

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Eloísa Díaz Moreno
ISBN: 978-84-9163-630-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48615>

**PRESERVACIÓN DE BIOMATERIALES DESCELULARIZADOS PARA SU
UTILIZACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR URETRAL**

Memoria que presenta la Licenciada en Medicina y Máster en Ingeniería Tisular

Eloísa Díaz Moreno

para aspirar al título de Doctor

Fdo.: Eloísa Díaz Moreno

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. D. Miguel Alaminos Mingorance
Universidad de Granada, España

Fdo.: Dr. D. Ricardo Fernández Valadés
Universidad de Granada, España

Departamento de Histología

Universidad de Granada

2017

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Los resultados de la Tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo científico:

Evaluation of freeze-drying and cryopreservation protocols for long-term storage of biomaterials based on decellularized intestine. Díaz-Moreno E, Durand-Herrera D, Carriel V, Martín-Piedra MÁ, Sánchez-Quevedo MD, Garzón I, Campos A, Fernández-Valadés R, Alaminos M. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017 Feb 10. doi: 10.1002/jbm.b.33861.

La doctoranda **Eloísa Díaz Moreno** y los directores de la Tesis Doctoral **D. Miguel Alaminos Mingorance** y **D. Ricardo Fernández Valadés** garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 19 de mayo de 2017

Doctoranda

Fdo.: Eloísa Díaz Moreno

Directores de la Tesis

Fdo.: Miguel Alaminos Mingorance

Fdo.: Ricardo Fernández Valadés

AGRADECIMIENTOS

Una vez concluida esta Tesis Doctoral, la cual representa una meta muy importante en mi vida profesional y personal, es momento de mirar atrás y recordar a esas personas que me han mostrado su apoyo desde que este proyecto empezó a andar.

A mis directores de tesis:

Al Dr. Ricardo Fernández Valadés, por guiarme en mis primeros pasos en la Cirugía Pediátrica, por el ejemplo de trabajo constante y perseverante, y por el estímulo profesional.

Al Dr. Miguel Alaminos Mingorance, por su contribución fundamental en la realización de esta investigación. Por su orientación y supervisión continua, y sobre todo, por su ejemplo investigador y humano.

A todo el Departamento de Histología de la Universidad de Granada, por brindarme la oportunidad de desarrollar mi tesis doctoral en un grupo investigador de tanto prestigio.

Destacar también aquellas personas con las que he compartido gran cantidad de horas en el laboratorio: Ingrid, Celeste, Miguel Ángel, Camilo, Giuseppe, Sebastián, Boris y Fernando. A ellos, gracias por su enseñanza y colaboración en el desarrollo de las técnicas utilizadas.

A mis padres, a quiénes jamás me alcanzaría la vida para agradecerles. Por enseñarme desde la infancia que siempre se deben perseguir los sueños y que, con esfuerzo y trabajo, es posible alcanzar cualquier meta por difícil que parezca.

A mis hermanos, Jose, Yago y Jesús, por sentirlos siempre cerca a pesar de la distancia que nos separa.

A Lourdes y Pepe, por su cariño y su disponibilidad continua.

A Juan, mi marido, por su ayuda, paciencia y confianza para poder finalizar este proyecto, pero sobre todo por su apoyo incondicional en el camino de la vida.

Y por último, a la persona que se ha convertido en mi motivación y alegría diaria, mi hijo Juan.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. La uretra humana.....	4
1.2. La Ingeniería Tisular.....	5
1.3. Técnicas de preservación para uso diferido.....	10
1.3.1. Criopreservación.....	10
1.3.2. Liofilización.....	12
2. Objetivos.....	15
2.1. General.....	17
2.2. Específicos.....	17
3. Materiales y Métodos.....	19
3.1. Obtención de muestras de intestino delgado de ratas de laboratorio.....	21
3.2. Generación de biomateriales descelularizados de intestino delgado para utilización en ingeniería tisular.....	22
3.3. Preservación de los biomateriales descelularizados de intestino delgado.....	23
3.3.1. Liofilización.....	25
3.3.2. Criopreservación.....	25
3.4. Análisis histológico e histoquímico de los biomateriales descelularizados de intestino delgado.....	26
3.4.1. Análisis morfoestructural mediante tinción con hematoxilina y eosina (HE).....	26
3.4.2. Método histoquímico con ácido periódico de Schiff (PAS).....	27
3.4.3. Método histoquímico azul alcian.....	27
3.4.4. Método histoquímico de picrosirius.....	27
3.4.5. Método histoquímico reticulina de Gomori.....	28
3.4.6. Método histoquímico de orceína.....	28
3.5. Análisis cuantitativo y estadístico.....	29
4. Resultados.....	31
4.1. Análisis morfoestructural de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación	33

4.2. Análisis de las glicoproteínas de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.....	36
4.3. Análisis de los proteoglicanos de las muestras descelularizadas sometidas a preservación.....	39
4.4. Análisis de las fibras de colágeno de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.....	43
4.5. Análisis de las fibras de reticulina de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.....	47
4.6. Análisis de las fibras elásticas de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.....	51
5. Discusión.....	57
6. Conclusiones.....	67
7. Referencias bibliográficas.....	73

1. INTRODUCCIÓN

La uretra puede presentar alteraciones desde el momento del nacimiento (patologías congénitas), o adquiridas a lo largo de la vida. En todos los casos, estas patologías pueden requerir cirugía reconstructiva. Tradicionalmente, la reparación de tejidos lesionados se ha realizado utilizando tejidos tomados del propio paciente (autoinjerto o autotrasplante de mucosa oral o de otros tejidos) (Osman *et al.*, 2015) o de otro individuo (aloinjerto o trasplante heterólogo). Actualmente, para la corrección de la mayor parte de las patologías uretrales, se recurre a colgajos autólogos de tejidos adyacentes o a injertos libres, principalmente de mucosa oral o vesical (Osman *et al.*, 2015; Gallegos y Santucci, 2016). Sin embargo, la obtención de colgajos locales no siempre es factible, y la extracción de mucosa oral o vesical no está exenta de complicaciones y efectos secundarios tanto en la zona donante como en la zona receptora. Por otro lado, la utilización de tejidos heterólogos ha arrojado resultados bastante pobres en la sustitución de uretra, siendo muy frecuente la aparición de rechazos inmunológicos del tejido trasplantado.

La elaboración de un sustituto uretral mediante ingeniería tisular, supondría un avance en el tratamiento de la patología uretral, evitando o reduciendo las complicaciones derivadas de las técnicas actualmente disponibles (Versteegden *et al.*, 2017). Para ello, se han descrito numerosas técnicas, entre las que destacan la elaboración de constructos (Versteegden *et al.*, 2017-2) y las técnicas de descelularización y recelularización (Simões *et al.*, 2017). De hecho, la descelularización de tejidos constituye un método eficaz en la generación de biomateriales en ingeniería tisular de distintos órganos humanos (Crapo *et al.*, 2011; Keane *et al.*, 2015). Asimismo, es necesario desarrollar nuevos métodos que permitan preservar adecuadamente los tejidos descelularizados para su transporte al quirófano e, idealmente, para uso diferido (Rodríguez *et al.*, 2013).

En la presente Tesis Doctoral se han obtenido biomateriales tubularizados mediante técnicas de descelularización, los cuales han sido sometidos a diversos protocolos de criopreservación y liofilización para uso diferido, evaluándose la efectividad de cada protocolo.

1.1. La uretra humana

La uretra es una estructura tubular que conecta la vejiga urinaria con el meato urinario, permitiendo de esta forma la excreción de la orina (Herrera-Imbroda *et al.*, 2016). La uretra masculina está dividida en uretra proximal (con una región membranosa y otra prostática) y uretra distal (con una región peneana y otra bulbar) (Schenkman y Manger, 2013; del Pozo-Jiménez *et al.*, 2014). Al tener menor longitud, la uretra femenina se divide únicamente en una región proximal y otra distal (Herrera-Imbroda *et al.*, 2016).

Histológicamente (Figura 1), la uretra está revestida internamente por un epitelio estratificado columnar y no queratinizado que se transforma en un epitelio transicional a nivel de la uretra membranosa y prostática. En el espesor de este epitelio se localizan numerosas glándulas productoras de moco que protegen a la uretra de los efectos perniciosos del paso de la orina. Bajo este epitelio, y separado por una membrana basal, encontramos un tejido conectivo que forma la lámina propia de la uretra, bajo el cual existe una capa vascular rodeada de fibras musculares lisas dispuestas en una capa longitudinal interna y otra capa circular externa, mucho más aparentes en las secciones uretrales a nivel prostático y membranoso (Gray y Carter, 2000).

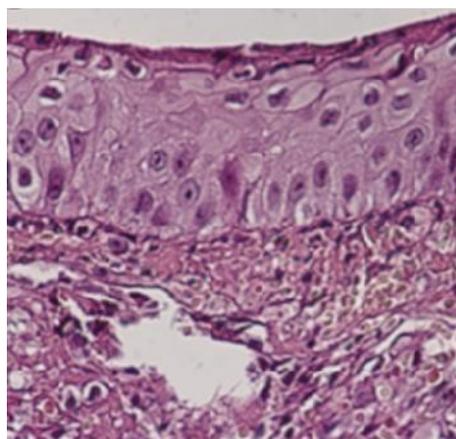


Figura 1. Estructura histológica de la uretra superficial, mostrando la capa epitelial y la lámina propia (Martín-Cano *et al.*, 2013)

1.2. La Ingeniería Tisular

La ingeniería tisular es una de las áreas de la biotecnología que más se ha desarrollado en los últimos años, debido a su utilidad potencial para la fabricación in vitro de tejidos y órganos para su implante en pacientes necesitados de los mismos. Se trata de un área interdisciplinaria que aplica los principios y métodos de la ingeniería para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la formación de los tejidos (Langer y Vacanti, 1993), mediante la combinación de células, biomateriales y señales moleculares (Campos, 2004). El objetivo de la mayoría de protocolos de ingeniería tisular es desarrollar un tejido lo más biomimético posible con el tejido a reproducir. Para ello, es importante generar nuevos biomateriales capaces de reproducir la compleja estructura de la matriz extracelular (MEC) de los tejidos nativos.

La matriz extracelular es una estructura compleja diseñada para satisfacer las necesidades específicas de los tejidos que contienen esta estructura, fundamentalmente las necesidades de tipo físico y biomecánico. En el caso del tejido conectivo, la población celular existente en este tejido es la encargada de sintetizar, remodelar y mantener la MEC en las cuales se encuentran embebidas las propias células (Ross y Pawlina, 2007). Aunque diversos autores han logrado generar sustitutos de distintos tejidos conectivos tales como el hueso o el cartílago (Goldberg *et al.*, 2017), el tejido conectivo que constituye algunas capas de la uretra humana, especialmente la lámina propia, es muy difícil de reproducir en laboratorio.

En el tejido conjuntivo, la matriz extracelular, es una red estructural compleja e intrincada que rodea y sostiene las células del tejido conjuntivo (Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2014). La matriz extracelular contiene una variedad de fibras, como las fibras colágenas y elásticas, que están compuestas por tipos diferentes de proteínas estructurales. Además, esta matriz contiene varios proteoglicanos (por ejemplo, agregano, sindecano), glucoproteínas multiadhesivas (como la fibronectina y la laminina) y glicosaminoglucanos (por ejemplo, dermatán sulfato, queratán sulfato, hialuronano). Los tres últimos grupos de moléculas constituyen la sustancia

fundamental. Todas las moléculas que hay en la matriz extracelular comparten dominios comunes y la función de esta matriz depende mucho de las interacciones entre estas moléculas. Cada célula del tejido conjuntivo secreta una proporción diferente de moléculas de la matriz extracelular que contribuyen a la formación de muchas organizaciones estructurales diferentes; en consecuencia, la matriz posee propiedades mecánicas y bioquímicas características específicas del tejido en el que se encuentra. La matriz extracelular juega un papel importante en el mantenimiento y el comportamiento celular, proveen soporte estructural, además de señales de adhesión, sitios de unión de factores de crecimiento y lugares de degradación. Aunque la estructura específica de la MEC uretral no es bien conocida, es muy probable que ésta sea similar a la de otros tipos de tejido conectivo existente en el organismo. La reproducción de esta estructura en laboratorio es muy compleja y aún requiere futuros desarrollos basados en biomateriales de nueva generación cada vez más biomiméticos respecto al tejido conectivo humano.

Hasta el momento, se han descrito numerosos tipos de biomateriales para uso en ingeniería tisular y en biomedicina. En concreto, desde las primeras aplicaciones médicas de las prótesis de madera o metales nobles hace ya más de cinco siglos, hemos pasado a una medicina en la que la utilización de los biomateriales naturales y sintéticos es cada vez mayor, utilizándose a menudo en intervenciones reparadoras del aparato locomotor (rodillas, caderas, etc.), el sistema cardiovascular (Lam y Wu, 2012), el aparato digestivo (esófago, conductos biliares), el sistema genitourinario (uréter, uretra, vejiga), así como en oftalmología, dermatología y cirugía plástica. De igual modo, la aplicación de adhesivos y selladores tisulares basados en polímeros de fibrina o colágeno ha permitido la realización de intervenciones quirúrgicas complejas (Haugh *et al.*, 2012), especialmente aquéllas relacionadas con la extirpación parcial de órganos macizos (riñones, hígado).

Un biomaterial adecuado debe poseer algunos requisitos básicos, como ser biocompatible, no debe ser tóxico ni carcinogénico, poseer propiedades físicas y mecánicas adecuadas para servir como sustituto de tejidos del cuerpo, posibilitar su fabricación en diferentes formas y presentar bajo coste (Agrawal, 1998). Para

aplicaciones en ingeniería tisular deben promover viabilidad, desarrollo, proliferación y diferenciación celular. Además de cumplir los requisitos básicos, los biomateriales deben mimetizar las características del tejido que será reparado. En este contexto, es necesario considerar algunos aspectos como propiedades eléctricas (conductores y aislantes), propiedades térmicas (termoestables, lábiles, conductores y aislantes), propiedades biomecánicas (tensión de compresión, elasticidad, ductilidad, cizalla, densidad, fatiga, fragilidad, desgaste y corrosión), propiedades estructurales y geométricas, y la respuesta celular (bioinerte, bioactivo y bioabsorbible) (Zhang *et al.*, 2010).

Los biomateriales pueden ser divididos en biomateriales sintéticos y naturales. Los biomateriales sintéticos son fundamentalmente los metales, polímeros sintéticos y cerámicos, mientras que los biomateriales naturales son los polímeros naturales y los materiales biológicos obtenidos mediante descelularización. En primer lugar, pasaremos a describir los materiales sintéticos y, posteriormente, los materiales naturales utilizados en ingeniería tisular.

A) **Sintéticos**

Los materiales sintéticos han sido desarrollados fundamentalmente a partir de metales, polímeros sintéticos y cerámicas. En primer lugar, los biomateriales sintéticos desarrollados a partir de metales (Xiao *et al.*, 2017) son ampliamente empleados como implantes en diferentes áreas, incluyendo ortopedia, cirugía maxilofacial y cardíaca (Agrawal, 1998). Entre los metales más utilizados, se encuentran acero inoxidable 316L, aleaciones de cobalto y cromo, aleaciones de titanio, aleaciones de aluminio y vanadio y cobalto, níquel, cromo y molibdeno.

Los biomateriales de acero inoxidable son bastante biocompatibles, aunque no parecen integrarse completamente al hueso o al tejido blando, y las aleaciones de cobalto-cromo se presentan altamente resistentes a la corrosión (Agrawal, 1998). Recientemente, se demostró que en la superficie de un implante a base de aleación de Co-Cr, células mesenquimáticas derivadas de la médula ósea son capaces de diferenciarse hacia osteoblastos activos y formar matriz ósea (Ogawa *et al.*, 2012). Por

otro lado, diversos estudios indicaron que otros tipos de aleaciones basadas en Mg-Ca-Zn, representan un excelente biomaterial biodegradable candidato para aplicaciones en síntesis ósea (Cho *et al.*, 2012). Biomateriales a base de titanio son muy biocompatibles, llegando a formarse hueso en aposición adyacente a estos materiales. Sin embargo, el titanio es relativamente caro y esto limita su popularidad (Agrawal, 1998).

La segunda variedad de biomateriales sintéticos son los polímeros, ampliamente utilizados en medicina como biomateriales (Kondiah *et al.*, 2016). Sus aplicaciones varían desde prótesis faciales hasta tubos traqueales; desde partes de riñones y pulmón, hasta componentes cardiacos; y desde prótesis odontológicas hasta articulaciones de cadera y rodilla (Agrawal, 1998).

La popularidad de los polímeros biodegradables como biomateriales ha aumentado continuamente en las últimas décadas. La ventaja de estos materiales es que pueden ser utilizados como implantes temporales que permanecen intactos hasta que el proceso de cicatrización se completa, y luego se degradan por acción hidrolítica o enzimática, siendo excretados como productos de desecho. Los polímeros biodegradables también pueden funcionar como sistemas de liberación de fármacos (Agrawal, 1998). Los polímeros biodegradables más populares son ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), y sus copolímeros. Otros materiales biodegradables de interés incluyen poliortoésteres, policaprolactona, y poliandria (Deplaine *et al.*, 2012).

B) **Naturales**

Los biomateriales naturales son aquellos que derivan de productos encontrados en la naturaleza. Consisten en polímeros naturales o son materiales biológicos obtenidos mediante descelularización de tejidos humanos o animales. Entre los materiales observados en la naturaleza, se puede encontrar los polímeros naturales, representados, básicamente, por el colágeno, hialuronato, fibrina, alginato, agarosa, gelatina y quitosano. En los últimos años, en medicina, se ha descrito el uso de dichos biomateriales en reparación de diferentes tejidos (Patino *et al.*, 2002; Lam y Wu, 2012; Haugh *et al.*, 2012; Pok *et al.*, 2012), e incluso algunos biomateriales altamente

biocompatibles de fibrina y agarosa han sido capaces de transferirse clínicamente (González-Andrades *et al.*, 2009; Ionescu *et al.*, 2011).

