

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



**Tesis Doctoral**

**DESARROLLO DE UN CORAZÓN  
BIOARTIFICIAL A PARTIR DE  
RECELULARIZACIÓN CON CÉLULAS MADRE  
DE ORIGEN ADIPOSO**

*Autor:* Nieva, Eduardo Gabriel

*Director:* Salvatierra, Nancy Alicia

Julio de 2022



Desarrollo de un corazón bioartificial a partir  
de recelularización con células madre de origen adiposo

---

# **DESARROLLO DE UN CORAZÓN BIOARTIFICIAL A PARTIR DE RECELULARIZACIÓN CON CÉLULAS MADRE DE ORIGEN ADIPOSO**

*Por*

Nieva, Eduardo Gabriel

*Director*

Salvatierra, Nancy Alicia

*Comisión Asesora*

Prof. Dr. Ing. **Carlos Oldani**. FCEFyN, UNC

Prof. Dr. Ing. **Carmelo José Felice**. FACET, UNT

Esta Tesis fue enviada a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba como requisito parcial para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias de la Ingeniería.

Córdoba, Argentina

Julio de 2022

---



**ACTA DE EXAMEN**

Libro: E2022 Acta: 00079 Hoja 01/01  
LLAMADO: Llamado del Turno P10-(T209)\_TESIS 28/07/2022  
CATEDRA - MESA: 28-07-22 NIEVA Eduardo G.

(P10-DI002) TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

NÚMERO	APELLIDO Y NOMBRE	DOCUMENTO	INGR.	COND.	NOTA	FIRMA
34184037	NIEVA, EDUARDO GABRIEL	DNI 34184037	2015		A (Aprobado)	

SCHNEITER, ERNESTO MATIAS - MONTINI BALLARIN, FLORENCIA - RODRIGUEZ, ANDREA PAOLA - LUCCI,  
Observaciones:

Córdoba, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_-.

Certifico que la/s firma/s que ha/n sido puesta/s en la presente Acta pertenece/n a: \_\_\_\_\_

1	0	1	0	1
Inscriptos	Ausentes	Examinados	Reprobados (0-3)	Aprobados (4-10)



**ACTA DE EXAMEN**

Libro: E2022 Acta: 00079 Hoja 01/01  
LLAMADO: Llamado del Turno P10-(T209)\_TESIS 28/07/2022  
CATEDRA - MESA: 28-07-22 NIEVA Eduardo G.

(P10-DI002) TESIS DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA

NÚMERO	APELLIDO Y NOMBRE	DOCUMENTO	INGR.	COND.	NOTA	FIRMA
34184037	NIEVA, EDUARDO GABRIEL	DNI 34184037	2015		A (Aprobado)	

SCHNEITER, ERNESTO MATIAS - MONTINI BALLARIN, FLORENCIA - RODRIGUEZ, ANDREA PAOLA - LUCCI,  
Observaciones:

Córdoba, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_-.

Certifico que la/s firma/s que ha/n sido puesta/s en la presente Acta pertenece/n a: \_\_\_\_\_

1	0	1	0	1
Inscriptos	Ausentes	Examinados	Reprobados (0-3)	Aprobados (4-10)



## Agradecimientos

Si bien esta tesis doctoral tiene un solo nombre como autor, es el resultado de muchas voluntades que pudieron hacer posible este ansiado proyecto:

Primero a mi familia, que siempre estuvo ayudándome y apoyándome, tirándome buena onda desde 1000km. Y no solo la familia que se encuentran a 1000km si no a los que tengo aquí, a mi familia elegida Fede, Nico; a mi Pauli, mi pilar que me sostuvo y me ayudó a mantenerme en pie, dándome energía para finalizar esta etapa. Ni hablar de Gauss, Grid y Koda mis compañeros felinos que estuvieron, están y estarán al lado mío.

Quién se merece estar también en un primer lugar es mi directora, Nancy Salvatierra... *llegamos Nan!! por fin!!* :D después de tantos mates, tantos días compartidos en el laboratorio, discutiendo de temas del día, defendiendo nuestras ideas y escuchando a Sabina y a veces hasta Rata blanca y la Renga llegó el día!! ¡¡¡¡Gracias!!!! Después de todo y tanto tiempo, ahora puedo decir que se pesar, o no?.

Ivan, no me olvidé de vos, pero tengo un parrafito especial, cuando entré al doctorado me faltaba como mi compinche, alguien quien me pueda enseñar a transitar estos años de doctorado y aunque estés en otro laboratorio creo que esa persona que te ayuda a manejar la frustración, los éxitos, esa persona con la que discutís ideas con una cerveza en el medio, esa persona que cuando te quedaste sin DMSO o te quedaste sin soluciones gritas *IVANNN!!!*, esa persona sos vos. ¡Muchas gracias!

También quisiera hacer llegar mis agradecimientos a un grupo de personitas muy especial que viven en el otro lado del charco, a los integrantes de mi querido Laboratorio de Cardiología Traslacional, a Uge, a Andreu, a las Anas, a la cordobesa y a todo el equipo, posta que tienen un lugar muy importante en mi corazón y estoy seguro de que sin Uds este día no hubiera llegado.

A la Universidad Nacional de Córdoba, *mi alma mater*, me vio llegar con 18 años y hoy soy un resultado de lo que la UNC brinda.

A la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales que me brindó el apoyo físico donde poder trabajar, reír, matear, investigar y a veces, porque no, llorar porque se me morían las células.

A todos aquellos que durante este tiempo han ayudado a que esta tesis sea hoy una realidad, mi comisión asesora, el Dr Felice y el Dr Oldani, a Ricardo Taborda, a Lucía Majul, a Silvana Elizondo, a Debora Mendoza, a Lucía Triñanes, a Ana Turina y a un sin número de personas que me ayudaron en todos los pasos de estos últimos años.

A los amiguis de Nancy.. Moni, Mariana Piégari, Gabi Paglini, al Gringo, a Santi, a Pablo,

Al CONICET y al IIByT. Gracias



Desarrollo de un corazón bioartificial a partir  
de recelularización con células madre de origen adiposo

---

Y siempre dije que sí me llegaba a doctorar iba a ser gracias a que en algún lugar del planeta hay una kazajistana que se dedica a abrir para el mundo la información científica que no se puede acceder gratis, gracias Alexandra Elbakyan, *Спасибо*.



## Resumen

El corazón es un órgano único que a partir del día 22 de vida intrauterina comienza a latir y no se detiene hasta la muerte. Sin embargo, durante la vida de una persona puede manifestar alguna falla parcial o total. Para este caso, actualmente, solo existe como solución el trasplante cardíaco. Aún con la reglamentación de la Ley Justina, el número de pacientes en espera de un trasplante cardíaco es elevado. La ingeniería de tejidos brinda un nuevo enfoque y una potencial salida para estas personas en espera de un órgano. En esta Tesis Doctoral se propuso desarrollar una matriz cardíaca descelularizada de conejo, con una estructura tridimensional conservada, como un andamio biológico para la recelularización. Se extrajo el corazón y se descelularizó usando una combinación de agentes descelularizantes, se desinfectó y se evaluaron las matrices obtenidas desde el punto de vista histológico, bioquímico, mecánico y de citobiocompatibilidad. El resultado de las caracterizaciones determinó que se obtuvo un órgano completo descelularizado y una matriz acelular desinfectada con una ultraestructura 3D preservada. Se describió, además, que usando como agente desinfectante el ácido peracético, las propiedades mecánicas de las matrices tratadas fueron mejoradas comparada con el etanol, que es de uso más difundido, sin alterar sus propiedades biocompatibles.

Por otro lado, se aislaron con éxito células madre mesenquimales a partir de lipoaspirados y se logró diferenciarlas en células de tipo cardíaco por estimulación química con 5-azaticidina como suplemento. Los resultados mostraron un aumento en la concentración de Troponina T cardíaca en las células estimuladas a los tiempos estudiados, indicando que el uso de estas células mesenquimales indiferenciadas obtenidas a partir de tejido adiposo adulto puede constituir una excelente opción para la recelularización de bioandamios

Con la posibilidad de lograr una estimulación mecánica de las matrices bajo condiciones que simulen la fisiología propia del tejido cardíaco, se diseñó, desarrolló e implementó un biorreactor de bajo costo, para controlar milimétricamente el estiramiento cíclico de los andamios recelularizados. El equipo diseñado mostró un correcto desempeño electrónico bajo condiciones de temperatura y humedad de cultivo celular favoreciendo el acoplamiento electromecánico de las células a la matriz alojada en los pocillos de estimulación. Los resultados de la microscopía confocal, mostraron una adecuada adherencia y supervivencia celular a las matrices según nuestro protocolo de estiramiento propuesto para la estimulación mecánica de las matrices recelularizadas con células previamente diferenciadas en condiciones fisiológicas.



## Abstract

The heart is a unique organ that from day 22 of intrauterine life begins to beat and does not stop until death. However, in a person's lifetime could fail partial or totally. This last one case, the heart transplant is the medical treatment. But even with the regulation of Ley Justina, the number of patients waiting for a new heart is high. The tissue engineering may present a different and new approach to solve these demands. It's proposed in this Thesis to develop a decellularized cardiac rabbit matrix with 3d structure intact, so it can be used as a biological scaffold for new cardiac tissue. The heart was extracted and decellularized using a combination of decellularizing agents, then disinfected and it was histological, molecular, mechanical, and cyto-biocompatible characterized. From these a whole decellularized heart and an acellular matrix were gotten, they were disinfected, and the 3D ultrastructure was conserved. The used of peracetic acid as a disinfected agent improved the mechanicals properties without losing the biocompatibility.

On the other hand, mesenchymal stem cells were isolated from adipose tissue successfully, and cardiac-like cells were differentiated with the use of 5-azaticidine as a supplement. This technique was measured as from the concentration of cardiac Troponin in the stimulated cells, that it was higher than the control.

To achieving a mechanical stimulation on the matrix under physiological conditions, a bioreactor was design, built and implemented, to monitor the cyclic stretch millimetrically over the recellularized matrix. This prototype shows an excellent electronic performance under cell culture temperature and humidity, facilitating the electromechanical coupling of the cells. The results of the microscopy show a proper adherence and cell survival in the matrix using our stretching protocol to stimulate mechanically the recellularized matrix under physiological conditions.



## Abstrato

O coração é um órgão único que a partir do 22º dia da vida intrauterina começa a bater e não para até a morte ou insuficiência cardíaca total. Neste último caso, o transplante de coração é o tratamento médico. Mas mesmo com a implementação de Ley Justina, o número de pacientes esperando por um novo coração é alto. A engenharia de tecidos pode apresentar uma abordagem diferente e nova para resolver essas demandas. É proposto nesta tese desenvolver uma matriz de coelho cardíaca descelularizada com estrutura 3d intacta, para que possa ser usado como um andaime biológico para novo tecido cardíaco.

O coração foi extraído e descelularizado usando uma combinação de agentes descelularizantes, depois desinfetado caracterizado e histológico, molecular, mecânico e cito-biocompatível. A partir destes, um coração descelularizado e uma matriz acelular foram obtidos, eles foram desinfetados, e a ultraestrutura 3D foi conservada. O uso do ácido peracético como agente desinfetado melhorou as propriedades mecânicas sem perder a biocompatibilidade.

Por outro lado, as células-tronco mesenquimais foram isoladas do tecido adiposo com sucesso, e as células cardíacas foram diferenciadas com o uso de 5-azaticidina como suplemento. Esta técnica foi medida a partir da concentração de Troponina cardíaca nas células estimuladas, que era maior do que o controle.

Para alcançar uma estimulação mecânica na matriz em condições fisiológicas, foi criado um bioreator, construído e implementado, para monitorar o estiramento cíclico milimetricamente sobre a matriz recelularizada. Este protótipo mostra um excelente desempenho eletrônico sob temperatura e umidade da cultura celular, facilitando o acoplamento eletromecânico das células. Os resultados da microscopia mostram uma adequada adesão e sobrevivência celular na matriz usando nosso protocolo de alongamento para estimular mecanicamente a matriz recelularizada em condições fisiológicas.



## Índice

Agradecimientos .....	3
Resumen .....	5
Abstract.....	6
Abstrato .....	7
Índice .....	8
Tablas de ilustraciones.....	10
Introducción.....	14
Corazón .....	14
Embriología .....	14
Anatomía.....	15
Morfología externa.....	15
Configuración interna.....	16
Irrigación del corazón .....	17
Inervación del corazón .....	17
Sistema cardionector o de conducción .....	17
Histología .....	18
Fisiología.....	20
Corazón eléctrico.....	20
Corazón mecánico .....	20
Fisiopatología cardíaca.....	21
Insuficiencia cardíaca.....	23
Cardiopatía congénita .....	23
Cardiopatía hipertensiva .....	23
Cardiopatía valvular.....	23
Cardiopatía Isquémica .....	23
Ingeniería en Tejidos.....	24
Definición .....	24
Necesidad actual (Área de vacancia).....	25
Tríada de ingeniería de tejidos.....	26



Desarrollo de un corazón bioartificial a partir  
de recelularización con células madre de origen adiposo

---

Andamios naturales.....	26
Fuente de células.....	28
Señales celulares .....	31
Capítulo I: Obtención y caracterización de la matriz extracelular proveniente de corazón .....	33
Materiales y métodos .....	33
Procedimiento quirúrgico.....	33
Caracterización de las Matrices.....	34
Resultados.....	41
Corazón completo descelularizado.....	41
Caracterización de parches de corazón descelularizado .....	47
Discusión y Conclusión.....	61
Capítulo II: Obtención y aislación de células madre mesenquimales de origen adiposo .....	67
Materiales y métodos .....	67
Obtención de la grasa y aislación de células madre .....	67
Diferenciación cardíaca .....	67
Concentración de Troponina T .....	67
Resultados.....	68
Diferenciación cardíaca y cuantificación de troponina.....	69
Discusión y Conclusión .....	71
Capítulo III: Desarrollo de un biorreactor con estimulación mecánica.....	73
Materiales y métodos .....	73
Especificaciones del biorreactor.....	73
Sistema de actuación.....	73
Control electrónico.....	74
Desinfección y Prueba de uso.....	83
Análisis microscópico de células viables y apoptóticas .....	84
Resultados.....	85
Impresión y ensamblaje.....	85
Control electrónico.....	86
Calibración del sistema de estiramiento .....	87

---



---

Prueba de concepto.....	90
Discusión y Conclusión .....	94
Conclusiones finales.....	95
Proyecciones a futuro .....	97
Bibliografía.....	98
Anexo .....	108
Anexo I: Lógica de programación del biorreactor .....	108

## Tablas de ilustraciones

Figura 1: Esquema de tubo primitivo embrionario. (3D Atlas of Human Embryology. New insights in human development por Bernadette S de Bakker).....	14
Figura 2: Embrión de 22 días, aproximadamente 2 mm[1] .....	14
Figura 3: Ubicación anatómica del corazón en el mediastino, con los órganos con quien se relaciona (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.).....	15
Figura 4: Corazón normal y grandes vasos (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.) .....	15
Figura 5: Configuración interna del corazón (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.) .....	16
Figura 6: Irrigación del corazón (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.) .....	17
Figura 7: Sistema Cardionector (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.) .....	18
Figura 8: Capas del corazón y pericardio[4] .....	19
Figura 9: Esquema de músculo cardíaco corte longitudinal[5] .....	19
Figura 10: Ciclo cardíaco .....	21
Figura 11: Causas de muerte a nivel mundial año 2017 (OurWordinData.org).....	22
Figura 12: Esquema de cortes en órgano completo descelularizado .....	35
Figura 13: Tres etapas del proceso de descelularización. A: Antes de iniciar; B: a la mitad del proceso, en donde se pueden observar el uso de la anatomía del árbol vascular como medio de distribución de los agentes descelularizantes; C: El proceso finalizado.....	41
Figura 14: Preparación de las matrices para ser enviadas a histología.....	41
Figura 15: Micrografías en HE de cortes de corazón control(arriba) y MEC descelularizada de corazón(abajo) .....	42
Figura 16: Micrografía de Tricrómico corazón control (en panel superior) y MEC descelularizada (en panel inferior) .....	43
Figura 17: Micrografía Electrónica de Barrido de corazón control(arriba) y MEC descelularizada (abajo) .....	44
Figura 18: Cuantificación de ADN remanente en la dMEC y su control respectivo. * p < 0,005 (Test de Student) el contenido de ADN es 10 veces menor a lo publicado .....	45



