2792–7.

142- Rieder E, Nigisch A, Dekan B, et al. Granulocyte-based immune response against decellularized or glutaraldehyde cross-linked vascular tissue. *Biomaterials.* 2006;27(33):5634–42.

- 143- Robertson MJ, Dries-Devlin JL, Kren SM, Burchfield JS, Taylor DA. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PLoS One*. 2014;9(2):e90406.
- 144- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(4):e18–e209.
- 145- Rouvière H, Delmas A, Delmas V. Corazón y vasos del tronco. En: *Anatomía humana: Descriptiva, topográfica y funcional*. 11a Edición. Elsevier España; 2005:192–181.
- 146- Sajesh KM, Jayakumar R, Nair S V, Chennazhi KP. Biocompatible conducting chitosan/polypyrrole-alginate composite scaffold for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2013;62:465–71.
- 147- Samouillan V, Dandurand-Lods J, Lamure A, et al. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprostheses. *J Biomed Mater Res*. 1999;46(4):531–8.
- 148- Sarathchandra P, Smolenski RT, Yuen AHY, et al. Impact of γ -irradiation on extracellular matrix of porcine pulmonary valves. *J Surg Res*. 2012;176(2):376–85.
- 149- Sayk F, Bos I, Schubert U, Wedel T, Sievers H-H. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: an autopsy study. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(5):1755–8.
- 150- Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, et al. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study. *Cardiovasc Res*. 2003;60(3):497–509.

151- Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol.* 2003;143(3):201–208.

152- Schenke-Layland K, Riemann I, Opitz F, König K, Halbhuber KJ, Stock UA. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol.* 2004;23(2):113–25.

153- Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(3):1072–80.

154- Schoen FJ. Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering. *Circulation.* 2008;118(18):1864–80.

155- Scott M, Vesely I. Aortic valve cusp microstructure: the role of elastin. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(2 Suppl):S391–4.

156- Shao Y, Yu Y, Pei C-G, et al. Evaluation of novel decellularizing corneal stroma for cornea tissue engineering applications. *Int J Ophthalmol.* 2012;5(4):415–8.

157- Shoja MM, Agutter PS, Loukas M, et al. Leonardo da Vinci's studies of the heart. *Int J Cardiol.* 2013;167(4):1126–33.

158- Simionescu DT, Lovekamp JJ, Vyavahare NR. Degeneration of bioprosthetic heart valve cusp and wall tissues is initiated during tissue preparation: an ultrastructural study. *J Heart Valve Dis.* 2003;12(2):226–34.

159- Simon P, Kasimir M-T, Rieder E, Weigel G. Tissue Engineering of heart valves—Immunologic and inflammatory challenges of the allograft scaffold. *Prog Pediatr Cardiol.* 2006;21(2):161–165.

160- Somers P, Knaapen M, Mistiaen W. Histopathology of calcific aortic valve stenosis. *Acta Cardiol.* 2006;61(5):557–62.

161- Stapleton TW, Ingram J, Katta J, et al. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(4):505–18.

162- Steinhoff G, Stock U, Karim N, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III50–5.

163- Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH. The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(2):113–118.

164- Torsten Hothorn, Frank Bretz and Peter Westfall. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal.* 2008;50(3), 346-363.

165- Tse JR, Long JL. Microstructure characterization of a decellularized vocal fold scaffold for laryngeal tissue engineering. *Laryngoscope.* 2014. doi:10.1002/lary.24605.

166- Tsuchiya T, Balestrini JL, Mendez JJ, Calle EA, Zhao L, Niklason L. Influence of pH on Extracellular Matrix Preservation During Lung Decellularization. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014. doi:10.1089/ten.TEC.2013.0492.

167- Tuan-Mu H-Y, Yu C-H, Hu J-J. On the decellularization of fresh or frozen human umbilical arteries: implications for small-diameter tissue engineered vascular grafts. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(6):1305–18.

168- Tudorache I, Cebotari S, Sturz G, et al. Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2007;16(5):567–73; discussion 574.

169- Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, et al. Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A.* 2003;67(3):834–7.

170- Wagner DE, Bonenfant NR, Sokocevic D, et al. Three-dimensional scaffolds of acellular human and porcine lungs for high throughput studies of lung disease and regeneration. *Biomaterials.* 2014;35(9):2664–79.

171- Wagner DE, Bonenfant NR, Parsons CS, et al. Comparative decellularization and recellularization of normal versus emphysematous human lungs. *Biomaterials.* 2014;35(10):3281–97.

172- Walles T, Lichtenberg A, Puschmann C, et al. In vivo model for cross-species porcine endogenous retrovirus transmission using tissue engineered pulmonary arteries. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;24(3):358–63.

173- Wang L, Johnson JA, Zhang Q, Beahm EK. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomater.* 2013;9(11):8921–31.

174- Wang L, Johnson JA, Chang DW, Zhang Q. Decellularized musculo-fascial extracellular matrix for tissue engineering. *Biomaterials.* 2013;34(11):2641–54.

175- Wang S, Oldenhof H, Dai X, et al. Protein stability in stored decellularized heart valve scaffolds and diffusion kinetics of protective molecules. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1844(2):430–8.

176- Westcott EB, Segal SS. Perivascular innervation: a multiplicity of roles in vasomotor control and myoendothelial signaling. *Microcirculation*. 2013;20(3):217–38.

177- Whitaker RH. Anatomy of the heart. *Medicine (Baltimore)*. 2010;38(7):333–335.

178- Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, et al. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis*. 2005;14(2):228–36; discussion 236–7.

179- Wilson GJ, Courtman DW, Klement P, Lee JM, Yeger H. Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(2 Suppl):S353–8.

180- Witzenburg C, Raghupathy R, Kren SM, Taylor DA, Barocas VH. Mechanical changes in the rat right ventricle with decellularization. *J Biomech*. 2012;45(5):842–9.

181- Xing Q, Yates K, Tahtinen M, Shearier E, Qian Z, Zhao F. Decellularization of Fibroblast Cell Sheets for Natural Extracellular Matrix Scaffold Preparation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014. doi:10.1089/ten.TEC.2013.0666.

182- Xing Y, He Z, Warnock JN, Hilbert SL, Yoganathan AP. Effects of constant static pressure on the biological properties of porcine aortic valve leaflets. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(4):555–62. .

183- Xu X-F, Smith S, Urban J, Cui Z. An in line non-invasive optical system to monitor pH in cell and tissue culture. *Med Eng Phys*. 2006;28(5):468–74.

184- Xu X-F, Guo H-P, Ren X-J, et al. Effect of carbodiimide cross-linking of decellularized porcine pulmonary artery valvular leaflets. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(3):649–56.

185- Ye X, Hu X, Wang H, Liu J, Zhao Q. Polyelectrolyte multilayer film on decellularized porcine aortic valve can reduce the adhesion of blood cells without affecting the growth of human circulating progenitor cells. *Acta Biomater*. 2012;8(3):1057–67.

186- Yoshida R, Vavken P, Murray MM. Decellularization of bovine anterior cruciate ligament tissues minimizes immunogenic reactions to alpha-gal epitopes by human peripheral blood mononuclear cells. *Knee*. 2012;19(5):672–5.

187- Young B, Wheater PR, Heath JW. Aparato circulatorio. En: Wheater's *Histología Funcional*. 4a Edición. Elsevier España; 2000:144–157.

188- Zhai W, Chang J, Lin K, Wang J, Zhao Q, Sun X. Crosslinking of decellularized porcine heart valve matrix by procyanidins. *Biomaterials*. 2006;27(19):3684–90.

189- Zhai W, Lü X, Chang J, Zhou Y, Zhang H. Quercetin-crosslinked porcine heart valve matrix: mechanical properties, stability, anticalcification and cytocompatibility. *Acta Biomater*. 2010;6(2):389–95.

190- Zhou J, Fritze O, Schleicher M, et al. Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*. 2010;31(9):2549–54.

191- Zilla P, Brink J, Human P, Bezuidenhout D. Prosthetic heart valves: catering for the few. *Biomaterials*. 2008;29(4):385–406.

192- Zou Y, Zhang Y. Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta. J Surg Res. 2012;175(2):359–68.

X- ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del flujo unidireccional en la circulación pulmonar y sistémica.	31
Figura 2: Estructura general de un vaso sanguíneo.	33
Figura 3: Corte histológico de una arteria.	34
Figura 4: Corazón en diástole visto desde la base con los atrios (aurículas) extirpados.	37
Figura 5: Corte histológico de miocardio.	38
Figura 6: Aspecto macroscópico de un velo de la válvula aorta.	40
Figura 7: Estructura funcional macroscópica de los velos valvulares.	41
Figura 8: Corte histológico de velo valvular.	42
Figura 9: Aspecto de las células VIC con diferentes técnicas de imagen.	45
Figura 10: Supervivencia de los pacientes con estenosis aórtica respecto al tiempo.	47
Figura 11: Muestras de velos calcificados en patologías de estenosis valvular.	49
Figura 12: Ejemplo de válvula mecánica.	52
Figura 13: Diferentes tipos de bioprótesis.	54
Figura 14: Diferentes alternativas, dentro del área de la ingeniería tisular, para su aplicación en válvulas cardíacas.	56
Figura 15: Válvulas cardíacas generadas por ingeniería tisular.	57
Figura 16: Alternativas en el implante de válvulas descelularizadas.	59

Figura 17: Porcentajes de los diferentes protocolos de descelularización utilizados.	64
Figura 18: Etapas de un protocolo de descelularización estándar.	67
Figura 19: Aislamiento de la válvula pulmonar del corazón de cordero	79
Figura 20: Diagrama de los 9 protocolos de descelularización realizados.....	81
Figura 21: Procesamiento de la válvula cardiaca para su análisis histológico.....	84
Figura 22: Diagrama esquemático de la optimización de un protocolo de descelularización.....	91
Figura 23: Esquema explicativo de las diferencias entre el Protocolo A/B y el Protocolo B/A.....	93
Figura 24: Representación esquemática del protocolo puesto a punto para la medida de viabilidad tisular.	96
Figura 25: Realización de los ensayos biomecánicos.	98
Figura 26: Representación esquemática del modelo de biocompatibilidad.....	105
Figura 27: Escala de pH con las variables utilizadas.	112
Figura 28: Representación de los valores de osmolalidad.	113
Figura 29: Comparación histológica del Protocolo N/N respecto al Tejido en Fresco.....	117
Figura 30: Comparación histológica del Protocolo N/A respecto al Tejido en Fresco.....	119
Figura 31: Comparación histológica del Protocolo N/B respecto al Tejido en Fresco.....	121