Otra posible estrategia para fabricar tejidos consiste en obtener materiales biológicos de tejidos y órganos mediante la eliminación de las células nativas, generando, de esa forma, un material natural, compuesto básicamente de la MEC procedente del tejido de origen, proceso denominado descelularización. Los protocolos de descelularización están focalizados en la eliminación de todo el material celular sin afectar adversamente la composición, actividad biológica, o integridad mecánica de la MEC tridimensional restante (Badylak *et al.*, 2011). De acuerdo con Gilbert *et al.* (2006), para descelularizar un tejido existen diversas técnicas como, las físicas, químicas y enzimáticas, pudiendo éstas utilizarse en combinación. Además, los agentes más eficientes para la descelularización de cada tejido y órgano dependerán de muchos factores, incluyendo la celularidad, densidad, contenido de lípidos y espesor del tejido (Crapo *et al.*, 2011). En los últimos años, se han desarrollado numerosos trabajos de descelularización para obtener biomateriales biológicos para aplicaciones en ingeniería tisular en distintos sistemas orgánicos, como riñones (Ross *et al.*, 2009), pulmón (Ott *et al.*, 2010), córnea (González-Andrades *et al.*, 2011), hígado (Barakat *et al.*, 2012) y corazón (Cigliano *et al.*, 2012).

En el caso de la uretra, trabajos muy recientes han logrado descelularizar este órgano para aplicarlo a protocolos de ingeniería tisular (Simões *et al.*, 2017). Sin embargo, aún es necesario investigar en este campo para encontrar biomateriales descelularizados plenamente biomiméticos y biocompatibles con la uretra humana. A este respecto, Saksena y cols. (Saksena *et al.*, 2016) sugieren utilizar órganos tubulares huecos para la obtención de biomateriales útiles en ingeniería tisular de la uretra. En la presente Tesis Doctoral, hemos empleado intestino delgado de rata de laboratorio para, mediante técnicas de descelularización, obtener biomateriales tubulares altamente biomiméticos con el tejido conectivo de la uretra humana.

En relación a la descelularización del tracto gastrointestinal, estudios previos demostraron que los biomateriales obtenidos mediante descelularización de intestino delgado de ratón pueden utilizarse como soporte para la reconstrucción de diferentes

órganos, incluyendo pulmón (Keckler *et al.*, 2007), uretra (Fiala *et al.*, 2007) y vagina (Lemos *et al.*, 2009). Probablemente, el uso de dichos materiales para propósitos clínicos es una consecuencia de la presencia de numerosos factores de crecimiento y citoquinas en estos biomateriales, incluyendo la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformador beta (TGF- β), y proteínas estructurales y funcionales que forman parte de la MEC nativa de mamíferos (Badylak, 2004). Por otro lado, el grupo de investigación de ingeniería tisular de la Universidad de Granada describió distintos protocolos de descelularización de intestino de ratón para su posterior aplicación a la ingeniería tisular de la córnea, demostrando que los protocolos más eficientes eran aquéllos que se basaban en el uso de SDS 0,1% y tritón X-100 como agentes descelularizantes (Oliveira *et al.*, 2013).

1.3. Técnicas de preservación de tejidos para uso diferido

Uno de los aspectos más importantes a considerar respecto de la ingeniería tisular es el desarrollo de métodos que permitan preservar los tejidos artificiales para uso diferido (Pornejad *et al.*, 2015). Aunque son numerosos los métodos y protocolos descritos para criopreservar algunos tipos de tejidos humanos en bancos de tejidos (Wang *et al.*, 2015), aún no se han desarrollado métodos efectivos para uso específico en ingeniería tisular. Entre los métodos más extendidos hasta el momento para la preservación de tejidos se encuentran la criopreservación y la liofilización.

1.3.1. Criopreservación

La criopreservación se define como el proceso por el cual las células o los tejidos son sometidos a bajas temperaturas, con el fin de conservar intactas sus estructuras y mantenerlos en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo (Pegg, 2007). Aunque estas técnicas ofrecen resultados satisfactorios a la hora de criopreservar células individuales (Elliott *et al.*, 2017), son muy ineficientes a la hora de criopreservar tejidos nativos o descelularizados, fundamentalmente por el efecto de los numerosos cristales de hielo que se suelen formar durante el proceso y que son capaces de alterar significativamente la estructura y composición de la MEC de estos tejidos (Rodríguez *et al.*, 2013). Para disminuir el efecto pernicioso de los cristales de

hielo sobre las estructuras criopreservadas, el proceso de criopreservación debe incluir un paso en el que las células o los tejidos son protegidos mediante el uso de un agente crioprotector específico. Los crioprotectores son sustancias hidrosolubles, de baja toxicidad, que disminuyen el punto de congelación. Bioquímicamente, es posible distinguir tres tipos de crioprotectores: los alcoholes (metanol, etanol, propanol, propanediol y glicerol), los azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa y trehalosa) y el dimetilsulfóxido (DMSO) (García, 1984; Porcu, 2001). Basados en estos y otros agentes, hasta el momento se ha descrito un gran número de protocolos diferentes que utilizan agentes crioprotectores diferentes.

Asimismo, estos agentes pueden ser penetrantes o no penetrantes, según su capacidad para atravesar la membrana celular:

- **Crioprotectores penetrantes:** Son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular. Los más utilizados son: el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el propanediol (PROH). El DMSO es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades crioprotectoras por Lovelock en 1959, el DMSO se ha usado como crioprotector. Su acción crioprotectora se atribuye principalmente a su habilidad de evitar la acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelación y la formación de cristales de hielo que pueden alterar significativamente la integridad de la membrana celular.

- **Crioprotectores no penetrantes:** Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, y ejercen su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular, logrando disminuir la posibilidad de ruptura de la membrana plasmática durante la congelación (Boiso, 2001; Meryman, 1971). Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se esperaría por su concentración molar. La adición de estos compuestos genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los agentes crioprotectores

y después se hidratan.

1.3.2. Liofilización

Para evitar los problemas relacionados con la presencia de agua en el tejido o estructura a preservar, se han desarrollado métodos basados en la desecación de dichas estructuras como la liofilización. La liofilización se basa en el fenómeno físico de la sublimación a bajas temperaturas del agua presente en el tejido. El objetivo de la liofilización es obtener un producto seco, que cuando se le vuelve a añadir agua o disolvente, presente las mismas características que el producto original.

Habitualmente, la liofilización se lleva a cabo en un equipo o instrumento denominado liofilizador, el cual consta de las siguientes partes (Figura 2):

-) Cámara seca o cámara de liofilización: es el lugar donde se coloca el tejido a liofilizar. Puede tener formas diferentes con compartimentos donde se realiza la sublimación, pasando el agua de sólido a vapor. El cierre es hermético y se trabaja bajo alto vacío.
-) Condensador con circuito de refrigeración: comunica con la cámara seca y es donde se condensa el vapor que se va produciendo en la sublimación. Un refrigerante lo mantiene a una temperatura más baja que la cámara seca (entre -50 y -125 °C).
-) Sistema de vacío: El vacío se produce con una bomba que trabaja sobre 10⁻² mbar conectada a una trampa para que no pasen vapores del solvente a su interior. El sistema de vacío elimina primero el aire de la cámara seca al iniciar el proceso de liofilización, y luego ayuda a la sublimación.

Hasta el momento, se han utilizado diferentes sistemas de liofilización para la preservación de diferentes fármacos, drogas y vacunas para uso humano (Hansen *et al.*, 2016; Thakkar *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017), así como algunos tipos de biomateriales (Julca *et al.*, 2012) y nanopartículas (Ball *et al.*, 2016). Sin embargo, su aplicación a células y tejidos humanos apenas ha sido estudiada y los resultados han sido, en su mayoría, muy poco satisfactorios.

En general, los productos obtenidos mediante liofilización tienden a ser muy higroscópicos y a tener escasa actividad biológica debido al proceso de desecación

(Wang, 2000; Julca *et al.*, 2012). Para reducir el daño generado durante la liofilización, diversos autores propusieron proteger los productos a liofilizar mediante el uso de agentes estabilizantes que incluyen distintos tipos de azúcares, aminoácidos y agentes surfactantes (Izutsu *et al.*, 1993; Wang, 2000; Arakawa *et al.*, 2007; Julca *et al.*, 2012).

La aplicación de técnicas de liofilización a tejidos generados mediante ingeniería tisular es muy reciente, habiéndose logrado algunos resultados prometedores mediante la liofilización de ciertos tipos de biomateriales para uso en tejidos duros, especialmente en hueso (Fereshteh *et al.*, 2016; Nakatani *et al.*, 2017). Asimismo, las técnicas de liofilización se han utilizado ocasionalmente para la generación de xenoinjertos descelularizados (Yang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Woon *et al.*, 2012; Hung *et al.*, 2013). Aunque esta técnica permite inactivar la mayor parte de las células presentes en el tejido a descelularizar, su eficiencia como agente descelularizante es limitada, por lo que es necesario combinar esta técnica con otros agentes descelularizantes tales como los detergentes aniónicos y no aniónicos (Oliveira *et al.*, 2013).

La aplicación de estas técnicas de liofilización a biomateriales obtenidos mediante descelularización permitirá determinar la utilidad de las mismas para la preservación a largo plazo de estos tipos de biomateriales y, por tanto, para su uso diferido en ingeniería tisular uretral.



Figura 2. Liofilizador utilizado para la preparación de muestras mediante desecación.

2. OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se han planteado los siguientes objetivos:

2.1. General

Optimizar y evaluar métodos de criopreservación y liofilización de biomateriales descelularizados capaces de preservar adecuadamente la matriz extracelular de estos biomateriales para su utilización en ingeniería tisular uretral.

2.2. Específicos

1. Generar biomateriales descelularizados utilizando protocolos basados en los agentes químicos SDS y Tritón X-100 útiles en ingeniería tisular de la uretra.
2. Evaluar la preservación de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de los biomateriales descelularizados sometidos a protocolos de criopreservación basados en dimetilsulfóxido.
3. Evaluar la preservación de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de los biomateriales descelularizados sometidos a protocolos de criopreservación basados en glicerol.
4. Evaluar la preservación de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de los biomateriales descelularizados sometidos a protocolos de criopreservación basados en los disacáridos maltosa, sacarosa y trehalosa.
5. Evaluar la preservación de componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de los biomateriales descelularizados sometidos a protocolos de liofilización basados en los disacáridos maltosa, sacarosa y trehalosa.
6. Establecer criterios de selección de los protocolos más eficientes para la preservación de biomateriales descelularizados para su utilización en ingeniería tisular uretral.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención de muestras de intestino delgado de ratas de laboratorio

Para la generación de biomateriales tubulares descelularizados, se procedió a extraer el intestino delgado de ratas Wistar macho adultas mantenidas en el animalario de la Unidad Experimental de Instituto Biosanitario ibs.GRANADA y el Complejo Hospitalario Universitario de Granada (Figura 3). Para ello, los animales fueron sometidos a anestesia general profunda y sacrificados mediante inyección intracardiaca de una solución 1M de cloruro potásico. Inmediatamente tras ello, se realizó laparotomía media y se extrajo el intestino delgado (Figura 4), del cual se obtuvieron un total de 138 fragmentos de intestino delgado de aproximadamente 1 cm de longitud. A continuación, las muestras obtenidas fueron lavadas con solución salina de fosfato tamponada (PBS) hasta que todos los detritos adheridos a la luz intestinal fueron completamente retirados (Figura 5).

Este trabajo se llevó a cabo bajo la conformidad con los protocolos de uso y cuidado animal de los comités de ética e investigación de la Universidad de Granada, España y guías nacionales y europeas.



Figura 3. Rata Wistar bajo anestesia general.



Figura 4. Muestra de intestino delgado.



Figura 5. Lavado de muestra con PBS.

3.2. Generación de biomateriales descelularizados de intestino delgado para utilización en ingeniería tisular

Una vez obtenidos los 138 fragmentos de intestino delgado, y con el fin de mantener su forma tubular, se colocó un segmento de tubo de silicona en la luz del intestino de cada muestra (Figura 6), la cual fue retirada antes de su análisis histológico. Tras ello, se procedió a aplicar dos protocolos de descelularización que demostraron utilidad para la obtención de xenoinjertos descelularizados de intestino de rata publicados en trabajos previos del grupo de Ingeniería Tisular (Oliveira *et al.*, 2013): la utilización de Tritón X-100 (0,1%) y de SDS (0,1%).

En primer lugar, cada muestra de intestino fue sumergida en uno de los dos agentes de descelularización durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se introdujeron de nuevo en soluciones de descelularización durante otras 24 horas. Finalmente, se efectuaron abundantes lavados con PBS hasta garantizar la total ausencia de agente descelularizante en el tejido. Las muestras de intestino descelularizado con SDS al 0,1% fueron llamadas SDIS, mientras que las muestras descelularizadas con Tritón X-100 al 0,1% se llamaron TDIS (Figura 7).

Todos los protocolos fueron llevados a cabo bajo inmersión en solución acuosa para evitar la pérdida de agua, que podría ocasionar cambios en la estructura del tejido (Badylak *et al.*, 2009), a temperatura ambiente y bajo agitación suave continua (Figura 7).

Como control, se utilizaron fragmentos de intestino nativo no descelularizado.



Figura 6. Muestra descelularizada con segmento de tubo de silicona en la luz intestinal.



Figura 7. Muestra de intestino delgado descelularizado con SDS al 0,1% (SDIS).

3.3. Preservación de los biomateriales descelularizados de intestino delgado

En la presente Tesis Doctoral se evaluaron 22 protocolos diferentes: 8 protocolos de liofilización (L1 a L8) y 14 protocolos de criopreservación (C1 a C14) que se describen en la Tabla 1. Para cada protocolo, se utilizaron 3 muestras de intestino descelularizadas con SDS al 0,1% (SDIS) y 3 muestras de intestino descelularizadas con Tritón X-100 al 0,1% (TDIS) escogidas al azar entre las 138 muestras obtenidas.

Asimismo, se utilizaron como controles 3 muestras de intestino descelularizadas con SDS al 0,1% (SDIS) y 3 muestras de intestino descelularizadas con Tritón X-100 al 0,1% (TDIS) no sometidas a ningún proceso de preservación (muestras CTR).

Grupo de estudio	Protocolo	Medio Basal	Dimetil sulfóxido (DMSO)	Glicerol	Albúmina	Suero Bovino Fetal	Trehalosa	Sacarosa	Maltosa
L1-PBS	Liofilización con PBS (control)	PBS							
L2	Liofilización con trehalosa 0.1M	PBS					3.42%		
L3	Liofilización con sacarosa 0.1 M	PBS						3.42%	
L4	Liofilización con maltosa 0.1 M	PBS							3.42%
L5	Liofilización en medio DMEM	DMEM							
L6	Liofilización con trehalosa 0.2 M	PBS					6.84%		
L7	Liofilización con sacarosa 0.2 M	PBS						6.84%	
L8	Liofilización con maltosa 0.2 M	PBS							6.84%
C1	Criopreservación en medio CUI	PBS	11.72%				3.42%		
C2	Criopreservación en medio Israel	RPMI		14.30%					
C3	Criopreservación para vasos sanguíneos humanos	TC-199	10.00%		25.00%				
C4	Criopreservación para células sanguíneas humanas	TC-199	20.00%		50.00%				
C5	Criopreservación para membrana amniótica humana	TC-199	15.00%		15.00%				
C6	Criopreservación para paratiroides humana	TC-199	8.00%		4.60%				
C7	Criopreservación para cultivos celulares humanos	DMEM	10.00%			10.00%			
C8-PBS	Criopreservación con PBS (control)	PBS							
C9	Criopreservación con trehalosa 0.1 M	PBS					3.42%		
C10	Criopreservación con trehalosa 0.2 M	PBS					6.84%		
C11	Criopreservación con sacarosa 0.1 M	PBS						3.42%	
C12	Criopreservación con sacarosa 0.2 M	PBS						6.84%	
C13	Criopreservación con maltosa 0.1 M	PBS							3.42%
C14	Criopreservación con maltosa 0.2 M	PBS							6.84%

Tabla 1. Protocolos de liofilización y criopreservación analizados en este trabajo. Cada grupo de estudio corresponde a un protocolo específico y la composición del medio protector utilizado se muestra en las columnas a la derecha.

3.3.1. Liofilización

Las muestras sometidas a liofilización (L-SDIS y L-TDIS) se sumergieron durante 1 hora en un agente estabilizante (trehalosa, sacarosa y maltosa) o en un medio control (medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle -DMEM- y PBS). Tras ello, fueron congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas durante 24 horas en un congelador E5300 Polaron equipado con un sistema de bomba de alto vacío.

El protocolo de liofilización empleado consistió en una secuencia de 6 ciclos: -100°C durante 6 horas, -70°C durante 1 hora, -50°C durante 4 horas, y un aumento progresivo de la temperatura a 25°C durante 12 horas. Este proceso fue llevado a cabo en alto vacío para permitir la sublimación del agua de las muestras.

Una vez concluido el proceso de liofilización, las muestras se mantuvieron en seco a temperatura ambiente durante 3 meses.

3.3.2. Criopreservación

Los protocolos de criopreservación utilizados en esta Tesis Doctoral y descritos en la Tabla 1 fueron seleccionados a partir de protocolos previamente establecidos y validados en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería para la preservación de distintos tipos de tejidos humanos procedentes de donantes (vasos sanguíneos, progenitores sanguíneos, membrana amniótica y paratiroides), así como de las publicaciones al respecto de Cui y colaboradores (Cui *et al.*, 2007) para la criopreservación de tejidos conectivos, de Ben-Bassat y colaboradores (Ben-Bassat *et al.*, 2000) para piel humana y de Serrato y colaboradores (Serrato *et al.*, 2009) para de tejidos artificiales. Como controles, algunas muestras se criopreservaron en medio de cultivo DMEM o en PBS.

En este caso, las muestras descelularizadas y sometidas a criopreservación (muestras C-SDIS y C-TDIS) se sumergieron en cada uno de los agentes crioprotectores descritos en la Tabla 1 durante 1 hora a 4°C. A continuación, se mantuvieron durante 48 horas a -20°C en el mismo agente, durante 48 horas a -80°C y, finalmente, fueron

mantenidas a temperatura de nitrógeno líquido (aproximadamente -195°C) durante 3 meses.

3.4. Análisis histológico e histoquímico de los biomateriales descelularizados de intestino delgado

Todas las muestras de intestino delgado descelularizado (criopreservadas, liofilizadas y controles no preservados) fueron analizadas histológicamente 3 meses después de su procesamiento. Para ello, las muestras liofilizadas fueron rehidratadas mediante inmersión en PBS durante 1h, mientras que las muestras sometidas a criopreservación fueron descongeladas a temperatura ambiente, tras lo cual se lavaron dos veces en PBS para eliminar el agente crioprotector.

