

**INDUCCIÓN DE LA RE-CELULARIZACIÓN CON TEJIDO ENDOTELIAL DE UN
VASO SANGUÍNEO UTILIZANDO SU MATRIZ EXTRACELULAR COMO
ANDAMIAJE, A PARTIR DE CELULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*.**

**MARGARITA MARÍA CADENA MORENO
JOSÉ MANUEL RIVERA ARBELÁEZ**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

**INDUCCIÓN DE LA RE-CELULARIZACIÓN CON TEJIDO ENDOTELIAL DE UN
VASO SANGUÍNEO UTILIZANDO SU MATRIZ EXTRACELULAR COMO
ANDAMIAJE, A PARTIR DE CELULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*.**

**MARGARITA MARÍA CADENA MORENO
JOSÉ MANUEL RIVERA ARBELÁEZ**

Pasantía en investigación para optar al título de Ingenieros Biomédicos

**Directora
PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRONICA
PROGRAMA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA
SANTIAGO DE CALI
2014**

Nota de aceptación:

Aprobado por el Comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar al título de profesional en cine y comunicación digital.

WILFREDO AGREDO

Jurado

PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS

Directora

Santiago de Cali, 05 Agosto de 2014

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	10
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	11
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. OBJETIVOS	15
3.1 OBJETIVO GENERAL	15
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MARCO REFERENCIAL	16
4.1 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE	16
4.2 MARCO TEÓRICO	19
5. METODOLOGÍA	28
5.1 EXTRACCIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS	28
5.2 DESCELULARIZACIÓN DEL VASO SANGUÍNEO	28
5.3 DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE	29
5.4 RE-CELULARIZACIÓN DEL VASO SANGUÍNEO	29
6. RESULTADOS	32
6.1 EXTRACCIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS	32

6.2 DESCELULARIZACIÓN DE UN VASO SANGUÍNEO	32
6.3 DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MSC	34
6.4 RE- CELULARIZACIÓN DEL VASO SANGUÍNEO	36
7. DISCUSIÓN	41
8. RECOMENDACIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Capas de venas y arterias.	21
Figura 2. Modelo jerárquico de las células madre por su potencial	25
Figura 3. Extracción vaso sanguíneo de cerdo.	32
Figura 4. Vasos sanguíneos de cerdo.	32
Figura 5. Corte del vaso sanguíneo 4x	33
Figura 6. Vaso sanguíneo con colorante de Papanicolaou sin células.	33
Figura 7. Corte del tejido con superficie rugosa	34
Figura 8. MSC 24 horas después de cultivo rata # 2	34
Figura 9. MSC 24 horas después de cultivo rata # 29	35
Figura 10 MSC desprendidas de la rata # 29	35
Figura 11. MSC con la confluencia alcanzada rata # 2	36
Figura 12. Montaje del biorreactor dentro de la incubadora	36
Figura 13. Biorreactor con los vasos sanguíneos, células y medio	37
Figura 14. Células al cuarto día de cultivo	37
Figura 15 Día octavo en medio de diferenciación a tejido endotelial	38
Figura 16. Corte del vaso sanguíneo de control a 100X.	39
Figura 17. Corte de la matriz de PLLA a 100X.	39
Figura 18. Quince días en medio de diferenciación a tejido endotelial	40
Figura 19. Corte vaso sanguíneo re-celularizado	40

RESUMEN

Las investigaciones realizadas con células madre mesenquimales (MSC) han demostrado que sus capacidades multipotenciales de producir células de diferentes linajes para la regeneración del tejido, han abierto amplias posibilidades para tratar enfermedades y recuperar tejidos afectados. Una de las enfermedades cardiovasculares frecuente es la arterioesclerosis, que es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Los tratamientos correctivos que actualmente se emplean para quienes sufren arterioesclerosis no erradican el problema y generan en su mayoría consecuencias como la reestenosis.

La medicina regenerativa con células madre busca semejar los procesos de reparación interna en los que las células especializadas son capaces de renovarse a sí mismas a través de la división celular y pueden ser inducidas a convertirse en un tipo de célula específica que forme tejido específico; el objetivo de esta investigación fue inducir la re-celularización en la matriz vaso sanguíneo utilizando células MSC diferenciadas *in vitro* a endotelio vascular.

Para desarrollar el proyecto se realizó la descelularización de una arteria coronaria de cerdo sumergiéndola en una solución hipotónica (SDS al 2 %) durante 8 horas. La re-celularización se hizo con células MSC criopreservadas de rata Wistar que se diferenciaron en un biorreactor, sembradas en el vaso sanguíneo y en PLLA; para verificar la adherencia de las células y su diferenciación, se realizó una tinción con colorante de Papanicolaou para buscar las características de las células endoteliales.

Palabras clave: Arteriosclerosis, biorreactor, células mesenquimales, diferenciación celular, descelularización, medicina regenerativa, tejido endotelial, vaso sanguíneo, re-celularización.

INTRODUCCIÓN

Los vasos sanguíneos son los encargados del transporte de nutrientes y la sangre oxigenada que es bombeada por el corazón y se clasifican en arterias, capilares y venas. Las arterias son los vasos sanguíneos que salen del corazón y llevan la sangre a los distintos órganos del cuerpo, ello es posible por sus paredes elásticas que están formadas por tres capas dentro de las cuales se encuentra el endotelio que es la capa más interna¹.

Cuando no se tiene un estilo de vida saludable se presentan depósitos de sustancias lipídicas en las paredes de las arterias, obstruyendo el flujo regular de la sangre a órganos vitales como el corazón o el cerebro, privándolos de oxígeno y los nutrientes necesarios para su normal funcionamiento. Esta enfermedad se denomina arterioesclerosis y es el principal agente de enfermedad cardiovascular².

La arterioesclerosis coronaria genera una disminución en la calidad de vida de la persona produciendo angina y en ocasiones puede llegar a un ataque cardiaco que puede ocasionar la muerte. Actualmente, los procedimientos que se realizan para devolver la irrigación al tejido son la angioplastia, la angioplastia con *stent* y el *bypass* coronario, sin embargo ninguno de estos procedimientos contribuye a la reparación del tejido endotelial de la arteria³.

La posibilidad de lograr la regeneración del tejido endotelial en arterias afectadas por arterioesclerosis permitiría restablecer de manera definitiva el adecuado funcionamiento del sistema circulatorio y una disminución en la tasa de morbi-mortalidad por enfermedades cardiovasculares causadas por la obstrucción de los vasos sanguíneos.

Las células madre utilizadas para la regeneración de tejidos dañados por algún tipo de enfermedad o trauma, proporcionan un panorama de investigación muy

¹ ANAIZ, Jorge, Anatomía Humana. Vasos Sanguíneos [En línea] Valparaíso: Universidad Pontificia Católica, 2006 [Consultado: 14 agosto 2013]. Disponible en internet: <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo2/vasos.html>.

² VALDEPEÑAS L, Moya F. Prevención Primaria De La Arteriosclerosis, editores. Comunicación Gráfica. Madrid; 2009. p. 29-53.

³ MEDLINE PLUS. Arteriosclerosis [En línea]. EEUU, MedLine Plus: [consulta: 15 agosto 2013]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/atherosclerosis.html>

promisorio por su multipotencialidad, su capacidad de auto-regeneración y las diversas fuentes anatómicas de donde pueden ser obtenidas⁴.

En el proyecto desarrollado se indujo la re-celularización de tejido endotelial de un vaso sanguíneo a partir de células madre extraídas de médula ósea y diferenciadas *in vitro*, buscando la regeneración del endotelio.

⁴ POUNTOS, Ippokratis *et al.* Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. En: Injury: International journal for the care of the injured. Septiembre,2007, vol. 38, suplemento 4, p. S24-S25

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud pública y un reto global⁵, que no solo afecta a los países en vía de desarrollo sino también a los del primer mundo; por ejemplo en los Estados Unidos, causan la muerte de más de 2 200 por cada millón de personas al año⁶, mientras que en los países de bajos y medianos ingresos representan el 62 % de las muertes⁷.

Se estima que para el año 2020 las muertes a causa de las enfermedades cardiovasculares aumentarán en un 15 al 20 %⁸, es decir que morirán cerca de 23,6 millones de personas por estas enfermedades y se pronostica que seguirán siendo la principal causa de muerte a nivel global⁹. El aumento de la prevalencia de enfermedades cardiovasculares puede resultar por un aumento de los diferentes factores de riesgo, además de múltiples factores no solamente de orden médico sino de naturaleza política, económica, sociocultural y ambiental¹⁰.

En países en vía de desarrollo como Colombia que se están abriendo a la globalización a través de modelos consumistas, se producirá un aumento en comportamientos poco saludables (fumar, beber alcohol y consumir alimentos con alto contenido calórico), que en conjunto contribuyen significativamente al incremento en las tasas de enfermedades cardiovasculares¹¹⁻¹².

⁵ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on non communicable diseases 2011. Fecha de consulta: 11 abril de 2013. Disponible en: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/es/.

⁶ TEXAS HEART INSTITUTE. Factores de Riesgo Cardiovascular 2011. Fecha de consulta: 12 abril de 2013. Disponible en: http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/HSmart/riskspan.cfm.

⁷ GOMÉZ, Luis Alberto. Enfermedades Cardiovasculares un problema de Salud Pública. Bogotá D.C.: Universidad Nacional. Revista Biomédico vol. 31. No. 4, p.1. Fecha de consulta: 8 abril 2013. Disponible en internet en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572011000400001&lng=pt&nrm=iso.

⁸ *Ibíd.*, p 2-4

⁹ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory 2011. Fecha de consulta: 8 de abril de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/gho/ncd/en/>.

¹⁰ BUTLER D. Un targets top killers. International summit considers how to stem the rise in non-communicable diseases. *Nature*. 2011; 477: 260-1.

¹¹ MONCAYO A. Nuevas dimensiones de la salud pública. En: Malagón-Londoño G, Moncayo-Medina A, editores. *Salud Pública. Perspectivas*. Segunda edición. Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 26-44. in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2007;370:1929-38.

¹² BROWNSON RC, Haire-Joshu D, Luke DASHaping the context of health: a review of environmental and policy approaches in the prevention of chronic diseases. *Annu Rev Public Health*. 2006;27:341-70

En Colombia, las causas de mortalidad están encabezadas por las enfermedades cardiovasculares, que corresponden al 28,7 % de todas las defunciones¹³; dentro de ellas se encuentra el infarto agudo al miocardio que junto a la angina de pecho son las dos manifestaciones clínicas principales de la arterosclerosis coronaria, la cual vuelve las arterias rígidas y gruesas, dificultando la circulación sanguínea. En los hombres el riesgo de desarrollar una enfermedad coronaria es del 49 % y en las mujeres del 32 %, después de los 40 años de edad¹⁴.