Figura 32: Comparación histológica del Protocolo A/N respecto al Tejido en Fresco.....	123
Figura 33: Comparación histológica del Protocolo A/A respecto al Tejido en Fresco.....	125
Figura 34: Comparación histológica del Protocolo A/B respecto al Tejido en Fresco.....	127
Figura 35: Comparación histológica del Protocolo B/N respecto al Tejido en Fresco.....	129
Figura 36: Comparación histológica del Protocolo B/A respecto al Tejido en Fresco.....	131
Figura 37: Comparación histológica del Protocolo B/B respecto al Tejido en Fresco.....	133
Figura 38: Comparación de las muestras de Velo en función del Protocolo aplicado.....	136
Figura 39: Comparación de las muestras de Arteria en función del Protocolo aplicado.....	137
Figura 40: Comparación de las muestras de Músculo en Función del Protocolo aplicado.....	138
Figura 41: Representación de la concentración de dsDNA por Tejido y Tiempo.	142
Figura 42: Representación de las medias y EEM de los diferentes Tratamientos enzimáticos realizados en Velo.	143
Figura 43: Representación de las medias y EEM de los diferentes Tratamientos enzimáticos realizados en Arteria.....	144

Figura 44: Representación de las medias y EEM de los diferentes Tratamientos enzimáticos realizados en Músculo.	145
Figura 45: Gráfico q-q normal de la distribución de los residuos estandarizados del modelo.....	147
Figura 46: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Tejido.....	148
Figura 47: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Protocolo de descelularización aplicado.....	149
Figura 48: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Tratamiento enzimático.....	150
Figura 49: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función del Tiempo aplicado para el Tratamiento enzimático.	151
Figura 50: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos en Fresco.	153
Figura 51: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos y Protocolos Previo al Tratamiento enzimático.	154
Figura 52: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos y Protocolos a las 2 horas del Tratamiento.....	156
Figura 53: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en función de los diferentes Tejidos y Protocolos a las 7 horas del Tratamiento.....	158
Figura 54: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Velo según el Protocolo y el Tiempo.	160

Figura 55: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Velo según el Tratamiento enzimático.	161
Figura 56: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Arteria según el Protocolo y el Tiempo.....	163
Figura 57: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Arteria según el Tratamiento enzimático.....	163
Figura 58: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Músculo según el Protocolo y el Tiempo.	165
Figura 59: Representación en cajas y bigotes de la concentración de dsDNA en Músculo según el Tratamiento enzimático.....	165
Figura 60: Resultados histológicos de Velo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo A/B.	168
Figura 61: Resultados histológicos de Velo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo B/A.	169
Figura 62: Resultados histológicos de Arteria en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo A/B.	171
Figura 63: Resultados histológicos de Arteria en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo B/A.	172
Figura 64: Resultados histológicos de Músculo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo A/B.	173
Figura 65: Resultados histológicos de Músculo en los diferentes Tratamientos enzimáticos y a diferentes Tiempos para el Protocolo B/A.	174
Figura 66: Imágenes de SEM para Velo, Arteria y Músculo en Fresco y tras la acción del Protocolo A/B y el Protocolo B/A.....	177

Figura 67: Viabilidad obtenida del ensayo Alamar Blue.....	179
Figura 68: Ejemplo de gráficas obtenidas tras la realización del ensayo uniaxial.	180
Figura 69: Representación en cajas y bigotes de rigidez según el factor Tejido y factor Protocolo.	182
Figura 70: Representación en cajas y bigotes de rigidez según el factor Protocolo para la Arteria y el Músculo.	183
Figura 71: Representación en cajas y bigotes del módulo elástico según el Factor Tejido y el Factor Protocolo.....	185
Figura 72: Representación en cajas y bigotes del módulo elástico según el Protocolo para la Arteria y el Músculo.	186
Figura 73: Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno según el Tejido y el Protocolo.	188
Figura 74: Representación en cajas y bigotes de la concentración de colágeno para Velo, Arteria y Músculo.	189
Figura 75: Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina según el Tejido y el Protocolo.	191
Figura 76: Representación en cajas y bigotes de la concentración de elastina para Velo, Arteria y Músculo.	192
Figura 77: Representación en cajas y bigotes de la concentración de GAG según el Protocolo.	194
Figura 78: Población celular en cultivo aislada de velo valvular.....	196
Figura 79: Resultados del ensayo de citotoxicidad sobre las células de velo.....	197
Figura 80: Resultados del ensayo de biocompatibilidad.	201

XI- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los agentes descelularizantes.....	63
Tabla 2: Relación de tejidos y órganos descelularizados, clasificados por especie en que se ha realizado.....	65
Tabla 3: Combinaciones de las variables de estudio.....	82
Tabla 4: Valoración de la estructura obtenida tras los protocolos de descelularización.....	86
Tabla 5: Concentración de DNAsa I y RNAsa A según el Tratamiento a aplicar.	88
Tabla 6: Descripción de las variables asociadas a cada condición experimental.	88
Tabla 7: Valores de la osmolalidad de las soluciones de descelularización.....	113
Tabla 8: Ensayo ciego sobre los cortes histológicos analizados.	135
Tabla 9: ANOVA para los diferentes factores presentes en el análisis global de los datos.....	147
Tabla 10: ANOVA del factor Tejido a Tiempo 0.....	152
Tabla 11: ANOVA de los factores Tejido y Protocolo a Tiempo Previo.	153
Tabla 12: ANOVA de los factores Tejido y Protocolo a Tiempo 2 horas.	155
Tabla 13: ANOVA de los factores Tejido y Protocolo a Tiempo 7 horas.	157
Tabla 14: ANOVA de los factores Protocolo, Tiempo y Tratamiento en Velo.	159
Tabla 15: ANOVA de los factores Protocolo, Tiempo y Tratamiento en Arteria...	162
Tabla 16: ANOVA de los factores Protocolo, Tiempo y Tratamiento en Músculo.	164