Todas las muestras fueron posteriormente fijadas en formalina tamponada al 10%, deshidratadas, impregnadas en xileno e incluidas en parafina siguiendo protocolos estándar de laboratorio. En cada caso, se realizaron cortes de $5\mu\text{m}$ de espesor utilizando un micrótopo, las cuales fueron desparafinizadas en xileno durante 10 minutos (dos veces) y rehidratadas mediante diluciones seriadas de etanol hasta agua destilada. Tras ello, se procedió a la tinción de cada muestra con hematoxilina y eosina (HE) o a la realización de técnicas histoquímicas para el análisis de componentes de la MEC tal como se describe a continuación.

3.4.1. Análisis morfoestructural mediante tinción con hematoxilina y eosina (HE)

Para un análisis morfoestructural de cada muestra sometida a descelularización, las secciones tisulares rehidratadas fueron teñidas con hematoxilina durante 1 minuto y con eosina durante 3 minutos. Tras ello, se lavaron y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol, se impregnaron en xileno y se cubrieron con bálsamo histológico para su posterior análisis histológico mediante un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i.

De cada grupo de muestras se tomaron imágenes a baja magnificación (20x), las cuales fueron evaluadas por tres observadores independientes que clasificaron cada muestra como bien conservada (+++), conservada (++) o mal conservada (+) basado en la

morfología general de las muestras y en el número de roturas encontradas en la pared de cada muestra. Las muestras con la pared totalmente conservada se clasificaron como bien conservadas, mientras que las muestras con único punto de ruptura se clasificaron como conservadas y las muestras con más de una ruptura fueron consideradas como mal conservadas.

3.4.2. Método histoquímico con ácido periódico de Schiff (PAS)

La tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) permitió la identificación de glicoproteínas en la MEC de las muestras descelularizadas. Tras la rehidratación, las secciones tisulares fueron sumergidas en una solución de ácido periódico al 0,5% durante 10 minutos. Una vez realizada dicha inmersión, las muestras fueron incubadas en reactivo de Schiff durante 15 minutos en oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron contrastadas con hematoxilina de Harris durante 15 segundos. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas mediante alcoholes de concentración ascendente y xileno y montadas con bálsamo en cubreobjetos.

3.4.3. Método histoquímico azul alcian

Para la identificación del contenido de proteoglicanos en la MEC de las muestras del estudio, se realizó la tinción histoquímica mediante azul alcian. Las muestras fueron preparadas histológicamente hasta rehidratación tal y como se describió en el apartado anterior y se incubaron en solución de azul alcian a pH 2,5 durante 30 minutos. Una vez teñidas, fueron contrastadas con *nuclear fast red* durante 5 minutos y posteriormente se realizó la deshidratación, aclaramiento y montaje histológico.

3.4.4. Método histoquímico de picosirius

La tinción mediante picosirius es una técnica utilizada para identificar fibras de colágeno maduras. Las secciones histológicas previamente rehidratadas, se tiñeron durante 30 minutos en una solución de Sirius Red F3B y a continuación, fueron contrastadas con hematoxilina de Harris durante 3 minutos. Finalmente, las muestras

fueron sometidas a deshidratación con alcoholes de concentración ascendente y xileno, montándose con cubreobjetos utilizando medio de montaje histológico.

3.4.5. Método histoquímico reticulina de Gomori

Para la detección de fibras reticulares, otro de los componentes fibrilares fundamentales de la matriz extracelular, se utilizó el método de la reticulina de Gomori. Tras la rehidratación de las secciones tisulares, se realizó una impregnación con sales de plata, las cuales reducen sobre las fibras reticulares. Para ello, las muestras fueron sumergidas en permanganato de potasio al 1% durante 1 minuto. A continuación, fueron sometidas a sensibilización con alumbre de hierro al 2% durante 1 minuto e incubadas durante 15 minutos en oscuridad en plata amoniaca y formaldehído al 20% durante 3 minutos. Finalmente, la diferenciación se realizó en cloruro de oro al 2% durante 5 minutos y en hiposulfito de sodio al 2% durante 1 minuto, contrastándose con *nuclear fast red* durante 1 minuto. Finalmente, las muestras fueron sometidas a deshidratación utilizando alcoholes ascendentes, para su posterior impregnación en xileno y montaje.

3.4.6. Método histoquímico de orceína

Para la identificación de fibras elásticas en las muestras estudiadas, se empleó la tinción de orceína. Una vez rehidratadas, las muestras se sumergieron en solución de orceína durante 30 minutos. Posteriormente, fueron lavadas con alcohol al 70% y contrastadas con solución de contraste durante 5 minutos. Por último, se realizó la deshidratación, aclaramiento y montaje histológico.

3.5. Análisis cuantitativo y estadístico

En el caso de los componentes de la MEC de los tejidos descelularizados, se realizó un análisis cuantitativo de los resultados obtenidos mediante histoquímica. Para cada grupo experimental, se tomaron tres fotografías con una magnitud de 200X y 400X usando un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i. La cuantificación de la señal histoquímica de cada componente de la MEC se midió utilizando el software *ImageJ*, cuantificándose la intensidad de señal positiva de forma automática por el software. Para cada tinción y para cada muestra, se obtuvieron 45 mediciones, obteniéndose los valores medios correspondientes a cada grupo de estudio.

Para la cuantificación relativa respecto a los controles no sometidos a preservación, los valores medios de intensidad correspondientes a cada tinción y cada muestra fueron normalizados respecto a los valores medios obtenidos para los controles SDIS y TDIS no sometidos a ninguna técnica de preservación, que fueron considerados como valores máximos de intensidad (100%) para cada método histoquímico. Este método nos permitió determinar la intensidad de la tinción de cada muestra como un porcentaje de señal referido al control preestablecido como el valor máximo.

Para el análisis estadístico, primero se comprobó que cada distribución cumplía criterios de normalidad mediante el uso de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Por ese motivo, se utilizó la prueba *t de Student* para comparar los resultados encontrados para cada método histoquímico en cada grupo de estudio respecto a los controles no preservados de SDIS y TDIS. Se consideraron significativos aquellos valores *p* que resultaron menores de 0,05 para los tests de doble cola.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis morfoestructural de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.

Como se refleja en la Tabla 2 y en la Figuras 8 y 9, la mayoría de las muestras mantuvieron su morfología original después del procedimiento de preservación. Cuando se utilizó la liofilización, se encontró que la mayoría de las muestras tenían varias roturas para el L-SDIS, mientras que las de L-TDIS tendieron a mostrar una mayor integridad de la pared del intestino. Los métodos que mostraron los resultados más adecuados fueron L4, L5 y L6 para L-TDIS. Para las muestras criopreservadas, se encontraron muy pocas diferencias entre C-SDIS y C-TDIS, y los resultados señalaron que la criopreservación tiende a conservar de manera más eficiente la morfología y la integridad de la pared del intestino descelularizado. Los métodos que mostraron la mayor integridad de la estructura fueron C2, C3, C10 y C13 para ambos tipos de muestras, C1, C4, C7 y C12 para C-SDIS y C6, C9 y C11 para C-TDIS. Como era de esperar, las muestras control sometidas a criopreservación o liofilización sin agente protector (muestras control con PBS) mostraron los peores resultados, mientras que las muestras control no preservadas presentaron la mejor integridad tisular.

	L1-PBS	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8-PBS	C9	C10	C11	C12	C13	C14	CTR
SDIS	+	++	+	+	+	++	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++
TDIS	+	++	+	+++	+++	+++	+	+	++	+++	+++	++	++	+++	++	+	+++	+++	+++	+	+++	++	+++

Tabla 2. Resultados del análisis morfoestructural de los tejidos SDIS y TDIS sometidos a cada protocolo de preservación evaluado en este trabajo. Muestras bien conservadas (+++), conservadas (++) o mal conservadas (+).

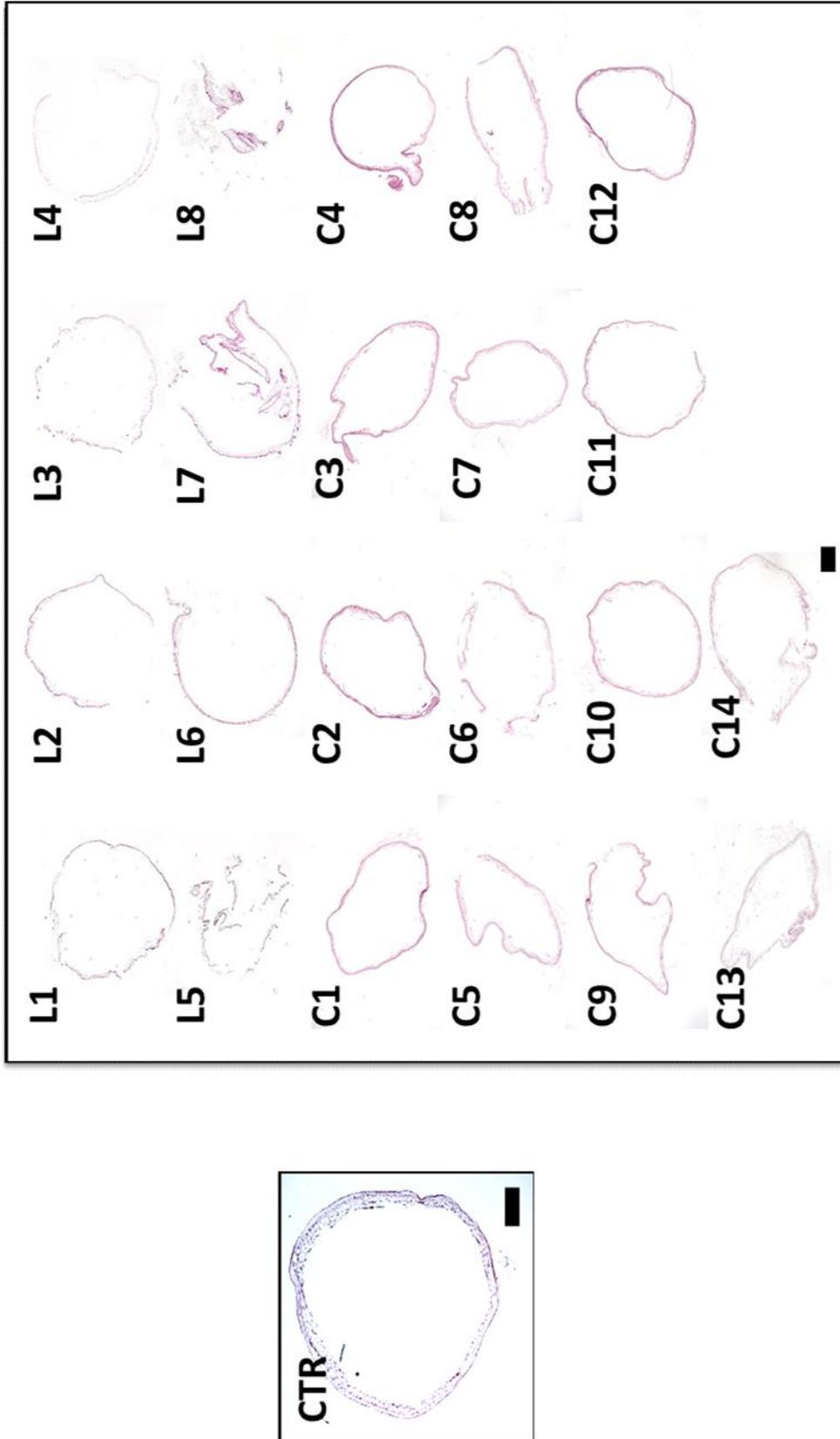


Figura 8. Análisis morfoestructural de las muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) sometido a diferentes métodos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a imágenes a baja magnificación de tejidos teñidos con hematoxilina-eosina. CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 1 mm.**

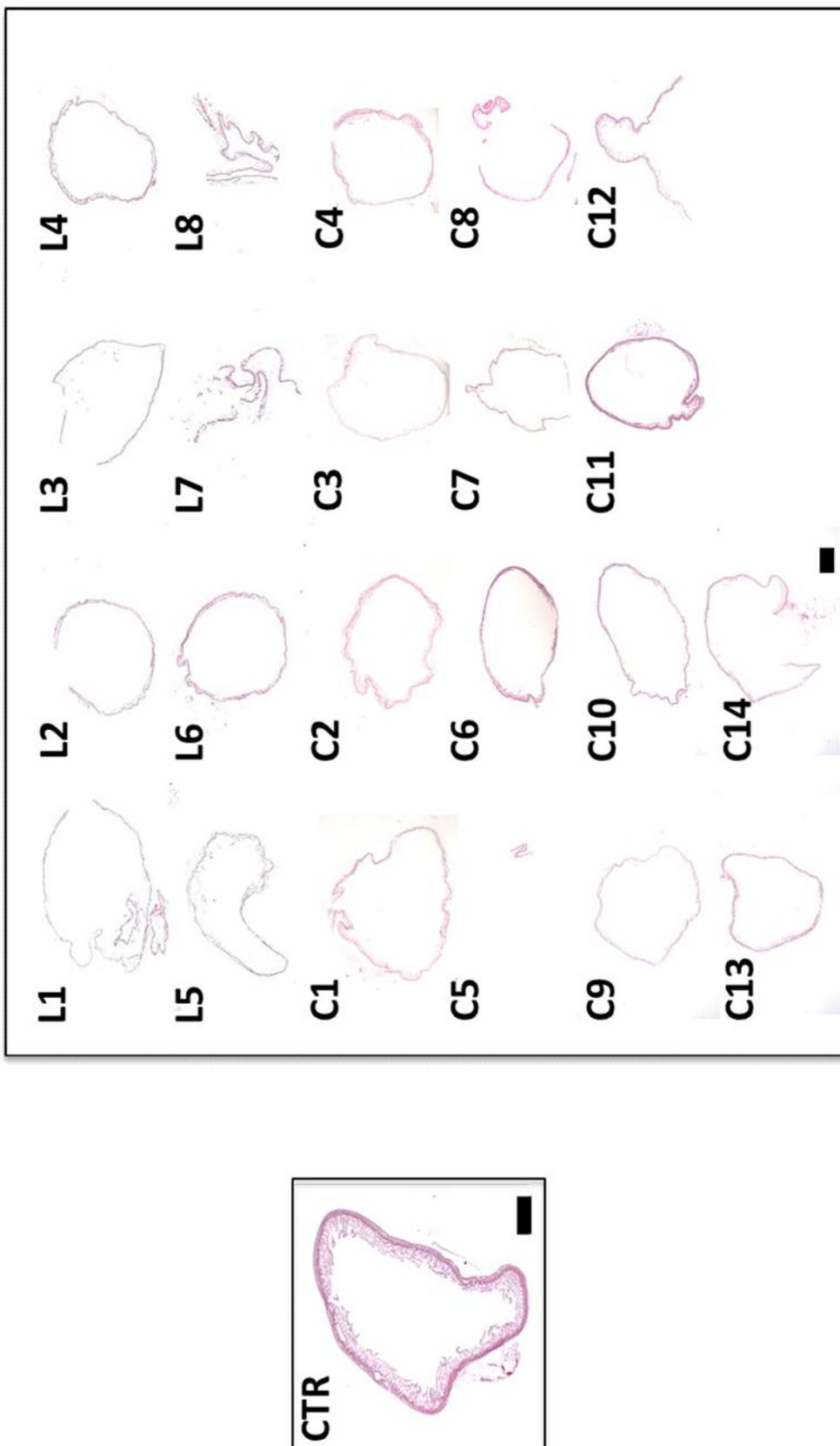


Figura 9. Análisis morfoestructural de las muestras de intestino descelularizado con tritón X-100 (TDIS) sometido a diferentes métodos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a imágenes a baja magnificación de tejidos teñidos con hematoxilina-eosina. CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 1 mm.**

4.2. Análisis de las glicoproteínas de las muestras descelerizadas sometidas a métodos de preservación.

El análisis histoquímico de la preservación de glicoproteínas en las muestras de SDIS y TDIS mediante tinción de PAS, puso de manifiesto que todas las muestras, incluyendo los controles negativos, tenían contenidos de glicoproteínas similares a las muestras control no preservadas (Tabla 3 y Figuras 10 y 11). El contenido promedio de glicoproteínas en comparación con los controles CTR fue 86.58% en C-SDIS y 75.31% en C-TDIS, mientras que para las muestras liofilizadas fue 91.69% para L-SDIS y 88.04% para L-TDIS.

SDIS	PAS %	PAS P	TDIS	PAS %	PAS P
L1-PBS	105.28	0.82582	L1-PBS	104.13	0.90774
L2	80.96	0.32574	L2	93.12	0.81469
L3	89.22	0.62939	L3	105.50	0.88697
L4	92.89	0.79003	L4	54.13	0.14592
L5	97.94	0.93516	L5	84.17	0.63570
L6	102.98	0.93877	L6	94.04	0.85254
L7	102.29	0.91400	L7	101.38	0.96718
L8	61.93	0.10703	L8	67.89	0.31993
C1	75.00	0.12593	C1	75.69	0.38565
C2	83.03	0.23657	C2	97.48	0.93866
C3	87.16	0.68239	C3	72.02	0.38438
C4	86.47	0.23698	C4	72.48	0.45786
C5	75.00	0.06434	C5	63.99	0.20702
C6	85.78	0.42114	C6	77.98	0.48307
C7	74.54	0.14389	C7	76.61	0.44044
C8-PBS	89.22	0.50646	C8-PBS	69.04	0.30421
C9	94.72	0.86625	C9	75.69	0.43920
C10	103.21	0.91291	C10	70.18	0.32040
C11	86.70	0.61679	C11	86.01	0.62068
C12	84.86	0.40508	C12	84.17	0.58304
C13	82.80	0.38426	C13	63.99	0.21728
C14	103.67	0.89753	C14	69.04	0.32025
CTR	100	1.00000	CTR	100	1.00000

Tabla 3. Análisis de los componentes de la matriz extracelular mediante tinción PAS en muestras de intestino descelerizado con SDS (SDIS) y con tritón X-100 (TDIS), sometidos a diferentes métodos de liofilización (L1 a L8) y protocolos de criopreservación (C1 a C14) y en los controles no preservados (CTR). Los valores en las columnas marcadas con % corresponden al porcentaje de la señal de la tinción para cada método en comparación con los controles CTR no preservados (considerados como 100%). Los valores en las columnas marcadas con P corresponden a los valores estadísticos de significación p para la comparación de cada protocolo frente a los controles CTR no preservados.