---

Figura 19: Cantidad de SDS residual en la muestra de MEC posterior al protocolo de descelularización. * $p < 0,0001$ $t=66,08$ (Test de Student) .....	46
Figura 20: Viabilidad celular del extracto 100% obtenido de la dMEC en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética $\pm$ ESM. $n= 3$ . *significativamente diferente del Control positivo, $p < 0,005$ (Test de bonferroni).....	47
Figura 21: Imágenes de antes(A) y después (B) del proceso de descelularización. ....	48
Figura 22: Micrografía de parches de miocardio teñidos con HE, control(A,B,C), la MEC descelularizada y desinfectada con APA(D,E,F) y MEC descelularizada y desinfectada con Etanol (G,H;I).....	49
Figura 23: Micrografía de parches de miocardio teñidos con Tricrómico de Masson, control(A,B,C), la MEC descelularizada y desinfectada con APA(D,E,F) y MEC descelularizada y desinfectada con Etanol (G,H;I).....	50
Figura 24: SEM de parche de miocardio control (A y B), MEC descelularizada (C,D,E y F). Las dos primeras tratadas con APA, las segundas con Etanol para ambos casos .....	51
Figura 25: Cuantificación de ADN remanente en la dMEC tratada con Etanol, tratada con Ácido peracético y el control respectivo * ( $p < 0,005$ ) Test de Bonferroni.....	52
Figura 26: Viabilidad celular del extracto 100%, 75%, 50% y 25% obtenidos de la dMEC desinfectada con Etanol en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética $\pm$ ESM. $n= 3$ . *significativamente diferente del Control positivo, $p < 0,005$ (Test de Bonferroni).....	53
Figura 27: Viabilidad celular del extracto 100%, 75%, 50% y 25% obtenidos de la dMEC desinfectada con APA en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética $\pm$ ESM. $n= 3$ . *significativamente diferente del Control positivo, $p < 0,005$ (test de Bonferroni) .....	53
Figura 28: Gráfico de tensión-deformación para el tejido control, MEC descelularizada(dMEC), dMEC desinfectada con APA, y dMEC desinfectada con Etanol. ....	54
Figura 29: Módulo de Young para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética $\pm$ ESM. *significativamente diferente del tejido control, $p < 0,005$ (Test de Bonferroni).....	55
Figura 30: Gráfico de reometría para el tejido control, dMEC desinfectada con APA, y dMEC desinfectada con Etanol. ....	56
Figura 31: Gráfico de módulo elástico(almacenamiento) para el tejido control, dMEC desinfectada con APA, y dMEC desinfectada con Etanol.....	56
Figura 32: Gráfico de módulo viscoso(pérdida) para el tejido control, dMEC desinfectada con APA, y dMEC desinfectada con Etanol.....	57
Figura 33:Gráfico de viscosidad compleja para el tejido control, dMEC desinfectada con APA, y dMEC desinfectada con Etanol. ....	57
Figura 34: Módulo elástico a 1 Hz para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética $\pm$ ESM. *significativamente diferente del tejido control, $p < 0,005$ .....	58

---



---

Figura 35: Módulo viscoso a 1Hz para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética +- ESM. *significativamente diferente del tejido control, $p < 0,005$ .....	58
Figura 36: Viscosidad compleja a 1Hz para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética +- ESM. *significativamente diferente del tejido control, $p < 0,005$ .....	59
Figura 37: Espectros FTIR para MEC desinfectada con APA al 0.2% y el control .....	60
Figura 38: Observación por microscópico óptico invertido a 10X a las 5 h de terminado el protocolo de aislación de ASC.....	68
Figura 39: Observación por microscopio óptico invertido a 10X a las 48h de aislación del tejido adiposo. ....	68
Figura 40: Observación por microscopio óptico invertido a 10X a las 120h de aislación del tejido adiposo .....	69
Figura 41: Microscopía óptica de control en día 0, y 14 y de cultivo suplementado con 5-azaticidina día 0 y 14 .....	70
Figura 42: Concentración de Troponina a 1 y 2 semanas posteriores al inicio del tratamiento con 5-azaticidina al 10mM. Barras representan media aritmética +- ESM. *significativamente diferente del control, $p < 0,005$ , $n=3$ .....	71
Figura 43: Impresión 3D de disco para el encoder. ....	75
Figura 44: Lógica de programación del microcontrolador.....	78
Figura 45: Parte móvil del biorreactor .....	80
Figura 46: Parte fija del biorreactor.....	80
Figura 47: Orificios para los sensores de temperatura y humedad y de final de carrera (Hall).....	81
Figura 48: Ranura en la parte móvil para alojamiento del imán.....	81
Figura 49: Delimitación de la región destinada al cultivo celular .....	82
Figura 50: Diseño de la tapa para resguardo de células .....	82
Figura 51: Resguardo móvil del biorreactor.....	83
Figura 52: Ensamblaje de las piezas impresas del biorreactor .....	85
Figura 53: Montaje final del biorreactor mecánico .....	86
Figura 54: Esquemático del circuito eléctrico del biorreactor .....	86
Figura 55: PCB resultante para la impresión de la placa de control. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 56 A: CAD de los moldes en negativo. B: Molde impreso y pulido .....	87
Figura 57: Proceso de fabricación de las cámaras de estiramiento.....	88
Figura 58: Valores obtenidos para biorreactor sin calibrar para PVS .....	89
Figura 59: Valores obtenidos y recta de tendencia para biorreactor calibrado. ....	90
Figura 60: MEC recelularizada a 40x A y B: Control; C y D: Estiramiento estático; E y F: Sometidas a estiramiento cíclico .....	91
Figura 61: Micrografías de la MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico, con las correspondientes vistas ortogonales de 53,46 $\mu\text{m}$ de espesor. (A) La flecha indica	

---



célula a 28,85  $\mu\text{m}$  de profundidad. (B) La flecha indica célula a 44,82  $\mu\text{m}$  de profundidad. .... 92

Figura 62: MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico. (A) Células penetradas por la fluoresceína. (B) células penetradas por el IP. (C) Fusión (Merge)..... 93



## Introducción

### Corazón

#### Embriología

El corazón embrionario es sumamente rudimentario, se origina a partir de un tubo primitivo (Figura 1) con ondas peristálticas como mecanismos de contracción, que se activan a partir del día 22 de vida intrauterina. Este tubo cardíaco se divide en cuatro cámaras con una salida sistémica izquierda y una salida derecha que se encarga de la circulación pulmonar [1]. El corazón desarrolla cuatro dilataciones sucesivas, llamadas senos venosos, aurícula, ventrículo y bulbo cardíaco. Este corazón primitivo va creciendo en el espacio que le cede la cavidad pericárdica [2] (Figura 2).



Figura 1: Esquema de tubo primitivo embrionario. (3D Atlas of Human Embryology. New insights in human development por Bernadette S de Bakker)

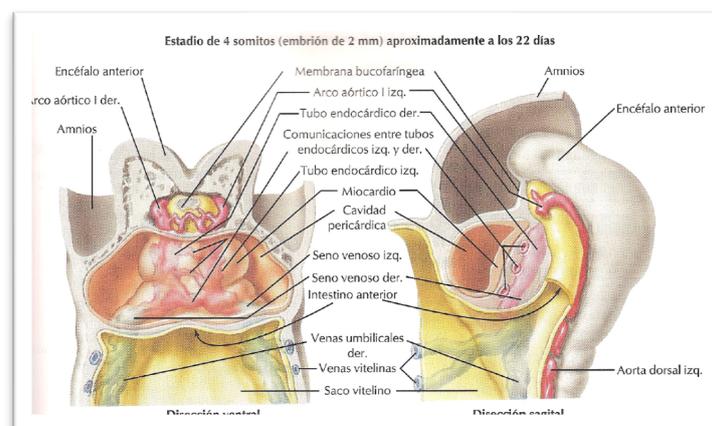


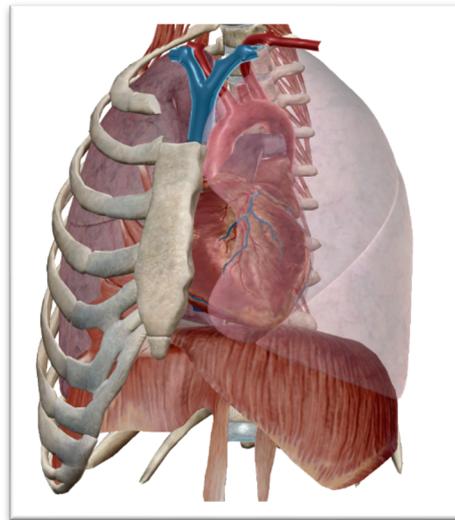
Figura 2: Embrión de 22 días, aproximadamente 2 mm[1]



## Anatomía

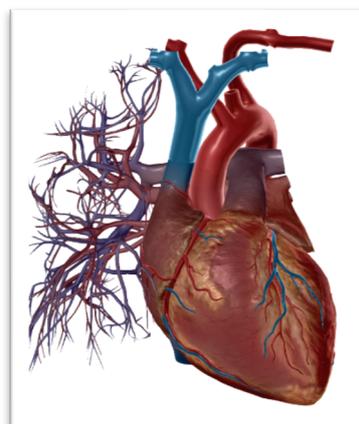
### Morfología externa

Una vez que el corazón completó su desarrollo y morfología característica, se sitúa en el mediastino de la cavidad torácica. Este es un compartimiento anatómico de la región media del tórax que está limitada lateralmente por la cara interna de los pulmones, hacia atrás por la columna dorsal, hacia adelante por el esternón y hacia abajo por el diafragma [3].



*Figura 3: Ubicación anatómica del corazón en el mediastino, con los órganos con quien se relaciona (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.).*

El corazón tiene una forma de pirámide triangular invertida, con base superior en la cara posterior, el eje se dirige oblicuamente hacia adelante, a la izquierda y abajo, finalizando en el vértice que se encuentra inclinado hacia adelante y a la izquierda [3].



*Figura 4: Corazón normal y grandes vasos (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.).*

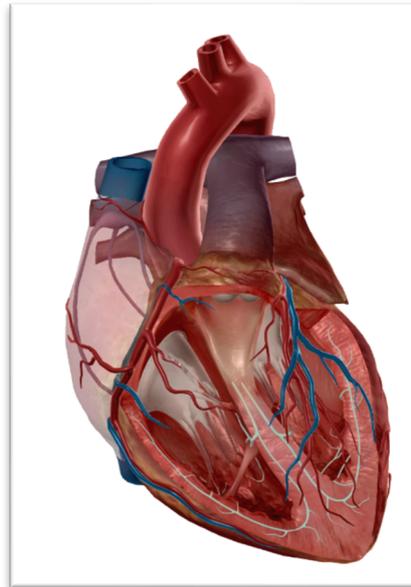


### Configuración interna

El corazón es un órgano muscular hueco, que en su interior tiene 4 cámaras, 2 superiores llamadas aurículas y 2 inferiores o ventrículos (Figura 5).

Las aurículas tienen forma cuboides, se encuentran separadas por un tabique intraauricular con paredes más delgadas que los ventrículos, y conectados a ellos por medio de válvulas, la bicúspide en el lado izquierdo y tricúspide en el lado derecho del corazón.

En la pared inferior de la aurícula derecha se determina una región triangular, formada por la válvula de Tebesio, el tendón de Todaro y la válvula tricúspide, llamado triángulo de Koch donde se encuentra el nódulo aurículo-ventricular, actor importante en la fisiología cardíaca.



*Figura 5: Configuración interna del corazón (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.).*

Los ventrículos, por su lado, tienen las paredes más gruesas que las aurículas siendo el ventrículo izquierdo de mayor grosor que el ventrículo derecho. Esto se debe a las diferentes presiones que debe vencer para bombear la sangre. Internamente cada ventrículo presenta salientes musculares denominados pilares, que se diferencian en 3 tipos. Los de primer orden, o músculos papilares contienen cuerdas tendinosas que se fijan a las válvulas auriculoventriculares para evitar la inversión durante su cierre. Los de segundo orden son fascículos musculares que se fijan al borde libre de la válvula y, por último, los de tercer orden son eminencias de la pared, suelen ser muy numerosas en la zona del vértice del corazón, cuya la función es evitar la coagulación de la sangre en los ventrículos [3].



### Irrigación del corazón

El corazón se encuentra irrigado por dos arterias colaterales de la aorta, las arterias coronarias derecha e izquierda (Figura 6). La arteria coronaria derecha recorre e irriga a la aurícula como al ventrículo derecho. La arteria coronaria izquierda por su lado se divide en 2 ramas terminales, la circunfleja que irriga la base del corazón y la descendente anterior o arteria interventricular anterior que irriga la cara anterior del corazón. De ellas se desprende todo el árbol vascular que irriga el corazón, mediante ramas colaterales que llegan hasta lo más íntimo del músculo cardíaco[3].

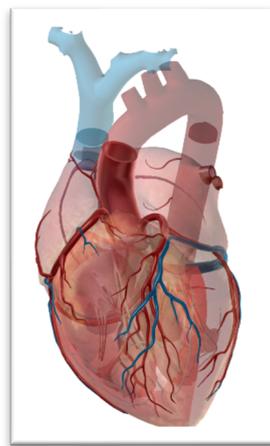


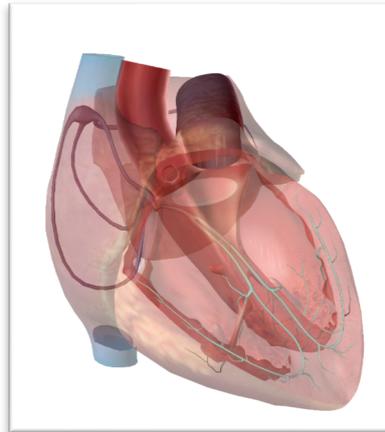
Figura 6: Irrigación del corazón (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.).

### Inervación del corazón

El corazón se encuentra inervado por un plexo vegetativo mixto llamado plexo cardíaco, este contiene fibras de nervios cardíacos simpáticos y parasimpáticos. Las descargas de nervios parasimpáticos van a tener un efecto de disminución de la frecuencia cardíaca, conocida como bradicardia, estos nervios son fibras nerviosas del X par craneal, el neumogástrico. Una acción de los nervios cardíacos simpáticos produce un aumento en la frecuencia cardíaca o taquicardia. [3]

### Sistema cardionector o de conducción

El sistema cardionector consiste en un conjunto de células musculares especializadas situada en el interior del músculo cardíaco (Figura 7), cuyo objetivo es asegurar la propagación de la contracción del miocardio y al mismo tiempo coordinar las contracciones de las diferentes etapas del músculo cardíaco.



*Figura 7: Sistema Cardionector (Human Anatomy Atlas. Argosy Publishing Inc.).*

Este sistema se encuentra formado por:

- Nódulo sinusal: situado en la pared posterior de la aurícula derecha, tiene forma de huso.
- Nódulo auriculoventricular: ubicado en la parte inferior de la aurícula derecha, en el triángulo de Koch, se encuentra conectado al nódulo sinusal por 3 bandas internodales.
- Haz de His: nace en el nódulo auriculoventricular, se divide en dos ramas, una derecha y otra izquierda, ambas terminan ramificándose en la base de los pilares de primer orden formando la red de Purkinje. [3]

### Histología

Si bien el corazón está compuesto de múltiples tejidos, se analizará el músculo cardíaco propiamente dicho.

La organización estructural de la pared del corazón es continua en las aurículas y los ventrículos. La pared se encuentra compuesta por tres capas (Figura 8):

- Epicardio: Se dispone en una sola capa de células mesoteliales, así como de tejido conjuntivo y adiposo.
- Miocardio: está formado por músculo cardíaco, el miocardio en las aurículas es sustancialmente más fino que en los ventrículos debido a la mayor presión que debe ejercer el ventrículo al bombear sangre a través de las circulaciones pulmonar y sistémica.
- Endocardio: es una capa interna endotelial que forma el revestimiento interno de las aurículas y los ventrículos.



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

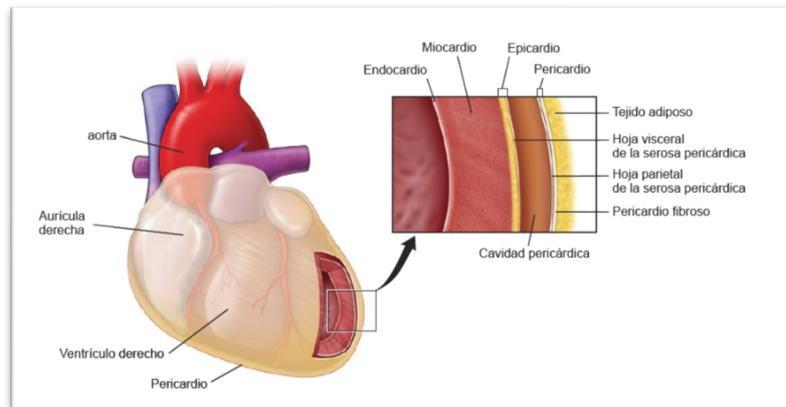


Figura 8: Capas del corazón y pericardio[4]

El músculo cardíaco es un tipo muscular estriado especial con la disposición de los filamentos contráctiles de las células musculares cardíacas exhibiendo estriaciones transversales macroscópicas evidentes. Además, las fibras cardíacas presentan bandas cruzadas bien coloreadas, llamadas discos intercalares, que atraviesan las fibras de modo lineal. Estos discos intercalares son sitios de adhesión especializados entre células contiguas, de esta forma las fibras musculares cardíacas están compuestas por numerosas células cilíndricas dispuestas extremo con extremo. Asimismo, algunas células musculares cardíacas en una fibra pueden unirse con dos o más células a través de los discos intercalares. En microscopio se observan como una estructura lineal, bien coloreada orientada transversalmente respecto a las fibras musculares (Figura 9). El elemento principal de estos discos son las uniones de hendidura, estas proporcionan continuidad iónica entre las células contiguas permitiendo que la información pase de una célula a otra. Este rápido intercambio hace que las fibras musculares actúen como un sincitio.