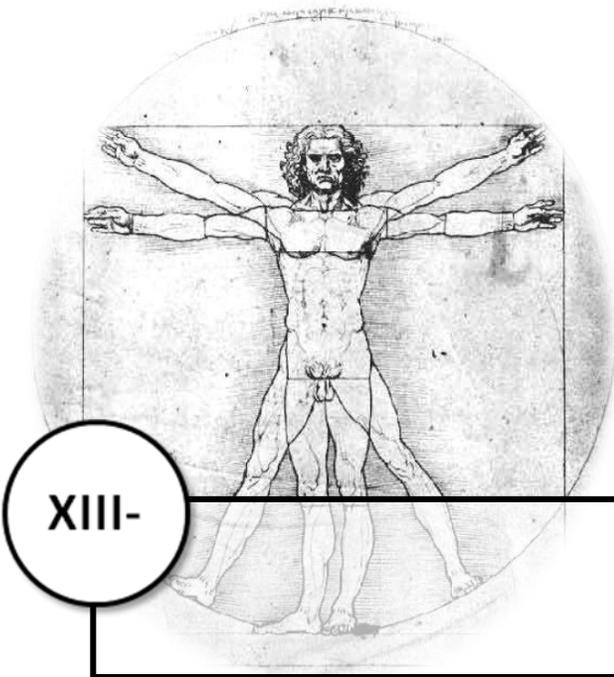
Tabla 17: Porcentaje de reducción de dsDNA, a Tiempo 7 horas para el TTO1, TTO2 y TTO3.....	166
Tabla 18: ANOVA para la rigidez con los factores Tejido y Protocolo.....	181
Tabla 19: ANOVA para el módulo elástico con los factores Tejido y Protocolo...	185
Tabla 20: ANOVA para la concentración de colágeno.....	187
Tabla 21: ANOVA para la concentración de elastina.....	191
Tabla 22: ANOVA para la concentración de GAG.....	193
Tabla 23: ANOVA de los porcentajes de viabilidad celular en el ensayo Life/Dead.	199

XII- ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A/A	pH Ácido/ pH Ácido
A/B	pH Ácido/ pH Básico
A/N	pH Ácido/ pH Neutro
ANOVA	Análisis de varianza
B/A	pH Básico/ pH Ácido
B/B	pH Básico/ pH Básico
B/N	pH Básico/ pH Neutro
DMEM	Medio de cultivo base (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAsa I	Desoxirribonucleasa I
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena (<i>double stranded Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPX	Medio de montaje (<i>Distyrene Plasticizer Xylene</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EMM	Error estándar de la media
EPC	Células progenitoras endoteliales (<i>Endothelial Progenitor Cells</i>)
GAG	Glucosaminoglicanos

H-E	Hematoxilina-eosina
N/A	pH Neutro/ pH Ácido
N/B	pH Neutro/ pH Básico
N/N	pH Neutro/ pH Neutro
P	Previo
P/E	Penicilina/ Estreptomicina
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PGA	Ácido poliglicólico
PLA	Ácido poliláctico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>)
Q-Q	Gráfico cuantil-cuantil (<i>q-q plot</i>)
RNAsa A	Ribonucleasa A
SBF	Suero Bovino Fetal
SD	Desoxicolato de sodio (<i>Sodium Deoxycholate</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecylsulfate</i>)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SMC	Células de músculo liso (<i>Smooth Muscle Cells</i>)
T/E	Tripsina/EDTA (<i>Trypsin /Ethylenediaminetetraacetic</i>)
t2t	2 horas de Tratamiento

t7t	7 horas de Tratamiento
TTO1	Tratamiento 1
TTO2	Tratamiento 2
TTO3	Tratamiento 3
VEC	Células endoteliales valvulares (<i>Valvular Endothelial Cells</i>)
VIC	Células intersticiales del velo (<i>Valvular Interstitial Cells</i>)



XIII-

Anexos

ANEXO I- MATERIAL

PREPARACIÓN MUESTRAS		
MATERIALES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
RECOGIDA Y PROCESADO		
Hoja de bisturí N°22	Braun Medical	BB522
Mango de bisturí N°4	Nopa	AD010/04
Paño estéril	Medline	15212CEB
Pinza de disección	HEBU Medical	HB274
Recipiente plástico 1 l	Deltalab	241013
Recipiente plástico 4,5 l	Deltalab	222803
Suero fisiológico estéril 250 ml	Braun Medical	3570380
Suero fisiológico estéril 500 ml	Braun Medical	3570470
Tijera de disección	HEBU Medical	HB1929
DECONTAMINACIÓN		
Anfotericina B	Sigma	A9528
Bencilpenicilina sódica 2.000.000 U.I.	Normon	644526.6
Colistimetato sódico	GES	838185.2
Sulfametoxazol- Trimetoprima	Almofarma	656754.8
Tobramicina	Braun Medical	600551
Vancomicina	Normon	618694.7
CONTROL MICROBIOLÓGICO		
Aguja 0,9 mm x 25 mm	BD Microlance	304827
Asa de siembra	Copan	8177CS10H
Hemocultivo aerobio	Biomérieux	259789
Hemocultivo anaerobio	Biomérieux	259790
Jeringa 10 ml	Braun Medical	4606108V
Tioglicolato	MAIM	2063