Los métodos tradicionales de tratamiento como la angioplastia con *stent* y el *bypass* coronario, se realizaron con una frecuencia de 38 mil por año en el 2011¹⁵; dichos procedimientos son correctivos y no logran la contención de las enfermedades cardiovasculares, generando en ocasiones reestenosis y muerte del tejido circundante. En el caso del *stent* convencional la reestenosis ocurre en un 15 % al 30 % de los pacientes y en raras ocasiones su uso puede producir lo que se conoce como trombosis del *stent*¹⁶.

La carencia de tratamientos definitivos hace preciso abordar la problemática desde terapéuticas novedosas como la ingeniería de tejidos, con técnicas alternativas como el uso de células madre, células multi-potenciales que ofrecen un camino prometedor gracias a su potencial de diferenciación y a la capacidad de controlar la respuesta inmune, proporcionando un panorama atractivo para su uso en la regeneración del tejido endotelial de las arterias con efectividad, eficiencia y seguridad.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¹³ GALVAN, Diana .Factores de riesgos para enfermedades crónicas. Bogotá D.C: Trabajo de grado: (Maestría en salud pública) Universidad Nacional. Facultad de medicina. Fecha de consulta: 5 mayo 2012. Disponible en internet: <http://www.bdigital.unal.edu.co/3073/1/598226.2010.pdf>.

¹⁴ CASSIANI, Carlos, CABRERA, Armando. Síndromes coronarios agudos: epidemiología y diagnóstico. Santiago de Cali (valle). Revista Salud Uninorte. Vol. 25, n.º 1, 2009 ISSN 0120-5552.

¹⁵ DOCSALUD. En el país el 20%de angioplastias son practicadas por urgencias. Colegio Argentino de Cardioangiólogos. Fecha de consulta: 20 agosto 2013. Disponible en internet: <http://www.docsalud.com/articulo/3624/en-el-pa%C3%ADs-el-20-de-las-angioplast%C3%ADas-deben-ser-practicadas-de-urgencia>

¹⁶MEDTRONIC. Beneficios y riesgos de la implementación de un *Stent* coronario. Fecha de consulta: 31 Octubre 2013. Disponible en internet: <http://www.medtronic.es/su-salud/enfermedad-arteria-coronaria/dispositivo/angioplastia-balon-implantacion-stent/beneficios-riesgos/index.htm>

¿Es posible reproducir una técnica que induzca la re-celularización con tejido endotelial de un vaso sanguíneo a partir de su matriz extracelular, utilizando células madre de médula ósea diferenciadas *in vitro*?

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud que afecta a toda la población mundial y se prevé que a futuro siga en aumento. Dentro de ellas está la arteriosclerosis coronaria, que después de cierto tiempo presenta manifestaciones clínicas como la angina de pecho y el infarto agudo al miocardio¹⁷.

La arterioesclerosis y sus complicaciones son la principal causa de mortalidad y morbilidad en los países desarrollados, sin embargo el número de muertes atribuibles a esta enfermedad en países en vía de desarrollo es mayor en comparación con los de primer mundo y en términos de costos, a los Estados Unidos las muertes al año le representan \$ 218 billones de dólares¹⁸.

Mientras que los países en vía de desarrollo como Colombia sean más abiertos a la globalización y sus economías e ingresos incrementen, se aumentarán los comportamientos poco saludables como el consumo de alcohol, grasas, cigarrillo, comidas rápidas con alto nivel calórico y el sedentarismo, que como consecuencia, en conjunto, contribuirán a la presencia de enfermedades cardiovasculares^{19 20}.

Estudios epidemiológicos estiman que para el año 2020 las enfermedades cardiovasculares serán responsables de 25 millones de muertes al año y por primera vez en la historia será considerada como la causa más común de muerte. Las proyecciones hacia el año 2030 indican que entre las principales causas de muerte a nivel mundial, la primera va hacer la isquemia cardiaca, de este modo las enfermedades cardiovasculares se pueden considerar como la más seria amenaza para el género humano²¹.

La arterioesclerosis coronaria siendo una de las enfermedades con alto impacto en la población, cuenta con soluciones que no son suficientes tanto en los

¹⁷ FUSTER, Valentin; RUSSEL, Ross. Arteriosclerosis y enfermedad arterial coronaria.

¹⁸ LEON, Jorge. Revista Colombiana de Cardiología. Vol 15- Suplemento 3. Fecha de consulta 30 de Octubre 2013. Disponible en internet: <http://scc.org.co/wp-content/uploads/2012/08/8-guia-enf-coronaria-2008.pdf>

¹⁹ GOMÉZ, Luis Op.Cit., p 4-5.

²⁰ DIARIO LIBRE. Enfermedades Cardiovasculares son la principal muerte en el mundo. revista Salud. Ginebra. Fecha de consulta 22 agosto 2013. Disponible en internet: http://www.diariolibre.com/noticias_det.php?id=393993&l=1.

²¹ LEON, Jorge .Op. Cit p. 153- 290

aspectos preventivos como correctivos. La angioplastia con *stent* es una de las alternativas y se realizan alrededor de 38 mil cirugías al año, sin embargo el *stent* presenta efectos secundarios como la reestenosis hasta en un 15 % al 30 % de los pacientes y en raras ocasiones produce lo que se conoce como trombosis del *stent*²². El *bypass* coronario presenta efectos secundarios como la muerte del tejido circundante y en comparación con el *stent* en un estudio realizado sobre su funcionamiento mostró mejores resultados, pero se reporta un 10,9 % de casos en los cuales el paciente falleció²³.

El esfuerzo en la búsqueda de alternativas terapéuticas que permitan restablecer la capacidad funcional del corazón no se explica solamente por las implicaciones de mortalidad, sino también por la morbilidad y el deterioro en la calidad de vida. La falla cardíaca conlleva mayor número de visitas al hospital por parte de la persona que la sufre, e incluso, mayores admisiones a hospitalización o una duración más larga de la misma, lo cual trae además implicaciones financieras²⁴.

La terapia con células madre, especialmente las células madre mesenquimales de médula ósea, ha surgido como una opción prometedora para el desarrollo de soluciones médicas en el área de la medicina regenerativa. Dichas células apoyan la hematopoyesis, tienen la capacidad de regular la respuesta inmune y una alta estabilidad en cultivos *in vitro*, lo que las hace muy atractivas para su uso en terapias celulares y regeneración de tejidos²⁵.

La posibilidad de reparar los vasos sanguíneos brinda un enorme potencial que podría ser una diferencia crucial en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares al reducir los efectos secundarios y maximizar los beneficios a los pacientes, además de ello también abriría paso a la posibilidad de proveer un sistema vascular a tejidos generados en laboratorio²⁶..

²² MEDTRONIC. Op.Cit p. 1-2

²³ FARKOUK, Michael; Strategies for Multivessel Revascularization in Patients with Diabetes. The New England Journal of Medicine. Noviembre 8, 2012.

²⁴ DIMARAKIS, Ioannis *et al.* In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes. Parte 1: Culture medium and growth factors. En: Journal of cardio-thoracic –renal research. Junio, 2006, vol. 1, p. 108.

²⁵ NASEF, A *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells. En: Libyan Journal of Medicine. 2007, vol. 2, no.4, p. 190.

²⁶ REKHA, Samuel; LAURENCE, Daheron, Generation of functionally competent and durable engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS). Julio 30, 2013.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Inducir la re-celularización del tejido endotelial de un vaso sanguíneo a partir de células madre de médula ósea diferenciadas *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar una técnica para descelularizar vasos sanguíneos de cerdo.
- Inducir la re-celularización de un vaso sanguíneo utilizando su matriz extracelular como andamiaje biológico para la regeneración.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

La búsqueda de células madre comenzó a raíz de los bombardeos de Hiroshima y Nagasaki en 1945, donde las personas que fallecieron tras la exposición a una mínima dosis letal lo hicieron a causa de una aplasia medular, ya que la normal renovación de las células sanguíneas (principalmente leucocitos y plaquetas) había quedado interrumpida, generando cantidades insuficientes de células blancas requeridas para la protección contra patógenos e infecciones.

En experimentos realizados en ratones irradiados se observó que si se protegía el bazo con una pantalla de plomo se evitaba el síndrome hematológico²⁷, y también que podían rescatarse animales sometidos a una dosis letal de radiación infundiéndoles células del bazo o de la médula ósea (MO) de un ratón no irradiado²⁸, hallazgos que sentaban las bases de los trasplantes hematopoyéticos, que desde los años 70 - 80 del pasado siglo se realizan de manera rutinaria en muchos de nuestros hospitales²⁹.

En la década de 1950 investigadores descubrieron que la médula ósea contenía al menos dos tipos de células madre. Uno de éstos son las llamadas células madre hematopoyéticas, que dan formación maduración y desarrollo de los elementos formes de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). El segundo tipo de células madre, llamadas células madre mesenquimales (MSC), fueron descubiertas unos años más tarde. Estas células madre no hematopoyéticas constituyen una pequeña proporción de la población de células del estroma de la médula ósea y pueden generar hueso, cartílago y adipocitos. Son las células que apoyan la formación de sangre y tejido conectivo fibroso³⁰.

La terapia celular es un enfoque para abordar el tratamiento de la enfermedad cardiovascular y se investiga en todo el mundo. Sin embargo, no se ha definido la mejor población celular a utilizar ni las mejores condiciones de tratamiento.

²⁷ . JACOBSON Lo, Simmons EL, Marks EK *et al.* (1950) The role of the spleen in radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med* **35**, 746-770.

²⁸ JACOBSON, Lo *Ibid.* p. 510-511.

²⁹ WEISSMAN, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403

³⁰ *Ibíd.*, Disponible en internet: <http://lascalulasmadre.es/adultas>

Todavía está por determinar si las células pueden conseguir estos efectos. La elección del tipo celular correcto, la ventana terapéutica ideal y el paciente adecuado también son cuestiones abiertas al debate³¹.

Debido a las dificultades para la obtención de células madre embrionarias y al dilema ético que estas conllevan, el uso de las células madre adultas ha sido el foco de las últimas investigaciones en el área, principalmente aquellas células obtenidas de la médula ósea. Se han realizado diversas investigaciones y aplicaciones de las células madres hematopoyéticas (HSC) y las células MSC en el tratamiento de enfermedades neurológicas degenerativas, diabetes, lesiones de la córnea, anomalías óseas, entre otras³².