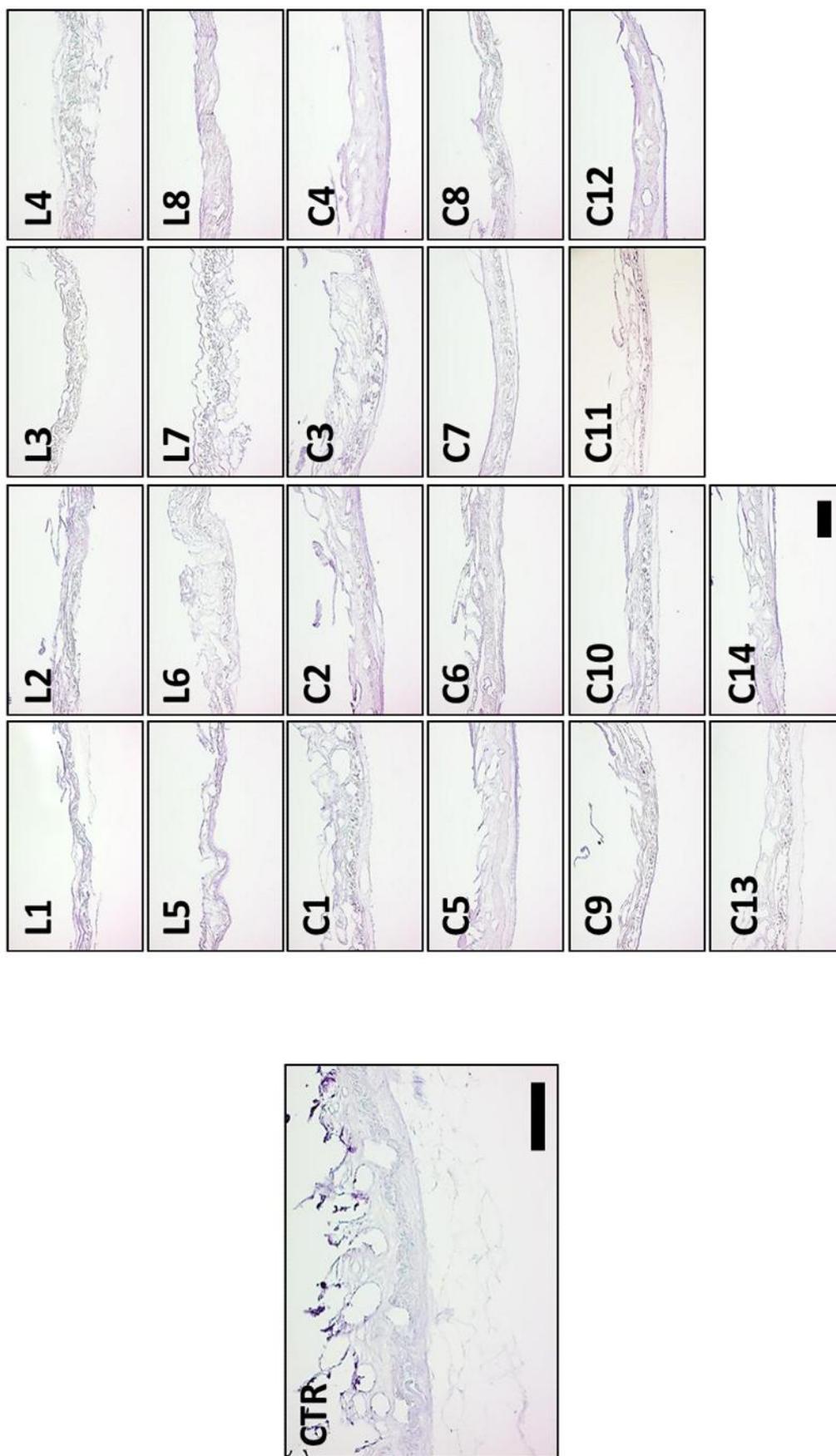


Figura 10. Análisis de glicoproteínas en las muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción PAS. CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 100µm**

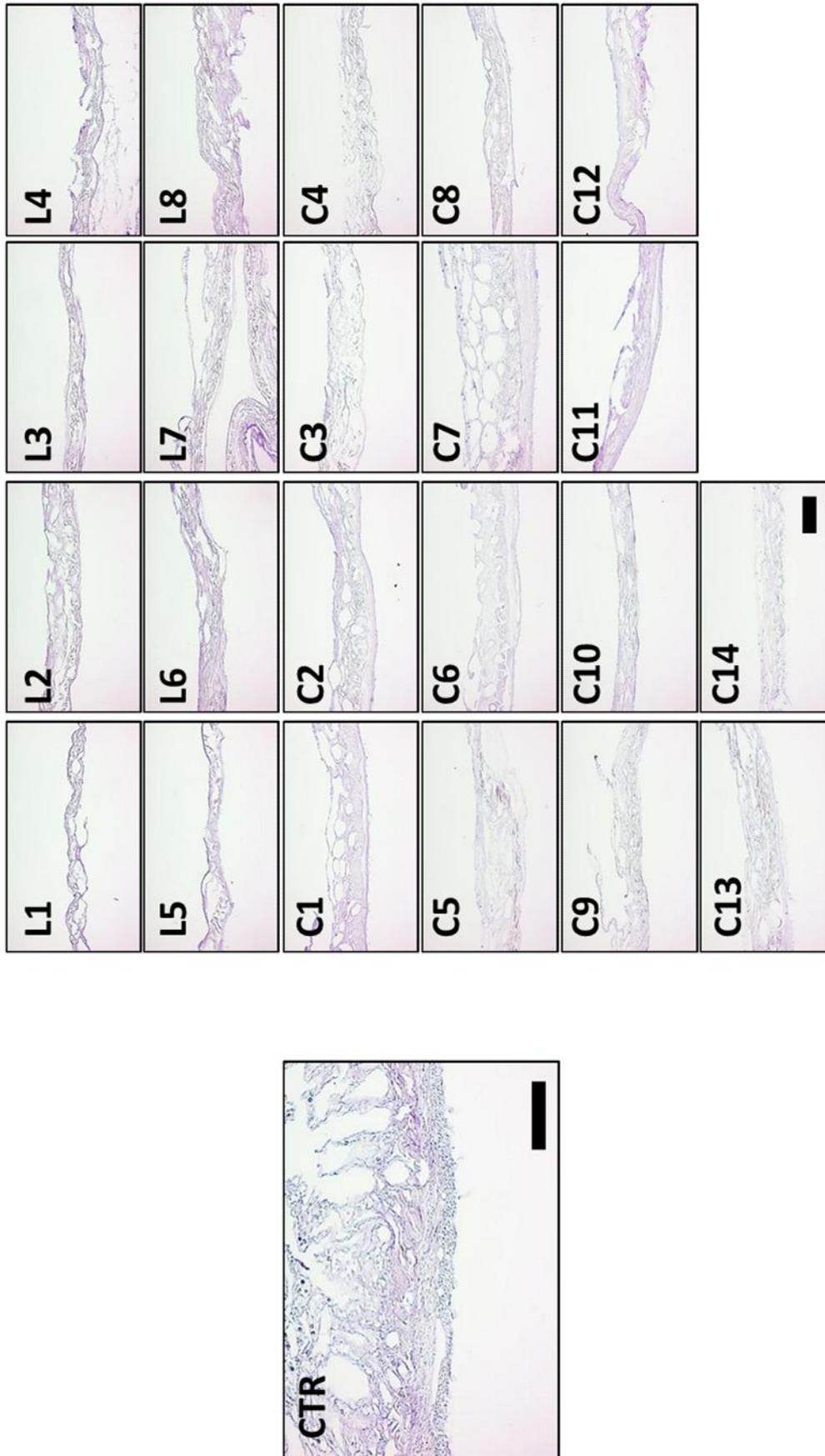


Figura 11. Análisis de glicoproteínas en las muestras de intestino descelularizado con triton X-100 (TDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción PAS. CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 100µm**

4.3. Análisis de los proteoglicanos de las muestras descelularizadas sometidas a preservación.

La evaluación de proteoglicanos se determinó mediante el análisis histoquímico con azul alcian. Los resultados se resumen en la Tabla 4 y en las Figuras 12 y 13. En general, las muestras liofilizadas sin agente protector (L1-PBS) mostraron menos de un tercio del contenido de proteoglicanos observado en las muestras control de intestino descelularizado sin preservación (CTR), tanto para L-SDIS como para L-TDIS. El contenido medio de estos componentes de la MEC respecto a las muestras CTR fue 70.90% para L-SDIS y 66,56% para L-TDIS. Las muestras de L-SDIS que mostraron diferencias no significativas con los controles fueron las sometidas a los protocolos L2, L3, L4, L6, L7 y L8, y sólo L5 mostró diferencias significativas. Para L-TDIS, los protocolos L2, L3, L6, L7 y L8 no tuvieron diferencias estadísticamente significativas con los controles, y sólo L4 y L5 mostraron diferencias significativas. Para los tejidos criopreservados, C-SDIS tuvo un contenido de proteoglicanos medio de 71,45% respecto a los controles y C-TDIS 63,19% de los controles. En el caso de la C-SDIS, sólo las muestras incluidas en los grupos C9, C13 y C14 tuvieron significativamente menos contenido de proteoglicanos que los controles. Para el grupo C-TDIS, los protocolos C9, C11, C12, C13 y C14 mostraron diferencias estadísticas con las muestras control sin preservar. Los protocolos de criopreservación que resultaron en contenidos más adecuados de proteoglicanos respecto al control CTR en ambos tipos de tejidos descelularizados (SDIS y TDIS) fueron C2, C4 y C7.

SDIS	AZUL ALCIÁN %	AZUL ALCIÁN P	TDIS	AZUL ALCIÁN %	AZUL ALCIÁN P
L1-PBS	27.92	0.00217*	L1-PBS	33.06	0.00057*
L2	108.26	0.75129	L2	78.23	0.25536
L3	107.41	0.79684	L3	70.64	0.13176
L4	84.33	0.60286	L4	42.30	0.00692*
L5	23.93	0.00100*	L5	50.31	0.01261*
L6	92.02	0.77542	L6	91.38	0.74958
L7	63.53	0.11087	L7	78.23	0.42827
L8	59.83	0.10277	L8	88.30	0.65163
C1	75.21	0.50930	C1	77.82	0.18413
C2	80.91	0.40303	C2	82.75	0.32767
C3	78.63	0.41825	C3	76.59	0.32301
C4	82.91	0.48411	C4	72.69	0.10920
C5	75.21	0.27620	C5	66.32	0.08352
C6	72.65	0.24140	C6	74.95	0.28308
C7	90.88	0.79794	C7	76.39	0.18457
C8-PBS	51.28	0.03804*	C8-PBS	52.36	0.01156*
C9	47.58	0.02963*	C9	30.60	0.00046*
C10	88.32	0.66735	C10	69.82	0.18662
C11	89.17	0.70750	C11	47.43	0.00825*
C12	91.74	0.77060	C12	56.88	0.03201*
C13	41.31	0.01090*	C13	48.05	0.00236*
C14	34.47	0.00324*	C14	51.95	0.00938*
CTR	100	1.00000	CTR	100	1.00000

Tabla 4. Análisis de los componentes de la matriz extracelular mediante tinción histoquímica con azul alción en muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) y con tritón X-100 (TDIS), sometidos a diferentes métodos de liofilización (L1 a L8) y protocolos de criopreservación (C1 a C14) y en los controles no preservados (CTR). Los valores en las columnas marcadas con % corresponden al porcentaje de la señal de la tinción para cada método en comparación con los controles CTR no preservados (considerados como 100%). Los valores en las columnas marcadas con P corresponden a los valores estadísticos de significación p para la comparación de cada protocolo frente a los controles CTR no preservados.

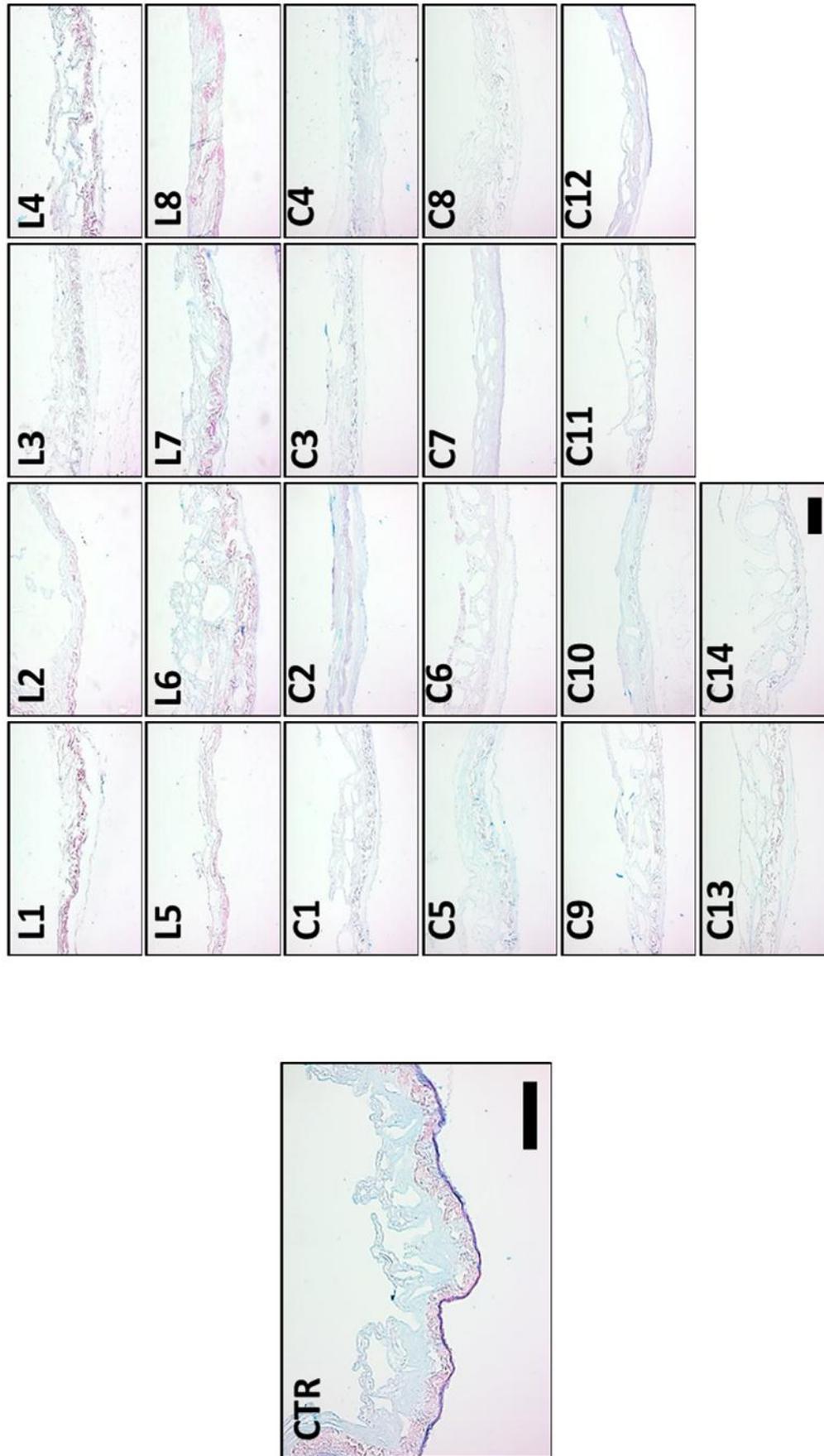


Figura 12. Análisis de proteoglicanos en las muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción azul alcian. CTR: muestras control no preservadas. Barra de escala: 100µm

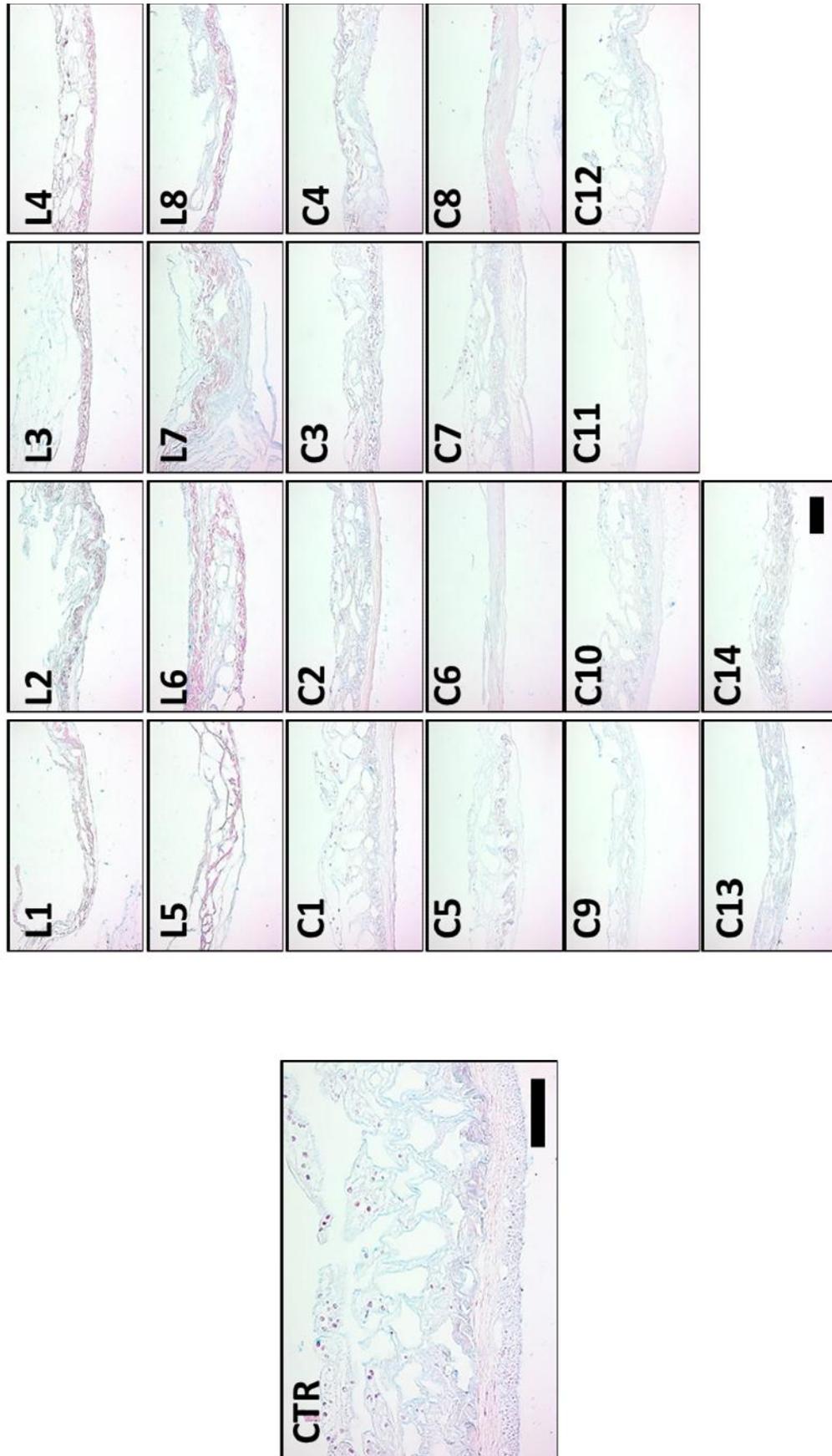


Figura 13. Análisis de proteoglicanos en las muestras de intestino descelularizado con triton X-100 (TDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción azul alcán. CTR: muestras control no preservadas. Barra de escala: 100µm

4.4. Análisis de las fibras de colágeno de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.

La cuantificación de las fibras de colágeno en la matriz extracelular de las muestras sometidas a la criopreservación y liofilización, mostró diferencias importantes entre los grupos de estudio. En primer lugar, las muestras liofilizadas sin agente de conservación (L1-PBS) mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles CTR sin preservación (Tabla 5 y Figuras 14 y 15), mostrando sólo un tercio del contenido de colágeno de los controles para L-SDIS y la mitad de este contenido para L-TDIS. El contenido promedio de colágeno fue 63.61% y 83.50% respecto a CTR para L-SDIS y L-TDIS, respectivamente. Curiosamente, los grupos de L-SDIS correspondientes a L2, L3 y L7, y los grupos de L-TDIS de L2, L3, L4, L6 y L7 no tenían diferencias estadísticas en comparación con las muestras controles. En cuanto a los tejidos sometidos a criopreservación sin agente protector (C8-PBS) mostraron entre 62,47% y 55,67% del contenido de colágeno respecto a los controles para C-SDIS y C-TDIS, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas. La media de contenido de colágeno de las muestras criopreservadas C-SDIS fue 68.78% y 76,51% para C-TDIS. Los protocolos de criopreservación con niveles de contenido de colágeno que no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a las muestras control fueron C2, C3, C5, C6, C11 y C12 para C-SDIS y C3, C4, C5, C6, C7, C12, C13 y C14 para C -TDIS.