PROTOCOLOS DE DESCELULARIZACIÓN		
MATERIALES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES		
Ácido clorhídrico (HCl)	Sigma	H1758
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma	E6758-500G
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Cloruro sódico (NaCl)	Panreac	121659.1211
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Sigma	P7626-250MG
Frasco de urocultivo	Soria Genlab	FRM100EU
Hidróxido sódico (NaOH)	Sigma	S8045
Microtubo de 0,5 ml	Deltalab	200400
Penicilina/ Estreptomina (P/E)	Sigma	P4333-100ML
Solución almacenamiento pHmetro	Hanna Instruments	900070308
Solución calibración pH 4	Hanna Instruments	900070040
Solución calibración pH 7	Hanna Instruments	900070070
Solución electrolito pHmetro	Hanna Instruments	900070710
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma	P5493-1L
Tampón Trizma® hidrocloreuro (TRIS)	Sigma	T5941-500G
TRATAMIENTO ENZIMÁTICO		
Albúmina humana	Octapharma	662667.2
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	Merck	5833
Cloruro sódico (NaCl)	Panreac	121659.1211
Desoxirribonucleasa I (DNAsa I)	AppliChem	A3778.0500
Glicerol	Panreac	131339.1211
Ribonucleasa A (RNAsa A)	AppliChem	A2760.0500
Tampón Trizma® hidrocloreuro (TRIS)	Sigma	T5941-500G

CUANTIFICACIÓN DE dsDNA		
Kit de cuantificación de DNA- PicoGreen®	Invitrogen	P11496
Kit de extracción de DNA (GeneJET Genomic DNA)	Thermo Scientific	K0722
Microtubo de 1,5 ml	Deltalab	640450
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Thermo Scientific/Nunc	265301

HISTOLOGÍA		
MATERIALES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Ácido acético glacial	Fluka	1005706
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Cubreobjetos de vidrio (24X24)	Paul Marienfeld GmbH	-
Cubreobjetos de vidrio (24X50)	Menzel-Glaser	AC1575
Eosina Y	Sigma	HT110216
Etanol 96°	Panreac	121085.1211
Etanol absoluto	Panreac	121086.1211
Hematoxilina de Mayer	Sigma	S1275
Medio de montaje (DPX)	Sigma	44581
Portaobjetos	Menzel-Glaser	J3800AMNZ
Cassette de histología 1 celda	Deltalab	554143
Cassette de histología 2 celdas	Labbox	127300
Xilol	Sigma	S34056
Parafina	Merck	1151619025
Paraformaldehído 4%	Panreac	252931.1211

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

MATERIALES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Etanol 96°	Panreac	121085.1211
Etanol absoluto	Panreac	121086.1211
Glutaraldehído	Sigma	G5882-50ML
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma	P5493-1L

ENSAYOS DE VIABILIDAD

MATERIALES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
Alamar Blue®	Abd Serotec	BUF012B
Medio base de cultivo (DMEM)	PAA Laboratories GmbH	E15-005
Penicilina/ Estreptomina (P/E)	Sigma	P4333-100ML
Placa multipocillo 24	TPP	TPP92024
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Thermo Scientific/Nunc	265301

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

MATERIALES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
DETECCIÓN DE ELASTINA		
Kit Fastin	Biocolor	F4000
Microtubo de 1,5 ml	Deltalab	640450
Microtubo de 2 ml	Deltalab	4092.7N
Placa multipocillo 96	Labclinics	256510

DETECCIÓN DE COLÁGENO

Ácido acético	Sigma	A9967
Ácido clorhídrico (HCl)	Sigma	H1758
Kit Sircol	Bicolor	S5000
Microtubo de 1,5 ml	Deltalab	640450
Microtubo de 2 ml	Deltalab	4092.7N
Pepsina	Sigma	P7012-1G
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Thermo Scientific/Nunc	265301

DETECCIÓN DE GAG

Acetato sódico (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Sigma	S8750-250G
Ácido etilendiaminotetraacético disodio (Na ₂ EDTA)	Sigma	E5134-100G
Agua destilada 1 l	Laboratorio Farmac	346189
Clorhidrato de cisteína	Sigma	C1276-10G
Kit Blyscan	Bicolor	B3000
Microtubo de 1,5 ml	Deltalab	640450
Microtubo de 2 ml	Deltalab	4092.7N
Papaína	Sigma	P3125-100MG
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Thermo Scientific/Nunc	265301
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma	P5493-1L

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD/BIOCOMPATIBILIDAD		
MATERIALES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
CULTIVO CELULAR		
Cámara Neubauer	Paul Marienfeld GmbH	-
Colagenasa tipo I	Serva	1745401
Filtro de vacío 150 ml- 0,22µm	Millipore	SCGPU01RE
Filtro de vacío 250 ml- 0,22µm	Millipore	SCGPU02RE
Filtro de vacío 50 ml- 0,22µm	Millipore	SCGP00525
Frasco de cultivo 25 cm ²	TPP	TPP90026
L-Glutamina	PAA Laboratories GmbH	M11-004
Medio base de cultivo (DMEM)	PAA Laboratories GmbH	E15-005
Parafilm	Pechiney	PM-966
Penicilina/ Estreptomina (P/E)	Sigma	P4333-100ML
Pipeta serológica 1 ml estéril	Labclinics	PN1E1
Pipeta serológica 5 ml estéril	Labclinics	PN5E1
Pipeta serológica 10 ml estéril	Labclinics	PN10E1
Placa multipocillo 24	TPP	TPP92024
Producto	Casa comercial	Referencia
Punta 0,5-10 µl	Labbox	TIPP-011-1k0
Punta 2-200 µl	Labbox	TIPP-200-1K0
Punta 100-1000 µl	Labbox	TIPP-1K1-1K0
Suero bovino fetal (SBF)	LINU	50181
Tripsina/ EDTA 0,25% (T/E)	Sigma	T4049-100ML
Tubo de 15 ml	Deltalab	429946
Tubo de 50 ml	Deltalab	429926