Figura 9: Esquema de músculo cardíaco corte longitudinal[5]



## Fisiología

El corazón actúa como una bomba aspirante e impelente, primero ocurre un evento eléctrico, es decir, una despolarización de las membranas de los cardiomiocitos que precede al evento mecánico o la contracción muscular propiamente dicha [5].

### Corazón eléctrico

Como se describió anteriormente en el interior del miocardio existe un sistema llamado sistema de conducción que comienza en el nódulo sinusal, se conecta por tres haces al nódulo auriculoventricular, este por medio del haz de His, sus ramas derecha e izquierda y la red de Purkinje llega a ambos ventrículos. El nódulo sinusal tiene una particularidad propia, sus células tienen la capacidad de autoexcitación, como esta frecuencia de excitación es mayor es quien comanda y actúa como un marcapasos natural. Una vez que el nódulo sinusal inició el proceso de despolarización, se propaga por toda la masa de fibras musculares auriculares hasta llegar al nódulo auriculoventricular, una vez allí el impulso presenta un ligero retraso en la conducción, que permite el llenado de sangre en los ventrículos. La causa de este retraso es la disminución de uniones en hendidura entre las células de las vías de conducción. Posteriormente, el impulso sigue viajando por el haz de His hacia los ventrículos por medio de la red de Purkinje. Este es un sistema especializado en la conducción rápida, para poder llegar casi instantáneamente a todo el músculo ventricular (Figura 7)[5].

### Corazón mecánico

El corazón mecánico está formado por dos bombas en serie y separadas: un corazón (o bomba) derecho que bombea sangre a la circulación pulmonar y un corazón izquierdo que bombea sangre a la circulación sistémica. Las aurículas actúan como bomba de cebado de los ventrículos y estos son los que aportan la principal presión para poder impulsar la sangre hacia los distintos tipos de circulación [5].

### El ciclo cardíaco

El ciclo cardíaco está formado por un periodo de relajación que se denomina diástole, seguido por un periodo de contracción denominado sístole. En la Figura 10 podemos observar el gráfico que relaciona la presión y el volumen del ventrículo izquierdo a lo largo del ciclo cardíaco. Desde A comienza el periodo de llenado, la sangre va pasando de la aurícula izquierda al ventrículo del mismo lado. En B se produce el cierre de la válvula mitral o bicuspidé y comienza la fase de la contracción isovolumétrica, en esta etapa el volumen no se modifica debido a que todas las válvulas se encuentran cerradas, pero la presión interna del ventrículo aumenta hasta igualarse a la presión en la aorta. Una vez igualadas las presiones la válvula aórtica se abre (C) y comienza la eyección de la sangre con la consiguiente disminución del



volumen y un aumento de la presión hasta aproximadamente 120 mmHg. Finalmente, en (D) la presión dentro del ventrículo es menor a la de la válvula aórtica que se cierra y comienza el periodo de relajación isovolumétrica donde la cantidad de sangre que queda dentro del ventrículo es mínima y la presión poco a poco va bajando a niveles próximos a 0 mmHg hasta que se abre de nuevo la válvula mitral y comienza el ciclo nuevamente. El área coloreada representa la presión por volumen, es decir el trabajo cardíaco externo neto del ventrículo durante su contracción [5].

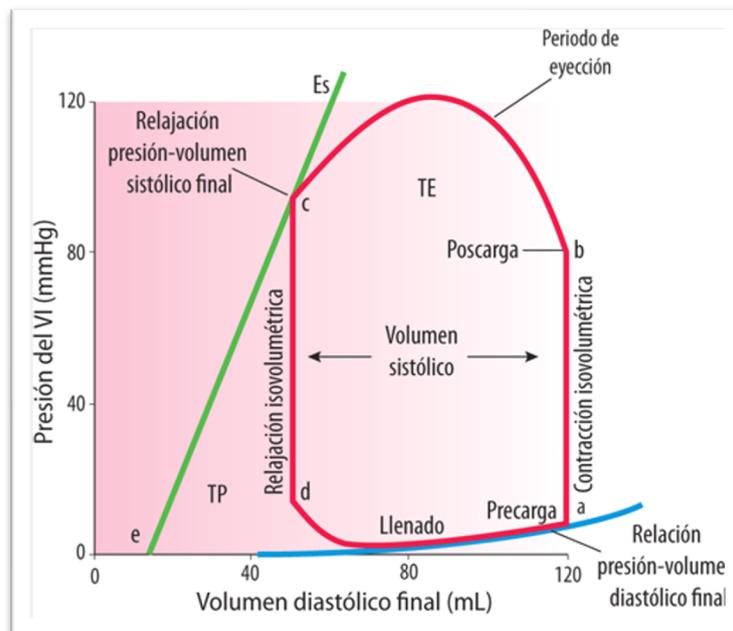


Figura 10: Ciclo cardíaco (Fisiología humana, Fernandez-Tresguerres)

### Fisiopatología cardíaca.

Las enfermedades cardíacas es la causa principal de muerte a nivel mundial (Figura 11) y aproximadamente una de cada cuatro muertes en los Estados Unidos, es decir 1 cada minuto, o 520 mil muertes por año. En Argentina en el año 2018 se registraron más de 61 mil muertes relacionadas con enfermedades cardíacas, que constituye el 18% de las muertes totales. Para EE. UU., el impacto económico anual de este tipo de enfermedades excede los 200 mil millones de dólares, el cuál más de la mitad se encuentra destinado a enfermedades isquémicas cardíacas. Además, aproximadamente, un tercio de esas muertes son denominadas “prematuras” ya que ocurren a personas menores de 75 años, por lo tanto, existe una carga económica adicional debido a la pérdida de productividad en una persona económicamente activa.



A pesar de amplio rango de enfermedades que pueden afectar el sistema cardiovascular se puede comprender la fisiopatología cardíaca a través de seis mecanismos principales:

- **Falla de la bomba:** es la situación más común, el músculo cardíaco se contrae débilmente y las cámaras no pueden evacuarse correctamente, o no se relajan correctamente, por lo tanto, no se permite un llenado ventricular correcto.
- **Obstrucción del flujo:** Es una lesión que previene que las válvulas se abran o cause un aumento en la presión ventricular, lo que puede aumentar el trabajo cardíaco del miocardio para poder vencer a la obstrucción.
- **Flujo regurgitante:** Patología de las válvulas que permiten que el caudal de cada contracción vuelva hacia la cavidad, lo que provoca una sobrecarga de volumen y una reducción del flujo anterógrado.
- **Cortocircuitos, o también llamado Flujo derivado:** es flujo anómalo de sangre bien de derecha a izquierda (que elude los pulmones) o de izquierda a derecha (que provoca una sobrecarga de volumen).
- **Trastorno del sistema de conducción:** impulsos descoordinados o bloqueados que pueden causar contracciones lentas o evitar un bombeo eficiente.
- **Rotura de grandes vasos:** que producen una pérdida de la continuidad de la circulación normal[6].

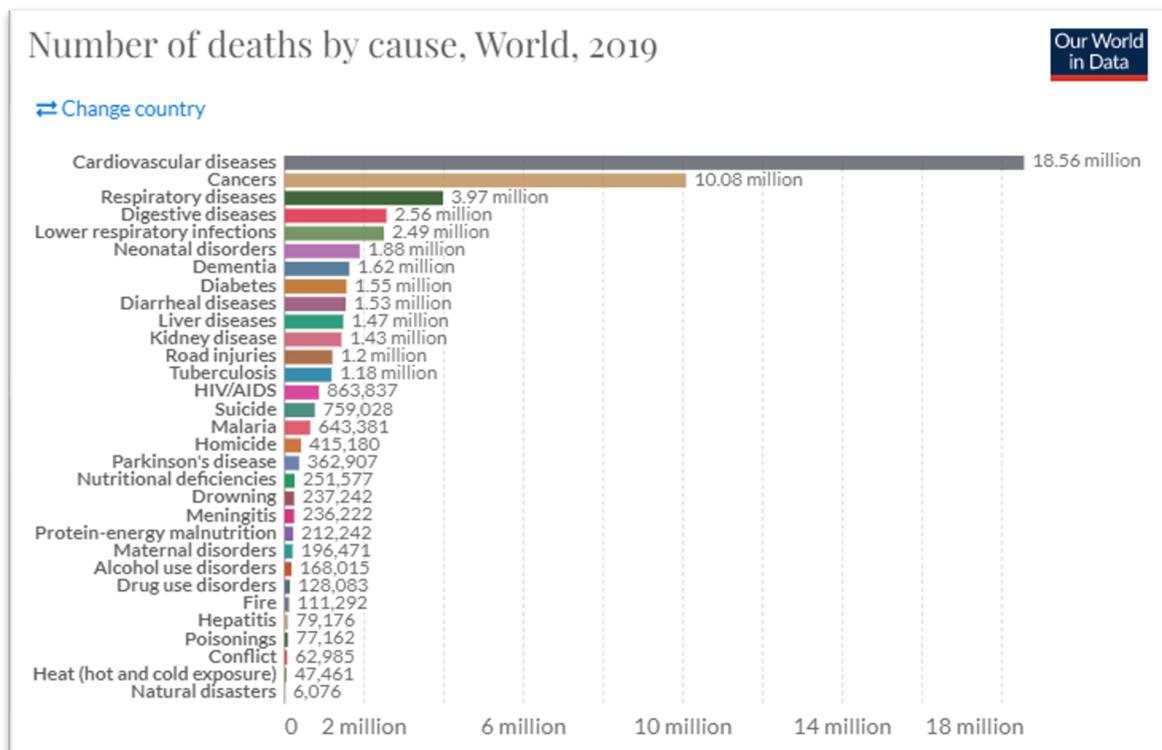


Figura 11: Causas de muerte a nivel mundial año 2019 (OurWordinData.org).



### Insuficiencia cardíaca

Se define como la alteración funcional del corazón para mantener el gasto cardíaco suficiente para cubrir las necesidades metabólicas del cuerpo o bajo presiones de llenado elevadas. Es el punto final común a muchas formas de cardiopatías, que típicamente tiene una prognosis pobre. En los Estados Unidos, más de 5 millones de individuos se encuentran afectados a dicha patología, lo que significa más de 1 millón de hospitalizaciones anuales, la mitad de los pacientes mueren dentro de los 5 años del diagnóstico y la población patológica representa una carga financiera de 32 mil millones de dólares. Para nuestro país el año 2018 hubo casi 23 mil defunciones, representando el 37% de las defunciones de origen cardíaco.

### Cardiopatía congénita

Este grupo de patologías se refieren a anomalías cardíacas o de los grandes vasos presentes en el nacimiento, la mayoría atribuible a un desarrollo embrionario defectuoso durante las semanas 3 y 8 de gestación. En Argentina, las malformaciones congénitas cardíacas representaron el 0,36% de las defunciones de enfermedades cardíacas en 2018.

### Cardiopatía hipertensiva

Es un mecanismo adaptativo del corazón como respuesta a la hipertensión, que causa sobrecarga de presión e hipertrofia ventricular.

### Cardiopatía valvular

La enfermedad cardíaca valvular se produce por una estenosis, insuficiencia o ambas razones. La gravedad va a variar en función del tipo de válvula afectada, el grado de deterioro, de los cambios compensadores y las enfermedades preexistentes.

### Cardiopatía Isquémica

Esta cardiopatía comprende múltiples síndromes con una fisiopatología similar a la isquemia miocárdica, es decir, un desequilibrio entre la demanda cardíaca y el aporte vascular de sangre oxigenada. Las consecuencias son el aporte inadecuado de oxígeno, de nutrientes y una menor depuración de los metabolitos. En EE.UU., la cardiopatía isquémica causa más de 400.000 muertes al año y, en los países desarrollados, la cifra llega a los 7 millones anuales. En Argentina, representaron casi el 29% de los casos de patologías cardíacas durante el año 2018, siendo en el mayor



porcentaje de casos debido a la reducción del flujo sanguíneo coronario secundario más que a una enfermedad vascular aterosclerótica.

Entre los síndromes isquémicos, el más común es el infarto del miocardio, que se define como una necrosis del músculo cardíaco como resultado de una isquemia prolongada. La causa principal se debe a una aterosclerosis en las arterias coronarias que puede presentarse a cualquier edad, aunque la frecuencia de aparición aumente con la edad y con el aumento de los factores de riesgo (historia familiar, hipertensión, tabaquismo, hipercolesterolemia, diabetes, entre otros).

## Ingeniería en Tejidos

### Definición

En octubre de 1987, Allen Zelman, director del programa *Bioingeniería e investigación para ayuda a los discapacitados*, preparó un borrador para una convención sobre ingeniería en tejido en donde la definiría como,

---

“una nueva iniciativa interdisciplinaria, la cual tiene el objetivo de cultivar tejido u órganos directamente de una sola célula tomada de un individuo. “ [7]

---

Este concepto fue rápidamente puesto en discusión debido a la complejidad de la producción de los órganos complejos, esto sería demasiado ambicioso como un punto de inicio.

Fue hasta febrero del año siguiente en donde Zelman, Heineken y Bruley en un *workshop* del Hotel Granlibakken en California, se pusieron de acuerdo en una nueva perspectiva:

---

“La ingeniería en tejidos es la aplicación de principios y metodología de la ingeniería y la biología con el objetivo de entender la relación entre estructura y función en condiciones normales y patológicas en los tejidos y en el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función de los tejidos “. [7]

---

El punto básico en esta definición involucra el uso de células vivas junto con su producto extracelular en el desarrollo de sustitutos biológicos para el reemplazo de implantes internos.



En 1992 durante un simposio en la Universidad de California, Los Ángeles sobre ingeniería en tejidos, Eugene Bell definió la ingeniería en tejidos en término de una lista de objetivos:

1. Proveer prótesis o reemplazos para el cuerpo humano
2. Proveer partes de reemplazos acelulares capaces de inducir la regeneración
3. Proveer modelos similares a tejidos u órganos poblado con células para investigación básica y aplicada.
4. Proveer vehículos de células para distribución en el resto del organismo.

Otro término que resalta en el estudio de la ingeniería en tejidos es la medicina regenerativa, el cual en muchos trabajos se utilizan indistintamente. A pesar de ser usado como un sinónimo, William Haseltine utiliza este término de un punto de vista más clínico orientado al futuro de la medicina, en donde enfatiza la construcción *in vitro* de órganos humanos para la implantación, que usan materiales biocompatibles especializados, moléculas de señalización y células adultas humanas [7].

#### Necesidad actual (Área de vacancia)

El Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI) establece en sus memorias anuales que los trasplantes realizados son insuficientes para cubrir las necesidades reales, a pesar de la reciente sanción de la ley Justina de donación y trasplante de órganos (Ley 27.447). Esta reglamentación resultó ser una poderosa herramienta que generó un impacto altísimo en materia de donación de órganos, fortaleció el sistema, simplificó procesos y ayudó a posicionar la trasplantología de nuestro país como referente de la región. Sin embargo, la escasez crítica de órganos de donantes conduce a una mayor morbi-mortalidad de miles de pacientes cada año. En nuestro país, según los datos en tiempo real del INCUCAI el total de pacientes que esperan por un trasplante es de 10163 al 08/04/2022 según los datos consignados en el Sistema Nacional de Información de Procuración y Trasplante de la República Argentina (SINTRA). De esa lista, 140 esperan por un reemplazo cardíaco, 5 por un trasplante cardiopulmonar y 2 por un cardiorenal [8].

Los datos presentados nos reflejan que a pesar de la generosidad de los donantes, la aplicación de las leyes y los esfuerzos asistenciales no han podido cubrir hasta el presente las necesidades de la población que crece a un ritmo exponencial. Por lo tanto, la insuficiencia de órganos para trasplante constituye un problema de salud prioritario que nos lleva a encontrar soluciones alternativas para restablecer la calidad de vida de los pacientes afectados. Sin tener en cuenta todos aquellos pacientes que si bien tienen la posibilidad de recibir un órgano cargan con el riesgo de rechazo crónico y la morbilidad asociada a un régimen permanente de la terapia inmunosupresora. Aunque se han hecho avances importantes en el desarrollo de la



ingeniería de tejidos tales como el desarrollo de vasos sanguíneos [9], vejiga urinaria [10] y tráquea [11] ninguno de estos tejidos requiere una red vascular intacta que se pueda conectar a la circulación del huésped en el momento de la implantación. Órganos como el corazón, los pulmones y el hígado requieren de este tipo de aporte vascular inmediato. Por lo tanto, una estrategia exitosa de la medicina regenerativa para el reemplazo de todo el órgano representaría un enorme avance en el tratamiento de pacientes con enfermedad orgánica terminal.