En el 2009, en la universidad de Queens de Belfast se llevó a cabo un tratamiento con inyección de células procedentes de la médula ósea de donantes en personas con retinopatía diabética para tratar de reparar los vasos sanguíneos de los ojos³³.

En el año 2011 se implantaron en pacientes sometidos a diálisis, vasos sanguíneos funcionales creados en un laboratorio con células de piel. El ensayo fue preliminar y todavía será necesario llevar a cabo estudios más amplios, pero tal como informaron los investigadores durante un seminario de la Asociación Estadounidense del Corazón, los resultados fueron exitosos. Según los científicos, estos injertos vasculares de tejido alogénico regenerado tienen el potencial de lograr que los tratamientos de diálisis y otros procedimientos, como la reparación de arterias dañadas y defectos cardíacos, sean más rentables³⁴.

En el mismo año en Alemania se realizó un tejido artificial que logró recibir nutrientes, por medio de una técnica llamada polimerización multifotónica. Para imprimir un vaso sanguíneo tan pequeño y complejo se combinaron la tecnología de impresión 3D con la polimerización de dos fotones, para estimular las

³¹TAYLOR, Doris, MATTHEW, Robertson. Fundamentos de la terapia celular para tratamientos de enfermedades cardiovasculares, España, 2009: Universidad de Minnesota. Revista Cardiología Vol. 62 Núm.09. Fecha de consulta el 25 de agosto de 2013. Disponible en internet:

<http://www.revespcardiol.org/es/fundamentos-terapia-celular-el-tratamiento/articulo/13140545/>

³² POLAK, Julia. Regenerative Medicine: A Primer for Pediatricians. En: Early Human Development. Noviembre, 2009, vol. 85, no.11, p. 685.

³³HERNÁNDEZ, Porfirio. Medicina regenerativa II: México: IMBIOMED, Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas, 2006. Fecha de consulta el 25 de Agosto de 2013. Disponible en internet: http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=37766&id_seccion=2547&id_ejemplar=3898&id_revista=66

³⁴ BBC. Tratamiento celular .Implantan en pacientes vasos sanguíneos artificiales, 2010. Fecha de consulta el 27 Agosto de 2013. Disponible en internet: http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2011/06/110629_implante_venas_cultivadas_men.shtml

moléculas en un mínimo punto de enfoque. El material se transforma en un elástico sólido, con el que se tiene una alta precisión y es capaz de interactuar con el tejido natural del cuerpo humano y ser recubierto por biomoléculas modificadas³⁵.

En el año 2012, investigadores aplicaron el método de tratamiento desarrollado por Cockrell, que permitiría a los médicos que hacen cirugías de *bypass*, reparar los vasos sanguíneos dañados mediante la inyección de una sustancia lipídica la cual, una vez esté dentro del cuerpo, estimularía el crecimiento celular y así mismo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes. Este método combina un factor de crecimiento capaz de estimular la proliferación y diferenciación celular, utilizando un receptor de lípidos que mejora su actividad, conocido como factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2)³⁶.

Recientemente investigadores del Hospital General de Massachusetts, en Estados Unidos, utilizaron precursores de células vasculares derivadas de células madre pluripotenciales inducidas de humanos (iPSC), para generar en un modelo animal, vasos sanguíneos funcionales con una duración de hasta nueve meses. En su trabajo, publicado en *Proceedings of the National Academy of Sciences*, estos expertos describen el uso de iPSC, células adultas reprogramadas que tienen muchas de las características de las células madre embrionarias, para generar vasos sanguíneos en la superficie exterior del cerebro o debajo de la piel de los ratones³⁷.

El descubrimiento de llevar las células maduras de nuevo a un estado en que pueden diferenciarse a muchos tipos diferentes de tejido, ha traído un enorme potencial para el campo de la medicina regenerativa basada en células, pero el desafío sigue siendo derivar células funcionales de estas iPSC³⁸.

³⁵ BBC Mundo. Alemania: Vasos sanguíneos hechos en una impresora 3D, 2011. Fecha de Consulta el 28 de agosto 2013. Disponible en internet: http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias_vasos_sanguineos_impresos_3d_en.shtml

³⁶ MEDICAL PRESS. Nueva capacidad para regenerar los vasos sanguíneos es muy prometedora, 2012. Fecha de Consulta el 30 agosto 2013. Disponible en internet : <http://www.medicalpress.es/nueva-capacidad-para-regenerar-los-vasos-sanguineos-es-muy-prometedora-para-el-tratamiento>

³⁷ LA VOZ DE GALICIA. Crean vasos sanguíneos duraderos a partir de células reprogramadas. Europa, Madrid, 2013. Fecha de consulta el 26 septiembre 2013. Disponible en internet: http://www.lavozdeg Galicia.es/noticia/salud/2013/07/16/crean-vasos-sanguineos-duraderos-partir-celulas-reprogramadas/0003_201307G16P24997.htm

³⁸ *Ibid.*, Disponible en internet: http://www.lavozdeg Galicia.es/noticia/salud/2013/07/16/crean-vasos-sanguineos-duraderos-partir-celulas-reprogramadas/0003_201307G16P24997.htm

En Latinoamérica, Brasil es el líder en la investigación con células madre. Actualmente han logrado tratamientos exitosos como la regeneración de córnea, usando células madre adultas obtenidas de los dientes de leche, al igual que han incursionado en tratamientos para diabetes tipo 1 y la regeneración de vasos sanguíneos³⁹. A nivel nacional no se encuentran estudios publicados relacionados con la diferenciación celular para restaurar el tejido endotelial de un vaso sanguíneo.

4.2 MARCO TEÓRICO

El aparato cardiovascular es un sistema tubular cerrado, formado por el corazón, vasos sanguíneos y sangre; su función es transportar nutrientes, gases, desechos, anticuerpos, electrolitos, células sanguíneas, entre otros y regular el pH y la temperatura del cuerpo⁴⁰.

El corazón actúa como una bomba muscular que juega un papel muy importante en la circulación sanguínea, su formación requiere una compleja interacción de diversos tipos celulares, entre ellos el mesodermo de la placa lateral y la cresta neural. Las células de la cresta neural contribuyen a la formación de arterias y ganglios cardíacos, mientras que el mesodermo de la placa lateral es inducido a diferenciarse en mesénquima cardíaca, la cual da origen a dos linajes cardiogénicos específicos: miocardio y endocardio⁴¹.

El desarrollo embrionario de la formación de la vasculatura se realiza a través de dos procesos: vasculogénesis y la angiogénesis. La vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos de *novo* a través de la hemangioblasto putativo, una población de células madre intraembrionaria que da lugar tanto a endotelial precursores y los precursores hematopoyéticos. Por el contrario, la angiogénesis implica el surgimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes. Durante el desarrollo cardíaco, la vasculogénesis y la angiogénesis juegan un papel en la formación de la vasculatura coronaria⁴².

El sistema vascular sanguíneo se distribuye y se ramifica en forma sucesiva y en consecuencia se torna cada vez más estrecho; está compuesto por arterias,

³⁹ CÉLULAS MADRE: La clave de la regeneración [Programa televisivo]. USA: Discovery Channel. 12, Febrero, 2011.

²⁷ ROGER, Kara. The Human Heart. In: The Cardiovascular System (2011). P.21

⁴¹ JACKSON, Kathyjo y GOODELL, Margaret. Capítulo 23: Generation and Stem Cell repair of cardiac tissue. En: SELL, S. Stem Cells Handbook. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 260.

⁴² *Ibíd.*, p. 260.

capilares y venas. Las arterias son los vasos que evacúan la sangre y las venas son los vasos que la devuelven al corazón⁴³. Los componentes más importantes de los vasos sanguíneos son:

Tres capas denominadas tunicas (ver figura 1):

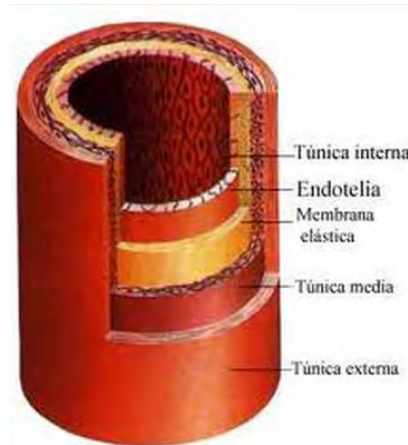
- Túnica íntima: capa interna formada por un epitelio simple y delgado, el endotelio, la lámina basal de las células endoteliales y la capa subendotelial formada por el tejido conjuntivo laxo, donde se encuentran células musculares lisas.
- Túnica Media: consiste en estratos circunferenciales de células musculares lisas.
- Túnica Adventicia: compuesta por colágeno, fibras colágenas, fibras elásticas, proteoglicanos, células musculares lisas

El endotelio es el tejido que recubre la zona interna de los vasos sanguíneos, que permite el intercambio de nutrientes y desechos, además de la circulación del torrente sanguíneo, la fluidez de la sangre y el tono vascular. Tiene una longitud de 50 micrómetros y un ancho promedio de 10 micrómetros, la superficie de las células endoteliales está recubierta de receptores permitiendo al endotelio realizar múltiples funciones. La pérdida de la función endotelial es la responsable de numerosas enfermedades como la arterosclerosis, hipertensión arterial, trombosis, hemorragias, etc.⁴⁴.

⁴³ FACIAS WEB. Vasos sanguíneos: Anatomía e histología de arterias, venas y capilares, sistema arterial y venoso hemodinámico, 2009. Fecha de consulta el 18 agosto 2013. Disponible en internet: http://faciasweb.uncoma.edu.ar/academica/materias/morfo/ARCHIVOPDF2/UNIDAD6/3-Unidad6-Vasos_sanguineos.pdf

⁴⁴ GASTON, Mariano, El endotelio vascular. En: Revista sflb. Buenos Aires,Argentina,2008

Figura 1. Capas de venas y arterias



Fuente: ROSS, H., Pawlina, W. Capítulo5: Arterias y Venas. En Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular (2012)

Las enfermedades crónicas no trasmisibles constituyen la mayor cantidad de muertes en el mundo y crecieron entre los años 2005 – 2010 en un 5,8%⁴⁵, dentro de este grupo la primera causa de muerte son las enfermedades cardiovasculares (48,8%), siendo la cardiopatía isquémica responsable de la mayor parte de este porcentaje⁴⁶.

La arterosclerosis es una enfermedad degenerativa de las arterias, que las vuelve rígidas y gruesas; una vez que pierden su elasticidad se dificulta la circulación sanguínea con consecuencias muy graves, las placas arterioscleróticas van ocluyendo las arterias hasta taponarlas, las células endoteliales se van deteriorando y se genera un proceso inflamatorio; las células a su vez se llenan de lípidos, principalmente del colesterol LDL, provocando la placa o ateroma que consiste en la acumulación de plaquetas. El riesgo está en que esta placa se puede romper y causar complicaciones cardiovasculares como cardiopatía isquémica, causa principal de muerte por enfermedades cardiovasculares, como se mencionó anteriormente^{47,48,49}.