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Cámara de cultivo 8 pocillos	Nunc Brand	154534
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma	D2650-100ML
Kit Life/Dead®	Life Technologies	L-3224
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma	P5493-1L

ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Ácido tranexámico	Rottpharm	672018.9
Cloruro cálcico (CaCl ₂)	Braun Medical	635656
Criovial 1,5 ml	Deltalab	409105.1
Placa multipocillo 24	TPP	TPP92024
Placa multipocillo 96 con bordes negros	Thermo Scientific/Nunc	265301
Tampón fosfato salino (PBS)	Sigma	P5493-1L
Tubo de citrato trisódico	BD Vacutainer Systems	367704

ANEXO II- PROTOCOLOS

PROTOCOLO I: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPOTÓNICA

En primer lugar se llena un vaso de precipitados, hasta un poco menos del volumen a preparar, con agua destilada. En segundo lugar se añaden los componentes de la solución hipotónica, bajo agitación magnética continuada (10-515 Bioblock Scientific), en el siguiente orden:

- Tampón Trizma® hidrocloreuro (TRIS) 10 mM.
- Ácido etilendiaminetetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA) 5 mM*.
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*, PMSF) 0,1 mM.
- Penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (P/E)

Una vez disueltos todos los componentes se ajusta el pH (KI 2211, Hanna Instruments) y se enrasa hasta el volumen necesario con agua destilada.

*Para que se disuelva el EDTA es necesario subir el pH a 7 y se requieren unos 20 minutos para su completa disolución.

PROTOCOLO II: PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN HIPERTÓNICA

En primer lugar, se llena un vaso de precipitados hasta un poco menos del volumen a preparar con agua destilada. En segundo lugar, se añaden los componentes de la solución hipertónica, bajo agitación magnética continuada, en el siguiente orden:

- TRIS 50 mM.
- EDTA 5 mM.*
- Cloruro sódico (NaCl) 150 mM.
- PMSF 0,1 mM.
- (100 U/ml- 100 µg/ml-P/E).

Una vez disueltos todos los componentes se ajusta el pH y se enrasa hasta el volumen necesario con agua destilada.

*Para que se disuelva el EDTA es necesario subir el pH a 7 y se necesitan unos 20 minutos para su completa disolución.

PROTOCOLO III: TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Antes de comenzar con la tinción, se introdujeron las muestras en una estufa (1.500E, Shel Lab) a 60°C durante media hora.

En primer lugar, se van a desparafinar y rehidratar las muestras:

- Xilol, 5 minutos (min) (2 ciclos), alcohol absoluto, 5 min (2 ciclos), alcohol 90°, 5 min (2 ciclos), alcohol 70°, 5 min y lavado en agua corriente, 2 min.

Posteriormente, se procede a realizar la tinción:

- Hematoxilina de Mayer, 2 min, como mordiente inmersión en alcohol de 50° y solución de eosina Y, 4 min.*

A continuación se deshidratan las muestras antes de su montaje.

- Alcohol de 90°, 5 min (2 ciclos), alcohol absoluto, 5 min (2 ciclos) y xilol, 5 min (2 ciclos).

Finalmente, se añade una gota de medio de montaje (*Distyrene Plasticizer Xylene, DPX*) sobre las muestras teñidas y se coloca el cubreobjetos de vidrio, aplicando un poco de presión para eliminar la presencia de burbujas que puedan interferir con la visualización de las preparaciones.

Como resultado de la tinción, los núcleos se van a teñir de morado; el citoplasma y la fibrina de rosa; la musculatura y los glóbulos rojos de rosa fuerte, rojo o anaranjado.

*Preparación de eosina Y, se añade 1 gramo de eosina Y en 100 ml de agua destilada. Además se añaden 2-3 gotas de ácido acético glacial y se agita vigorosamente hasta su completa dilución.

PROTOCOLO IV: SOLUCIÓN PARA EL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO

Primero se preparan las soluciones stock de DNAsa I y RNAsa A para luego preparar la solución de utilización con ambas enzimas.

Solución *stock* de RNAsa A:*

- TRIS 10 mM.
- NaCl 15 mM.
- Enzima ribonucleasa A (RNAsa A) 10 mg/ml.

Solución stock de DNAsa I:*

- Glicerol 50% v/v.
- TRIS 20 mM.
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 1 mM.
- Enzima desoxirribonucleasa I (DNAsa I) 10 mg/ml.

*Una vez preparadas se almacenan a 4°C.

Solución de utilización:

- TRIS 50 mM.
- $MgCl_2$ 20 mM.
- Albúmina humana 50 μ g/ml.
- Solución stock de RNAsa A 10 μ g/ml, 20 μ g/ml o 40 μ g/ml.
- Solución stock de DNAsa I 12 μ g/ml, 25 μ g/ml o 50 μ g/ml.

PROTOCOLO V: EXTRACCIÓN DE DNA

Antes de comenzar el protocolo, las muestras se disgregaron mecánicamente (con bisturí), se introdujeron en un tubo de 1,5 ml y se pesaron (ABZ100C, PCE).