SDIS	PICROSIRIUS %	PICROSIRIUS P	TDIS	PICROSIRIUS %	PICROSIRIUS P
L1-PBS	36.38	0.00122*	L1-PBS	54.08	0.01506*
L2	82.69	0.06430	L2	94.00	0.72414
L3	87.09	0.05007	L3	88.83	0.53346
L4	43.54	0.00004*	L4	99.33	0.94959
L5	65.25	0.00069*	L5	66.50	0.00634*
L6	53.68	0.00051*	L6	100.00	1.00000
L7	75.73	0.05750	L7	103.17	0.72069
L8	64.50	0.04884*	L8	62.08	0.00774*
C1	69.51	0.00549*	C1	63.83	0.02376*
C2	82.49	0.12659	C2	67.17	0.01525*
C3	82.62	0.30274	C3	84.08	0.24389
C4	47.40	0.00222*	C4	87.50	0.46243
C5	74.44	0.05507	C5	89.75	0.52840
C6	99.73	0.97556	C6	99.92	0.99650
C7	44.15	0.00001*	C7	86.00	0.42667
C8-PBS	62.47	0.01465*	C8-PBS	55.67	0.00873*
C9	46.38	0.00478*	C9	50.33	0.00665*
C10	41.24	0.00003*	C10	64.67	0.01442*
C11	105.81	0.22264	C11	72.17	0.00855*
C12	95.61	0.64448	C12	73.42	0.08648
C13	53.75	0.00632*	C13	72.00	0.05463
C14	57.34	0.00846*	C14	104.58	0.69811
CTR	100	1.00000	CTR	100	1.00000

Tabla 5. Análisis de los componentes de la matriz extracelular mediante el método histoquímico picrosirius en muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) y con tritón X-100 (TDIS), sometidos a diferentes métodos de liofilización (L1 a L8) y protocolos de criopreservación (C1 a C14) y en los controles no preservados (CTR). Los valores en las columnas marcadas con % corresponden al porcentaje de la señal de la tinción para cada método en comparación con los controles CTR no preservados (considerados como 100%). Los valores en las columnas marcadas con P corresponden a los valores estadísticos de significación p para la comparación de cada protocolo frente a los controles CTR no preservados.

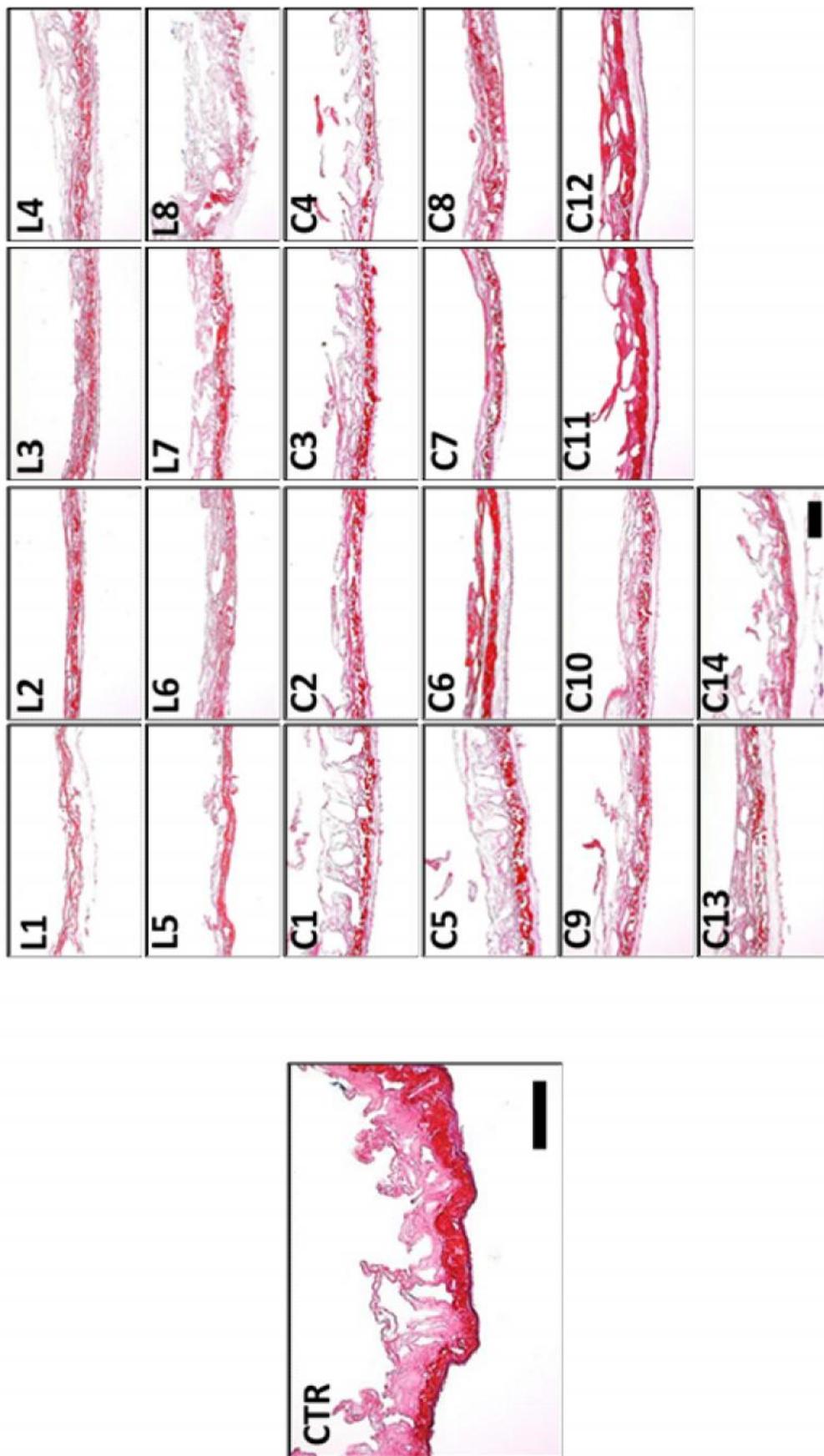


Figura 14. Análisis de fibras de colágeno en las muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción picrosirius. CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 100µm**

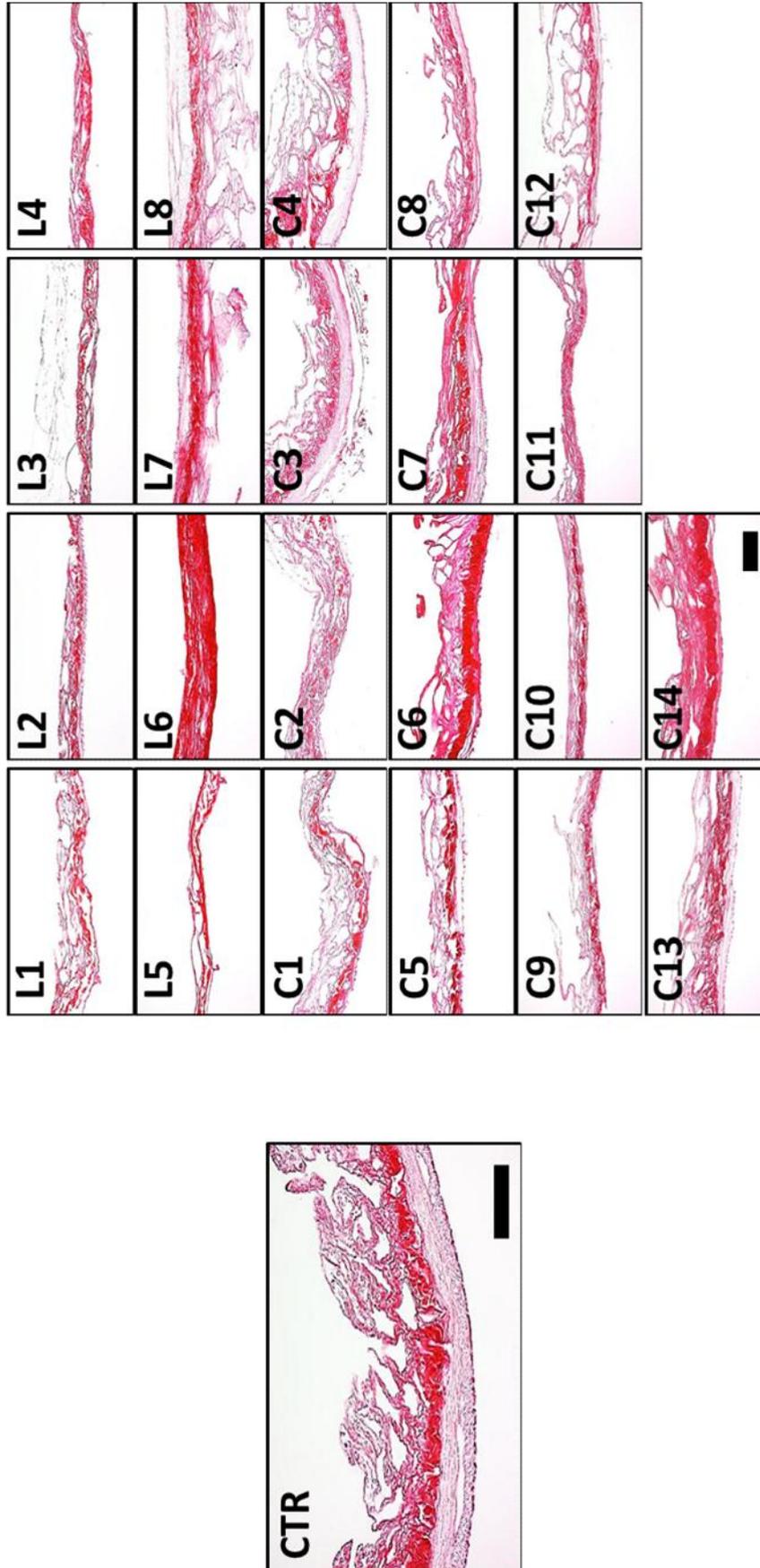


Figura 15. Análisis de fibras de colágeno en las muestras de intestino descelularizado con tritón X-100 (TDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción picrosirius. CTR: muestras control no preservadas. Barra de escala: 100µm

4.5. Análisis de las fibras de reticulina de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.

La preservación de fibras reticulares determinada mediante el método histoquímico reticulina de Gomori, mostró en general que los métodos de liofilización fueron más eficientes que los métodos de criopreservación. Para la liofilización, las muestras L1-PBS sin agente de conservación mostraron diferencias significativas con los controles, con el 38.33% del contenido de reticulina respecto a los controles CTR para L-SDIS y 33,57% para L-TDIS (Tabla 6 y Figuras 16 y 17). El contenido medio de reticulina en L-SDIS fue 65.94% respecto a los controles y 47.60% en L-TDIS. La mayoría de las muestras no tuvieron diferencias estadísticas con los controles, con la excepción de L5 para L-SDIS y L5 y L8 para L-TDIS. En cuanto a las muestras de intestino descelularizado criopreservado en ausencia de agente crioprotector (C8-PBS), C-SDIS sólo mostró el 38,81% del contenido de reticulina observado en el control, mientras que C-TDIS presentaba el 43,21%. Las muestras que no mostraron diferencias estadísticas respecto a los controles fueron aquéllas tratadas con los protocolos C3, C6, C7, C13 y C14 para C-SDIS y C6, C7, C13 y C14 para C-TDIS. El contenido medio de reticulina fue del 46.45% del control CTR para C-SDIS y del 45.25% para C-TDIS.

SDIS	RETICULINA %	RETICULINA P	TDIS	RETICULINA %	RETICULINA P
L1-PBS	38.33	0.03476*	L1-PBS	33.57	0.03479*
L2	102.42	0.93267	L2	49.25	0.14747
L3	59.58	0.31291	L3	54.59	0.09038
L4	79.23	0.59063	L4	70.85	0.32036
L5	39.94	0.04583*	L5	44.83	0.03710*
L6	54.59	0.16239	L6	50.87	0.05803
L7	76.97	0.53932	L7	55.17	0.10341
L8	76.49	0.53044	L8	21.72	0.01004*
C1	29.47	0.01602*	C1	43.55	0.03235*
C2	41.87	0.04248*	C2	37.51	0.01728*
C3	59.58	0.25770	C3	41.46	0.03406*
C4	35.75	0.02643*	C4	43.90	0.03152*
C5	23.67	0.01088*	C5	28.11	0.00997*
C6	85.02	0.64918	C6	51.68	0.05055
C7	86.15	0.60243	C7	51.10	0.06363
C8-PBS	38.81	0.03469*	C8-PBS	43.21	0.02725*
C9	22.71	0.01014*	C9	38.91	0.01941*
C10	22.06	0.00955*	C10	32.29	0.01258*
C11	32.05	0.01947*	C11	50.52	0.04666*
C12	36.55	0.02766*	C12	44.02	0.02606*
C13	70.53	0.32483	C13	73.17	0.27382
C14	66.02	0.23795	C14	54.01	0.07522
CTR	100	1.00000	CTR	100	1.00000

Tabla 6. Análisis de los componentes de la matriz extracelular mediante el método histoquímico para reticulina de Gomori en muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) y con tritón X-100 (TDIS), sometidos a diferentes métodos de liofilización (L1 a L8) y protocolos de criopreservación (C1 a C14) y en los controles no preservados (CTR). Los valores en las columnas marcadas con % corresponden al porcentaje de la señal de la tinción para cada método en comparación con los controles CTR no preservados (considerados como 100%). Los valores en las columnas marcadas con P corresponden a los valores estadísticos de significación p para la comparación de cada protocolo frente a los controles CTR no preservados.