⁴⁵ MATHERS CD, Loncar D. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results. WHO 2005; 1-130.

⁴⁶ CAPEWELL S, et al. Cardiovascular risk factor trends and potential for reducing coronary heart disease mortality in the United States of America. Bulletin of the World Health Organization 2010; 88: 120-130.

⁴⁷ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Op.Cit., http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/es/.

⁴⁸ JIMÉNEZ, María Alba Jiménez. Arteriosclerosis. España, Madrid: Universidad de Alcalá de Henares. Revista Salud al día, 2010 fecha de consulta el 28 agosto 2013. Disponible en internet: <http://www.webconsultas.com/arteriosclerosis/arterioesclerosis-3240>

La disfunción endotelial se define como el desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación facilitando el desarrollo de la arteriosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis. La disfunción es provocada por la alteración de funciones del endotelio (control del tono arterial, coagulación, fibrinólisis y crecimiento vascular)⁵⁰.

Dentro de las alternativas de tratamiento para enfermedades de las arterias, se han implementado el manejo convencional con medicamentos y procedimientos de intervenciones percutáneas como la angioplastia para abrir las arterias obstruidas y la cirugía de revascularización o derivación (*bypass*), considerados como un acercamiento óptimo para la mayoría de casos⁵¹. Sin embargo, los tratamientos farmacológicos suelen ir encaminados a alteraciones específicas como diabetes e hipertensión y la angioplastia puede producir trombosis, oclusión súbita de la malla implementada, o una reestenosis que es la recurrencia de una obstrucción a consecuencia del crecimiento de una cicatriz⁵².

Actualmente no hay un tratamiento que ofrezca una reparación del tejido endotelial, pero sí un restablecimiento completo del vaso sanguíneo con una técnica que está en estudio llamada polimerización multifotónica que mediante la impresión 3D, permitiría que los vasos sanguíneos artificiales puedan ser utilizados en trasplantes de órganos creados⁵³.

Se han explorado técnicas de la medicina regenerativa donde se usan células madre para tratar de reparar el daño de un tejido⁵⁴. Las células madre son células clonogénicas indiferenciadas, con un potencial extraordinario para convertirse en diferentes tipos de células en el cuerpo durante una vida temprana y el crecimiento. Sirven como una especie de reparación interna. Son células especializadas capaces de renovarse a sí mismas a través de la división celular,

⁴⁹HERREROS, Benjamín y BANDRES, Fernando. Análisis de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. En: Prevención primaria de arteriosclerosis (2009).P 51.

⁵⁰ DISFUNCIÓN ENDOTELIAL. En: Revista Española de Cardiología, Barcelona, España, Marzo 2010, Vol. 6 Núm. Supl.A DOI: 10

⁵¹ GEOSALUD. Arteriosclerosis, 2010. Fecha de consulta el 11 Agosto 2013. Disponible en internet: <http://geosalud.com/Enfermedades%20Cardiovasculares/aterosclerosis.htm>

⁵² TEXAS HEART INSTITUTE. Enfermedad arterial coronaria. Fecha de consulta: 11 agosto 2013. Disponible en: http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/Cond/cad_span.cfm

⁵³ ALPERT, Joseph; KERN, Karl y EWY, Gordon. The Risk of Stent Thrombosis after Coronary Arterial Stent Implantation. In: The American Journal of Medicine, Vol 123, No 6, June 2010.

⁵⁴ MOSKVITCH, Katia Vasos sanguíneos hechos en una impresora 3D. En: Revista BBC Mundo, 2011.

pueden ser inducidas a convertirse en un tejido o células específicas de órganos⁵⁵
56 57 .

Las células madre cuentan con cuatro propiedades o características fundamentales:

- Auto-renovación: proceso por el cual una célula madre se divide para generar células madre hijas, que tienen un potencial de desarrollo similar a la célula madre. La capacidad de auto-renovación es esencial para las células madre para ampliar su número durante el desarrollo que se mantiene dentro de los tejidos adultos y para restaurar células después de una lesión⁵⁸.
- Diferenciación: capacidad de las células madre de convertirse en uno de los tipos de células especializadas que forman una gran variedad de tejidos y órganos funcionales del cuerpo. La clave de la diferenciación celular no está en qué genes se encuentren en sus cromosomas, sino cuáles de ellos son expresados, dada tanto por factores internos de la célula, como externos que no dependen directamente de las diferencias en la secuencia del ADN. Una vez diferenciada la célula, no hay marcha atrás⁵⁹.
- Migración: Proceso esencial por medio del cual las células migran y se poseionan en el tejido en el que tendrán efectos funcionales y de protección. Se sabe que la dirección migratoria sigue un gradiente de densidad de quimiquinas. El aumento de la concentración de quimiocinas inflamatorias en el lugar de la inflamación es un mediador clave del anidamiento de las MSC⁶⁰
61 .

⁵⁵ STEM CELLS PRIMER. What are stem cells, and why are they important. Fecha de Consultado el 20 de Mayo de 2011. Disponible en internet: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>

⁵⁶ WEISSMAN, Irving. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. En: Cell. Enero, 2000, vol. 100, p. 157.

⁵⁷ CHAPMAN, Audrey; FRANKEL, Mark y GARFINKEL, Michele. Stem Cell Research and Applications: Monitoring the frontiers of Biomedical Research. Reporte producido por: The American Association for the Advancement of Science and the Institute for Civil Society. Washington, 1999. p. 1.

⁵⁸ SHENGHUI HE, Daisuke Nakada, and Sean J. Morrison, Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal, 2009

⁵⁹ HOCHEDLINGER, K (2010). Your Inner Healers: A Look into the Potential of Induced Pluripotent Stem Cells. Scientific American, a Division of Nature America. May, 2010.

⁶⁰ TAKAHASHI, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126:663-676.

⁶¹ LUSTER, AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. Nat Immunol 2005;6:1182–1190

- Inmunomodulación: Las células madre ejercen importantes funciones inmunomoduladoras al ser capaces de regular la respuesta inmune innata^{62 63}.

Según la potencialidad de una célula madre para originar células diferentes, se clasifica en: las células primarias (desde el cigoto hasta primeros ciclos de división celular), que se denominan totipotenciales y tienen la capacidad de diferenciarse en todo tipo de células del organismo y formar órganos; pluripotenciales, que pueden diferenciarse para dar origen a células de casi todos los tejidos; las multipotenciales que dan lugar a las diversas células de un mismo tejido, y progenitoras, que se diferencian en un solo tipo de célula⁶⁴.

Una característica del potencial de diferenciación de las células madre se conoce como plasticidad, lo que permite que estas células puedan adoptar distintas alternativas en respuesta a las señales regenerativas derivadas de un tejido, fenómeno denominado como transdiferenciación⁶⁵.

Existen diferentes tipos de células madre, nombradas de acuerdo al tejido en donde se encuentren o la fuente de la que se obtengan. Las células madre embrionarias (ESC), como su nombre lo indica, provienen de un grupo de células dentro de la masa celular interna de un estadio temprano del embrión (fase blastocito). Existen también células madre adultas, que se definen como células no especializadas, es decir no diferenciadas, que se encuentran en un tejido especializado y que posee la capacidad de generar regeneración y reparación del tejido en el que se encuentran⁶⁶. En las investigaciones más recientes se ha trabajado con las células madre mesenquimales porque se ha comprobado su multipotencialidad y no presentan dilemas éticos en su uso como las embrionarias. Dentro de las células madre adultas se encuentran las obtenidas de la médula ósea, que se han convertido en el objeto de investigación cada vez más intensa, que parecen conservar una amplia capacidad de diferenciación *in vitro*⁶⁷.

Entre las células madre de médula ósea se tienen las células madre hematopoyéticas (HSC), las células madre mesenquimales (MSC), y

⁶² ARGUEDAS, Samuel y RODELLAR, Clementina. Análisis de la capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria de las células madre mesenquimales equinas.

⁶³ ORDÁS, Ingrid; BOSCH, Elena; PANÉS, Julián. Tratamiento con células madre para la enfermedad de Crohn. En: Medicina Universitaria 2010;12(47):120-124

⁶⁴ TAKAHASHI, IL, Anderson. DJ, Gage F Op. cit., p.126.

⁶⁵ DOMEN, Jos; WAGERS, Amy y WEISMANN, Irving. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells. In: Cell. p. 19-20.

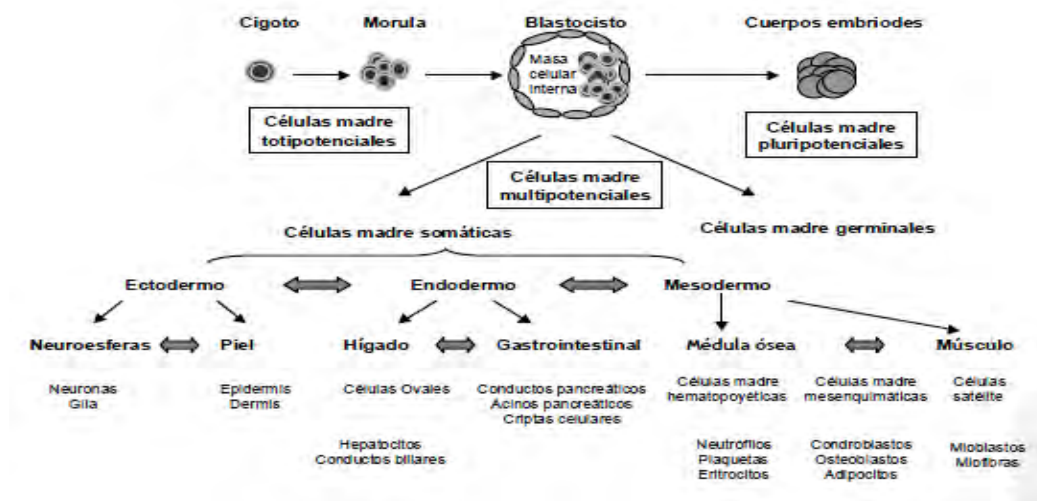
⁶⁶ CLARKE, D.L, Johansson, C.B., Wilberts, J., Veress, B, Nilsson, E., Karlstrom, H., and Frisen, J. (2000). Generalized potential of adult neural stem cells. Science 288, 1660-3.