1. Se añaden 180 μ l de la Solución de digestión* y 20 μ l de la Solución de Proteinasa K.*
2. Se incuban a 56°C y bajo agitación 400 rpm en el agitador térmico (Termomixer compact 5850, Eppendorf). Para las muestras de velo y arteria son necesarias dos horas de digestión, sin embargo, para el músculo es necesario realizar una digestión *over night*, entre 14-16 horas.
3. Se añaden 20 μ l de la Solución de RNAsa A,* se agitan en el vórtex (Vortex-2Genie, Scientific Industries) y se deja incubar durante 10 min a T^a A.
4. Se añaden 200 μ l de la Solución de lisis.* Se mezcla durante 15 segundos en el vórtex.
5. Se añaden 400 μ l de etanol al 50% y se mezcla en el vórtex.
6. Se transfiere el preparado de lisis a una columna de purificación* que está inserta en un tubo de recogida.* Se centrifuga (Centrífuga 5417R, Eppendorf) durante 1 min a 6.000 g. Tras la centrifugación se desecha el líquido del tubo de recogida y se inserta la columna de purificación en un nuevo tubo de recogida.

7. Se añaden 500 μ l de *Buffer* de lavado I* y se centrifuga durante 1 min a 8.000 g. Tras el centrifugado se desecha el líquido del tubo de recogida.
8. Se añaden 500 μ l de *Buffer* de lavado II* y se centrifuga durante 3 min a 12.000 g. Tras el centrifugado se desecha el líquido del tubo de recogida y se inserta la columna de purificación en un tubo de 1,5 ml.
9. Se añaden 200 μ l del *Buffer* de elución* y se deja incubar durante 2 min a T^a A. Posteriormente se centrifuga durante 1 min a 8.000 g. Se descarta la columna de purificación y se queda la muestra de dsDNA extraído en el tubo de 1,5 ml.

*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

PROTOCOLO VI: PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SEM

En primer lugar es necesario deshidratar las muestras para proceder a desecarlas.

- Lavado con PBS, 30 min (3 ciclos), alcohol al 20%, 40 min, alcohol al 30%, 40 min, alcohol al 50%, 40 min, alcohol al 70%, 40 min, alcohol al 80%, 40 min, alcohol al 90%, 40 min, alcohol al 96%, 40 min (3 ciclos), Etanol Absoluto, 40 min (2 ciclos).

Una vez que las muestras están en etanol absoluto, se desecan por punto crítico en un desecador (CPD Balzers).

1. Para ello se inserta la cámara en el agente intermedio (alcohol absoluto) y se colocan las muestras sin tocar la zona de estudio.
2. Se cierra la cámara de presión y se refrigera, *cooling*, por debajo de 10°C (5 min).
3. Se permite la entrada de CO₂ líquido, *medium in*, abriendo la bombona. Comprobar que la válvula esté bien cerrada. En este paso se inicia la sustitución del agente intermedio por el CO₂. Se agita, *stirrer*, durante todo el proceso de sustitución.
4. Se deja que la cámara se llene completamente.
5. Se permite la salida de parte del líquido, *medium out*, pero las muestras quedan siempre cubiertas.

6. Se repiten los pasos 4 y 5 durante 6 veces, con 3 lavados de 15 min, y luego el resto de 10 min.
7. Se llena la cámara de CO₂ justo por debajo del borde superior de la ventana frontal.
8. Se apaga *stirrer, medium in, cooling* y se enciende *heating*. Una vez alcanzados los 40°C, el CO₂ habrá pasado de líquido a gas superando así el punto crítico del CO₂. Se deja hasta presión de 90 bar.
9. Se permite la salida del gas, *gas out*, muy lentamente durante 15 minutos aproximadamente asegurándose antes de que la válvula está cerrada completamente.
10. Se abre la cámara de presión, se retiran las muestras y se cierra la bombona.

Tras la completa desecación de las muestras se introducen las muestras en un recubridor (Sputter coater SCD 004, Balzers) para cubrir las con una capa de oro coloidal que asegure la conductividad eléctrica de toda su superficie.

Se colocan las muestras con cinta doble sobre los soportes específicos para SEM, evitando tocar la zona de estudio y se abre la válvula de argón.

1. Se inserta la muestra en la campana y se enciende el equipo.

2. Se hace el vacío entre 0,05 y 0,07 (esto se consigue con varios lavados de hasta un mínimo de 0,02). En este paso se sustituye el aire que contiene el equipo por el gas argón.
3. Se ajusta el tiempo a 400 segundos y la corriente a 25-30 mA.
4. Se enciende el botón *start*.

Una vez recubierta las muestras, ya estarían listas para su visualización en el microscopio.

PROTOCOLO VII: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO SIRCOL

Para la realización de este protocolo se requieren dos días, en el primer día se procesan las muestras para su digestión enzimática y en el segundo día se realiza el protocolo para la detección de colágeno.

DIA 1:

1. Se prepara la solución enzimática para la digestión:

Solución stock. Pepsina 4 mg/ml en HCl 10 mM (se almacena a -20°C) Tarda en disolverse 1 h aproximadamente. Se agita en el agitador orbital (Rocker 25, Labnet) a 4°C hasta su completa disolución.

Solución de trabajo. 0,1 mg/ml de la solución stock de pepsina en ácido acético 0,5 M.

NOTA: La solución stock se descongela a 4°C y se disuelve en ácido acético 0,5 M previamente enfriado a 4°C .