### Tríada de ingeniería de tejidos

Alrededor de los años 90, la ingeniería en tejidos se propuso la idea de reconstruir órganos como alternativa a aplicaciones terapéuticas farmacológicas convencionales. Esta disciplina se basa en el uso de andamios tridimensionales que proporcionan el sustrato adecuado para la regeneración de tejidos y órganos. Estos andamios son sembrados con células y ocasionalmente con factores de crecimiento, y pueden estar sometidos a estímulos biofísicos en un biorreactor. La combinación de células, andamios y factores bioquímicos (señales extracelulares y factores de crecimiento) se suele denominar tríada de la ingeniería de tejidos [12].

### Andamios naturales

Un gran número de andamios tridimensionales han sido fabricados a partir de materiales biológicos naturales, principalmente colágeno y alginatos a partir de mezclas de matrices extracelulares obtenidas naturalmente como la marca comercial Matrigel® o matrices extracelulares de órganos descelularizados. Estos andamios serán descritos a continuación:

### Colágeno

El colágeno es el componente predominante en la matriz extracelular del miocardio y ha sido usado como matriz para estudios electrofisiológicos y mecánicos del miocardio desde el principio de los años 90 [13][14]. Una propiedad interesante del músculo cardíaco de hidrogel a base de colágeno es que reproduce algunas propiedades de contractibilidad del miocardio nativo [15], [16]. El hidrogel a base de esta proteína se ensayó en un andamio de colágeno que contenía células madre mesenquimales en su interior con la finalidad de ser un medio de entrega de células en un modelo de infarto de miocardio de rata. Los andamios de colágenos también se han usado como *entrega* de factores de crecimiento endotelial [17] de esta forma se pudo promover el crecimiento vascular en el tejido infartado [17]. Los avances en el desarrollo de tejido miocárdico a base de colágeno apunta a que las plataformas que se desarrollen tengan propiedades biomiméticas, es decir, que incorporen estimulación eléctrica [18] y mecánica [15].



### *Alginato*

Los alginatos son los polisacáridos más abundantes presentes en las algas marinas pardas, comprendiendo hasta un 40% de su peso seco. Son los componentes estructurales que forman la pared celular brindando elasticidad, flexibilidad y la capacidad de enlazar agua. En su estado natural, los alginatos se presentan como una mezcla de sales de cationes que comúnmente se localizan en el agua de mar, principalmente  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Na}^+$ . Las proporciones en las que estos iones están unidos al alginato dependen de su composición, así como de la selectividad de enlace de los cationes alcalinos por el alginato [19].

Landa y cols (2008), inyectaron un hidrogel a base de alginato, libre de células en infartos recientes (7 días) y antiguos (60 días), lo cual proveyó un andamio temporario que atenuó el remodelado cardíaco adverso y mejoró la contractilidad. Estos beneficios fueron comparables y en algunos casos superiores con los obtenidos a un trasplante de cardiomiocitos neonatales en el tejido cicatrizal [20]. La capacidad de angiogénesis pudo mejorar con la integración de arginina-glicerina-asparagina en el hidrogel de alginato [21], además, se observaron resultados similares en los andamios de alginato con factor de crecimiento-1 tipo insulina [22].

### *Matrices de corazón descelularizado*

Los primeros descubrimientos relacionados en la producción de tejido específico de Matrices Extracelulares (MEC) fueron reportados entre 1970 y 1980 [23]. A pesar de estos esfuerzos, no fue hasta 10 años después que Badylak y cols (1995) lograron generar pequeñas matrices acelulares de submucosa intestinal mediante la remoción mecánica del tejido mesentérico [24]. Dichas matrices demostraron tener capacidad benéfica para la reparación de tendón de Aquiles en modelo animal canino [24]. Se obtuvieron resultados prometedores en metodologías de descelularización sobre tejidos simples como piel [25], tejido vascular [26], válvulas cardíacas [27] y vejiga [28] en la generación de andamios biológicos para aplicaciones biomédicas como alternativas al uso de andamios sintéticos.

En el año 2008, Ott y cols (2008) descelularizó un corazón de rata completo mediante perfusión retrógrada de diferentes agentes químicos y enzimáticos. Esto representó un gran logro en el campo de la ingeniería en tejidos y significó el principio de la era del desarrollo de la descelularización de órganos completos [29]. En años posteriores, distintos grupos de investigación continuaron enfoques similares, reportando la posibilidad de obtener andamios completos de matriz extracelular descelularizada (dMEC) de diferentes órganos incluyendo hígado[30], corazón[31], pulmones[32], y riñones [33].



La composición y ultraestructura de la dMEC se encuentra en constante cambio por las células residentes que remodelan dependiendo de la demanda metabólica y mecánica del tejido, este concepto es conocido como “reciprocidad dinámica” [34]. Este mecanismo puede estar alterado durante una enfermedad o lesión, llevando a modificar la composición y las propiedades biofísicas de la MEC, y con consecuencias finales en la función del órgano.

En general, el andamio de dMEC provee una compleja combinación de especificidad de sitio, de señales bioquímicas y mecánicas, sobre las cuales se hipotetiza que estas guían la adhesión, la proliferación y la diferenciación celular durante la recelularización [35].

#### Ventaja de las dMEC

- Preservación de la ultraestructura y composición que induce favorablemente a la organización y remodelación del tejido [29],[36], [37].
  - La dMEC mejora el comportamiento celular, es decir la adherencia, la migración y la diferenciación celular [29],[36], [37].
  - La dMEC no produce rechazo inmunológico ya que sus componentes se preserva a través de las especies [38], [39].
  - La dMEC conserva propiedades mecánicas, similares a su contraparte nativa [36], [37],[29], [40]

#### Fuente de células

Para desarrollar un tejido cardíaco se necesitan tres tipos de poblaciones celulares, que se encuentran en mayor proporción en el corazón: células de músculo liso, células endoteliales y cardiomiocitos. Hasta entonces la forma de obtener estas células fueron a partir de explantes alogénicos o fuentes autólogas, de los cuales se obtienen cardiomiocitos de células madres para ser usadas en los distintos ensayos clínicos, con el objetivo de mejorar la función cardíaca [41].

#### Cardiomiocitos

El volumen del corazón, en su mayor parte está conformado por cardiomiocitos, por lo tanto, el primer enfoque estuvo basado en la obtención y aislamiento de los cardiomiocitos [42]. Los cardiomiocitos fetales y neonatales tienen una mejor tasa de supervivencia respecto a los cardiomiocitos adultos, debido a que la tasa de replicación *in vitro* es mayor en los primeros, asimismo se observó que pueden ayudar a curar la escara causada por el infarto del miocardio [43].



### Células madre

Las células madre son aquellas células que tienen propiedades clonogénicas, de autorrenovación y la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes. Estas células las podemos encontrar desde etapas embrionarias hasta en órganos y tejidos adultos y muy especializados. Las células madre son la base de los organismos multicelulares, tiene la potencialidad de diferenciarse en un amplio rango de células adultas [44]. La totipotencialidad de las células madre a pesar de ser una de las características más distintivas, se observa solamente en etapas embrionarias, a medida que el organismo va desarrollándose las células madre tienen la capacidad de multipotencialidad y guardan una plasticidad para diferenciarse en otra célula [45].

### Células madre pluripotenciales

Por lo general, estas células madre son células indiferenciadas que se pueden autorrenovar con la capacidad diferenciarse en múltiples linajes. Entre ellas, incluye las células madre embrionarias (ESCs, por sus siglas en inglés) que son pluripotentes, es decir, que tienen la capacidad de poder diferenciarse en las tres capas germinales, ectodermo, mesodermo y endodermo. Las ESCs han demostrado tener un gran potencial cardiogénico, en un cultivo de blastocitos, por lo que fueron evaluadas como una alternativa a la falla cardíaca [46]. Pocos estudios llevados a cabo en modelos animales demostraron una mejora en la función cardíaca [47]. Sin embargo, las ESCs presentan algunas contradicciones a nivel ético y biológico en la actualidad. La pluripotencialidad es responsable de la formación de teratomas y la causa natural de los rechazos de los injertos alogénicos que limitarían las aplicaciones clínicas [48].

### Célula madre pluripotentes inducidas (iPSC)

Takahashi y cols(2006) describieron por primera vez a las células madre pluripotentes inducidas (*iPSC*, por sus siglas en inglés), esto lo lograron a partir de fibroblastos de ratón adulto a través de la transducción de factores definidos [49]. Desde entonces la metodología de producción de las *iPSC* y su diferenciación en células cardíacas han evolucionado rápidamente. Se ha demostrado que las células cardíacas obtenidas por medio de diferenciación en *iPSC* poseen funcionalidades similares a las células cardíacas nativas [50]. Además, estudios han revelado que modelos animales con insuficiencia cardíaca, obtienen beneficios en la función cardíaca al injertar células cardíacas obtenidas por medio de la diferenciación de *iPSC* [51], [52]. Lewandoski y cols (2017), implantaron un parche recelularizado con cardiomiocitos derivados de *iPSC*, fibroblastos embrionarios de ratón y células endoteliales, en un modelo de isquemia cardíaca de ratón. Cuatro semanas después de la implantación, observaron un aumento en el número de la neovasculatura en el corazón, como así también una mejora en la función cardíaca observada en ecocardiografía [51]. Mauritz y cols(2011), utilizando un modelo animal similar para evaluar una inyección intramiocárdica de



*iPSC*, obtenidas a partir de células Flk-1+, reportaron una mejora en la fracción de eyección ventricular izquierda y prevención de remodelado ventricular comparado con aquellos ratones controles [52]. Sin embargo, algunos autores han descrito que la pluripotencialidad de las *iPSC* ha mostrado potencial teratógeno, además de la baja productividad y un bajo grado de reproducibilidad en la metodología [48], [53].

#### Células madre Multipotentes

El organismo adulto posee varios tipos de células capaces de diferenciarse en una de las capas germinales, que son las llamadas células madre multipotentes. Entre ellas y para la ingeniería de tejidos cardíaca, los mioblastos esqueléticos fueron los primeros en ser propuestos para reparaciones cardíacas, ya que presentaban numerosas ventajas, como ser autólogos, de fácil obtención por medio de biopsia muscular, y con una gran velocidad en la amplificación *in vitro*. Sin embargo, estas células demostraron diferenciarse en miocitos esqueléticos en vez de cardiomiocitos [47]. Además, se observó que la falta de acoplamiento electromecánico causaba arritmias y un bajo nivel de implantación [54].

Las células mononucleares de médula ósea se han usado en numerosos ensayos clínicos [55]. Un Meta-análisis sobre el uso de estas células en modelos animales de accidente cerebro vascular isquémico demostraron consistentemente beneficios sobre la estructura y función del ventrículo izquierdo [55].

Las células madre mesenquimales (*MSC*, por sus siglas en inglés) pueden ser obtenidas a partir de médula ósea, cordón umbilical o tejido adiposo. Estas células, descritas hace 40 años [56], son la más usadas para regeneración cardíaca. En los últimos años, la *upregulation* de factores de transcripción cardíaca que han sido determinados, mejoran el potencial regenerativo. El ensayo clínico "*Cardiopoietic stem Cell therapy in hearth failure*" (C-CURE) involucró 48 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, en el cual se demostró la seguridad y factibilidad de las *MSC* autólogas [57].

#### Células Madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Las células madre derivada de tejido adiposo (*AdSC*, por sus siglas en inglés) ofrecen una gran capacidad terapéutica con una capacidad de potencialidad similar a otras células multipotentes [58], [59]. Numerosos datos clínicos, testearon con éxito las *AdSC* en reparaciones musculares esqueléticas, esclerosis múltiple, infarto del miocardio y más [58]. Por lo tanto, las *AdSC* parecen ser la opción más prometedora para terapias de enfermedades cardiovasculares [60].

Zuk y cols (2002), publicaron que las *AdSC* son una fuente prometedora de células madre multipotentes mesodermales. Estas se obtienen por medio de



lipoaspirados tratados con colagenasa para obtener la fracción de estroma vascular, estas células también derivadas del proceso de lipoaspirado retienen la capacidad multipotente de diferenciación [59]. Estas células madres derivadas de tejido adiposo pueden ser diferenciadas *in vitro* en diferentes linajes, dependiendo del medio de cultivo [61], por ejemplo si se suplementa con 5-azacitidina [62] o con angiotensina II [63] para inducir la diferenciación en cardiomiocitos, otra metodología es la transfección del gen *TBX18* para diferenciar las *AdSC* en células marcapasos [64]. Por lo tanto, las *AdSC* tiene la capacidad inherente de diferenciarse en numerosos tipos celulares propios del sistema cardiovascular [60].

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, médula ósea, y cordón umbilical poseen los mismos marcadores antigénicos de superficie [65] aunque las proteínas características de la división celular cardíaca son expresadas preferencialmente en las *AdSC*, sugiriendo que estas tiene un mayor potencial proliferativo [65]. La funcionalidad de las *AdSC* no están limitadas únicamente a la diferenciación exitosa, sino también a los efecto parácrinos, ya que secretan factores de crecimiento como el vascular endotelial [66] y otros [60].

#### Señales celulares

Las señales son un vértice importante en la tríada de la ingeniería de tejidos, ya que las características del funcionamiento de cada célula están determinadas por claves, o sea estas señales, las cuales forman parte del microambiente tisular. Todas estas señales trabajan de una forma orquestada, compuesta por moléculas solubles, sustratos /matrices extracelulares en donde las células se adhieren, contacto célula-célula y las fuerzas físicas (eléctrica/mecánica) del microambiente celular donde residen.

#### Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento han sido ampliamente usados para controlar el microambiente tisular. Estos factores son polipéptidos secretados por células, que se unen a los receptores de superficie celulares para ayudar a regular funciones como, supervivencia, migración, crecimiento, diferenciación, replicación y angiogénesis [67]-[68]. Los factores de crecimiento que se incorpora en los andamios ayudan a proteger el tejido de la degradación con una mayor predisposición a las células del microambiente, evitando que las mismas se propaguen fuera del tejido. Estos tipos de andamios pueden reclutar a células más fácilmente, influir el destino del tejido y con más probabilidad de provocar una respuesta celular [69]–[71].



### *Estimulación eléctrica*

El corazón bombea continuamente bajo el control de células marcapaso en el nódulo sinusal. Los constructos cardíacos también podrían latir espontáneamente, pero a frecuencias muy variadas e irregulares. Se ha reportado que la siembra de células cardíacas en andamios de Matrigel® con estimulación eléctrica durante 8 días mejoró la orientación celular, la estructura y la función del tejido [18], [72].

### *Estimulación mecánica*

Ha sido demostrado que la estimulación mecánica es crucial para alinear y madurar los cardiomiocitos como se observa en numerosos estudios de tejido cardíaco a base de hidrogel. La forma más fácil de deformación es la tensión estática, la cual puede obtenerse por diversas técnicas a partir del tejido cardíaco fijado a dos varillas de vidrio [16], o un anillo alrededor de una varilla central [73], o un molde tubular alrededor de un mandril [74] o una tira entre dos agujas de acero [75], entre otros [76]. También, el desarrollo de mayores fuerzas en tejidos cardíacos que se expusieron a tensiones dinámicas del 10 al 15% de estiramiento por un biorreactor tipo *stretcher* mostraron una mejora en la estructura del tejido cardíaco [77]. En conclusión, las metodologías que permitan al tejido realizar contracciones auxotónicas son las más recomendadas probablemente debido a que se busca imitar las condiciones normales de la contracción cardíaca contra la presión hidrostática de la circulación.

Por lo expuesto anteriormente, nuestra hipótesis es que una matriz extracelular descelularizada a partir de corazón de conejo con una estructura 3D preservada constituye un potencial soporte para el ensamblaje y maduración de células madre de origen adiposo. El objetivo general del trabajo fue desarrollar una matriz cardíaca descelularizada de conejo, con una estructura tridimensional conservada, como un andamio biológico para la recelularización con la finalidad de establecer una metodología alternativa al trasplante de corazón mediante el uso de técnicas de ingeniería de tejidos. Como objetivos específicos nos planteamos:

1. Desarrollar y optimizar un protocolo propio de descelularización de corazón completo de conejo. Caracterizar bioquímica, histoanatómica, biológica y mecánicamente la matriz extracelular descelularizada.
2. Obtención, aislación y diferenciación cardíaca de células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo adulto.
3. Realizar la siembra celular sobre la matriz descelularizada de las células diferenciadas previamente por perfusión en un biorreactor.



## Capítulo I: Obtención y caracterización de la matriz extracelular proveniente de corazón

### Materiales y métodos

#### Procedimiento quirúrgico

Los corazones se obtuvieron mediante una cardiectomía total en conejos neozelandeses machos de  $2.100 \pm 120$  g con preservación de la vasculatura coronaria. Previo a la cirugía los animales fueron sacrificados en una cámara de dióxido de carbono, con una atmósfera saturada al 70% de este gas durante 5 minutos. Posteriormente, los conejos se fijaron en posición decúbito dorsal por sus extremidades. Se realizó una incisión mediana y posteriormente se amplió al hemitórax derecho. Se identificó la vena cava e inmediatamente se inyectó 1000 UI de heparina por vía intravenosa. Se procedió a la identificación del cayado aórtico y las venas cavas tanto superior como inferior, se realizó una ligadura en cada vaso. Se identificó y diseccionó la vena cava inferior y la consiguiente liberación de adherencias del corazón. Luego, se localizó la vena cava superior, con la correspondiente identificación, disección, ligadura y sección de la vena cava superior para culminar con la cardiectomía total.