⁶⁷ PROSPER. F, Universidad de Navarra. Se encuentra en: Células Madre Adultas.

recientemente las células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC) que generan principalmente hueso, cartílago, adipocitos, células de soporte y tejido fibro-conectivo⁶⁸.

En general las células se especializan en funciones determinadas debido a los genes que se expresan en cada una de ellas. La diferenciación que ocurre con las células madre, es una serie de etapas a través de las cuales la célula se va volviendo cada vez más diferenciada. Cada una de las fases de este proceso es irreversible y se puede dar tanto *in vitro* por medio de la adición de los factores de crecimiento y medios adecuados de acuerdo al tejido deseado como, *in vivo*. Estas investigaciones se han realizado como diversos tratamientos en los cuales se han extraído células madre de la médula ósea y se inyectan directamente en un tejido que necesite regeneración, quedando inmersas en un ambiente que las lleva a diferenciarse en el tipo celular necesario^{69 70}.

Figura 2. Modelo jerárquico de las células madre por su potencial



Fuente: WEISSMAN IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 387-403

⁶⁸ ASAKURA A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002;159:123-34.

⁶⁹ CHAPMAN, Audrey; FRANKEL, Mark y GARFINKEL, Michele. Stem Cell Research and Applications: Monitoring the frontiers of Biomedical Research. Reporte producido por: The American Association for the Advancement of Science and the Institute for Civil Society. Washington, 1999. p. 1.

⁷⁰ LEE Oscar *et al.* Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. En: *Blood: Journal of the American Society of Hematology*. Marzo, 2004, vol. 103, no. 5, p. 1669 –1670.

Las células diferenciadas en un proceso de investigación deben ser cultivadas para que se auto-renueven rápidamente y se mantengan en altas cantidades. Hay muchas variaciones a las técnicas de cultivo y los medios usados, dependiendo de la fuente de las células y la especie donante, las técnicas tanto de cultivo como de diferenciación pueden variar ampliamente de acuerdo a la persona que las maneje⁷¹.

En los vasos sanguíneos se debe trabajar una técnica denominada descelularización, que consiste en dejar el vaso sanguíneo solo con la estructura proteica de sostén y en la parte interna sin ninguna célula viva.⁷².

El procedimiento comprende la exposición del tejido a una solución hipotónica o hipertónica, en condiciones tales que se producen lisis celular y el sometimiento del tejido resultante a tratamiento con nucleasas, para eliminar los ácidos nucleicos. El tratamiento con nucleasas detiene de forma eficaz la replicación celular y la síntesis proteínica⁷³. El tejido puede mantener la integridad de su estructura con el uso de soluciones y esterilización⁷⁴.

Entre las soluciones adecuadas se incluye el agua o una solución que tenga una concentración de soluto (una sal como NaCl) de hasta 80 miliosmolar (por ejemplo, una solución de NaCl 10-20 o 20-40 mM). La lisis puede ser efectuada en un rango de temperatura que oscila entre 30 y 40 °C, preferiblemente 37 °C, preferiblemente en atmósfera con 5% de CO₂, durante un período de entre aproximadamente 12 y 24 horas. El tejido es después transferido a una solución de nucleasas (contenido DNA asa- y/o RNA asa) y sometido a incubación a una temperatura que oscila entre 30 y 40°C entre 4 y 9 horas.⁷⁵

La extensión de la descelularización puede ser determinada histoquímicamente, a través del teñido del tejido con hematoxilina y eosina, utilizando técnicas habituales. Puede también utilizarse el teñido inmunohistoquímico, para visualizar

⁷¹ SECCO, Marianne *et al.* Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord is Richer than Blood. En: Journal of Stem Cells. 2008, vol. 26, p.148.

⁷² BEYER NARDI, N y DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. En: WOBUS, Anna y BOHELER, Kenneth. Stem Cells. Vol. 174, Handbook of Experimental Pharmacology. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006. p. 263.

⁷³ ATALA, Anthony. Métodos para la descelularización de un órgano. [En línea]: Europa: Espatentes 2006 [Consultado el 17 de Agosto de 2013]. Disponible en internet: http://www.espatentes.com/pdf/2250220_t3.pdf.

⁷⁴ *Ibid.*, Disponible en internet: http://www.espatentes.com/pdf/2250220_t3.pdf.

⁷⁵ GILBERT TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials 2006;27 (19):3675–3683. [PubMed: 16519932]

marcadores celulares específicos, tales como actina de músculo liso y antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad; la ausencia de estos marcadores indica la descelularización⁷⁶.

Subsiguientemente, el tejido es transferido a una solución que ayuda a mantener la integridad de su estructura que puede ser una solución fisiológica (isotónica) como un medio de cultivo celular (DMEM).

Para la revisión del vaso sanguíneo descelularizado se realiza el proceso de tinción por técnica de Papanicolaou que consiste en la tinción de los núcleos de las células⁷⁷; una vez verificada la conservación del tejido biológico acelular, se realiza el proceso de re-celularización.

⁷⁶ STAPLETON TW, Ingram J, Katta J, Knight R, Korossis S, Fisher J, et al. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2008;14(4):505–518. [PubMed: 18370607].

⁷⁷ LACRUZ Pelea, César. *Citología Ginecológica de Papanicolaou a Bethesda*. Editorial Complutense, 2003. ISBN 84-7491-717-4

5. METODOLOGÍA

5.1 EXTRACCIÓN DE VASOS SANGUINEOS

El proceso de extracción se hizo a partir de los insumos biológicos (corazón de cerdo) tomados de un cerdo sacrificado con fines de comercialización de carne. Según el Artículo 1 del Decreto 2278 de 1982, no es necesaria la aprobación por parte de un comité de ética animal, debido a que su muerte fue por fines alimenticios.

El corazón del cerdo se conservó en hielo seco desde su adquisición hasta el procedimiento de extracción de los vasos sanguíneos, unas 12 horas aproximadamente. Se requirió de un kit quirúrgico estéril y una jeringa con 20 ml con solución salina fisiológica (SSF).

Se identificaron los vasos sanguíneos a extraer, se les inyectó SSF para identificar más fácil su contorno y se procedió a retirar con cuidado todo el tejido muscular circundante hasta obtener cada uno de ellos.

5.2 DESCELULARIZACIÓN DEL VASO SANGUÍNEO

Los vasos sanguíneos extraídos se colocaron en una caja Petri y se llevaron a una cámara de flujo laminar estéril al igual que todo el material a utilizar para evitar cualquier contaminación en las muestras.

Se trabajó con dos soluciones diferentes para el proceso de descelsularización que son NaCl 3M y SDS al 2 %, se prepararon 100 ml de cada una. Los vasos sanguíneos se introdujeron en 25 ml de cada solución por separado y se colocaron en agitación continua en un vórtex (BIO-RAD, BR 2000 Vortexer).

El vaso sanguíneo sumergido en NaCl 3M se retiró de la agitación a las 24 horas, se descartó la solución y se le realizaron tres lavados con SSF; durante cada lavado se colocó el recipiente en agitación durante 5 minutos y luego se puso en el vórtex durante 24 horas más. Al finalizar el tiempo se repitió el proceso de lavado

con SSF durante 5 minutos y se congeló el vaso sanguíneo en 50 ml de SSF a -20 °C.

El vaso sumergido en SDS al 2 % se agitó en el vórtex durante 6 horas, se descartó la solución y se reemplazó por 25 ml de SSF fresca, nuevamente se colocó en agitación durante 2 horas y al finalizar el tiempo se reemplazó la solución por 50 ml de SSF y se congeló a -20 °C.

Para verificar la descelularización del vaso sanguíneo en cada caso, se hicieron cortes muy delgados con bisturí No. 20, se fijaron por calor en un portaobjetos y se hizo la tinción con colorante de Papanicolaou.

El portaobjetos se colocó en una rejilla y se cubrió con la solución de Papanicolaou durante 1 minuto, se lavó 10 veces en agua desionizada y se colocó el cubreobjetos para visualizarlo al microscopio.

5.3 DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE

Se utilizaron células de rata Wistar criopreservadas en el banco de células del laboratorio *In vitro* de Univalle, se descongelaron 4 viales de las ratas número 3, 3, 2 y 29 a temperatura ambiente durante 10 minutos, se colocaron en 4 frascos T-25 (CORNING Flask, Vent Cap 430639) con 7 ml de DMEN (LONZA biowhittaker, CC No. 12-604F), suero fetal bovino (SFB) al 20% (LONZA CC No.14-502F,) y antibiótico(Gibco®, Penicillin-Streptomycin, CC No.15140-122) al 1 %, durante 24 horas en incubación a 37°C y 5% de CO₂

Pasadas las 24 horas se descartó el medio con las células no adheridas y se renovó el medio de cultivo manteniendo las condiciones de incubación; el medio se cambió cada 3 o 4 días hasta alcanzar la confluencia del 80 %. Una vez alcanzada la confluencia del 80%, se hicieron pases a frascos T-25 y frascos T-75 (SPL Life Sciences, Filter Cap CC No.71175), que fueron incubados con 7 y 15ml de medio de cultivo fresco a 37 °C con 5% de CO₂ hasta alcanzar una confluencia del 80 %

5.4 RE- CELULARIZACIÓN DEL VASO SANGUÍNEO

Para iniciar la re-celularización se mezclaron los frascos T-25 y T-75 de células MSC de la rata # 2 y se hizo el conteo celular. Se descartó el medio de cada frasco y se realizaron tres lavados con HBSS (CORNING, CC No. 20-023-CV) 1X a cada uno, se añadió tripsina-EDTA (Sigma) al 0,25%, al frasco T-25 1,5 ml y al T-75 3 ml y se incubó durante 5 minutos a 37°C al 5 % de CO₂, luego se añadieron 15 ml de DMEN con SFB al 20% para bloquear la acción de la tripsina.

Para el conteo se mezclaron 100 µl de suspensión de células con 900 µl de azul de tripán y se montaron 10 µl en la cámara de Neubauer. El recuento fue de 8.250.000 MSC aproximadamente. El valor se calculó considerando el volumen de medio en el que se encontraban las células (15 ml), el factor de la cámara (10 000), la dilución (10) y el promedio del conteo realizado (5,5).

El medio de diferenciación a tejido endotelial se preparó suplementando una botella de EBM-2 (CC-3156) de 500 ml con el kit EGM-2 Single Quots que contiene FBS 10 ml, hFGF-B 2ml, VEGF 0,5 ml, hEGF 0,5ml, R3-IGF-1 0,5 ml, Heparin 0,5 ml, Ascorbic Acid 0,5 ml y Hydrocortisone 0,2 ml.