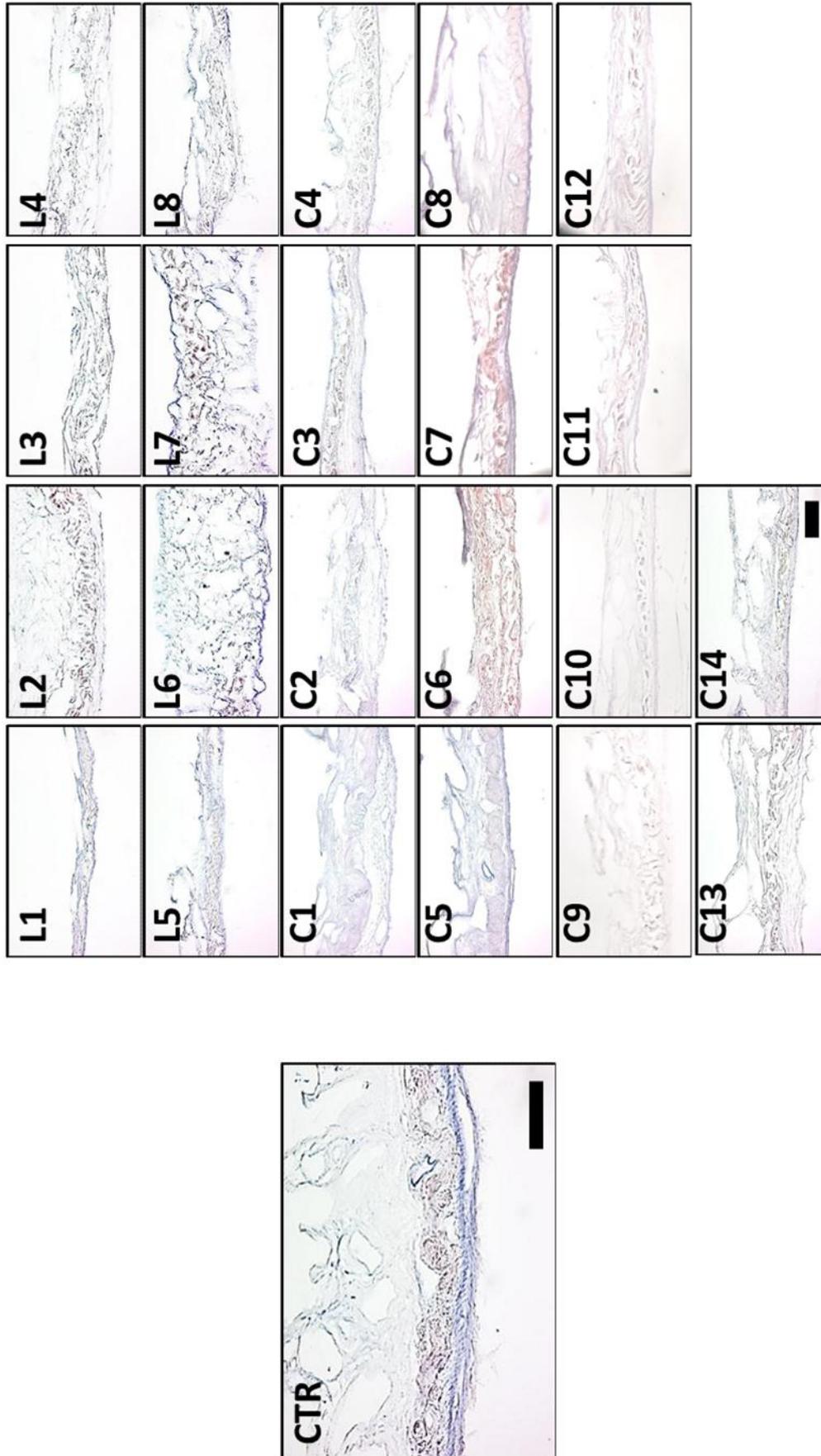


Figura 16. Análisis de fibras reticulares en las muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción reticulina de Gomori. CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 100µm**

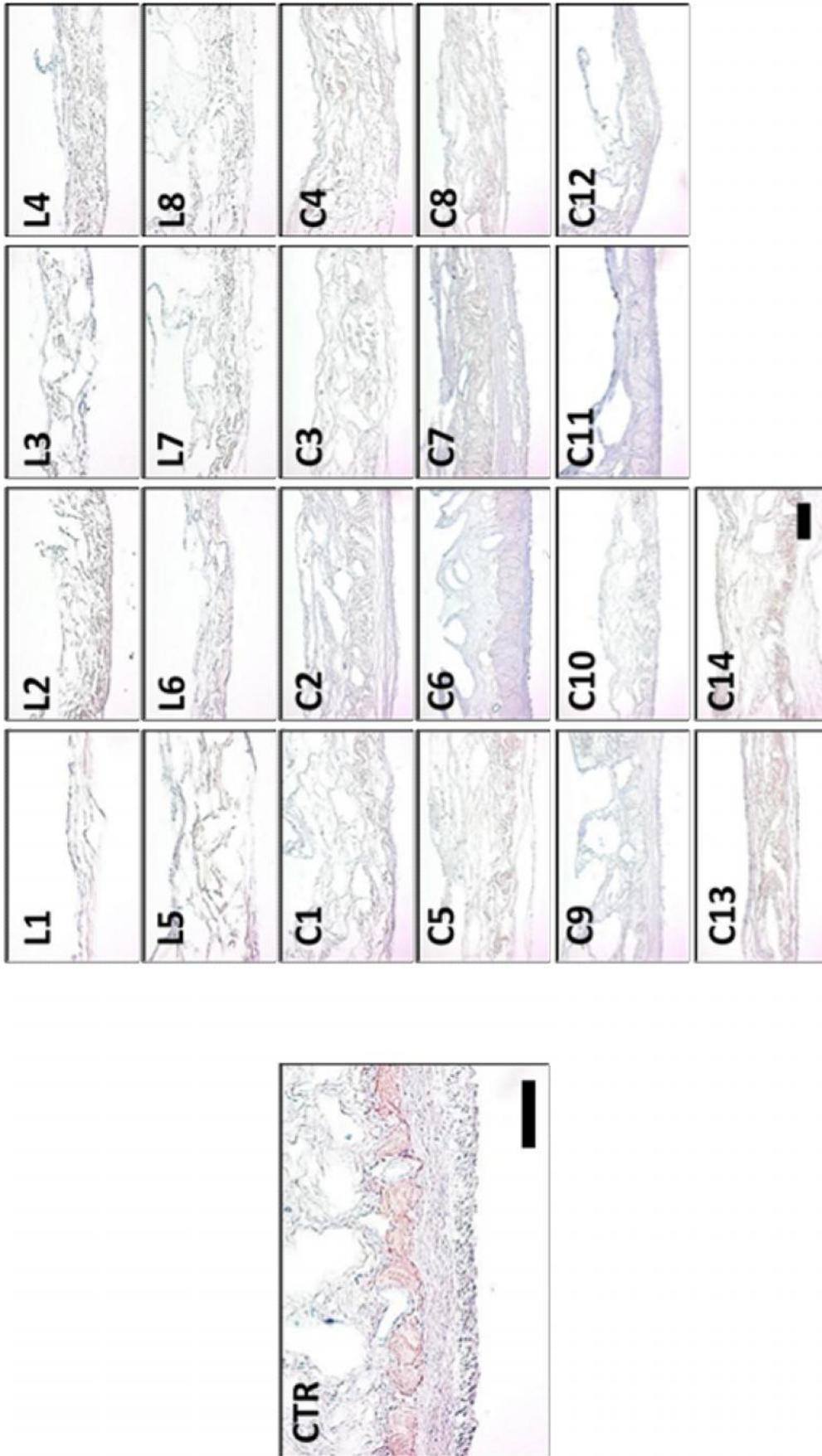


Figura 17. Análisis de fibras reticulares en las muestras de intestino descelularizado con tritón X-100 (TDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción reticulina de Gomori. CTR: muestras control no preservadas. Barra de escala: 100 μ m

4.6. Análisis de las fibras elásticas de las muestras descelularizadas sometidas a métodos de preservación.

El análisis del contenido de fibras elásticas mediante tinción histoquímica de orceína, mostró varias diferencias con los controles tanto en las muestras liofilizadas como en las criopreservadas. En primer lugar, las muestras L1-PBS tuvieron diferencias significativas con los controles, mostrando 27,84% de contenido de fibras elásticas para L-SDIS y 37,43% para L-TDIS en comparación con los controles sin preservación (Tabla 7 y Figuras 18 y 19). L-SDIS mostró un valor medio de 50,46% de fibras elásticas respecto a los controles y L-TDIS, un 60,49%. Los protocolos L2, L4, L6, L7 y L8 se asociaron a contenidos de fibras elásticas que no difirieron significativamente de los controles para L-SDIS, mientras que L2, L3, L4, L6 y L8 no mostraron diferencias significativas con los controles para L-TDIS. En las muestras criopreservadas, los tejidos C8-PBS (sin ningún agente crioprotector) mostraron diferencias estadísticamente significativas con los controles, con menos del 40% del contenido de elastina tanto para C-SDIS como para C-TDIS. El contenido promedio de elastina de C-SDIS fue 60,33% del total de los controles y del 59,60% para C-TDIS. Las muestras cuyo contenido de fibras elásticas no fue significativamente diferente a la de los controles fueron C2, C6, C7, C11, C12 y C14 para C-SDIS y C2, C4, C6, C7, C11, C12, C13 y C14 para C-TDIS.

SDIS	ORCEÍNA %	ORCEÍNA P	TDIS	ORCEÍNA %	ORCEÍNA P
L1-PBS	27.84	0.00188*	L1-PBS	37.43	0.03156*
L2	73.08	0.32341	L2	66.75	0.24355
L3	34.02	0.01373*	L3	63.22	0.26027
L4	69.07	0.33610	L4	93.32	0.85063
L5	19.82	0.00044*	L5	22.64	0.00978*
L6	52.46	0.11067	L6	85.99	0.71557
L7	69.19	0.16668	L7	29.45	0.01494*
L8	58.19	0.16313	L8	85.08	0.69942
C1	42.73	0.01278*	C1	38.74	0.02998*
C2	59.68	0.08231	C2	81.54	0.51879
C3	31.16	0.00252*	C3	45.29	0.04627*
C4	30.36	0.00184*	C4	86.39	0.66899
C5	53.49	0.02427*	C5	29.71	0.01549*
C6	61.74	0.08096	C6	87.17	0.67234
C7	84.31	0.54118	C7	83.38	0.57776
C8-PBS	39.86	0.00370*	C8-PBS	39.66	0.03290*
C9	44.67	0.01011*	C9	42.80	0.03757*
C10	60.60	0.03524*	C10	33.38	0.02069*
C11	109.62	0.58596	C11	66.36	0.21141
C12	106.64	0.71109	C12	57.07	0.13341
C13	54.30	0.02337*	C13	94.24	0.85512
C14	65.52	0.11838	C14	48.69	0.07789
CTR	100	1.00000	CTR	100	1.00000

Tabla 7. Análisis de los componentes de la matriz extracelular mediante tinción histoquímica para orceína en muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) y con tritón X-100 (TDIS), sometidos a diferentes métodos de liofilización (L1 a L8) y protocolos de criopreservación (C1 a C14) y en los controles no preservados (CTR). Los valores en las columnas marcadas con % corresponden al porcentaje de la señal de la tinción para cada método en comparación con los controles CTR no preservados (considerados como 100%). Los valores en las columnas marcadas con P corresponden a los valores estadísticos de significación p para la comparación de cada protocolo frente a los controles CTR no preservados.

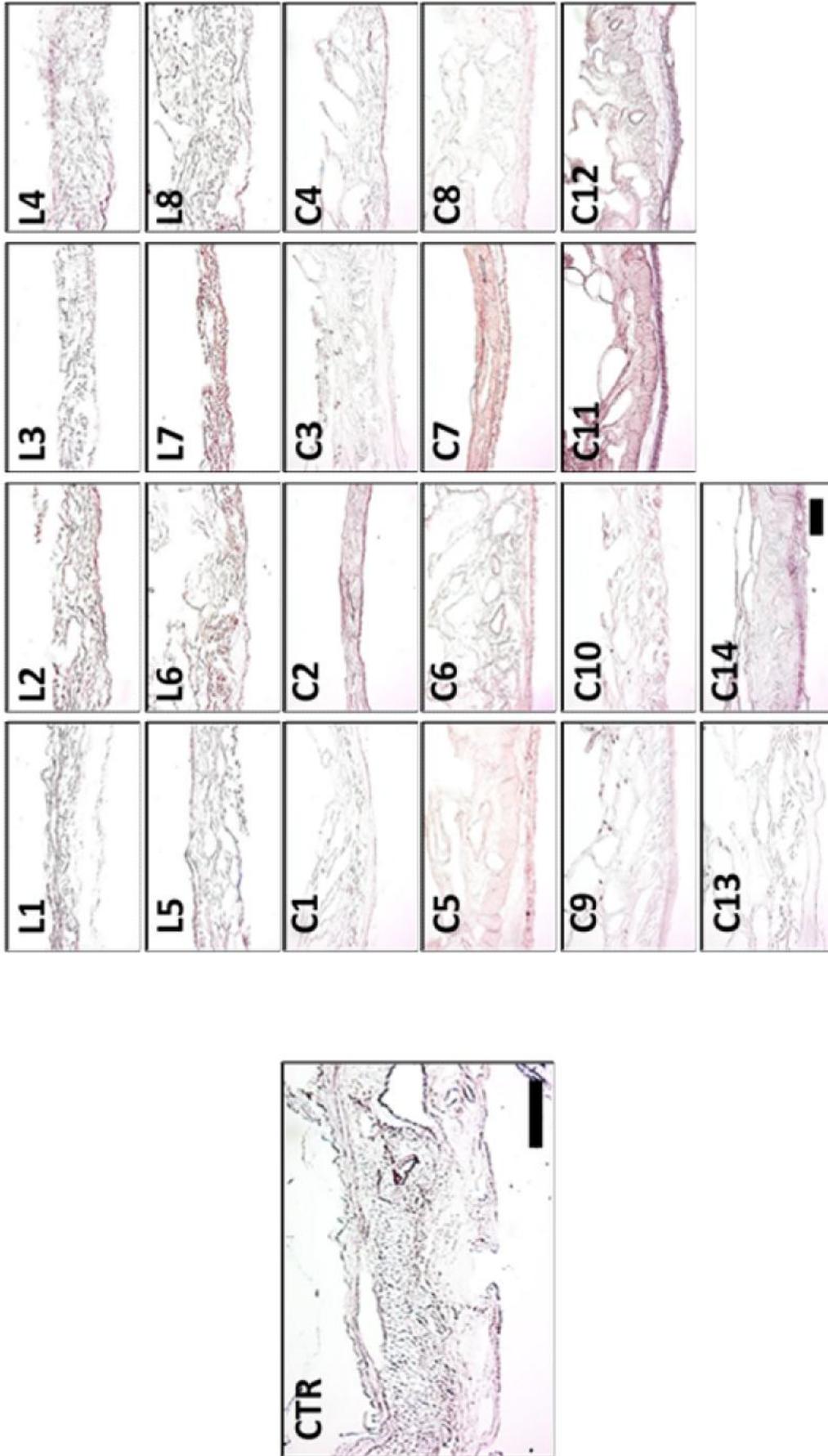


Figura 18. Análisis de fibras elásticas en las muestras de intestino descelularizado con SDS (SDIS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción de orceína. CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 100µm**

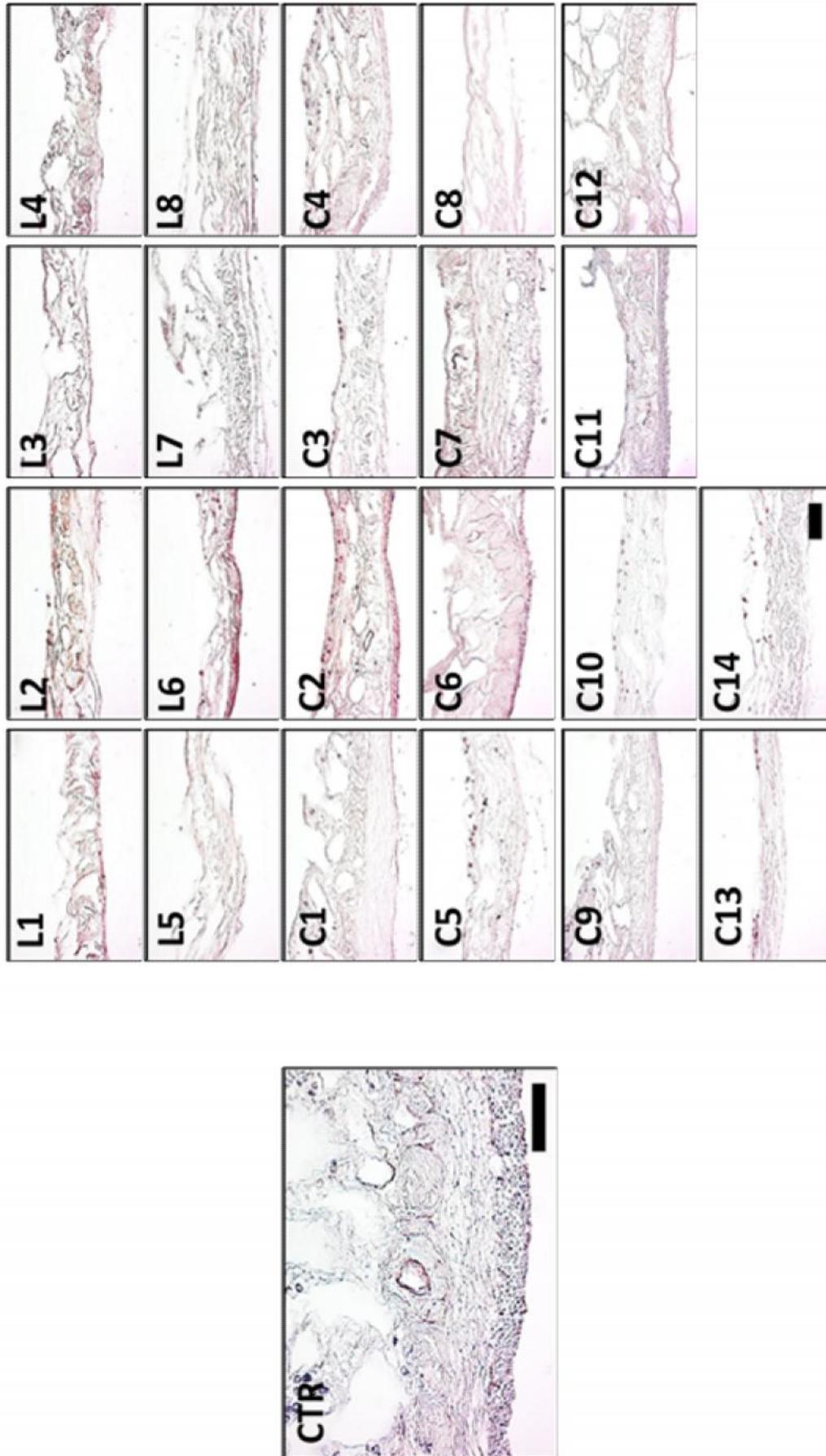


Figura 19. Análisis de fibras elásticas en las muestras de intestino descelularizado con tritón X-100 (TDS) sometido a diferentes protocolos de liofilización (L1 a L8) y criopreservación (C1 a C14). Las imágenes corresponden a tinción de orceína CTR: muestras control no preservadas. **Barra de escala: 100 μ m**

5. DISCUSIÓN

El reciente desarrollo de las técnicas de descelularización ha permitido disponer de nuevos biomateriales altamente biomiméticos y biocompatibles para su utilización en protocolos de ingeniería tisular de la uretra y otras estructuras humanas (Simões *et al.*, 2017).

El mantenimiento de la estructura y composición de la MEC del tejido original es uno de los principales retos de la descelularización tisular (Scarritt *et al.*, 2015). Tanto el proceso de descelularización como la aplicación diferida del biomaterial, pueden alterar significativamente la estructura y composición molecular de estos materiales. De hecho, trabajos previos demostraron que los tejidos descelularizados suelen mantener ciertos componentes tales como colágeno, laminina, elastina y fibronectina, pero los factores de crecimiento y otras proteínas importantes pueden reducirse y alterarse (Caralt *et al.*, 2015; Scarritt *et al.*, 2015). Anteriormente se demostró que los injertos intestinales descelularizados se pueden utilizar como matrices útiles en ingeniería tisular de diversos órganos como la córnea, la vejiga urinaria o la uretra, y los agentes de descelularización más eficientes en el caso de intestino de rata demostraron ser el SDS y el Tritón X-100 al 0,1% (Oliveira *et al.*, 2013).

