

Chemical, biological and anatomical characterization of an extracellular matrix obtained from rabbit heart

Eduardo G. Nieva^{1,2} and Nancy A. Salvatierra^{1,2}

¹*Departamento de Química, Ingeniería Biomédica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

²*IIByT- CONICET.*

Abstract— Tissue Engineering is a discipline that works on biomaterials as scaffold to functional tissues been generated that restore, keep and improve damage organ or tissues. Tissue structure is essential, cells are responsible to keep and secrete their own support, named extracellular matrix. It's organized into a three-dimensional ultrastructure, unique and specific for each tissue, interact individually with each cell and their environment through a dynamic reciprocity. Thus, an extracellular matrix generated by a decellularization process makes a proper scaffold to stem cells culture. The aim of this work is to get a cardiac decellularized extracellular matrix and their biochemical and anatomical characterization. Results show that our protocol of decellularization is effective to get an acellular extracellular matrix preserved, showed by microscopy and with residual nucleic acids traces and with no cytotoxicity, which could be recellularized in further steps. Also, the methodology to achieve the decellularization was used in the fastest and efficient way to get a three-dimensional preserved architecture.

Keywords— extracellular matrix, decellularization, heart, biocompatibility

Resumen— La ingeniería de tejidos es una disciplina que desarrolla biomateriales para su uso como andamio para la generación de tejidos funcionales que restauren, mantengan o mejoren los tejidos u órganos dañados. La estructura tisular es fundamental, siendo las células quienes la mantienen y secretan su propio soporte, denominada matriz extracelular. Esta se organiza en una ultraestructura tridimensional, única y específica de cada tejido e interactúa con las células individuales y su entorno mediante una reciprocidad dinámica. Por lo tanto, una matriz extracelular generada a través de un proceso desceldularización constituye un andamio propicio para la potencial resiembra con células madres con la consecuente funcionalidad y supervivencia. El objetivo de este trabajo es obtener una matriz extracelular cardíaca por desceldularización y posteriormente, caracterizarla bioquímica y anatómicamente. Los resultados muestran que el protocolo de desceldularización permitió obtener una matriz acelular conservada evidenciada microscópicamente, con mínimos contenidos de ácidos nucleicos residuales y sin evidencias de citotoxicidad, las cuales podrían ser recelularizadas en un paso posterior. Además, la metodología desarrollada para la desceldularización constituyó una forma eficiente y rápida de obtención de una matriz con la arquitectura tridimensional preservada.

Palabras clave— matriz extracelular, desceldularización, corazón, biocompatibilidad.

I. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos es una disciplina que hace uso del desarrollo de biomateriales que sirvan como andamio o soporte para que células y moléculas biológicamente activas puedan crear tejidos funcionales que restauren, mantengan o mejoren los tejidos u órganos dañados. Es un campo de estudio que evolucionó del desarrollo de biomateriales y constituye un área de gran interés en la salud pública, en especial, en la búsqueda de una aplicación clínica que se traduzca en beneficios para los pacientes como la restauración de tejidos dañados o, la creación de tejidos u órganos compatibles y funcionales. Los tejidos corporales no sólo están formados por las células que mantienen la estructura fundamental sino que forman y secretan sus propias estructuras de soporte, denominada matriz extracelular (MEC). Esta matriz actúa como soporte para las células y constituye el lugar para variadas moléculas de señalización que interactúan con las células

individuales, con su entorno e instauran los tejidos y organismos, organizándose en una ultraestructura tridimensional, única y específica de cada tejido. La estructura como la composición de la MEC a través de lo que se conoce como "reciprocidad dinámica" (1) cambian constantemente en respuesta a la actividad metabólica de la población de células residentes, a las exigencias mecánicas del tejido y a las condiciones microambientales del órgano y es una ventaja importante sobre el uso de materiales sintéticos. En los últimos años ha surgido un enfoque prometedor para el reemplazo de órganos funcionales: La desceldularización alogénica o xenogénica de órganos donantes tales como el corazón (2), el hígado (3) y el pulmón (4) proporciona un soporte biológico tridimensional acelular de origen natural que posteriormente se pueden sembrar con células parenquimatosas funcionales o poblaciones de células progenitoras seleccionadas. La composición de la MEC está representada por una mezcla compleja de moléculas funcionales y estructurales que afectan a una variedad de actividades celulares. Así, la generación de órganos bioartificiales funcionales para suplir la necesidad de trasplantes es un gran desafío hacia