En un recipiente del biorreactor se pusieron 3 vasos descelularizados, (recipiente A) y en el segundo (recipiente B), se puso una matriz de PLLA (Synthecon, BiostructureMatrix Tubular Scaffolds, diámetro 1mm) y tres vasos de control sin someter a descelularización, para ambos casos se añadieron 10 ml del medio de diferenciación y 358.695 MSC/ml, la células previamente se centrifugaron durante 5 minutos a 2 000 r.p.m. El proceso de incubación fue a 37 °C al 5 % de CO₂ con una velocidad de rotación de 11,5 r.p.m. buscando que las diferentes matrices no tocaran las paredes de los recipientes.

Como control de diferenciación se sembraron MSC con medio de diferenciación en un frasco T-25 que se mantuvo en iguales condiciones de incubación y de cambios de medio cada 3 o 4 días hasta alcanzar la diferenciación a células endoteliales, evidenciada por la morfología de las células al microscopio.

Al recipiente B se le extrajo todo el medio de diferenciación a los 11 días y se le realizaron 2 lavados con HBSS 1X y antibiótico, en el último lavado se dejaron 15 minutos en esa solución. Se llevaron en una caja de Petri los 3 vasos y el PLLA para realizar el corte histológico.

El corte de los tres vasos sanguíneos de control se realizó con bisturí quirúrgico No. 20 y se colocaron en portaobjetos, de igual forma se hizo con la matriz de PLLA. La fijación al portaobjetos se llevó a cabo por calor; para la tinción con colorante de Papanicolaou se colocaron los portaobjetos en una rejilla y durante

un minuto se dejaron cubiertos por la solución de tinción, después se hicieron 10 lavados con agua desionizada a cada uno y luego se les colocó el cubreobjetos para visualización en el microscopio.

Al recipiente A, se descartó el medio de diferenciación a los 15 días y los 3 vasos sé pusieron en una caja de Petri. El corte y la tinción con el colorante de Papanicolaou se realizaron de la misma forma que a los vasos de control.

6. RESULTADOS

6.1 EXTRACCIÓN DE VASOS SANGUINEOS

En la extracción de vasos sanguíneos, se obtuvieron la arteria coronaria descendente y 2 arterias más, las cuales se dividieron en 6 partes iguales (ver figura 3).

Figura 3. Extracción vaso sanguíneo de cerdo



Figura 4. Vasos sanguíneos de cerdo



6.2 DESCELULARIZACIÓN DEL VASO SANGUÍNEO

Al realizar la descélularización con NaCl 3M y SDS 2%, se encontró que con los dos métodos era posible obtener la descélularización completa, sin embargo

existe una diferencia de tiempo considerable entre ellas, razón por la cual se estandarizó la técnica con SDS 2% para ser la empleada, requiere el menor número de intervenciones, disminuyendo los riesgos de contaminación y permite alcanzar el objetivo en un menor tiempo.

El resultado de la tinción de Papanicolaou, evidencia que no hay células, ya que no se visualizaron núcleos, solo la matriz de colágeno del vaso sanguíneo con su característica de superficie rugosa (ver figura 5, 6 y 7).

Figura 5. Corte del vaso sanguíneo 4x



Figura 6. Vaso sanguíneo con colorante de Papanicolaou sin células.

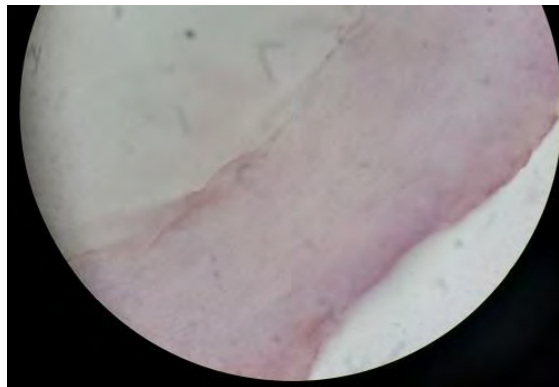
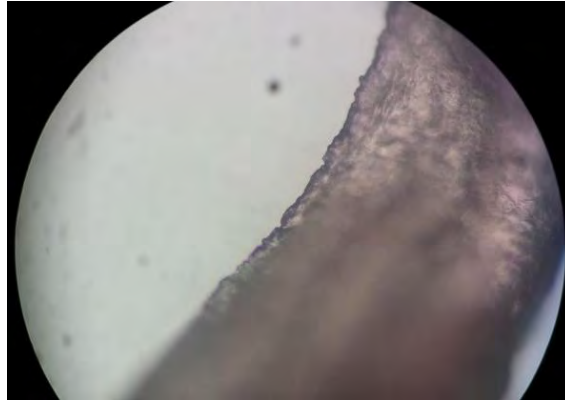


Figura 7. Corte del tejido con superficie rugosa



6.3 DESCONGELACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MSC

Las células se pusieron en cultivo y a las 24 horas se hizo el primer cambio de medio; se revisó la adherencia de las células y se encontró que las células de la rata # 3 no se adhirieron por lo cual tuvieron que ser descartadas, mientras que las MSC de las ratas # 2 y 29 tuvieron adherencia (ver figura 8 y 9).

Figura 8. MSC 24 horas después de cultivo rata # 2

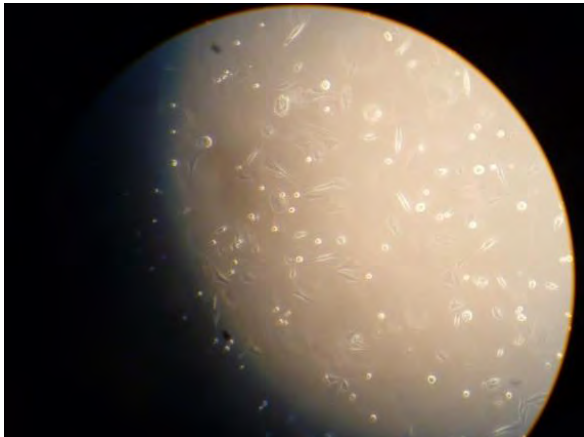
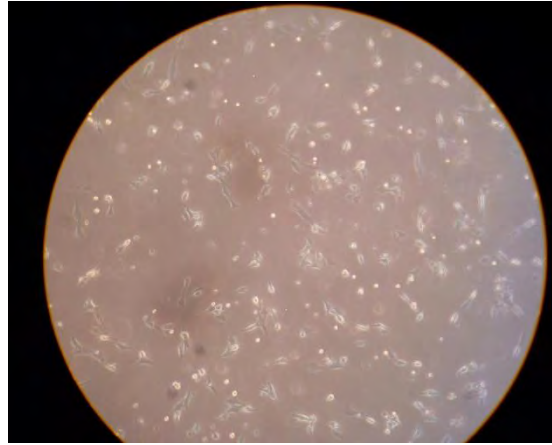


Figura 9. MSC 24 horas después de cultivo rata # 29

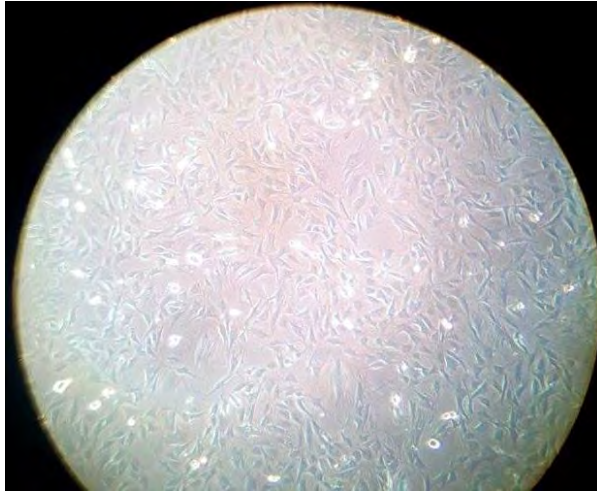


A los 9 días de la expansión se alcanzó la confluencia del 80 % en los frascos de las células de la rata # 2, sin embargo los frascos con células de la rata # 29 comenzaron a desprenderse (ver figura 10 y 11), por lo que fueron descartadas

Figura 10. MSC desprendidas de la rata # 29



Figura 11. MSC con la confluencia alcanzada rata # 2



6.4 RE- CELULARIZACIÓN DEL VASO SANGUÍNEO

La instalación del biorreactor y su distribución se muestran en la figura 12 y 13, la base para los recipientes se coloca dentro de la incubadora para garantizar las condiciones de incubación. Las células del frasco de control no mostraron modificaciones en la morfología cuatro días después de haberse puesto en el medio de diferenciación (ver figura 14).

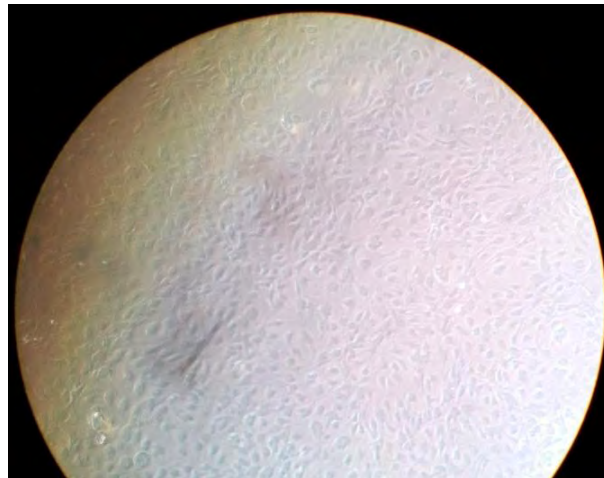
Figura 12. Montaje del biorreactor dentro de la incubadora



Figura 13. Biorreactor con los vasos sanguíneos, células y medio



Figura 14. Células al cuarto día de cultivo



En la revisión para cambio de medio al octavo día de cultivo, las células del frasco de control comenzaron a mostrar modificaciones en su morfología (ver figura 15).

Figura 15. Día octavo en medio de diferenciación a tejido endotelial



Las células puestas en el recipiente del biorreactor con la matriz de PLLA y los 3 vasos de control se encontraron contaminadas el undécimo día, por lo que se extrajeron inmediatamente para visualizar los resultados. La tinción mostró en el microscopio en 100X, que tanto en el PLLA como en los vasos de control habían células endoteliales (ver la figura 16 y 17).

En los vasos de control (Figura 16), se visualizaron los núcleos y estructura en forma alargada característicos de las células endoteliales confirmando que dentro del biorreactor se mantienen vivas y en el caso del PLLA se confirmó la adherencia y diferenciación a células endoteliales (ver figura 17). La morfología característica de las células endoteliales se observó claramente a los quince días en el frasco de control (Ver figura 18.)