Aunque los biomateriales descelularizados ofrecen nuevas posibilidades para la generación de tejidos y órganos bioartificiales mediante ingeniería tisular, una de sus limitaciones principales es la dificultad para su uso diferido y almacenamiento en bancos de tejidos, debido al estado altamente hidratado de estos materiales y a la probabilidad de contaminación microbiológica, degradación por hidrólisis, inestabilidad físico-química y la pérdida de actividad biológica (Morais *et al.*, 2016). Por esta razón, en la presente Tesis Doctoral hemos evaluado varios protocolos de preservación previamente descritos y de uso común para la preservación de productos para uso clínico, para determinar si estos materiales descelularizados pueden ser almacenados para aplicaciones futuras.

En primer lugar, las muestras de intestino descelularizadas se sometieron a liofilización, técnica mediante la cual se eliminó el agua del tejido por sublimación en alto vacío (Morais *et al.*, 2016) para generar un biomaterial estable y completamente seco. Este método se utiliza comúnmente para la conservación a largo plazo de vacunas

(Hansen *et al.*, 2015) y otros productos biológicos, ya que los productos liofilizados son muy estables y son fáciles de transportar y almacenar (Morais *et al.*, 2016) y pueden esterilizarse con óxido de etileno o radiación gamma (Sheridan *et al.*, 2013). En segundo lugar, utilizamos la criopreservación. Este método mantiene tejidos y órganos muy por debajo de 0°C, y permite el almacenamiento a largo plazo de aloinjertos humanos en bancos de tejidos (Jashari *et al.*, 2013). Aunque ambos métodos permiten el almacenamiento a largo plazo de tejidos y órganos, es bien sabido que la estructura y composición del tejido nativo puede ser modificada por el proceso, alterándose la microestructura y las propiedades mecánicas de la MEC debido a la formación de cristales de hielo o al proceso de desecación (Karlsson y Toner, 1996).

En nuestro trabajo, se encontró que la apariencia morfoestructural de todos los tejidos descelularizados varía entre los diferentes grupos de estudio. En general, los protocolos de criopreservación tuvieron más éxito que la liofilización en la preservación de la estructura y morfología de los tejidos. De hecho, numerosos protocolos de criopreservación fueron capaces de mantener eficazmente la estructura de los tejidos descelularizados. Los métodos basados en la liofilización son muy eficientes, pero durante el proceso de congelación previa se puede formar un gran cristal de hielo en la estructura del tejido que podría alterar la MEC y crear heterogeneidad en el tejido (Nail *et al.*, 2002). Por lo tanto, no es sorprendente que los tejidos liofilizados tengan más alteraciones morfoestructurales que los tejidos criopreservados. A pesar de ello, hemos sido capaces de identificar varios protocolos de liofilización y criopreservación que dan como resultado niveles adecuados de preservación de la morfología y la estructura, lo que sugiere que la histomorfología del intestino descelularizado se mantiene con la mayoría de los protocolos.

A nivel histológico, se encontró que los resultados correspondientes a los tejidos descelularizados con SDS y tritón X-100 (SDIS y TDIS) tuvieron resultados muy similares, encontrándose diferencias sólo para algunos componentes específicos de la MEC y para determinados protocolos. Esto sugiere que la capacidad histoprotectora de cada protocolo de preservación es independiente del método de descelularización utilizado para obtener los biomateriales SDIS y TDIS y que ambos tipos de tejidos se pueden

almacenar para su uso retardado. Por otro lado, cuando analizamos el contenido de glicoproteínas y proteoglicanos, probablemente las moléculas no fibrilares más abundantes de la MEC, encontramos que estos componentes se conservaron adecuadamente con el uso de la mayoría de los protocolos de preservación, con la única excepción de los proteoglicanos para algunos protocolos. El hecho de que las glicoproteínas no se vean afectadas por la preservación, incluso en ausencia de un agente protector, y que los proteoglicanos estén protegidos eficazmente con el uso de la mayoría de los protocolos, sugiere que los componentes de la MEC no fibrilares pueden ser más estables y resistentes a la liofilización y la criopreservación que los componentes fibrilares. Estudios previos demostraron que la criopreservación de válvulas aórticas descelularizadas no afectó significativamente el contenido de la mayoría de los proteoglicanos, aunque ciertos proteoglicanos asociados interfibrilares sí podrían verse alterados (Narine *et al.*, 2006). De forma similar, estudios realizados sobre cartílago no descelularizado mostraron que el ácido hialurónico (uno de los glicosaminoglicanos más abundantes) puede ser criopreservado usando algunos crioprotectores específicos (Geraghty *et al.*, 2015).

Por otro lado, nuestro análisis de los componentes fibrilares de la MEC mostró que éstos pueden ser alterados por el proceso de preservación más intensamente que las moléculas no fibrilares, aunque existe variabilidad. La evaluación de los resultados encontró que los protocolos L2 y C6 fueron capaces de preservar adecuadamente los tres componentes fibrilares evaluados (colágeno, fibras reticulares y fibras elásticas), tanto en SDIS como en TDIS, mientras que L3, L4, L6, L7, C7 y C14 conservaron estos componentes en todos los grupos de estudio excepto en uno. Además, el colágeno fue el componente fibrilar que mostró menos alteración tras la liofilización y la criopreservación, siendo las fibras reticulares las más alteradas. Trabajos previos de Giannini y colaboradores (Giannini *et al.*, 2008) demostraron la disminución del número de fibras de colágeno después de la criopreservación de tejidos nativos ricos en colágeno, aunque las alteraciones no fueron muy importantes y afectaron principalmente al diámetro de las fibras, con resultados similares para la liofilización (Chen *et al.*, 2011). Sin embargo, la descelularización y posterior liofilización de grandes arterias en ausencia de agente de

preservación dio lugar a una disrupción significativa del colágeno y de la elastina, aunque esto estaba relacionado con el protocolo específico utilizado para llevar a cabo la liofilización (Sheridan *et al.*, 2013). El mencionado estudio sugiere que la alteración de las fibras fue causada por el secado desigual durante la liofilización, lo que llevó a la formación de grandes cristales de hielo en el centro de la pared arterial cuando la temperatura de liofilización no era apropiada. Aunque las fibras reticulares no han sido evaluadas en tejidos descelularizados y preservados, los pocos estudios que evalúan este componente fibrilar de la MEC en tejidos conservados a 0°C sugieren la existencia de gran variabilidad dependiendo tanto del protocolo de descelularización como del de preservación utilizados (Quintana *et al.*, 2003).

En conjunto, nuestros resultados sugieren la posibilidad de preservar tejidos descelularizados para su uso diferido en ingeniería tisular de distintos órganos, incluida la uretra, aunque no todos los métodos y protocolos son eficaces para este propósito. Si se tienen en cuenta tanto la morfología de los tejidos como la composición histológica de los mismos, podríamos concluir que los métodos que muestran los resultados más adecuados son L2 y C6, que muestran tanto una preservación adecuada de la morfoestructura, como de los componentes no fibrilares y fibrilares en SDIS y TDIS.

Por un lado, el protocolo L2 se basa en la liofilización usando 0,1 M de trehalosa como agente protector. Se ha demostrado que los protectores para liofilización estabilizan proteínas y liposomas durante la liofilización y la trehalosa parece ser capaz de estabilizar el volumen celular reteniendo más agua líquida a bajas temperaturas, reduciendo de este modo la concentración de electrolitos externos (Muller-Schweinitzer, 2009). La trehalosa está naturalmente presente en los tejidos de varias especies con alta capacidad de supervivencia a la deshidratación y la desecación, ya que confiere resistencia a la desecación y la congelación (Serrato *et al.*, 2009; Julca *et al.*, 2012). De hecho, hemos demostrado previamente que la trehalosa puede prevenir la formación de cristales de hielo y conservar la estructura de los tejidos artificiales para su posterior análisis histológico (Serrato *et al.*, 2009), aunque ésta es la primera vez que este método se aplica a los biomateriales de intestino descelularizado. Aún son necesarios más trabajos para demostrar si el uso de trehalosa 0,1 M como agente protector puede

impedir la formación de macroporos en la estructura del tejido nativo que podrían alterar la estructura del tejido.

Por otro lado, C6 es un protocolo de criopreservación utilizado en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería y en otros bancos de tejidos para la preservación del tejido paratiroideo humano (Borot *et al.*, 2010). Curiosamente, este protocolo utiliza una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) y albúmina como agentes crioprotectores. El DMSO es un crioprotector permeable capaz de reducir la formación de hielo extracelular, evitando una concentración excesiva de solutos y minimizando la deshidratación celular hasta un grado tolerable (Márquez-Curtis *et al.*, 2015), aunque su papel como crioprotector para tejidos y órganos no se conoce bien. El DMSO es uno de los componentes más comunes en los medios de criopreservación comercialmente disponibles debido a su alta capacidad de crioprotección y normalmente se usa en combinación con una solución electrolítica tal como un medio de cultivo y una alta concentración de proteínas (Márquez-Curtis *et al.*, 2015), especialmente la albúmina. En la presente Tesis Doctoral se evaluaron varios protocolos que combinan DMSO y albúmina, incluyendo C6, pero también C3, C4 y C5 y el protocolo C7, que utiliza una mezcla de DMSO y suero bovino fetal. Curiosamente, el agente de crioprotección que más eficientemente logró preservar la estructura y la composición histológica de SDIS y TDIS fue C6, que utiliza las concentraciones más bajas de DMSO (8%) y albúmina (4,6%). El DMSO se usa típicamente a una concentración final de 10% para la criopreservación de células humanas (Lecchi *et al.*, 2016), para las que se ha demostrado que esta concentración funciona eficientemente, pero nuestros resultados sugieren que su concentración óptima para preservar biomateriales intestinales descelularizados es menor. Probablemente, la necesidad de preservar la membrana celular de las células vivas obliga a usar concentraciones más altas de este agente cuando las células están presentes en el tejido. En cuanto a la concentración de albúmina, algunos informes encontraron que la presencia de suero o proteínas combinadas con DMSO no tiene ningún efecto sobre la tasa de supervivencia de las células criopreservadas (Ohno *et al.*, 1988), pero nuestros resultados señalan la posibilidad de que una baja concentración es

importante para una eficiente conservación de los componentes de la MEC, especialmente para fibras reticulares y elásticas.

Una de las posibles limitaciones de la presente Tesis Doctoral es el método de cuantificación utilizado para determinar la cantidad de componentes de la MEC de las diferentes muestras. Aunque es un método sencillo y directo que ha sido ampliamente utilizado por nuestro grupo de investigación (Oliveira *et al.*, 2013; Alfonso-Rodríguez *et al.*, 2014; Carriel *et al.*, 2014; González-Andrades *et al.*, 2015; Martín-Piedra *et al.*, 2016), los resultados obtenidos con este método deberían ser corroborados mediante otros métodos más sensibles y específicos. A este respecto, en el futuro serán necesarios nuevos estudios para determinar la cantidad exacta de componentes de la MEC conservados en cada tejido después de su preservación, utilizando métodos altamente precisos basados en la cuantificación de proteínas como el ELISA y los métodos enzimáticos cuantitativos.

En resumen, la presente Tesis Doctoral constituye una primera aproximación para el desarrollo de protocolos de preservación eficaces de intestino descelularizado para uso diferido en ingeniería tisular de la uretra o de otros órganos tubulares. Nuestros resultados sugieren que la liofilización utilizando trehalosa 0,1 M y la criopreservación en presencia de DMSO al 8% y albúmina al 4,6% son más eficientes que otros protocolos para preservar la morfoestructura y la composición histológica del biomaterial. Sin embargo, aún se deben realizar trabajos futuros para determinar las propiedades biomecánicas de estos tejidos y la posibilidad de utilizarlos para la construcción de tejidos humanos artificiales mediante ingeniería tisular.

6. CONCLUSIONES

De los resultados de la presente Tesis Doctoral podemos inferir las siguientes conclusiones:

1. Los protocolos descritos en la presente Tesis Doctoral basados en la utilización de los agentes químicos SDS y Tritón X-100 a una concentración de 0,1% permitieron generar de forma eficiente biomateriales descelularizados a partir del intestino de la rata. El análisis morfoestructural de estos biomateriales sometidos a protocolos de preservación reveló que los métodos que más eficientemente mantenían la morfología del intestino descelularizado eran la criopreservación con glicerol y con las concentraciones más bajas de DMSO y algunos protocolos que utilizaban los dicaríidos trehalosa y maltosa. Asimismo, la liofilización con trehalosa al 0,1M lograba mantener la estructura tubular de estos biomateriales para uso en ingeniería tisular uretral.
2. La utilización de protocolos basados en DMSO como agente crioprotector logró preservar adecuadamente la mayor parte de los componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de los biomateriales obtenidos mediante descelularización con agentes químicos y sometidos a criopreservación. Los niveles más elevados de preservación se encontraron para las fibras de colágeno, existiendo variabilidad entre las muestras descelularizadas con SDS y con Tritón X-100 en lo referente a la preservación de fibras reticulares y elásticas. La preservación de proteoglicanos y glicoproteínas resultó asimismo muy elevada tanto en muestras descelularizadas con SDS como con Tritón X-100, aunque no alcanzaron los niveles de preservación de las fibras de colágeno. Por otro lado, los resultados más óptimos se obtuvieron cuando se utilizaron las concentraciones más bajas de DMSO combinadas con una baja concentración de albúmina sérica.
3. La utilización de protocolos basados en glicerol como agente crioprotector resultó en niveles adecuados de preservación de los componentes no fibrilares de la matriz extracelular de los biomateriales obtenidos mediante descelularización con agentes químicos y sometidos a criopreservación. Los niveles más elevados de preservación se encontraron para las glicoproteínas y los proteoglicanos, que no mostraron diferencias significativas respecto a las muestras control no sometidas a preservación. Sin embargo, el análisis de componentes fibrilares reveló una disminución no significativa de las fibras

elásticas y una alteración significativa de las fibras de colágeno y reticulina, especialmente en las muestras descelularizadas con Tritón X-100.

4. La utilización de protocolos basados en disacáridos como agentes crioprotectores resultó, en general, en niveles variables de preservación de los componentes fibrilares y no fibrilares de la matriz extracelular de los biomateriales obtenidos mediante descelularización con agentes químicos y sometidos a criopreservación. En lo que se refiere a los componentes no fibrilares, los niveles más elevados de preservación se encontraron para las glicoproteínas, las cuales se mantuvieron similares a los controles en todos los protocolos de criopreservación basados en disacáridos. Sin embargo, únicamente el protocolo basado en trehalosa al 0,2M logró mantener los niveles de proteoglicanos tanto en las muestras descelularizadas con SDS como en las descelularizadas con Tritón X-100. Para los componentes fibrilares, se encontró gran variabilidad entre los distintos disacáridos, encontrándose que la maltosa preservaba más eficientemente las fibras reticulares, mientras que la sacarosa preservaba mejor las fibras de colágeno y elásticas.

5. La utilización de protocolos de liofilización mostró gran variabilidad entre las muestras descelularizadas con SDS y las descelularizadas con Tritón X-100 y entre los diferentes agentes protectores. Para las glicoproteínas, se encontró que todos los protocolos preservaban eficientemente estos componentes, siendo mayores los niveles de preservación en los protocolos que utilizan sacarosa como agente protector. El uso de trehalosa y sacarosa resultó en niveles elevados de preservación de proteoglicanos, con diferencias entre los dos métodos de descelularización. Ambos agentes protectores fueron asimismo eficaces para preservar las fibras de colágeno, reticulares y elásticas de la matriz extracelular, con diferencias entre los distintos protocolos.

6. Del análisis de los resultados anteriores podemos concluir que los protocolos más eficientes a la hora de mantener la estructura y composición histomolecular de los biomateriales descelularizados son aquéllos que se basan en la criopreservación con bajas concentraciones de DMSO (8%) y albúmina sérica (4,6%) y aquéllos que utilizan la liofilización utilizando trehalosa al 0,1M como agente estabilizador.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal CM. Reconstructing the human body using biomaterials. *JOM*. 1998; 50: 31.
doi:10.1007/s11837-998-0064-5.

Alfonso-Rodríguez CA, Garzón I, Garrido-Gómez J, Oliveira AC, Martín-Piedra MÁ, Scionti G, Carriel V, Hernández-Cortés P, Campos A, Alaminos M. Identification of histological patterns in clinically affected and unaffected palm regions in Dupuytren's disease. *PLoS One*. 2014 Nov 7;9(11): e112457. doi: 10.1371/journal.pone.0112457. eCollection 2014.

Arakawa T, Tsumoto K, Kita Y, Chang B, Ejima D. Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids*. 2007;33:587-605.

Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater*. 2009;5(1): 1-13.

Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001;13: 27-53.

Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transpl Immunol*. 2004;12(3-4): 367-377.

Ball RL, Bajaj P, Whitehead KA. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. *Int J Nanomedicine*. 2016 Dec 30;12:305-315. doi: 10.2147/IJN.S123062. eCollection 2017.

Barakat O, Abbasi S, Rodriguez G, Rios J, Wood RP, Ozaki C, Holley LS, Gauthier PK. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ. *J Surg Res*. 2012;173(1): e11-25

Ben-Bassat H, Chaouat M, Zumai E, Segal N, Cinamon U, Ron M, Wexler MR, Eldad A. The Israel National Skin Bank: Quality Assurance and Graft Performance of Stored Tissues. *Cell Tissue Bank*. 2000;1(4):303-312.

Boiso I. *Criobiología*. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 2001;18(4): 20-22.

Borot S, Lapierre V, Carnaille B, Goudet P, Penfornis A. Results of cryopreserved parathyroid autografts: a retrospective multicenter study. *Surgery*. 2010 Apr;147(4):529-35. doi: 10.1016/j.surg.2009.10.010. Epub 2010 Feb 12.

Campos A. *Cuerpo, Histología y Medicina. De la observación microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de Ingreso en la real Academia Nacional de Medicina y Cirugía*. Madrid. 2004.

Caralt M, Uzarski Js, Iacob S, Obergfell KP, Berg N, Bijonowski BM, Kiefer KM, Ward HH, Wandinger-Ness A, Miller WM, Zhang ZJ, Abecassis MM, Wertheim JA. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant* 2015 Jan;15(1): 64-75. doi: 10.1111/ajt.12999. Epub 2014 Nov 17.

Carriel V, Garzon I, Campos A, Cornelissen M, Alaminos M. Differential expression of GAP-43 and neurofilament during peripheral nerve regeneration through bio-artificial conduits. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Feb;11(2):553-563. doi: 10.1002/term.1949. Epub 2014 Jul 31.