2. Se introducen las muestras desecadas en tubos de 2 ml y se añade 1,5 ml de la solución de digestión. Se mantiene la digestión enzimática durante toda la noche a 4°C .

DIA 2:

3. Se recuperan 100 μl de cada muestra, estaban a 4°C , en tubos de 2 ml y se añade un 1 ml del reactivo *Sircol Dye Reagent*.*

4. Se mezcla durante 30 min en el agitador orbital a 120 revoluciones por minuto (rpm).
5. Se centrifugan las muestras a 15.000 g durante 10 min.
6. Se retira con cuidado el sobrenadante de las muestras sin eliminar el pellet (Se puede utilizar un papel o bastoncillo).
7. Se añaden 750 μ l del reactivo *Acid-Salt Wash Reagent** a las muestras (no se debe agitar y/o resuspender).
8. Se centrifuga a 15.000 g durante 10 min.
9. Se retira con cuidado el sobrenadante de las muestras sin eliminar el pellet (Se puede utilizar un papel o bastoncillo).
10. Se añaden 250 μ l del reactivo *Alkali-Reagent** a las muestras.
11. Se agita en el vórtex hasta su completa disolución, (el proceso tarda unos 2 min aproximadamente).
12. Se añaden 200 μ l en la placa de absorbancia y se mide en el espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems) a 550 nm.

*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

PROTOCOLO VIII: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO FASTIN

1. Se prepara la extracción de la elastina insoluble:

Para ello se introducen las muestras en tubos de 1.5 ml y se añaden 750 µl de ácido oxálico* 0,25 M.

NOTA: El ácido oxálico, suministrado con el kit, se encuentra a una concentración de 1 M, se diluye 1:4 en agua destilada para alcanzar una concentración final de 0,25 M.

2. Se introducen las muestras en el agitador térmico a 100°C durante 60 minutos. A los 30 minutos se agitan las muestras en el vórtex durante 1 minuto.
3. Se centrifugan las muestras a 12.000 g durante 10 minutos.

NOTA: Estos pasos se repetirán tantas veces sea necesario hasta que no se detecte pellet tras la centrifugación. Se ha establecido un total de dos extracciones para los tejidos a estudiar. Los datos obtenidos en la segunda extracción se suman a los de la primera para obtener el contenido total de elastina.

4. Se recoge un volumen de entre 10 y 100 µl de sobrenadante (se recomiendan 50 µl) y se añade a un nuevo tubo de 1,5 ml.
5. Se añade un volumen equivalente de *Elastin Precipitating Reagent** al volumen de muestra recogida.
6. Se agita en el vórtex durante unos segundos y se deja reposar a T^a A durante 15 min.

7. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 min.
 8. Se retira el sobrenadante invirtiendo los tubos, se trata de eliminar la mayor cantidad de líquido con ayuda de un papel o bastoncillo.
 9. Se añade 1 ml de *Dye Reagent** (se almacena a 4°C) y se introduce en el agitador térmico a 1.400 rpm durante 90 minutos.
 10. Se centrifuga a 12.000 g durante 10 min.
 11. Se retira el sobrenadante invirtiendo los tubos y se trata de eliminar la mayor cantidad de líquido con ayuda de un papel o bastoncillo.
 12. Se añaden 250 µl de *Dye Dissociation Reagent*.*
 13. Se mezclan durante 1 min a 1.400 rpm en el agitador térmico y se deja reposar durante 10 min.
 14. Se pasa por el vórtex unos minutos.
 15. Se añaden 250 µl de muestra en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia con el filtro de 550 nm.
- *Estos componentes vienen suministrados en el kit.

PROTOCOLO IX: REALIZACIÓN DEL ENSAYO BIOQUÍMICO BLYSCAN

1. Se prepara la solución de digestión:
 - Solución stock de papaína. 80 µl de solución de papaína dan lugar a una solución de 15 a 20 mg de papaína por 100 ml de PBS.
 - 0,1 M de acetato sódico (0,82 g /100 ml).
 - 0,01 M de ácido etilen-diamino-tetraacético disodio (Na₂EDTA) (0,37 g/ 100 ml).
 - 0,005M Clorhidrato de cisteína (80 mg/ 100 ml).
 - 0,2 M de PBS a pH 6,4.
2. Se introducen las muestras desecadas en tubos de 2 ml y se añaden 1,5 ml de la solución de digestión. Se mantiene la digestión durante 3 horas a 65°C en el agitador térmico.
3. Se centrifugan los tubos de la digestión a 10.000g durante 10 min.
4. Se recogen 50 µl del sobrenadante resultante y se añaden a un nuevo tubo de 2 ml.
5. Se enrasa a 100 µl con agua destilada y se añade 1 ml de *Blyscan Dye Reagent*.* Se mezcla por inversión.
6. Se mezcla durante 30 min a 120 rpm en un agitador orbital (Rocker 25, Labnet).
7. Se centrifuga a 15.000 g durante 10 min.

8. Se retira el sobrenadante por inversión, con cuidado de no arrastrar el pellet, ayudarse de un bastoncillo o papel para retirar la mayor cantidad de líquido.
9. Se añaden 500 µl del *Dissociation Reagent*.*
10. Se agita en el agitador térmico durante 1-2 min hasta su completa disolución.
11. Se centrifuga a 15.000 g durante 5 min para eliminar la espuma.
12. Se añaden 200 µl de cada muestra en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia a 656 nm.

*Estos componentes vienen suministrados en el kit.