Figura 16. Corte del vaso sanguíneo de control a 100X

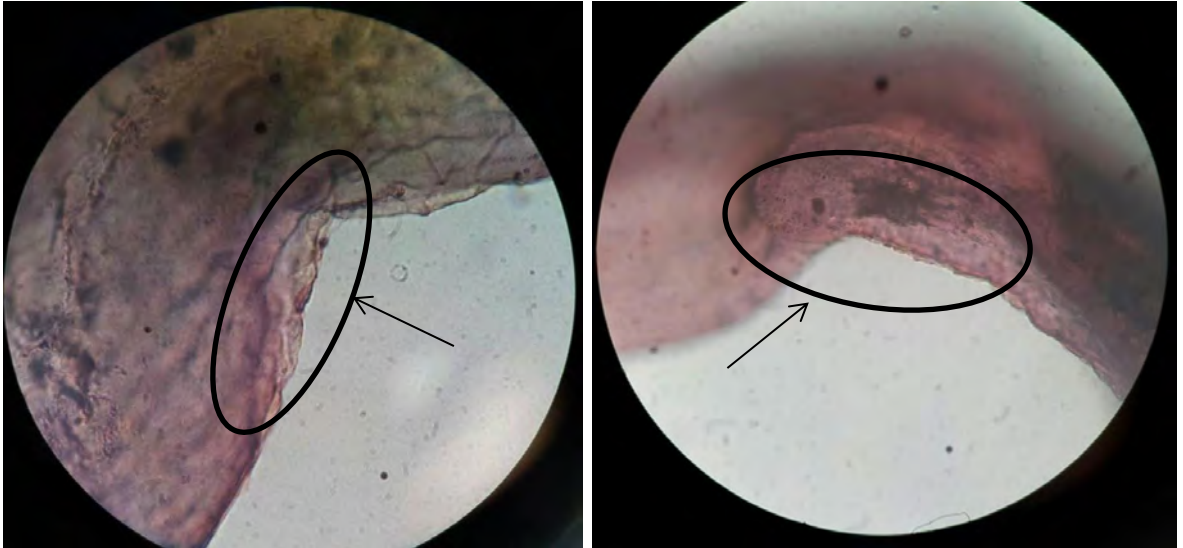


Figura 17. Corte de la matriz de PLLA a 100X

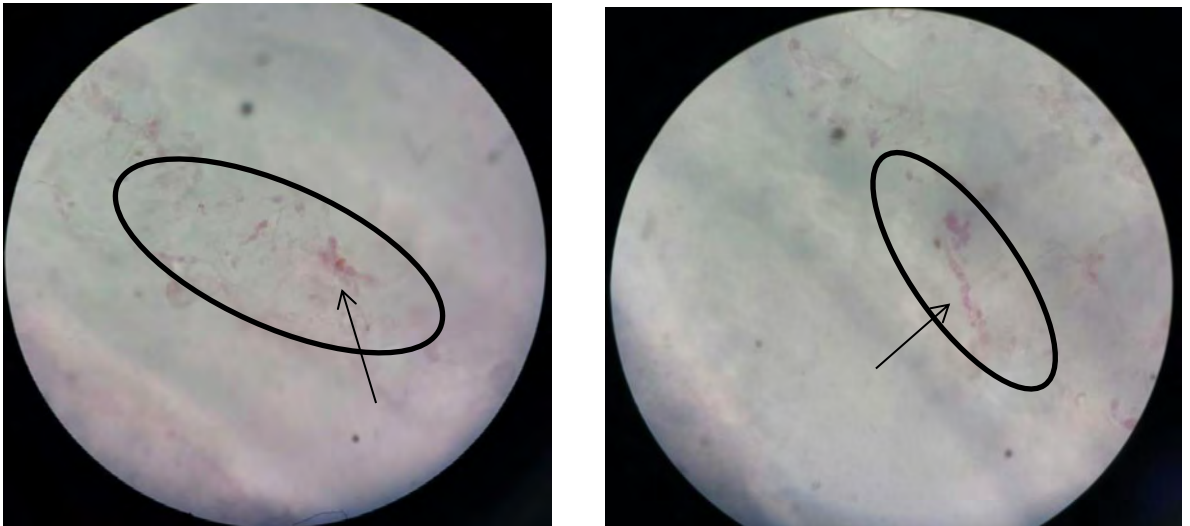
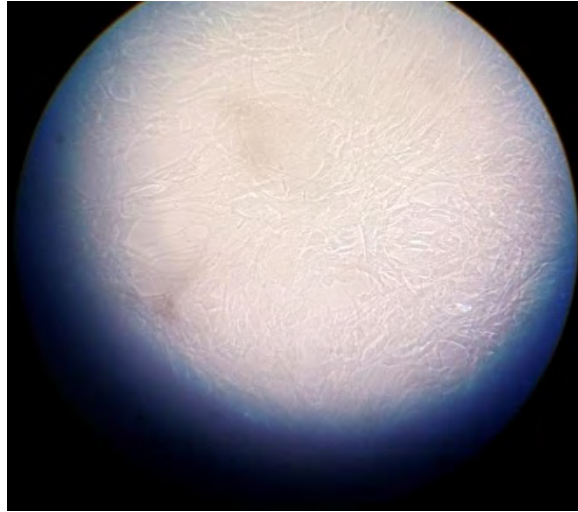
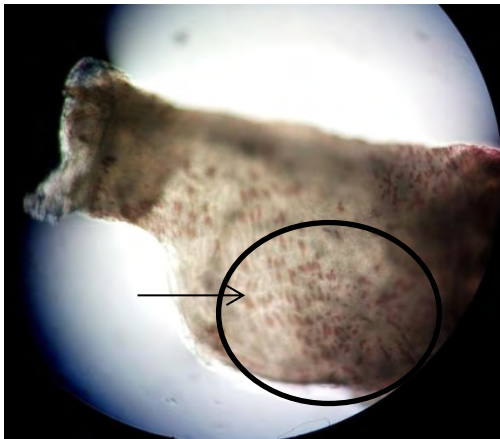


Figura 18. Quince días en medio de diferenciación a tejido endotelial



Se confirmó la re-celularización y la diferenciación a endotelio dentro del biorreactor después de 15 días en la matriz extracelular de un vaso sanguíneo, al observarse núcleos alargados y una distribución organizada de las células endoteliales (ver figura 19)

Figura 19. Corte vaso sanguíneo re-celularizado



7. DISCUSIÓN

En esta investigación la extracción del vaso sanguíneo se realizó del corazón de un cerdo sacrificado con fines alimenticios, debido a que no se harían pruebas en humanos, para una posterior investigación que articule los procesos *In vitro* con pruebas en humanos, los protocolos de extracción deben ser más estrictos.

Los elementos vinculados directa e indirectamente con los cultivos celulares en el biorreactor deben estar en completo estado de esterilidad para evitar cualquier tipo de contaminación. En la investigación la contaminación generó la extracción anticipada de la matriz de PLLA y los vasos sanguíneos de control, interrumpiendo la continuidad en el crecimiento celular que ya había alcanzado la adherencia y la diferenciación.

La adherencia de las células al vaso sanguíneo en la investigación era el objetivo, sin embargo la ubicación de ellas no, por ello en procesos futuros se debe buscar como bloquear la capa externa del vaso sanguíneo.

Para visualizar los resultados se realizaron cortes con bisturí quirúrgico No 20 con el cual el espesor de corte fue impreciso, ocasionando que no se pudiera establecer un área de sección para calcular el número de células en la placa histológica. Por ello para una posterior investigación se debe usar un micrótopo que garantice cortes adecuados y precisos.

La viabilidad y lo prometedor de la regeneración de tejido que se viene desarrollando en el exterior, como los vasos sanguíneos creados a partir de células de piel informado en el seminario de la Asociación Estadounidenses del Corazón en el 2011, la creación de tejido artificial combinando la tecnología de impresión 3D, usando materiales como el PLLA y La reparación de vasos sanguíneos realizada por Cockrell en el 2012, muestran que los resultados encontrados en esta investigación son los primeros pasos en la búsqueda de tratar enfermedades y recuperar tejidos.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda la metodología seguida para la descelularización en investigaciones que requieran trabajar con matrices biológicas, la cual garantiza la conservación de la estructura y logra el objetivo en el menor tiempo. Así mismo se sugiere a los investigadores que trabajen en la rama de ingeniería de tejido con células madre, el uso del biorreactor para el cultivo y diferenciación, ya que contrarresta el efecto de la gravedad en las células y para una futura continuidad de la investigación aumentar el tiempo de cultivo para buscar la formación de tejido endotelial.

Adicionalmente se recomienda que la Universidad Autónoma de Occidente y el grupo de investigación G-Bio continúe trabajando en conjunto con la Universidad del Valle dándole continuidad a la investigación y fomentando nuevas investigaciones con células madre en el área cardiovascular, buscando fortalecer la rama de ingeniería de tejido en la carrera de ingeniería Biomédica.

BIBLIOGRAFÍA

ALPERT, Joseph; KERN., Karl y EWY, Gordon. The Risk of Stent Thrombosis after Coronary Arterial Stent Implantation. In: The American Journal of Medicine, June 2010, Vol 123, No 6.

American Association for the Advancement of Science and the Institute for Civil Society.

ANAIZ, Jorge. Anatomía Humana. Vasos Sanguíneos [En línea]. [citado 14 agosto,. 2013]. Disponible en internet: <<http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo2/vasos.html>.> Applications: Monitoring the frontiers of Biomedical Research.

ARGUEDAS, Samuel y RODELLAR, Clementina. Análisis de la capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria de las células madre mesenquimales equinas. Trabajo de grado Master en Biología Molecular y Celular. Zaragoza.: Universidad de Zaragoza. Facultad de Ciencias, 2012

ASAKURA A, Seale P; GIRGIS, Gabardo A y RUDNICKI, M. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. J Cell Biol 2002;159:123-34.

ATALA, Anthony. Métodos para la descelularización de un órgano. [En línea]: Europa: Espatentes 2006 [Citado 17 Agosto,. 2013]. Disponible en internet: <http://www.espatentes.com/pdf/2250220_t3.pdf>

BBC Mundo. Alemania: Vasos sanguíneos hechos en una impresora 3. [En línea]. [Citado 28 Agosto,. 2013]. Disponible en internet: <http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias_vasos_sanguineos_impresos_3d_en.shtml>

BBC. Tratamiento celular .Implantan en pacientes vasos sanguíneos artificiales, 2010[En línea]. [Citado 18 Agosto,. 2013]. Disponible en internet: <http://www.bbc.co.uk/mundo/noticias/2011/06/110629_implante_venas_cultivadas_men.shtml>

BEYER NARDI, N y DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *in vitro* Biomédicas Latinoamericanas, 2006[Documental]. [Citado l 25 Agosto, 2013]. Disponible en internet: Blood: Journal of the American Society of Hematology. Marzo, 2004, vol. 103, no. 5, p. 1669 –1670.