Cigliano A, Gandaglia A, Lapedda AJ, Zinellu E, Naso F, Gastaldello A, Aguiari P, De Muro P, Gerosa G, Spina M, Formato M. Fine structure of glycosaminoglycans from fresh and decellularized porcine cardiac valves and pericardium. *Biochem Res Int*. 2012;2012: 979351. doi: 10.1155/2012/979351. Epub 2012 Feb 22

Corvin S, Feil G, Stenzl A. Tissue engineering of the urethra and ureter. *Urologe A*. 2004;43(10):1213 -6.

Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32: 3233-3243.

Cui X, Gao DY, Fink BF, Vasconez HC, Rinker B. Cryopreservation of composite tissues and transplantation: preliminary studies. *Cryobiology*. 2007 Dec;55(3):295-304. Epub 2007 Sep 18.

Chen L, Wu Y, Yu J, Jiao Z, Ao Y, Yu C, Wang J, Cui G. Effect of repeated freezing-thawing on the Achilles tendon of rabbits. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011;19: 1028-1034. doi: 10.1007/s00167-010-1278-y. Epub 2010 Oct 7.

Cho SY, Chae SW, Choi KW, Seok HK, Kim YC, Jung JY, Yang SJ, Kwon GJ, Kim JT, Assad M. Biocompatibility and strength retention of biodegradable Mg-Ca-Zn alloy bone implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013 Feb;101(2):201-12. doi: 10.1002/jbm.b.32813. Epub 2012 Oct 31.

Del Pozo-Jiménez G, Jara Rascón J, Aragón Chamizo J, Blaha I, Hernández Fernández C, Lledó García E. Anatomy and vascularization on the male urethra and penis. *Arch Esp Urol*. 2014 Jan-Feb;67(1):5-11. Review. Spanish

Deplaine H, Lebourg M, Ripalda P, Vidaurre A, Sanz-Ramos P, Mora G, Prósper F, Ochoa I, Doblaré M, Gómez Ribelles JL, Izal-Azcárate I, Gallego Ferrer G. Biomimetic hydroxyapatite coating on pore walls improves osteointegration of poly(L-lactic acid)

scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013 Jan;101(1):173-86. doi:10.1002/jbm.b.32831. Epub 2012 Nov 14.

Drury PJ, Olsen EG, Ross DN. Morphological assessment of sucrose preservation for porcine heart valves. *Thorax* 1982;37: 466-471.

Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology.* 2017 Apr 18. pii:S0011-2240(17)30146-3. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.04.004

Fereshteh Z, Fathi M, Bagri A, Boccaccini AR. Preparation and characterization of aligned porous PCL/zein scaffolds as drug delivery systems via improved unidirectional freeze-drying method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 Nov;68:613-22. doi: 10.1016/j.msec.2016.06.009. Epub 2016 Jun 8.

Fiala R, Vidlar A, Vrtal R, Belej K, Student V. Porcine small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures. *Eur Urol.* 2007;51(6): 1702-1708.

Fu Q, Cao YL. Tissue engineering and stem cell application of urethroplasty: from bench to bedside. *Urology.* 2012;79(2):246-53.

Gallegos MA, Santucci RA. Advances in urethral stricture management. *F1000Res.* 2016 Dec 23;5:2913. doi: 10.12688/f1000research.9741.1. eCollection 2016.

García JV. Criopreservadores concepto y manejo. *Biol Clin Hematol.* 1984;6(4): 219-225.

Geraghty S, Kuang JQ, Yoo D, LeRoux-Williams M, Vangsness CT Jr, Danilkovitch A. A novel, cryopreserved, viable osteochondral allograft designed to augment marrow stimulation for articular cartilage repair. *J Orthop Surg Res.* 2015 May 14;10:66. doi: 10.1186/s13018-015-0209-5.

Giannini S, Buda R, Di Caprio F, Agati P, Bigi A, De Pasquale V, Ruggeri A.. Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons. *Int Orthop* 2008 Apr;32(2):145-51. Epub 2007 Jan 10.

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27(19): 3675-3683.

Goldberg A, Mitchell K, Soans J, Kim L, Zaidi R. The use of mesenchymal stem cells for cartilage repair and regeneration: a systematic review. *J Orthop Surg Res.* 2017 Mar 9;12(1):39. doi: 10.1186/s13018-017-0534-y.

González-Andrades M, Carriel V, Rivera-Izquierdo M, Garzón I, González-Andrades E, Medialdea S, Alaminos M, Campos A. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. *Transl Vis Sci Technol* 2015 Apr 10;4(2):13. eCollection 2015 Apr.

González-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, Del Mar Perez M, Alaminos M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1): 215-22.

González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Avila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009 Aug;3(6):442-9. doi: 10.1002/term.178.

Hansen L, Daoussi R, Vervaet C, Remon JP, De Beer TR. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine* 2015 Oct 13;33(42):5507-19. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.08.085. Epub 2015 Sep 26.

Hansen L, Van Renterghem J, Daoussi R, Vervaet C, Remon JP, De Beer T. Spectroscopic evaluation of a freeze-dried vaccine during an accelerated stability study. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016 Jul;104:89-100. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.04.010. Epub 2016 Apr 19.

Haugh MG, Thorpe SD, Vinardell T, Buckley CT, Kelly DJ. The application of plastic compression to modulate fibrin hydrogel mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;16C: 66-72.

Hauser S, Bastian PJ, Fechner G, Muller SC. Small intestine submucosa in urethral stricture repair in a consecutive series. *Urology*. 2006;68(2):263-6.

Herrera-Imbroda B, Aragón IM, Hierro MI, Álvarez M, Alaminos M, Campos A, Izeta A, Machuca J, Lara MF. An immunohistochemical study of cytokeratins distribution of the human adult male and female urethra. *Histol Histopathol*. 2017 Mar;32(3):283-291. doi: 10.14670/HH-11-796. Epub 2016 Jun 24.

Hung SH, Su CH, Lee FP, Tseng H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J Voice*. 2013 May;27(3):289-94. doi: 10.1016/j.jvoice.2013.01.018. Epub 2013 Mar 13.

Ionescu AM, Alaminos M, de la Cruz Cardona J, de Dios García-López Durán J, González-Andrades M, Ghinea R, Campos A, Hita E, del Mar Pérez M. Investigating a novel nanostructured fibrin-agarose biomaterial for human cornea tissue engineering:

rheological properties. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011 Nov;4(8):1963-73. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.06.013. Epub 2011 Jun 30.

Izutsu K., Yoshioka S., Terao T. Decreased protein-stabilizing effects of cryoprotectants due to crystallization. *Pharmaceutical Research.* 1993;10:1232-1237.

Jashari R, Van Hoeck B, Ngakam R, Goffin Y, Fan Y. Banking of cryopreserved arterial allografts in Europe: 20 years of operation in the European Homograft Bank (EHB) in Brussels. *Cell Tissue Bank.* 2013 Dec;14(4):589-99. doi: 10.1007/s10561-012-9359-4.

Julca I, Alaminos M, González-López J, Manzanera M. Xeroprotectants for the stabilization of biomaterials. *Biotechnol Adv.* 2012 Nov-Dec;30(6):1641-54. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.07.002. Epub 2012 Jul 17.

Kahn D, Les C, Xia Y. Effects of cryopreservation on the depth-dependent elastic modulus in articular cartilage and implications for osteochondral grafting. *J Biomech Eng.* 2015; 137: 054502.

Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials.* 1996; 17: 243-256.

Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods.* 2015; 84: 25-34.

Keckler SJ, Spilde TL, St Peter SD, Tsao K, Ostlie DJ. Treatment of bronchopleural fistula with small intestinal mucosa and fibrin glue sealant. *Ann Thorac Surg.* 2007;84(4): 1383-1386.

Kim Y, Ko H, Kwon Ik, Shin K. Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering. *Int Neurourol J.* 2016; 20: S23-29.

Kondiah PJ, Choonara YE, Kondiah PP, Marimuthu T, Kumar P, du Toit LC, Pillay V. A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering. *Molecules.* 2016 Nov 21;21(11). pii: E1580

Kropp BP, Ludlow JK, Spicer D, Rippey MK, Badylak SF, Adams MC, et al. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. *Urology.* 1998;52(1):138-42.

Lam MT, Wu JC. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012;10(8): 1039-1049.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 May 14;260(5110):920-6. Review.

Lecchi L, Giovanelli S, Gagliardi B, Pezzali I, Ratti I, Marconi M. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci* 2016; 54: 324-336. Jun;54(3):324-36. doi: 10.1016/j.transci.2016.05.009. Epub 2016 May 11.

Lemos NL, Kamergorodsky G, Faria AL, Ribeiro PA, Auge AP, Aoki T. Small intestinal submucosa patch for extensive vaginal endometriosis resection. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16(6): 765-767.

Lovelock JE. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 1953;10:414-426.

Mangera A, Chapple CR. Tissueengineering in urethral reconstruction-an update. *Asian J Androl*. 2013;15(1):89- 92.4.

Mantovani F, Tondelli E, Cozzi G, Abed El Rahman D, Spinelli MG, Oliva I, et al. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix (SIS): evolution of the grafting technique and results of 10-year experience. *Urologia*. 2011;78(2):92-7

Márquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, Mcgann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. 2015;71: 181-197.

Martín-Cano F, Garzón I, Marañés C, Licerias E, Martín-Piedra MA, Ruiz-Montes AM, Alaminos M, Fernández-Valadés R. Histological and immunohistochemical changes in the rat oral mucosa used as an autologous urethral graft. *J Pediatr Surg*. 2013 Jul;48(7):1557-64. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2013.01.056.

Martín-Piedra MA, Alaminos M, Fernández-Valadés Gámez R, España-López A, Licerias-Licerias E, Sánchez-Montesinos I, Martínez-Plaza A, Sánchez-Quevedo MC, Fernández-Valadés R, Garzón I. Development of a multilayered palate substitute in rabbits: A histochemical ex vivo and in vivo analysis. *Histochem Cell Biol*. 2017 Mar;147(3):377-388. doi: 10.1007/s00418-016-1489-5. Epub 2016 Sep 6.

Meryman H. Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 1971;8(2):173-183.

Morais AR, Alencar Edo N, Xavier Junior FH, De Oliveira CM, Marcelino HR, Barratt G, Fessi H, Do Egito ES, Elaissari A. Freeze-drying of emulsified systems: A review. *Int J Pharm*. 2016 Apr 30;503(1-2):102-14. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.047. Epub 2016 Mar 2.

Muller-SCHWEINITZER E. Cryopreservation of vascular tissues. *Organogenesis*. 2009;5: 97-104.

Nail SL, Jiang S, Chongprasert S, Knopp SA. Fundamentals of freeze-drying. *Pharm Biotechnol.* 2002;14: 281-360.

Nakatani Y, Agata H, Sumita Y, Koga T, Asahina I. Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan;73:172-178. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.006. Epub 2016 Oct 15.

Narine K, Ing EC, Cornelissen M, Desomer F, Beele H, Vanlangenhove L, Smet SD, Nooten GV. Readily available porcine aortic valve matrices for use in tissue valve engineering. Is cryopreservation an option? *Cryobiology.* 2006 Oct;53(2):169-81. Epub 2006 Aug 14.

Ogawa M, Tohma Y, Ohgushi H, Takakura Y, Tanaka Y. Early fixation of cobalt-chromium based alloy surgical implants to bone using a tissue-engineering approach. *Int J Mol Sci.* 2012;13(5):5528-41. doi: 10.3390/ijms13055528. Epub 2012 May 9.

Ohno T, Kurita K, Abe S, Eimori N, Ikawa Y. A simple freezing medium for serum-free cultured cells. *Cytotechnology.* 1988 Jul;1(3):257-60. doi: 10.1007/BF00145029.

Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, González-Andrades M, Pérez Mdel M, Alaminos M, Campos A. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering. *PLoS One.* 2013 Jun 14;8(6):e66538. doi: 10.1371/journal.pone.0066538. Print 2013.

Osman NI, Hillary C, Bullock AJ, MacNeil S, Chapple CR. Tissue engineered buccal mucosa for urethroplasty: progress and future directions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Mar;82-83:69-76. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.006. Epub 2014 Oct 16.

Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, Kotton D, Vacanti JP. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* 2010;16(8): 927-33.

Patino MG, Neiders ME, Andreana S, Noble B, Cohen RE. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. *J Oral Implantol.* 2002;28(5): 220-225.

Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007;368: 39-57.

Pok S, Myers JD, Madhally SV, Jacot JG (2012) A multi-layered scaffold of a chitosan and gelatin hydrogel supported by a Pcl core for cardiac tissue engineering. *Acta Biomater.* 2013 Mar;9(3):5630-42. doi: 10.1016/j.actbio.2012.10.032. Epub 2012 Nov 2.

Poornejad N, Frost TS, Scott DR, Elton BB, Reynolds PR, Roeder BL, Cook AD. Freezing/Thawing without Cryoprotectant Damages Native but not Decellularized Porcine

- Renal Tissue. *Organogenesis* 2015;11: (1):30-45. doi: 10.1080/15476278.2015.1022009.
- Porcu E. Oocyte Cryopreservation. 2001. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives*. Eds. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. UK: Martin Dunitz Ltd, London.
- Quintana AB, Rodriguez JV, Scandizzi AL, Guibert EE. The benefit of adding sodium nitroprusside (NPNa) or S-nitrosoglutathion (GSNO) to the University of Wisconsin solution (UW) to prevent morphological alterations during cold preservation/reperfusion of rat livers. *Ann Hepatol*. 2003;2: 84-91.
- Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*. 2011;377(9772):1175 -82.
- Rodriguez MA, López-López MT, Durán JD, Alaminos M, Campos A, Rodriguez IA. Cryopreservation of an artificial human oral mucosa stroma. A viability and rheological study. *Cryobiology*. 2013 Dec;67(3):355-62. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.10.003. Epub 2013 Oct 28.
- Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T, Terada N, Clapp WL, Adin C, Ellison GW, Jorgesen M, Batich CD. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(11): 2338-47.
- Ross MH, Pawlina W. Tejido conjuntivo. *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular*. Ed. Lippincott Williams JB & Wilkins. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 2007;160-196.
- Saksena R, Gao C, Wicox M, de Mel A. Tubular organ epithelialisation. *J Tissue Eng*. 2016 Dec 19;7: 2041731416683950. doi: 10.1177/2041731416683950.
- Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3: 43.
- Schenkman N. and Manger J. Male urethra anatomy. 2013.
- Serrato D, Nieto-Aguilar R, Garzón I, Roda O, Campos A, Alaminos M. Comparison of the effect of cryopreservation protocols on the histology of bioengineered tissues. *Histol Histopathol*. 2009 Dec;24(12):1531-40. doi: 10.14670/HH-24.1531.
- Sheridan WS, Duffy GP, Murphy BP. Optimum parameters for freeze-drying decellularized arterial scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19: 981-990.

Simões IN, Vale P, Soker S, Atala A, Keller D, Noiva R, Carvalho S, Peleteiro C, Cabral JM, Eberli D, da Silva CL, Baptista PM. Acellular Urethra Bioscaffold: Decellularization of Whole Urethras for Tissue Engineering Applications. *Sci Rep.* 2017 Feb 6;7:41934. doi: 10.1038/srep41934.

Thakkar SG, Ruwona TB, Williams RO 3rd, Cui Z. The immunogenicity of thin-film freeze-dried, aluminum salt-adjuvanted vaccine when exposed to different temperatures. *Hum Vaccin Immunother.* 2017 Apr 3;13(4):936-946. doi: 10.1080/21645515.2016.1259042. Epub 2017 Jan 4.

Versteegden LR (1), de Jonge PK, IntHout J, van Kuppevelt TH, Oosterwijk E, Feitz WF, de Vries RB, Daamen WF. Tissue Engineering of the Urethra: A Systematic Review and Meta-analysis of Preclinical and Clinical Studies. *Eur Urol.* 2017 Apr 3. pii: S0302-2838(17)30237-3. doi: 10.1016/j.eururo.2017.03.026.

Versteegden LR (2), van Kampen KA, Janke HP, Tiemessen DM, Hoogenkamp HR, Hafmans TG, Roozen EA, Lomme RM, van Goor H, Oosterwijk E, Feitz WF, van Kuppevelt TH, Daamen WF. Tubular collagen scaffolds with radial elasticity for hollow organ regeneration. *Acta Biomater.* 2017 Apr 1;52:1-8. doi: 10.1016/j.actbio.2017.02.005. Epub 2017 Feb 5.

Vorotnikova E, Mcintosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, Cordero K, Bedelbaeva K, Gourevitch D, Heber-Katz E, Badylak SF, Braunhut SJ . Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol* 2010 Oct;29(8):690-700. doi: 10.1016/j.matbio.2010.08.007. Epub 2010 Aug 24.

Wang B, Timilsena YP, Blanch E, Adhikari B. Characteristics of bovine lactoferrin powders produced through spray and freeze drying processes. *Int J Biol Macromol.* 2017 Feb;95:985-994. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.087. Epub 2016 Oct 29.

Wang S, Goecke T, Meixner C, Haverich A, Hilfiker A, Wolkers WF. Freeze-dried heart valve scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012 Jul;18(7):517-25. doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0398. Epub 2012 Feb 24.

Wang S, Oldenhof H, Goecke T, Ramm R, Harder M, Haverich A, Hilfiker A, Wolkers WF. Sucrose Diffusion in Decellularized Heart Valves for Freeze-Drying. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015 Sep;21(9):922-31. doi: 10.1089/ten.TEC.2014.0681. Epub 2015 May 4.

Wang W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm.* 2000 Aug 10;203(1-2):1-60.

Woon CY, Farnebo S, Schmitt T, Kraus A, Megerle K, Pham H, Yan X, Gambhir SS, Chang J. Human flexor tendon tissue engineering: revitalization of biostatic allograft scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2012 Dec;18(23-24):2406-17. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0152. Epub 2012 Jul 30.

Xiao M, Chen YM, Biao MN, Zhang XD, Yang BC. Bio-functionalization of biomedical metals. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Jan 1;70(Pt 2):1057-1070. doi: 10.1016/j.msec.2016.06.067. Epub 2016 Jun 23

Yang B, Zhang Y, Zhou L, Sun Z, Zheng J, Chen Y, Dai Y. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Oct;16(5):1201-11. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0311.

Yang SX, Yao Y, Hu YF, Song C, Wang LL, Jin HM. Reconstruction of rabbit urethra using urethral extracellular matrix. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117(12):1786-90. 6.

Zhang J, Huang C, Xu Q, Mo A, Li J, Zuo Y. Biological properties of a biomimetic membrane for guided tissue regeneration: a study in rat calvarial defects. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(4): 392-397.