un futuro que podría hacerse realidad a mediano plazo. Nuestra hipótesis de trabajo es que una MEC generada a partir de un corazón descelularizado de conejo constituye un andamio propicio para la potencial resiembra con células madres con la consecuente funcionalidad y supervivencia. El objetivo de este trabajo es obtener una matriz extracelular cardíaca por descelularización y posteriormente, caracterizarla mediante Microscopía Óptica Electrónica de Barrido, a fin de determinar presencia de componentes típicos de la MEC y su morfología preservada, así también como observar la ausencia de citotoxicidad por ensayos *in vitro* y cuantificar detergentes y ácidos nucleicos remanentes al proceso de descelularización.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la matriz extracelular cardíaca por descelularización

Animales y Técnica quirúrgica: Se utilizaron conejos machos neozelandeses de 2.100 ± 120 g. Para la obtención del corazón, se realizó una cardiectomía total con preservación de la vasculatura coronaria. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las normas del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio aprobados por el CICUAL de la FCEFyN-UNC (17/2018). Se minimizó el sufrimiento y el número de animales utilizados. Previo a la cirugía los animales fueron anestesiados mediante una combinación de Ketamina (35 mg/kg de peso corporal) y Xilacina (5 mg/kg) administrada por vía intramuscular como única dosis. Los conejos se fijarán en posición decúbito dorsal por sus extremidades. Se realizó una incisión mediana y posteriormente se amplió al hemitórax derecho. Se identificó la vena cava e inmediatamente se inyectó 1000 UI de heparina por vía intravenosa. Se procedió a la identificación del cayado aórtico y las venas cavas tanto superior como inferior, que se cargó sobre la ligadura e identificó y diseccionó la vena cava inferior y la consiguiente liberación de adherencias del corazón. Luego, se diseccionó la vena cava superior, con la correspondiente identificación, disección, ligadura y sección de la vena cava superior para culminar con la cardiectomía total. A los fines de comenzar con el protocolo de descelularización se introdujo un catéter de teflón por la arteria aorta y se fijó con puntos de prolene 4/0. Se perfundió una solución PBS para lavado durante 3 h. El órgano se colocó en solución de PBS en baño de hielo para su transporte y posterior congelamiento a -80°C durante 24 h. Esta etapa es primordial para comenzar con los procesos de lisis celular mediante los procesos físicos de congelamiento-descongelamiento.

Técnica de descelularización: La descelularización se basó en el protocolo desarrollado por nuestro grupo para hígado de conejo con modificaciones según la anatomía cardíaca (5). Luego de 24 h el corazón se descongeló a temperatura ambiente para ayudar a la lisis celular. El catéter se conectó a una bomba peristáltica y se iniciaron ciclos de perfusión retrógrada a una velocidad de entre 3 y 6 ml/min de la siguiente manera: se lavó con agua desionizada a 4°C y luego se perfundió SDS 1%. La velocidad de perfusión fue ajustada a fin de evitar la ruptura de las válvulas mitral y aórtica. Posteriormente, se realizaron sucesivos lavados de dos horas cada uno, a fin de arrastrar los restos celulares. Se perfundió nuevamente con SDS 1% durante toda la noche. Al día siguiente, se

realizaron lavados sucesivos con agua desionizada para arrastrar todos los restos celulares y el detergente. Por último, se perfundió durante una hora con etanol al 4% para desinfectar el órgano, y 1 h más con 10.000 unidades/mL de penicilina-10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina, pasos importante para lograr una matriz preservada y perfundible para una recelularización posterior. La correcta descelularización se verificó macroscópicamente a través de la MEC translúcida, posteriormente se perfundió azul de metileno en agarosa al 2% para verificar la estructura vascular conservada.