BROWNSON RC, Haire-Joshu D, Luke DA Shaping the context of health: a review of environmental and policy approaches in the prevention of chronic diseases. Annu Rev Public Health. 2006;27:341-70

BUTLER D. Un targets top killers. International summit considers how to stem the rise in non-communicable diseases. Nature. 2011;477: 260-1.

CAPEWELL S, et al. Cardiovascular risk factor trends and potential for reducing coronary heart disease mortality in the United States of America. Bulletin of the World Health Organization 2010; 88: 120-130. Cell Self-Renewal, 2009

CASSIANI, Carlos, CABRERA, Armando. Síndromes coronarios agudos: epidemiología y diagnóstico. Santiago de Cali (valle). Revista Salud Uninorte. Vol. 25, n.º 1, 2009 ISSN 0120-5552.

CÉLULAS MADRE: La clave de la regeneración [Programa televisivo]. USA: Discovery Channel.

CHAPMAN, Audrey; FRANKEL, Mark y GARFINKEL, Michele. Stem Cell Research and Applications: Monitoring the frontiers of Biomedical Research. Reporte producido por: The American Association for the Advancement of Science and the Institute for Civil Society. Washington, 1999. p. 1.

CLARKE, D.L, Johansson, C.B., Wilberts, J., Veress, B, Nilsson, E., Karlstrom, H., and Frisen, J.(2000). Generalized potential of adult neural stem cells. Science 288, 1660-3.

DIARIO LIBRE. Enfermedades Cardiovasculares son la principal muerte en el mundo. revista Salud. Ginebra. [Citado 22 Agosto, 2013]. Disponible en internet: http://www.diariolibre.com/noticias_det.php?id=393993&l=1

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL. En: Revista Española de Cardiología, Barcelona, España, Marzo 2010, Vol. 6 Núm. Supl.A DOI: 10

DOCSALUD. En el país el 20%de angioplastias son practicadas por urgencias. Colegio Argentino de Cardioangiólogos. [Citado 20 Agosto 2013]. Disponible en internet: <<http://www.docsalud.com/articulo/3624/en-el-pa%C3%ADs-el-20-de-las-angioplast%C3%ADas-deben-ser-practicadas-de-urgencia>>

DOMEN, Jos; WAGERS, Amy y WEISMANN, Irving. Bone Marrow (Hematopoietic) Stem Cells.

En: Journal of Stem Cells. 2008, vol. 26, p.148.expansion and characterization. En: WOBUS, Anna y BOHELER, Keneth. Stem Cells. Vol. 174, Handbook of xperimental Pharmacology. Alemania: Springer-Verlag Berlín Heidelberg, 2006. p. 263.

FACIAS WEB. Vasos sanguíneos: Anatomía e histología de arterias, venas y capilares, sistema arterial y venoso hemodinámico, 2009. [Citado 18 Agosto 2013]. Disponible en internet: <http://faciasweb.uncoma.edu.ar/academica/materias/morfo/ARCHIVOPDF2/UNIDAD6/3-Unidad6-Vasos_sanguineos.pdf>

GALVAN, Diana .Factores de riesgos para enfermedades crónicas. Bogotá D.C: Trabajo de grado: (Maestría en salud pública) Universidad Nacional. Facultad de medicina. [Citado 5 mayo 2012]. Disponible en internet: <<http://www.bdigital.unal.edu.co/3073/1/598226.2010.pdf>>

GASTON, Mariano, El endotelio vascular. En: Revista SFLB. Buenos Aires, Argentina, 2008

GEOSALUD. Arteriosclerosis, 2010. [Citado 11 Agosto,. 2013]. Disponible en internet: <http://geosalud.com/Enfermedades%20Cardiovasculares/aterosclerosis.htm>

GILBERT TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials 2006;27(19):3675–3683. [PubMed: 16519932]

GOMÉZ, Luis Alberto. Enfermedades Cardiovasculares un problema de Salud Pública [En línea]. Bogotá D.C.: Universidad Nacional. Revista Biomédico vol. 31. No. 4, p.1. [Citado 8 abril 2013]. Disponible en internet en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572011000400001&lng=pt&nrm=iso>

HERNÁNDEZ, Porfirio. Medicina regenerativa II: México: IMBIOMED, Índice Mexicano de Revistas

HERREROS, Benjamín; BANDRES, Fernando. Análisis de los factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. En: Revista Prevención primaria de arterosclerosis (2009).P 51.

HOCHEDLINGER, K (2010). Your Inner Healers: A Look into the Potential of Induced Pluripotent Stem Cells. Scientific American, a Division of Nature America. May, 2010.

JACKSON, Kathyjo ; GOODELL, Margaret. Capítulo 23: Generation and Stem Cell repair of cardiac tissue. En: SELL, S. Stem Cells Handbook. New Jersey: Humana Press, 2004. p. 260.

JACOBSON Lo, *et al.* (1950). The role of the spleen in radiation injury and recovery. En: *Revista Médica: Lab Clin* .No. **35**, p. 746-770.

JIMÉNEZ, María Alba Jiménez. Arteriosclerosis. España, Madrid: Universidad de Alcalá de Henares [En línea]. En: Revista Salud al día, 2010 [Citado 28 agosto 2013]. Disponible en internet: <<http://www.webconsultas.com/arteriosclerosis/arterioesclerosis-3240>>

KNOEPFLER, Paul. Stem Cell.San Diego California. USA: School of medicine. [En línea]. [Citado 22 de agosto de 2013]. Disponible en internet: <<http://lascalulasmadre.es/adultas>>

LACRUZ Pelea, César. Citología Ginecológica de Papanicolaou a Bethesda. Editorial Complutense, 2003. ISBN 84-7491-717-4

LA VOZ DE GALICIA. Crean vasos sanguíneos duraderos a partir de células reprogramadas [En línea]. Europa, Madrid, 2013. [Citado 26 Septiembre 2013]. Disponible en internet: <http://www.lavozdeg Galicia.es/noticia/salud/2013/07/16/crean-vasos-sanguineos-duraderos-partir-celulas-reprogramadas/0003_201307G16P24997.htm>

LEE Oscar *et al.* Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. En: MATHERS CD, Loncar D. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results. WHO 2005; p. 1-130.

LUSTER, AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005; 6:1182–1190

MEDICAL PRESS. Nueva capacidad para regenerar los vasos sanguíneos es muy prometedora [En línea], 2012. [Citado 30 Agosto 2013]. Disponible en internet: <<http://www.medicalpress.es/nueva-capacidad-para-regenerar-los-vasos-sanguineos-es-muy-prometedora-para-el-tratamiento>>

MEDLINE PLUS. Arteriosclerosis [En línea]. [Citado 15 Agosto 2013]. Disponible en internet: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/atherosclerosis.html>>

MEDTRONIC. Beneficios y riesgos de la implementación de un Stent coronario [En línea]. [Citado 31 Octubre 2013]. Disponible en internet: <<http://www.medtronic.es/su-salud/enfermedad-arteria-coronaria/dispositivo/angioplastia-balon-implantacion-stent/beneficios-riesgos/index.htm>>

MONCAYO A. Nuevas dimensiones de la salud pública. En: Malagón-Londoño G, Moncayo-Medina A, editores. *Salud Pública. Perspectivas*. Segunda edición. Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 26-44. in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2007; 370:1929-38.

MOSKVITCH, Katia Vasos sanguíneos hechos en una impresora 3D. En: Revista BBC Mundo, 2011.

ORDÁS, Ingrid; BOSCH, Elena y PANÉS, Julián. Tratamiento con células madre para la enfermedad de Crohn. En: Medicina Universitaria 2010; p.120-124

POLAK, Julia. Regenerative Medicine: A Primer for Pediatricians. En: Early Human Development. Noviembre, 2009, vol. 85, no.11, p. 685.

POUNTOS, Ippokratis *et al.* Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. En: Injury: International journal for the care of the injured. Septiembre, 2007, vol. 38, suplemento 4, p. S24-S25

PROSPER. F, Universidad de Navarra. Se encuentra en: Células Madre Adultas. Radiation injury and recovery. *J Lab Clin Med* **35**, 746-770.

ROGER, Kara. The Human Heart. In: The Cardiovascular System (2011). P.21

ROSS, H., Pawlina, W. Capítulo5: Arterias y Venas. En Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular (2012)

SECCO, Marianne *et al.* Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord is Richer than Blood. En: Journal of Stem Cells. 2008, vol. 26, p. 146-150.

SHENGHUI HE, Daisuke Nakada, and Sean J. Morrison, Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal, 2009

SMIBA. Disfunción endotelial: impacto en la enfermedad arterial coronaria, 2010[En línea]. [Citado 18 Agosto 2013]. Disponible en internet: <http://www.smiba.org.ar/revista/smiba_03/endotelial01.htm>

STAPLETON TW, Ingram J, Katta J, Knight R, Korossis S, Fisher J, et al. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2008;14(4):505–518. [PubMed: 18370607].

STEM CELLS PRIMER. What are stem cells, and why are they important [En línea]. [Citado 20 de Mayo, 2011]. Disponible en internet: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>

TAKAHASHI, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. p.126:663-676.

TAYLOR, Doris, MATTHEW, Robertson. Fundamentos de la terapia celular para tratamientos de enfermedades cardiovasculares, España, 2009; Universidad de Minnesota. Revista Cardiología Vol. 62 Núm.09.

TEXAS HEART INSTITUTE. Enfermedad arterial coronaria [En línea]. [Citado Agosto 2013]. Disponible en internet: http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/Cond/cad_span.cfm

TEXAS HEART INSTITUTE. Factores de Riesgo Cardiovascular 2011[En línea]. [Citado 12 Abril 2013]. Disponible en internet: http://www.texasheartinstitute.org/HIC/Topics_Esp/HSmart/riskspan.cfm.

VALDEPEÑAS L, Moya F. Prevención Primaria De La Arteriosclerosis, editores. Comunicación Gráfica. Madrid; 2009. p. 29-53. Washington, 1999. p. 1.

WEISSMAN IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol 2001;17:387-403.

WEISSMAN, Irving. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. En: Cell. Enero, 2000, vol. 100, p. 157.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Health Observatory 2011 [En línea]. [Citado 8 de Abril 2013]. Disponible en internet: <http://www.who.int/gho/ncd/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on non communicable diseases 2011[En línea]. [Citado 11 Abril de 2013]. Disponible en internet: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/es/.