Antes de comenzar con el protocolo de descelularización se introdujo un catéter de teflón por la arteria aorta y se fijó con puntos de prolene 4/0 y se perfundió de una bomba de perfusión peristáltica (APEMA, PC25-4-f-s) con agua desionizada para su lavado completo durante 3 h. Posteriormente, el órgano se colocó en solución de PBS y en baño de hielo para su transporte y posterior congelamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Esta etapa es primordial para comenzar con los procesos de lisis celular mediante los procesos físicos de congelamiento-descongelamiento.

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados de acuerdo a las normas del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio aprobados por el CICUAL de la FCEyN-UNC (17/2018).

#### *Protocolo de descelularización de corazón completo*

Se siguió el protocolo de descelularización desarrollado por Ott en el año 2008 [29] con modificaciones. El corazón conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  fue extraído del freezer y descongelado a temperatura ambiente para ayudar a la lisis celular. El catéter se conectó a una bomba peristáltica y se iniciaron ciclos de perfusión retrógrada a una velocidad entre 3 y 6 ml/min. Primero se perfundió agua desionizada a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 h y posteriormente, se inició una perfusión durante 2 h con una solución de SDS (dodecilsulfato sódico) 1% P/V en agua desionizada. La velocidad de perfusión se ajustó a fin de evitar la ruptura de las válvulas mitral y aórtica. Para eliminar el detergente del sistema, se realizaron sucesivos lavados de dos horas cada uno, a fin de arrastrar los restos celulares. Se perfundió nuevamente con SDS 1% durante toda la



noche. Al día siguiente, se realizaron lavados sucesivos con agua desionizada para arrastrar los restos celulares y el detergente. Por último, se perfundió durante media hora con etanol 70% para desinfectar el órgano, paso importante para lograr una matriz preservada, desinfectada y perfundible para la recelularización. La correcta descelularización se observa macroscópicamente a través de la MEC translúcida; una vez obtenida se conserva en PBS estéril con gentamicina 1% (Richter) a 4°C.

#### *Técnica de descelularización de parche*

El protocolo que se siguió para la descelularización estuvo basado en bibliografía con modificaciones [78]. Los corazones se conservaron a -80°C durante 48 h. Al cabo de ese tiempo, se procedió a su descongelación a temperatura ambiente. Luego se realizaron cortes del ventrículo izquierdo de aproximadamente 1 mm de espesor y se sumergieron los parches en agua desionizada a 4°C durante 2 h. Posteriormente, se reemplazó el agua desionizada por una solución de SDS al 1% durante 4 h en agitación constante a 4°C. Esta solución fue renovada por solución fresca y se dejó en agitación constante durante toda la noche. Finalmente, se reemplazó el medio por agua desionizada. Este ciclo fue repetido hasta completar las 72 h a fin de obtener una correcta eliminación de los restos celulares. Los parches obtenidos fueron desinfectados mediante un lavado de 30 minutos con ácido peracético al 0,2% o con etanol 70%. Una vez desinfectado se procedió a conservar la matriz descelularizada en PBS estéril con gentamicina 1% (Richter) a 4°C.

#### *Caracterización de las Matrices*

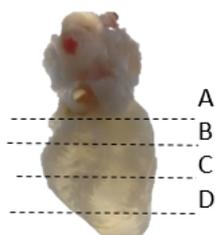
La sección siguiente describe las caracterizaciones histoanatómicas, físicas y bioquímicas para verificar la correcta descelularización del corazón como así también de los parches descelularizados.

#### *Caracterización Histológica*

Las matrices descelularizadas fueron analizadas por microscopía óptica con técnicas de tinción convencionales para evaluar la falta de contenido celular en las muestras obtenidas por ambos tipos de descelularizaciones descriptas.

#### *Microscopía óptica*

Las matrices en forma de parche u órgano completo descelularizado fueron fijadas con p-formaldehído al 4% durante 24 horas, para detener los procesos celulares catalíticos y así obtener la estructura con mínimas modificaciones. Se realizaron cortes a distinta altura en los corazones descelularizados y controles:



*Figura 12: Esquema de cortes en órgano completo descelularizado*

Se realizaron 2 tipos de tinciones en las muestras anteriormente puntualizadas. Con la finalidad de observar la presencia de núcleos y contenido celular se usó la técnica de tinción con Hematoxilina-Eosina [79]. Esta técnica consiste en el teñido de color violeta de los núcleos por medio del colorante básico (catiónico), la hematoxilina, y de color rosado el contenido citoplasmático por el colorante ácido (aniónico), la eosina. También se realizó la tinción Tricrómica de Masson [79], que es una técnica de coloración especial que permite visualizar las fibras de colágeno tipo I así también como, aunque en menor intensidad, de las fibras reticulares. Se emplean tres colorantes para diferenciar el núcleo celular, el citoplasma y las fibras de colágeno. Se fundamenta en el uso de una tinción ácida como escarlata de Biebrich que permite visualizar el citoplasma, y el colágeno. Además, el ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico permiten la tinción diferente del citoplasma y contribuyen como medio de unión entre el colágeno y el colorante azul de la anilina, que tiñe al colágeno. Por lo tanto, el tejido conjuntivo y las fibras de colágeno se teñirán de azul. El citoplasma adquirirá un color rojo del mismo modo que los glóbulos rojos y el tejido muscular quedando los núcleos celulares de color marrón. La opción de uso de esta técnica nos permitió obtener una clara visualización de la distribución y constitución de las fibras de colágeno, así como de un posible deterioro de las mismas por acción del protocolo de descelularización.

#### Microscopía de fluorescencia

De forma complementaria, las membranas controles y dMEC fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia usando la tinción de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Este tipo de técnica se utiliza para evaluar la presencia de núcleos celulares a través de la unión del marcador fluorescente DAPI que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de la doble hélice del ADN [80]. Brevemente, las matrices y membranas controles fueron fijadas por inmersión en una solución de p-formaldehído al 4% en buffer de Tritón-X100 10% durante 25 minutos. Para permeabilizar las membranas posteriormente al lavado con PBS durante 5 min, se agregó 0,1% Tritón-X100 en PBS hasta cubrir la muestra, se



realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno, entre cada lavado se renovó la solución. Por último, se sumergieron las matrices en la solución de DAPI en una dilución de 1:1000 y se la dejó reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se retiró la solución de DAPI y se lavó con PBS por 5 minutos, esto último se repitió dos veces más. Posteriormente, fueron montadas en un portaobjeto para su observación microscópica. Las imágenes obtenidas fueron captadas mediante un haz ultravioleta de longitud de onda 358 nm para excitar el cromóforo de DAPI en un microscopio Nikon, modelo ECLIPSE TE2000-U.

#### Microscopía electrónica de barrido

Con la finalidad de evaluar la ultraestructura de las matrices descelularizadas se procedió a tomar muestras de 0,5 cm<sup>3</sup> de los ventrículos del corazón descelularizado y control, asimismo de los parches descelularizados, con su correspondiente control. Estas fueron deshidratadas durante 10 minutos en concentraciones crecientes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%). Posteriormente, se realizó un secado a punto crítico y luego se realizó un proceso de metalizado con Cromo. Cada muestra fue analizada en un microscopio electrónico marca Carl Zeiss- Sigma (LAMARX- CONICET): a 3 kV a 1000X, 5000X, 25000X.

#### Caracterización bioquímica

##### Cuantificación de ADN remanente

Una cantidad suficiente de ADN remanente al proceso de descelularización puede desencadenar una reacción inflamatoria en el huésped, por lo tanto, es determinante validar el correcto proceso de descelularización mediante la cuantificación del ADN remanente, el cual debe ser menor a 50 ng/mg de tejido o poseer menos de 200 bp [81]. Para cuantificar se realizaron cortes de 1 cm<sup>3</sup> de tejido liofilizado. Las muestras de tejido fueron colocadas en tubos eppendorf, en los cuales se adicionó 0,5 ml de buffer de extracción a cada tubo (200 mM NaCl, 100 mM TRIS, 5 mM EDTA, 0,2% SDS y 100ug proteinasa K).

Los tubos fueron incubados a 55°C durante toda la noche. Al día siguiente, se agregó el mismo volumen de isopropanol (propan-2-ol) (Merck) al tubo y se agitó manualmente hasta observar un fluido homogéneo. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, el precipitado que contenía ADN se lavó con etanol absoluto (Merck) y se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente. El precipitado seco se disolvió en agua desionizada a 37°C durante 30 minutos y se leyó en un espectrofotómetro a 260 nm. Los resultados se expresaron como la cantidad de ácidos nucleicos por mg de tejido seco[82]



### Cuantificación de SDS remanente

Para la cuantificación del SDS se tomaron muestras de la última hora del lavado del proceso de descelularización y se prosiguió el protocolo propuesto [83]. Brevemente, se tomó una muestra de 300  $\mu$ l de la solución de lavado, se agregó 300  $\mu$ l de agua desionizada y se agitó manualmente. Posteriormente, se agregó 600  $\mu$ l de reactivo de azul de metileno (250 mg de azul de metileno, 50 gr de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en un volumen final de 1000 ml). Se agitó y se adicionó 2,4 ml de cloroformo y se agitó nuevamente en un vórtex durante 1 minuto. La solución se centrifugó a 2.500 rpm durante 2 min. Se recogió el sobrenadante y se cuantificó por espectrofotometría a 651 nm. Los cálculos finales fueron expresados en %P/V.

### Evaluación de la Biocompatibilidad

La meta final de obtener matrices descelularizadas es ser implantadas, por lo tanto, estas deben ser biocompatibles para evitar reacciones de histocompatibilidad negativa dentro del organismo. Para observar esta condición se realizó uno de los ensayos recomendados por la ISO 10993 - *Biological Evaluation of medical devices (2018)*: el ensayo de citotoxicidad *in vitro* que corresponde a la Parte 5 de la Norma [84].

### Obtención de extractos

Los ensayos propuestos por la parte 5 de la Norma fueron realizados a partir de extractos derivados de las matrices descelularizadas y desinfectadas. Los extractos fueron obtenidos de acuerdo a lo recomendado por la Parte 12 de la Norma ISO 10993 [85]. Brevemente, las matrices estériles se cortaron con una tijera en piezas de aproximadamente 3  $\text{cm}^2$  y se las sumergió en 1 ml de medio de cultivo celular DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 1% antibióticos y 1% de glutamina dentro de un tubo Eppendorf. Se mantuvo en agitación constante a 37°C durante 72 h. Estos extractos se usaron inmediatamente luego de su correcta preparación para evitar contaminaciones, cambios en la composición u homogeneidad. El pH del extracto no fue modificado para ser apto en cultivo celular.

### Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar la capacidad citotóxica de las matrices descelularizadas y no descelularizadas se realizó el ensayo de MTT sugerido por la Norma según el Anexo C. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán). Esta metodología permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la



cantidad de formazán producido. El método fue desarrollado por Mosmann en 1983[86] y modificado posteriormente por Denizot y Lang en 1986[87].

Para la realización de este ensayo se usó la línea celular Vero, unos de los tipos celulares recomendado por la Norma 10993:5. Este linaje es muy utilizado en biología celular ya que se trata de una cepa que fuera aislada a partir de las células epiteliales del riñón de un mono verde africano (*Chlorocebus sp*). Esta estirpe celular fue crioconservada en nitrógeno líquido hasta su uso. Las mismas fueron descongeladas paulatinamente hasta las condiciones óptimas de cultivo sumergidas en medio de cultivo celular DMEM con 1% de glutamina, 1% de gentamicina (50 µg / ml) y suplementado con 10% de suero fetal bovino dentro de una placa de Petri. Esta se mantuvo en una incubadora a 37°C en atmósfera controlada con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 3 pasajes se procedió a realizar el ensayo de MTT. En el día de la prueba, las células se levantaron de la placa con una solución de digestión enzimática (Tripsina/EDTA 0,25%) y fueron contadas usando una cámara de Neubauer. A continuación, se preparó una solución que contuvo una concentración de 1 x 10<sup>5</sup> células/ml, se sembró 100 µl de esta solución por sextuplicado en una placa *multiwell* de 96 pocillos luego se incubó a 37°C en atmósfera controlada a 5% de CO<sub>2</sub>. Veinticuatro horas se removió el medio de cultivo celular y se agregó en cada pocillo los extractos provenientes de las membranas descelularizadas y/o controles sin descelularizar, los controles de ensayo, positivo (DMSO al 100%) y negativo (polietileno de alta densidad). Las placas se colocaron dentro de la incubadora de cultivo. Al día siguiente se removieron los extractos de todas las placas, se adicionó 50µl de una solución de MTT (1 mg/ml en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino) en cada pocillo y se incubó durante 3 h. A continuación, se eliminó el sobrenadante, se adicionó 100µl de isopropanol en cada pocillo, de esta forma se disolvieron los cristales de formazán y se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm, utilizando un lector multiplaca ELISA (Multiskan Spectrum; Thermo Scientific; Suecia). Debido a que la cantidad de cristales de formazán es directamente proporcional a la viabilidad celular, el porcentaje de viabilidad fue expresado como el resultado obtenido a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{100 \times DO_{595e}}{DO_{595b}}$$

*Ecuación 1: Cálculo de la viabilidad de una muestra de material ensayada, donde DO<sub>595e</sub>: Densidad óptica media de los pocillos con extracto del material; DO<sub>595b</sub>: Densidad óptica media de los pocillos blanco.*

Los resultados obtenidos fueron expresados como el porcentaje de viabilidad celular, el cual según lo recomienda la Norma ISO 10993: 5 debe ser mayor al 70% que indica la ausencia de citotoxicidad.

---



### Caracterización mecánica

#### Ensayo de estiramiento

Este experimento consiste en conocer el comportamiento de las matrices cuando son sometidas a un estiramiento uniaxial y a partir de estos resultados determinar sus propiedades elásticas

El ensayo consistió en fijar una muestra de membrana descelularizada de corazón con dimensiones aproximadas de 15 mm de longitud, 4,5 mm de ancho y 1,6 mm de espesor a una máquina universal de ensayos (DIGIMESS RS-8000, con celda de carga Transcell BSS-500 kg) y se la programó para un estiramiento continuo con un avance de 1 mm/s hasta la ruptura de la muestra de tejido. Los datos devueltos por la máquina universal de ensayos (kgf, mm) fueron transformados en esfuerzo (kPa) y deformación unitaria.

Se buscó observar las diferencias cualitativas que existen a causa del proceso de descelularización y el proceso de desinfección, por lo tanto, se usaron muestras de tejido cardíaco sin descelularizar (control), tejido descelularizado sin desinfectar (dMEC), tejido descelularizado y desinfectado por ácido peracético al 0,2% (dMEC-APA) y tejido descelularizado y desinfectado por etanol al 70% (dMEC-Etanol), por comparación de gráficos de esfuerzo de tracción.

Un procesamiento posterior se basó en obtener el módulo de Young de las medidas en el segmento línea de la curva de esfuerzo versus deformación, de las distintas muestras mediante la siguiente ecuación

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

*Ecuación 2: Cálculo de módulo de Elasticidad*

donde  $\sigma$  es la tensión ejercida sobre el área de la sección transversal del elemento,  $\varepsilon$  es la deformación unitaria.

#### Ensayo de reometría

Se procedió a realizar el análisis reométrico mediante un reómetro (Rheoplus Physica MCR 301 Anton Paar), se utilizó una geometría de placa PP (8 mm de diámetro) y se cortaron discos de muestras de tejido cardíaco sin descelularizar, tejido descelularizado sin desinfectar, tejido descelularizado y desinfectado por ácido peracético al 0,2% y tejido descelularizado y desinfectado por etanol al 70% con un sacabocados de 8 mm de diámetro. El primer paso del ensayo consistió en realizar un barrido de amplitud a una frecuencia constante, se configuró el equipo en una frecuencia constante de 1 Hz y un estiramiento variable entre 0,01% y 10%, con 6



puntos por década. El resultado de ese primer paso se utilizó para establecer la Región Viscoelástica Lineal (RVL) de cada una de las matrices.

Una vez determinado un valor de estiramiento para cada matriz, dentro de la RVL se procedió al segundo paso del ensayo. Este consistió en un barrido en frecuencia del material, configurado con una amplitud constante de 0,99%, y una frecuencia variable entre 0,1 a 10 Hz con 13 puntos por década. Los resultados de ambas partes del ensayo fueron procesados con la aplicación Rheoplus 32 V3.10 21003376-33024.