Evaluación morfológica de las MEC obtenidas

La efectividad de descelularización fue evaluada a través de dos técnicas de tinción histológica, Hematoxilina-Eosina y tinción tricrómica de Masson (colágeno y fibras elásticas). Estas tinciones se realizaron tanto en los corazones controles como descelularizados. Como controles se usaron corazones que fueron obtenidos por la misma técnica quirúrgica pero no descelularizados. La ausencia total de células en la MEC descelularizada (dMEC), así como la presencia de fibras reticulares como fibras de colágeno nos indican un correcto proceso de descelularización. Para evaluar la integridad del parénquima cardíaco descelularizado las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol y secadas por punto crítico para finalmente ser metalizadas con Au-Pd previo a la observación de la microestructura por Microscopía Electrónica de Barrido Carl Zeiss-Sigma a 3kV a distintos zooms (LAMARX, CONICET-UNC).

Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN se realizaron cortes (1 cm^2) de tejido seco en un ambiente controlado y se adicionó buffer de extracción a cada tubo (200 mM NaCl, 100 mM TRIS, 5 mM EDTA, 0,2% SDS y proteinasa K).

Los tubos fueron incubados a 55°C durante toda la noche (6). El tejido digerido se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para precipitar las impurezas. Se recolectó el sobrenadante, se agregó isopropanol y se agitó manualmente. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 10000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, el precipitado que contenía ADN se lavó con etanol y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm, 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente.

El precipitado seco se los resuspendió en agua estéril a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, se conservó a -20°C . La cantidad de ácidos nucleicos por mg de tejido seco fue obtenido por espectrofotometría al ultravioleta.

Cuantificación del SDS

Para la cuantificación del SDS residual se tomaron muestras posteriores al último lavado según el protocolo de Arand (7), lo cual constituyen junto con el ADN residual dos complicaciones importantes en la citocompatibilidad para la reendotelización posterior. Brevemente, se recolectaron 0,3 ml del líquido de perfusión de la muestra de dMEC y se agregó igual volumen de agua desionizada. Luego, se agregaron 0,6 ml de reactivo de azul de metileno (0,025% p/v azul de metileno, 5% p/v Na_2SO_4 y 1% v/v H_2SO_4) con agitación manual. Finalmente, se agregó 2,4 ml de CHCl_3 y se agitó en vortex durante 1 minuto. Luego

se centrifugó a 1100g durante 2 minutos y se cuantificó por espectrofotometría a 651 nm.

Evaluación de la citotoxicidad de las MEC obtenidas

La potencial acción citotóxica de la dMEC obtenida se evaluó mediante el ensayo de citotoxicidad del MTT dispuesto en la Norma ISO 10993: parte 5-2009 (8), que evalúa la viabilidad y proliferación celular. Como control negativo de citotoxicidad se utilizó polietileno de alta densidad (PEHD) y como control positivo se usó una solución de Fenol 0,2%. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Los datos experimentales fueron expresados como la media aritmética \pm ESM. Los resultados de la cuantificación de ADN y SDS residual fueron analizados por test de Student. Las diferencias observadas en la viabilidad celular fueron analizadas por ANOVA de una vía seguida de una comparación de medias individuales de Newman-Keuls. Un valor de $p < 0,05$ será considerado una diferencia significativa en todos los casos.

III. RESULTADOS

Análisis Macroscópico

Se verificó la transparencia de la MEC obtenida por descelularización. Las zonas traslúcidas corresponden a la dMEC mientras que las zonas con opacidad se deben a la presencia de remanentes de tejido adiposo.

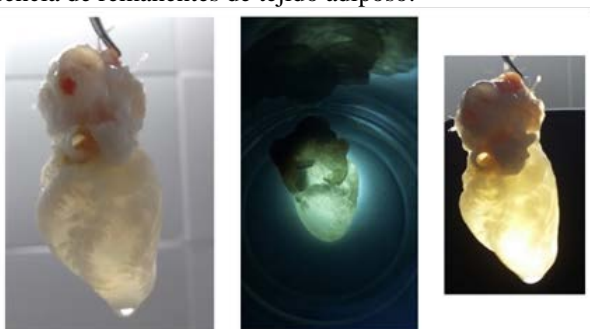


Fig. 1. Visualización macroscópica de un corazón de conejo posterior al protocolo de descelularización descrito en Materiales y Métodos.

Microscopía óptica

La tinción del tejido cardíaco con Hematoxicilina-Eosina muestra la ausencia total de núcleos y citoplasma celulares en la muestra de MEC descelularizada en comparación con el control sin descelularizar. En la misma micrografía también se observa una arquitectura de la dMEC bien conservada (Fig.2).

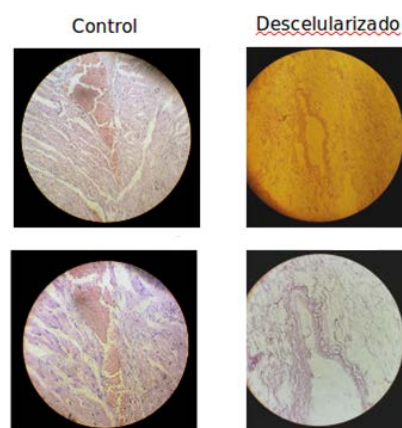


Fig. 2: Microscopía óptica de tinción de Hematoxicilina-Eosina a 20x (superior) y 40 x (inferior) de aumento. Las micrografías de la izquierda muestran el tejido cardíaco control con la presencia de núcleos celulares evidenciado por el colorante básico y los citoplasmas expuestos por la presencia de eosina. Las micrografías de la derecha corresponden a una MEC completamente descelularizada sin núcleos y citoplasmas celulares (las fotos son representativas de una serie experimentos, n = 3).

La Fig. 3 muestra la MEC descelularizada a dos aumentos diferentes luego de la tinción Tricrómica de Masson. Se evidencia la preservación de las fibras de colágeno conservadas sin la presencia de núcleos ni citoplasmas celulares.

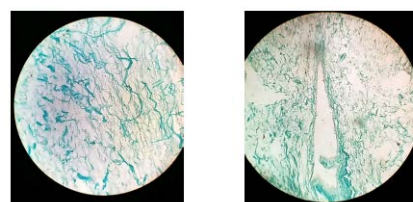


Fig. 3: Fibras de colágeno preservadas luego del proceso de descelularización por tinción tricrómica de Masson (20x y 40x) donde se observa ausencia de células y presencia de fibras (las fotos son representativas de una serie experimentos, n = 3).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En las micrografías se observa la presencia de fibras entrecruzadas libres de células adheridas a diferencia de la muestra no descelularizada donde se observa una alta presencia de células (Fig. 4).

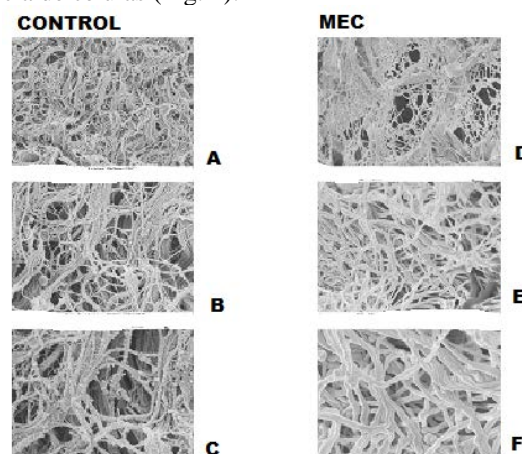


Fig. 4. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A-C) corazón control y (D-F) descelularizado donde se observa el entramado de la MEC sin la presencia de células y la arquitectura completamente preservada (las fotos son representativas de una serie experimentos, n = 4) (A y D: 4500x, B y E: 15000x, C y F: 30000x).

La Fig. 5 muestra la ausencia de ADN remanente en las muestras de dMEC que evidencia la obtención de una matriz sin la presencia de ácidos nucleicos.

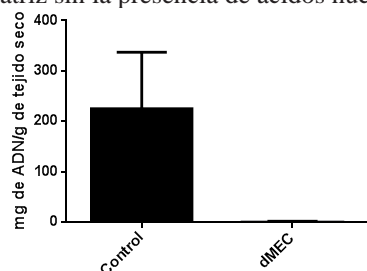


Fig. 5. Cuantificación de ADN remanente en la dMEC y su control respectivo ($p < 0,0001$). $P < 0,001$ (Test de Student)

La Fig. 6 muestra que la dMEC obtenida luego del proceso de descelularización químico-mecánico no presenta rastros de SDS del protocolo de trabajo ensayado, indicando un óptimo proceso de lavado de la matriz acelular.