#### *Caracterización química*

##### *Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)*

Para caracterizar químicamente las matrices se procedió a realizar un ensayo de espectrofotometría de transformada de Fourier entre las matrices descelularizadas sin desinfección y la descelularizada con desinfección por ácido peracético al 0,2%. La preparación de muestra consistió en secarlas durante 24 h en un liofilizador (Rificor Mod L-05) a  $-47^{\circ}\text{C}$  en un vacío de 0,5 psi. Una vez listo, se procedió a usar un espectrómetro FTIR ABB Bomem MB-100. Los espectros IR de las muestras fueron obtenidos utilizando la técnica de reflectancia difusa. Las muestras finamente pulverizadas se irradiaron con longitudes de onda comprendida entre 800 y  $4000\text{ cm}^{-1}$  y los espectros fueron obtenidos como porcentaje de transmitancia. Los espectros y resultados fueron tratados con el software OMNIC 9.2.86, Thermo Fisher Scientific Inc.



## Resultados

### Corazón completo descelularizado

El protocolo de descelularización desarrollado en este trabajo logró obtener una matriz extracelular de corazón de conejo completamente descelularizada. Macroscópicamente, se observó (Figura 13-C) una matriz blanca, translúcida y sin rastro de sangre visible ni restos del tejido cardíaco. Con el fin de observar posibles cambios en la anatomía interna del órgano descelularizado, se realizaron cortes axiales a distintos niveles y se verificó que las diferentes secciones obtenidas permanecieron intactas, así también como la disposición de las cámaras cardíacas y el septum se mantuvieron sin alteraciones (Figura 14).

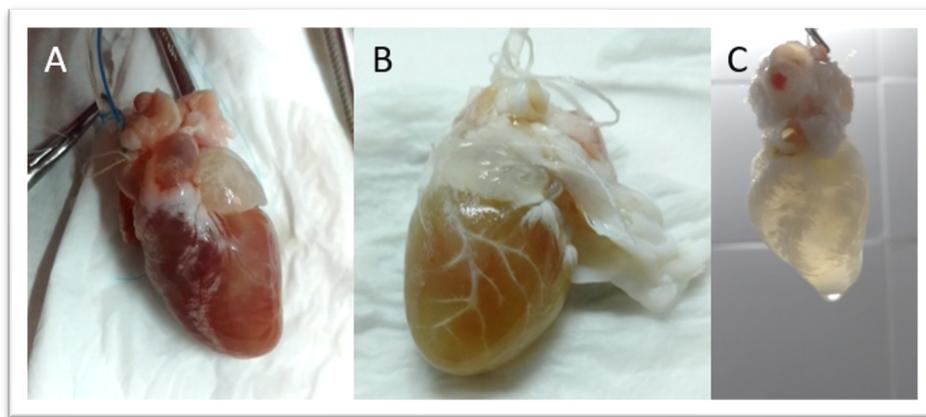


Figura 13: Tres etapas del proceso de descelularización. A: Antes de iniciar; B: a la mitad del proceso, en donde se pueden observar el uso de la anatomía del árbol vascular como medio de distribución de los agentes descelularizantes; C: El proceso finalizado.



Figura 14: Preparación de las matrices para ser enviadas a histología, estas corresponden a las secciones cortadas como se dispuso en la Figura 12.



La microscopía óptica mostró la ausencia completa de restos celulares en las matrices descelularizadas analizadas. En la Figura 15 se puede observar la ausencia total de núcleos y citoplasma celulares, aun así, la integridad anatómica de la matriz estuvo conservada. La Figura 15, A, B, y C representan el tejido cardíaco control, no descelularizado, la figura 15 D, E y F se puede observar la presencia de células del miocardio y la sección de un vaso sanguíneo con la túnica tisular completa y restos de sangre en la luz del mismo.

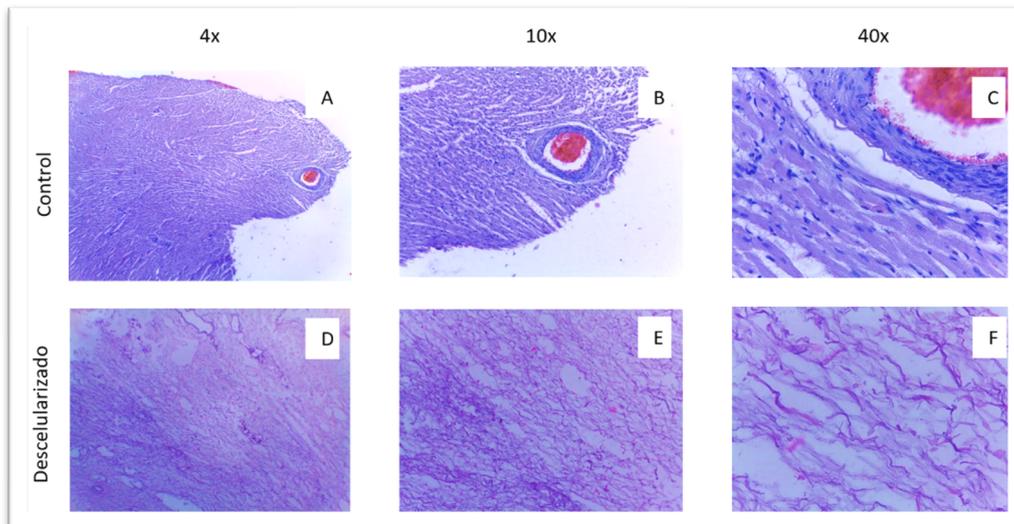


Figura 15: Micrografías ópticas de secciones de miocardio con tinción HE corazón control a 4x(A), 10x(B) y 40x(C) y MEC descelularizada de corazón (D, E, F). En los paneles superiores se puede observar la presencia de núcleos celulares teñidos de azul, citoplasma en púrpura y hematíes en rosa. Mientras que, en los paneles inferiores donde el miocardio ya fue descelularizado, se nota la ausencia de núcleos y citoplasma, se observa la estructura de la matriz coloreada con tonos violetas.

En la Figura 16, la tinción tricrómica de Masson reveló la conservación del tejido conectivo en las muestras provenientes de tejido descelularizado respecto de las muestras de músculo cardíaco control. La distribución y organización del colágeno en la MEC fue similar a la observada para el miocardio control. La tinción en los cortes de la MEC mostró la presencia, en su mayoría, de fibras de colágeno con una morfología y orientación preservada. Mientras que en las muestras del tejido control, además, de las fibras de colágeno, se puede chequear la presencia de núcleos y citoplasmas celulares. Asimismo, se pudo verificar la estructura conservada de vasos sanguíneos presentes en el corte histológico.



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

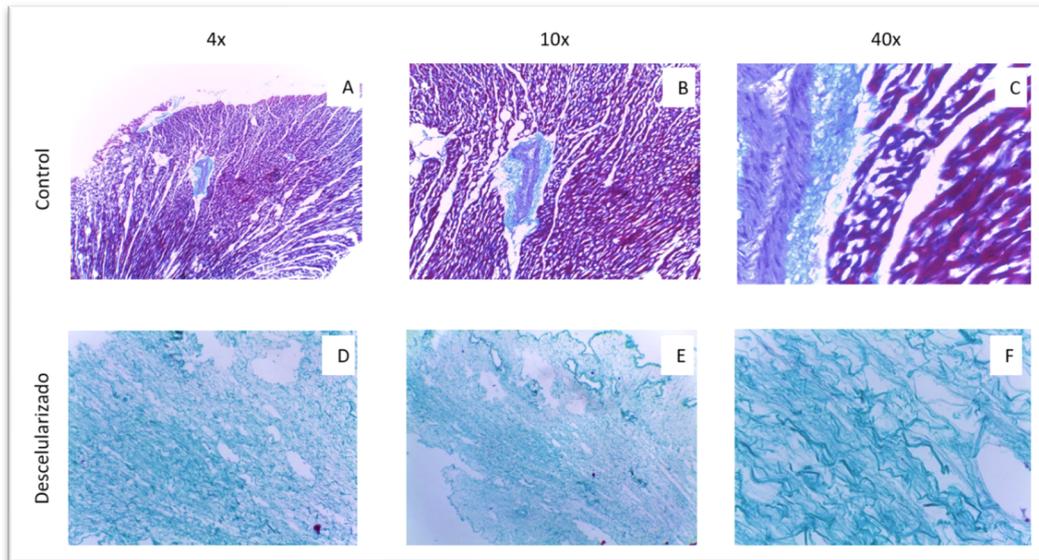


Figura 16: Micrografía de tinción tricrómica de Masson, en los paneles A, B y C observamos cortes de miocardio sin descelularizar. En los paneles inferiores (D, E y F) observamos la ausencia de núcleos(púrpura) y citoplasma celular(rojo), pero se denota la presencia de fibras de colágeno teñidas de celeste.

La microscopía electrónica de barrido corroboró, la ausencia de núcleos y contenido citoplásmico en los cortes realizados de la matriz extracelular. Asimismo, los distintos aumentos mostraron una preservación correcta de las fibras de colágeno en la MEC luego del protocolo de descelularización desarrollado, comparada a las muestras de músculo cardíaco control. Además, el mayor aumento permitió verificar la adecuada conservación de la arquitectura microscópica de la MEC con la distribución, orientación, dimensión y grado de agregación de la organización tridimensional de la ultraestructura de las fibras reticulares que fueran sometidas al proceso de descelularización tanto físico como químico (Figura 17).



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

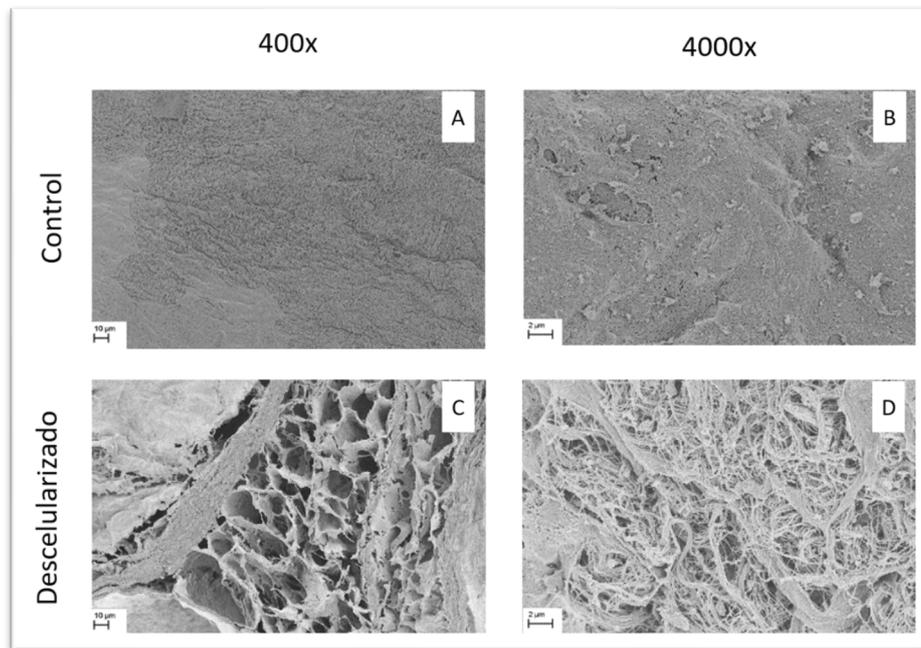


Figura 17: Micrografía Electrónica de Barrido de corazón control sin descelularizar en panel superior (A y B) y MEC descelularizada en panel inferior (C y D), en estos paneles se observa la conservación de la ultraestructura de la MEC tanto en aumentos de 400x como de 4000X.

### Ensayos bioquímicos

#### Determinación de ADN remanente

La Figura 18 muestra la cuantificación del ADN en muestras de músculo cardíaco control, sin descelularizar y descelularizado. El contenido total de ADN en las muestras analizadas de MEC fue de  $7,68 \pm 0,42$  ng de ADN por gr de tejido seco comparado al contenido de  $2.100 \pm 579$  ng/gr tejido proveniente de miocardio intacto ( $t = 3,453$ ,  $p < 0,05$ , Test de Student), indicando que el protocolo de descelularización utilizado fue eficaz para eliminar los remanentes nucleares del tejido sometido al protocolo de descelularización.

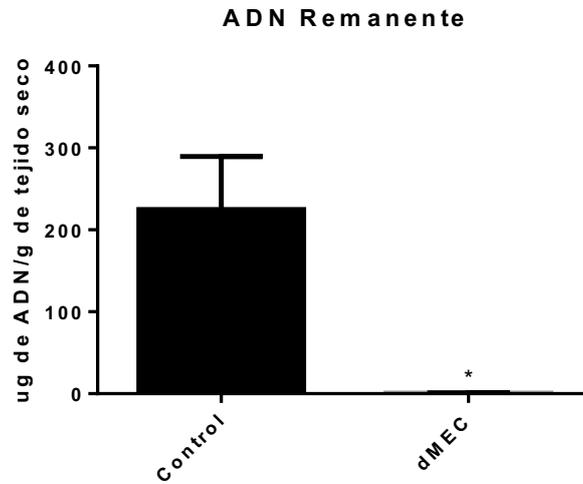


Figura 18: Cuantificación de ADN remanente en la dMEC y su control respectivo.  $n=3$ . \*  $p < 0,005$  (Test de Student).

Obtener una matriz celular con concentraciones bajas de SDS residual, puede ser un factor determinante para la recelularización de esta y la adherencia y proliferación celular. La Figura 19 muestra la cantidad de SDS residual en la MEC luego del protocolo de descelularización. Las matrices extracelulares exhibieron un contenido al finalizar el procedimiento de descelularización de  $0,009 \pm 0,001$  % P/V en comparación con la concentración al inicio del mismo proceso, que fue del 1 %P/V. Estos valores obtenidos brindaron la evidencia de que los sucesivos lavados implementados así también como el medio de desinfección final llevaron a una eliminación prácticamente total del detergente, esencial para evitar una futura interacción negativa en el proceso de recelularización propuesto. El Test de Student reveló una diferencia significativa entre el principio del ensayo con la concentración final obtenida, luego del protocolo ensayado con un  $p < 0,0001$  y un  $t=66,08$ .

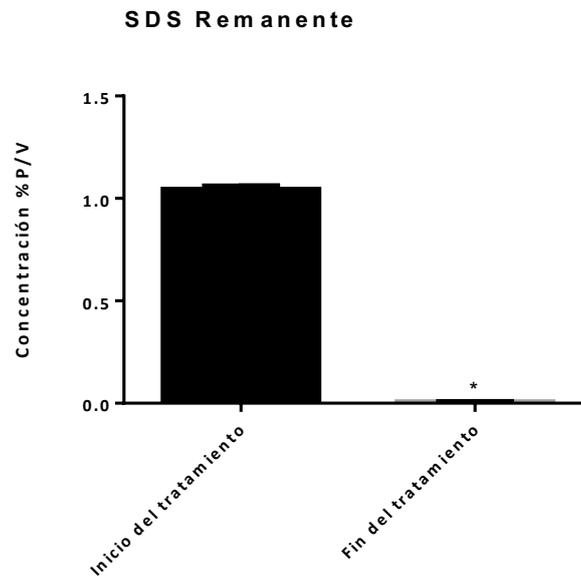


Figura 19: Cantidad de SDS residual en la muestra de MEC posterior al protocolo de descelularización.  $n=3$  \*  $p < 0,0001$   $t=66,08$  (Test de Student).

#### Evaluación de la citotoxicidad

La ausencia de citotoxicidad de la matriz resultante luego del protocolo de descelularización es indispensable para poder considerarse como un andamio seguro para la resiembra con las diferentes estirpes celulares que deberán adherirse y proliferar sobre la MEC obtenida. La Figura 20 revela que la viabilidad celular para la muestra del extracto obtenido a partir de la matriz extracelular es mayor al 70% recomendado por la Norma ISO 10993:5 [84]. Un ANOVA de una vía mostró un efecto sobre la viabilidad celular estudiada ( $F(2, 15) = 62.16$   $p < 0.0001$ ). El test *a posteriori* de Bonferroni reveló una viabilidad similar de la MEC ( $108,6 \pm 11,12$  %) y el control negativo ( $85,85 \pm 3,257$  %) ( $p = 0,05$ ) y una diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) respecto del control positivo ( $7,869 \pm 0,618$  %). Estos resultados nos sugieren que la MEC obtenida carece de citotoxicidad bajo las condiciones ensayadas.