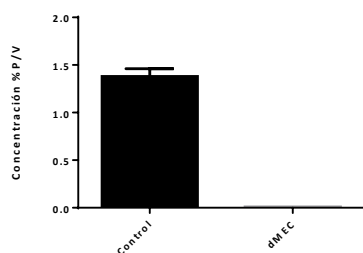


Fig. 6. Cantidad de SDS residual en la muestra de MEC posterior al protocolo de descelularización. $P < 0,001$ (Test de Student)

La Fig. 7 confirma que el extracto obtenido a partir de la dMEC no presenta citotoxicidad en las condiciones ensayadas.

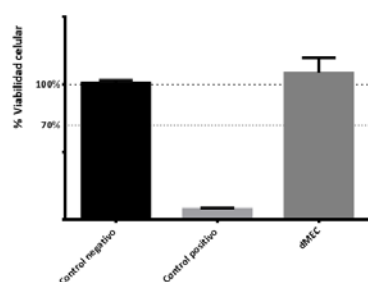


Fig. 7. Viabilidad celular del extracto 100% obtenido de la dMEC en cultivo de células Vero durante 24hs. Barras representan media aritmética \pm ESM. $n = 3$. *significativamente diferente del Control positivo, $p < 0,001$

IV. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el protocolo de descelularización de un corazón de conejo empleado en este trabajo fue exitoso. El análisis microscópico de la dMEC

revela una estructura tridimensional conservada, con fibras de colágeno preservadas (Fig. 2-4). Las Fig. 5 y 6 muestran que las concentraciones remanentes de ADN y detergentes son menores a la concentración mínima para ocasionar toxicidad. Asimismo, en el ensayo de citotoxicidad de la Norma ISO 10993:5 la viabilidad celular fue del 102% (Fig.7) para la dMEC luego del protocolo de descelularización ensayado.

V. CONCLUSIONES

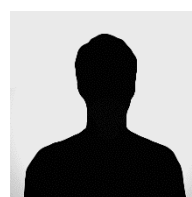
La matriz extracelular de corazón de conejo obtenida por el presente protocolo de descelularización no presenta evidencia de toxicidad, las cuales podrían ser utilizadas como andamio de recellularización en un paso posterior. Asimismo, la metodología desarrollada para la descelularización constituye una forma eficiente y rápida de obtención de matrices de corazón con una arquitectura tridimensional preservada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la SECyT - Universidad Nacional de Córdoba y el MINCyT-Cba (Argentina).

REFERENCIAS

- [1] Bissell MJ, Aggeler J. 1987 Prog. Clin. Biol. Res. 249:251–627
- [2] Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, et al. 2008. Nat. Med. 14:213–21
- [3] Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, et al. 2010. Nat. Med. 16:814–20
- [4] Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, et al. 2010. Science 329:538–41
- [5] Nari GA, Cid M, Comín R, Reyna L, Juri G, Taborda R, Salvatierra NA. Rev Esp Enferm Dig. 2013 105: 138-43.
- [6] Laird P, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki M jaenisch R et al. Nucleic Acids Research 1991; 19:4293-5.
- [7] Arand, M, Friedberg, T, Oesch, F, Analytical Biochemistry, 1992 207(1), 73-75.
- [8] International Organization for Standardization, ISO 10993-5, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in Vitro Methods, 2009. URL <http://doi.acm.org/10.1145/2461466.2461522>.



Eduardo G. Nieva es Ingeniero Biomédico de la Universidad Nacional de Córdoba (2013). Es estudiante del Doctorado en Ingeniería y becario CONICET. Sus áreas de interés son la ingeniería de tejidos y el desarrollo de biotintas a base de alginato. Actualmente, es docente en la carrera de Ingeniería Biomédica e integra el grupo de Biocompatibilidad de Ingeniería Biomédica (FCEFYN-UNC, IIByT-CONICET).



Nancy A. Salvatierra es Bióloga y Doctora en Ciencias Biológicas. Sus áreas de interés son la ingeniería de tejidos en la optimización de una metodología alternativa al trasplante. Es investigadora Independiente del CONICET, profesora titular en la carrera de Ingeniería Biomédica de la UNC y Directora del grupo de Biocompatibilidad de Ingeniería Biomédica (FCEFYN-UNC, IIByT-CONICET).