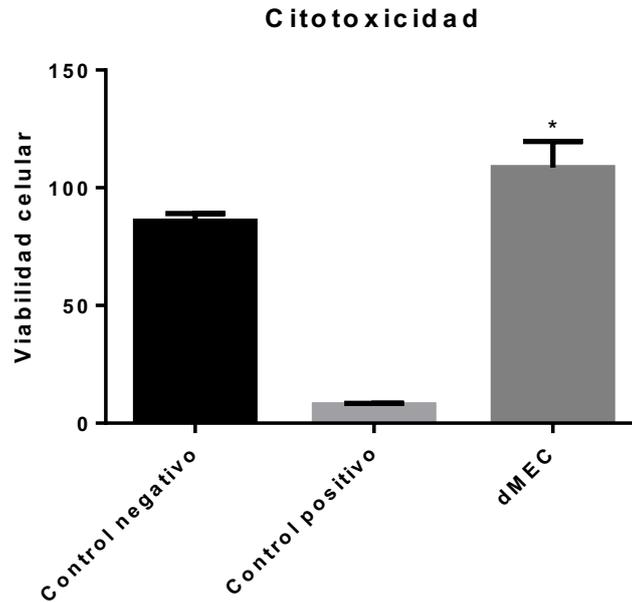


Figura 20: Viabilidad celular del extracto 100% obtenido de la dMEC en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética ± ESM. n= 3. \*significativamente diferente del Control positivo,  $p < 0,005$  (Test de bonferroni)

#### Caracterización de parches de corazón descelularizado

Con la finalidad de caracterizar mecánica, química y funcionalmente a las matrices cardíacas descelularizadas, se procedió a preparar los parches de ventrículo cardíaco. La Figura 21 muestra el resultado de la descelularización de parches de miocardio de aproximadamente 1 mm de espesor. En el panel A de la Figura 21, se aprecian secciones del músculo sin descelularizar con la coloración característica del tejido cardíaco fresco. En la Figura 21, panel B se observa macroscópicamente una matriz descelularizada completamente traslúcida luego del protocolo descrito en Materiales y Métodos con la forma de los cortes resguardada así también como el árbol vascular conservado sin restos de sangre.



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

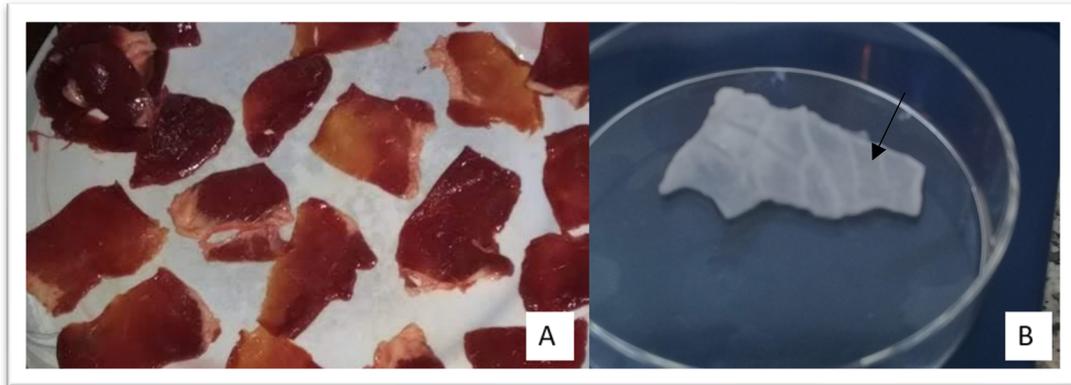


Figura 21: Imágenes de antes(A) y después (B) del proceso de desceldularización.

La Figura 22 muestra el detalle histológico de los parches de miocardio control (no desceldularizado) y posterior al proceso de desceldularización con los tratamientos de desinfección propuestos, con etanol 70% y ácido peracético 0,2% a diferentes aumentos (4x, 10x y 40x). La tinción con Hematoxilina-Eosina reveló que la desceldularización no dejó rastros de componentes celulares en los cortes de ventrículo cardíaco comparado al corte control. Asimismo, no se observaron diferencias cualitativas entre los dos métodos de desinfección utilizados. En ambos casos la pérdida de núcleos y citoplasma fue completa y la matriz no tuvo diferencias observables a los diferentes aumentos estudiados (D-F y G-I) comparado con el control no desceldularizado (A-C). Asimismo, podemos visualizar dos vasos sanguíneos en ambas micrografías tratadas donde la microestructura vascular está altamente preservada. La flecha destaca la correcta preservación de la forma y dimensiones de un vaso sanguíneo dentro de la matriz extracelular, que es indispensable para una futura recelularización.

La Figura 23 demuestra la presencia de las estructuras de las fibras de colágeno y tejidos vasculares, a través de la tinción tricrómica de Masson, completamente conservadas. Además, la falta de tinción con el colorante acidófilo hace referencia a la ausencia de citoplasma celular en ambas matrices desceldularizadas y los vasos sanguíneos preservados.

En la Figura 24, la microscopía electrónica de barrido permite la visualización superficial tridimensional de la organización celular y fibrilar en el miocardio ventricular. En la muestra control(A-B), sin desceldularizar, podemos observar una fina capa celular sobre la matriz y también, una superficie condensada formada principalmente por células endoteliales. El protocolo de desceldularización eliminó totalmente las componentes celulares (C-D y F-G) de las matrices con las fibras de colágeno preservadas, que indicaría que el tratamiento implementado no afectó la integridad y disposición de las mismas. Ambos tratamientos de desinfección de la MEC no mostraron diferencias en las características histoanatómicas de las MEC obtenidas sugiriendo que ambos métodos no causan diferencias histológicas en la conservación



Desarrollo de un corazón bioartificial a partir  
de recelularización con células madre de origen adiposo

de las estructuras de andamiaje especialmente en el entramado general de fibras de colágeno y elastina de las MEC así también como la falta de fragmentos o restos celulares.

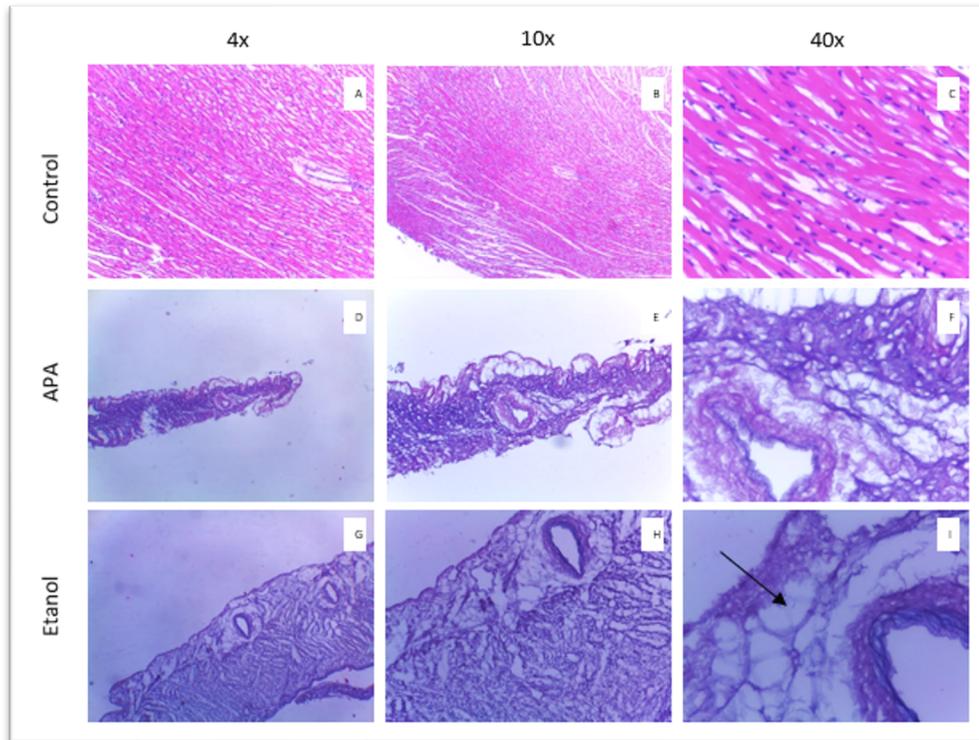


Figura 22: Micrografía de parches de miocardio teñidos con HE, control(A, B,C), la MEC descelularizada y desinfectada con APA(D,E,F) y MEC descelularizada y desinfectada con Etanol (G,H,I)



Desarrollo de un corazón bioartificial a partir  
de recelularización con células madre de origen adiposo

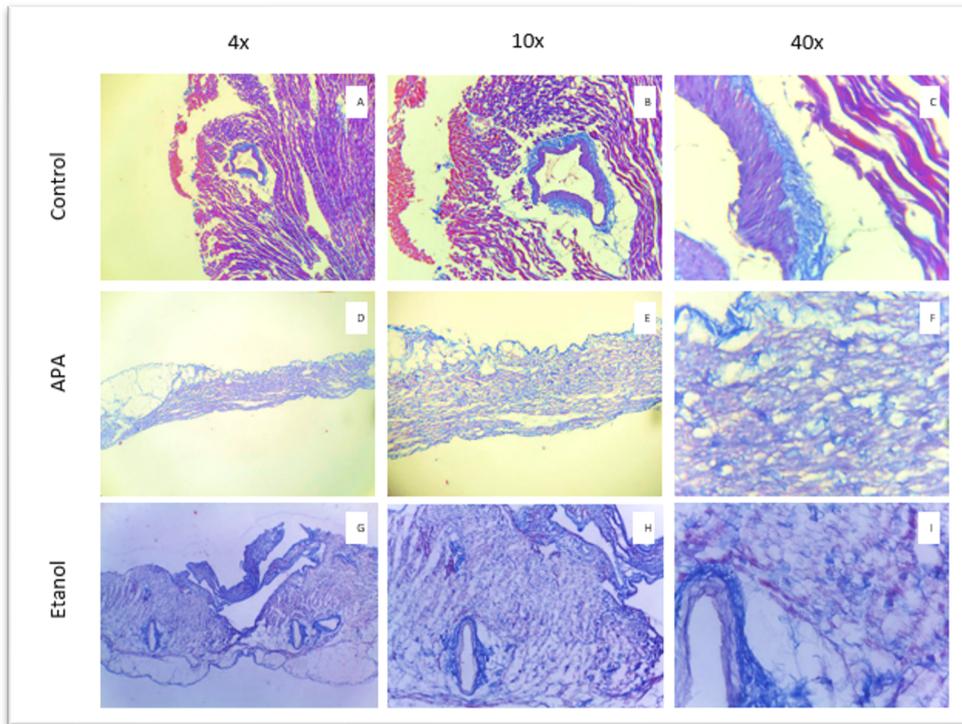


Figura 23: Micrografía de parches de miocardio teñidos con Tricrómico de Masson, control(A, B,C), la MEC descelularizada y desinfectada con APA(D,E,F) y MEC descelularizada y desinfectada con Etanol (G,H,I)

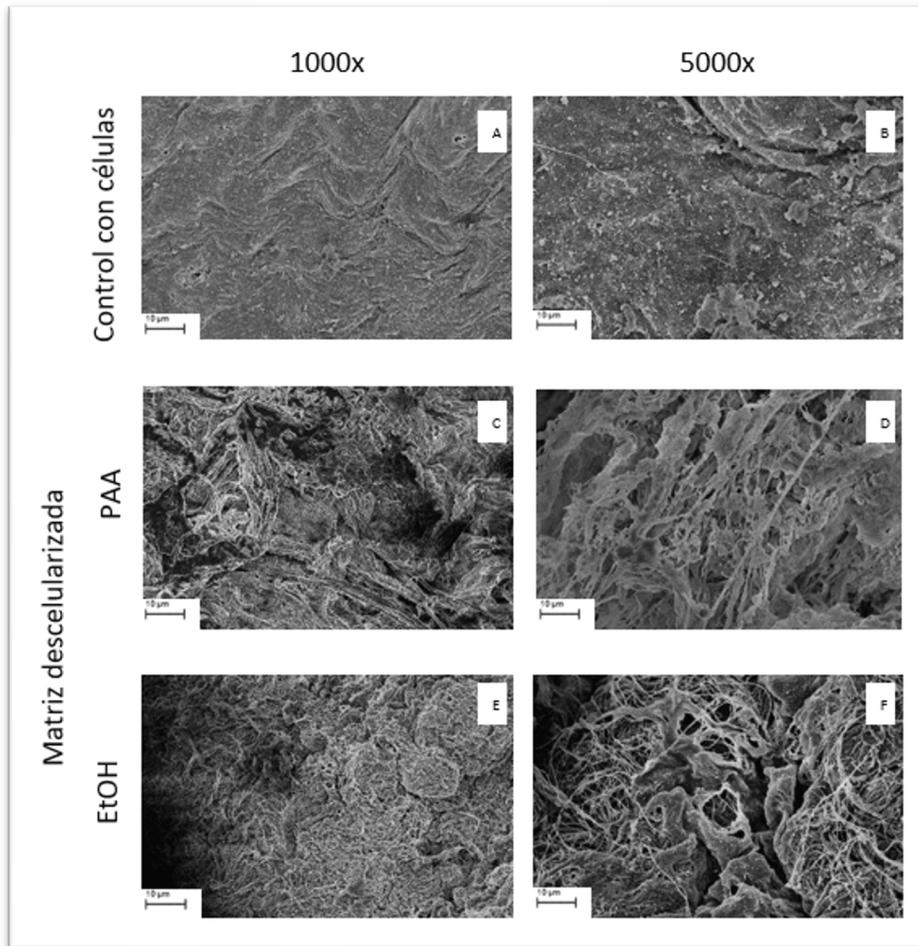


Figura 24: SEM de parche de miocardio control (A y B), MEC descelularizada (C, D, E y F). Las dos primeras tratadas con APA, las segundas con Etanol para ambos casos

### Estudios bioquímicos

Una ANOVA de una vía reveló un efecto significativo de los distintos tratamientos de desinfección sobre la cantidad de ADN remanente en los parches descelularizados y desinfectados ( $F(2, 6) = 13.30, p < 0,01$ ). El test de comparaciones múltiple *a posteriori* de Bonferroni mostró diferencias significativas para ambos tratamientos, las muestras desinfectadas con etanol 70%  $8,874 \pm 0,184$  ng de ADN/gr de tejido seco ( $p > 0,01$ ) y de  $5,150 \pm 0,259$  ng de ADN/gr de tejido seco ( $p > 0,01$ ) en los cortes tratados con ácido peracético 0,2%, respecto del tejido control ( $400 \pm 0,184$  ng de ADN/gr). Estos resultados sugieren que el protocolo desarrollado fue adecuado para la eliminación de las miofibras constituyentes del tejido cardíaco.

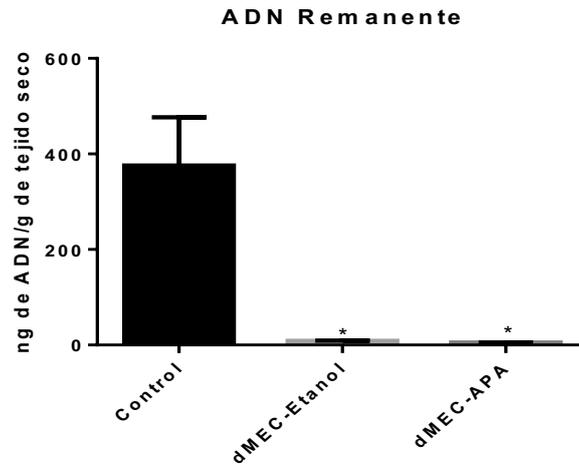
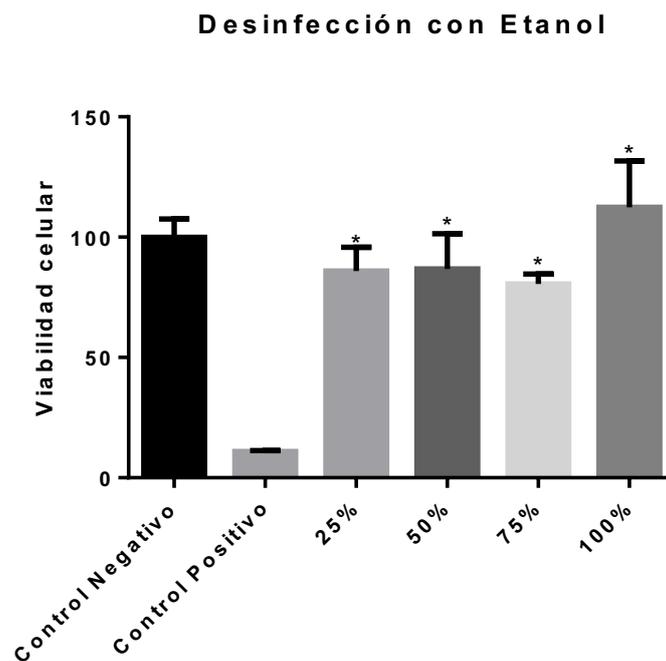


Figura 25: Cuantificación de ADN remanente en la dMEC tratada con Etanol, tratada con Ácido peracético y el control respectivo.  $n=3$ . \* ( $p < 0,005$ ) Test de Bonferroni.

#### Citotoxicidad de los parches descelularizados

En la desinfección con Etanol la viabilidad celular fue superior a 70% que son los valores mínimos recomendado por la norma ISO 10993-5. Una ANOVA de una vía reveló un efecto significativo sobre la citotoxicidad en los parches descelularizados y desinfectados con Etanol ( $F(5, 22) = 15,27$ ,  $p < 0,001$ ). El test de comparaciones múltiple *a posteriori* de Bonferroni mostró diferencias significativas entre las distintas diluciones y el control positivo, para un  $p < 0,005$  (Figura 26).





## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

Figura 26: Viabilidad celular del extracto 100%, 75%, 50% y 25% obtenidos de la dMEC desinfectada con Etanol en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética  $\pm$  ESM.  $n=3$ . \*significativamente diferente del Control positivo,  $p < 0,005$  (Test de Bonferroni)

Para las matrices descelularizadas que fueron tratadas y desinfectadas con APA, el ensayo de citotoxicidad evidenció resultados interesantes, todos los extractos no mostraron citotoxicidad en el ensayo de MTT recomendado por la norma ISO 10993-5 siendo la viabilidad celular mayor al 70% (Figura 26). Una ANOVA de una vía reveló un efecto significativo sobre la citotoxicidad en los parches descelularizados y desinfectados con ácido peracético ( $F(5, 21) = 32,69$ ,  $p < 0,0001$ ). El test de comparaciones múltiple a posteriori de Bonferroni mostró diferencias significativas entre las distintas diluciones y el control positivo, para un  $p < 0,005$  (Figura 27).

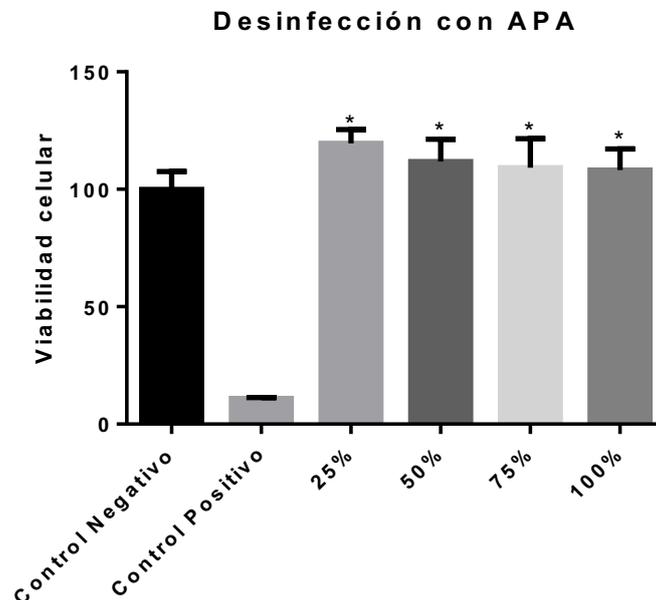


Figura 27: Viabilidad celular del extracto 100%, 75%, 50% y 25% obtenidos de la dMEC desinfectada con APA en cultivo de células Vero durante 24h. Barras representan media aritmética  $\pm$  ESM.  $n=3$ . \*significativamente diferente del Control positivo,  $p < 0,005$ (test de Bonferroni)

### Caracterización Mecánica

El ensayo de tracción, fundamentado en la aplicación de dos fuerzas que actúan en sentido opuesto, nos permitió analizar los resultados desde el punto de vista cualitativo y también cuantitativo.

En la Figura 38 se observa la curva representativa de tensión-deformación del comportamiento de las matrices frente a las tensiones ejercidas para su deformación. La matriz extracelular sin desinfectar (azul) y el tejido control no descelularizado (gris), exhibieron un comportamiento similar de deformación de las probetas muestras y alcanzaron valores máximos muy dispares a medida que se incrementó la carga aplicada, indicando mayor resistencia a la tracción de la muestra de miocardio control. Sin embargo, cuando las matrices descelularizadas fueron desinfectadas como último



paso del protocolo ensayado, mostraron un comportamiento diferente a la carga aplicada. Aquellas desinfectadas con ácido peracético 0,2% (naranja) exhibieron una curva con valores de tensión más elevados que el resto de las matrices ensayadas y con un límite de ruptura desplazado fuertemente a la derecha, es decir no solamente soporta cargas mayores, sino que además posee una zona elástica mayor que los tejidos controles y demás tratamientos realizados, sugiriendo una mayor resistencia luego del tratamiento con ácido peracético.

Desde el punto de vista cuantitativo, los valores de los Módulos de Young de cada material para cada punto de la curva en la zona elástica fueron calculados mediante la Ecuación 2.

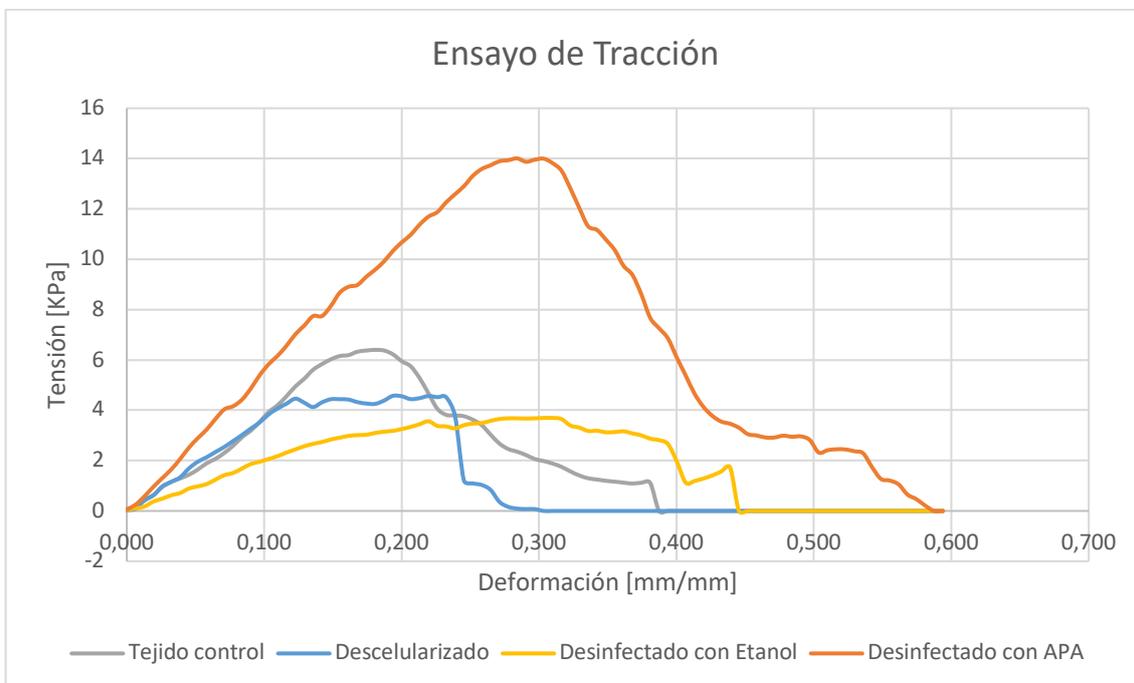


Figura 28: Curva representativa de tensión-deformación para el tejido control(gris), MEC descelularizada(azul), dMEC desinfectada con APA (naranja), y dMEC desinfectada con Etano(amarillo).

Los valores del Módulo de Young calculados para las muestras de los diferentes tejidos tratados según lo descrito en Materiales y Métodos se presentan en la Figura 39. Un ANOVA de una vía revela un efecto significativo de los tratamientos de desinfección sobre el módulo de elasticidad en membranas de miocardio descelularizado ( $F(3, 58) = 4,719, p < 0,01$ ). La prueba de Bonferroni mostró que los tratamientos finales de desinfección modificaron la elasticidad significativamente luego del tratamiento con etanol 70% ( $p < 0,001$ ) y ácido peracético 0,2% ( $p < 0,001$ ) respecto de las matrices descelularizadas sin desinfectar. Además, las membranas desinfectadas con etanol 70% exhibieron un Módulo de Young inferior, es decir, una



menor rigidez ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, el tratamiento con ácido peracético 0,2% produjo un Módulo de elasticidad longitudinal mayor comparado a las matrices descelularizadas ( $p < 0,001$ ). No se observaron diferencias significativas en el Módulo de Young entre músculo cardíaco intacto y el mismo descelularizado.

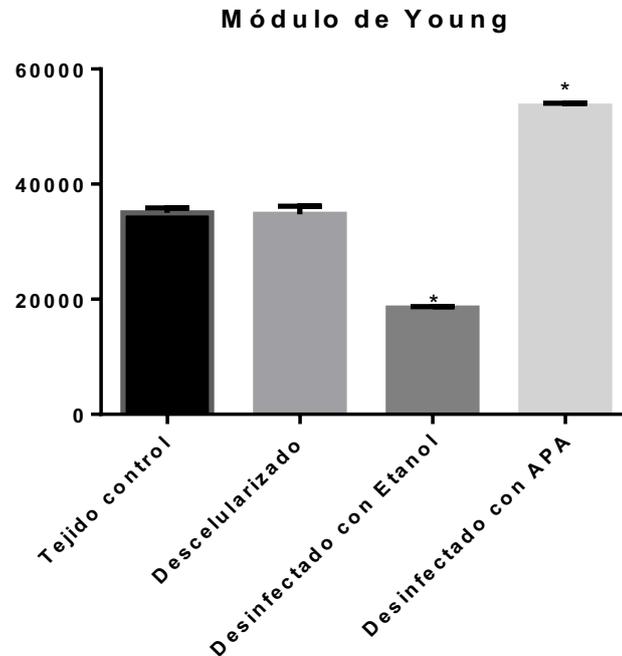


Figura 29: Módulo de Young para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética  $\pm$  ESM. \*significativamente diferente del tejido control,  $p < 0,005$  (Test de Bonferroni)

### Reometría

Por medio del ensayo reológico se obtuvieron los módulos elástico y viscoso de cada una de las matrices y del control. Se obtuvieron valores de media que fueron graficados en función de la frecuencia angular con un rango de 0,1 a 10 Hz como se muestra en la Figura 30, en ella podemos observar que las 3 muestras ensayadas tiene un módulo elástico mayor que el módulo viscoso, esto nos revela que estamos frente a un sistema de comportamiento similar a un sólido viscoelástico, donde las deformaciones son esencialmente elásticas y recuperables [88]. En la Figura 30 observamos la ausencia de cruce de ambos módulos (Elástico y viscoso) lo que nos da un indicio que estamos frente a un comportamiento de gel-débil.

Además, observando los módulos elásticos (Figura 31), viscosos (Figura 32) y complejo (Figura 33) de las matrices desinfectadas con ácido per-acético tienen un



comportamiento muy parecido a las matrices controles, es decir que no fueron descelularizadas. Las matrices que fueron desinfectadas con etanol al 70%, tuvieron una tendencia similar a las otras matrices como al control, pero con valores de casi un orden de magnitud menor.

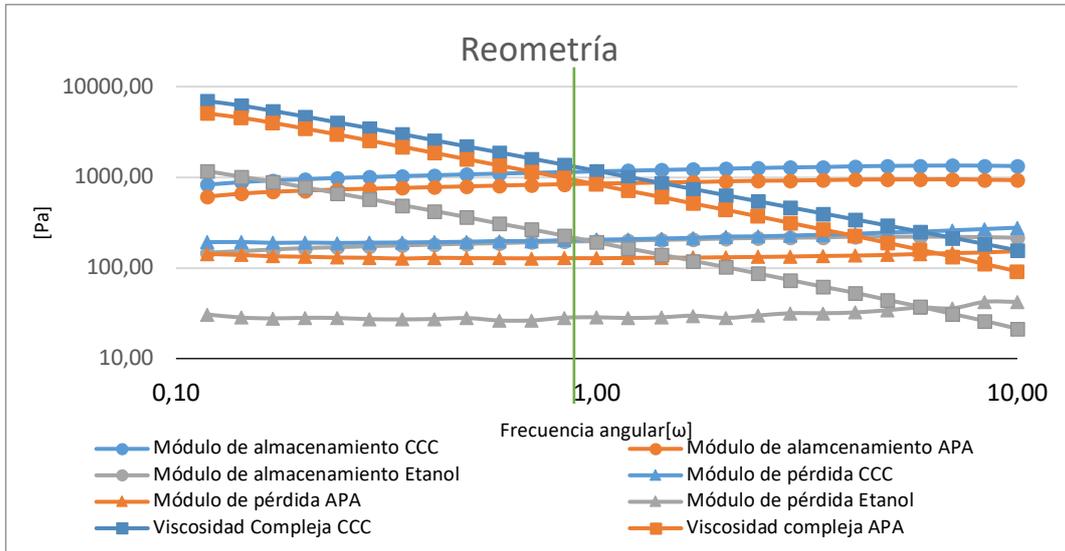


Figura 30: Gráfico de reometría para el tejido control(azul), dMEC desinfectada con APA(naranja), y dMEC desinfectada con Etanol(gris).

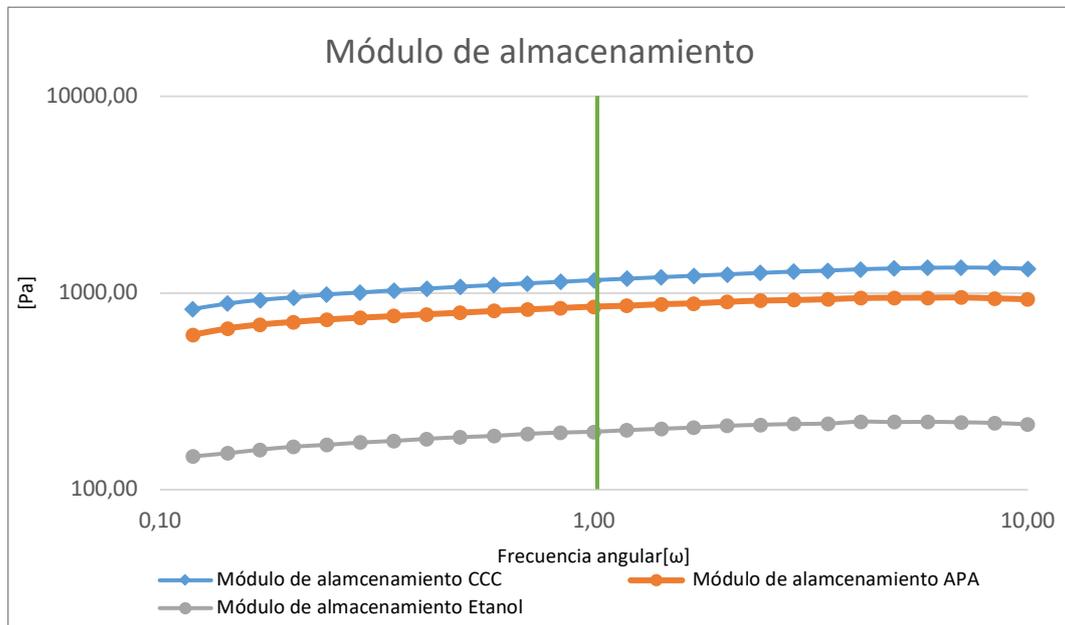


Figura 31: Gráfico de módulo elástico(almacenamiento) para el tejido control(azul), dMEC desinfectada con APA(naranja), y dMEC desinfectada con Etanol(gris).



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

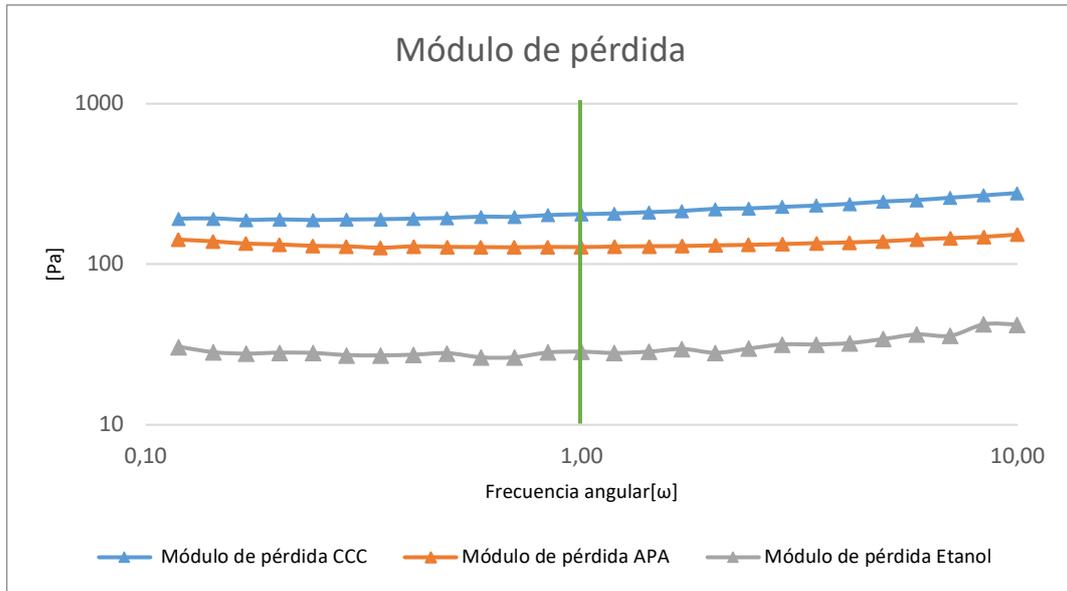


Figura 32: Gráfico de módulo viscoso(pérdida) para el tejido control(azul), dMEC desinfectada con APA(naranja), y dMEC desinfectada con Etanol(gris).

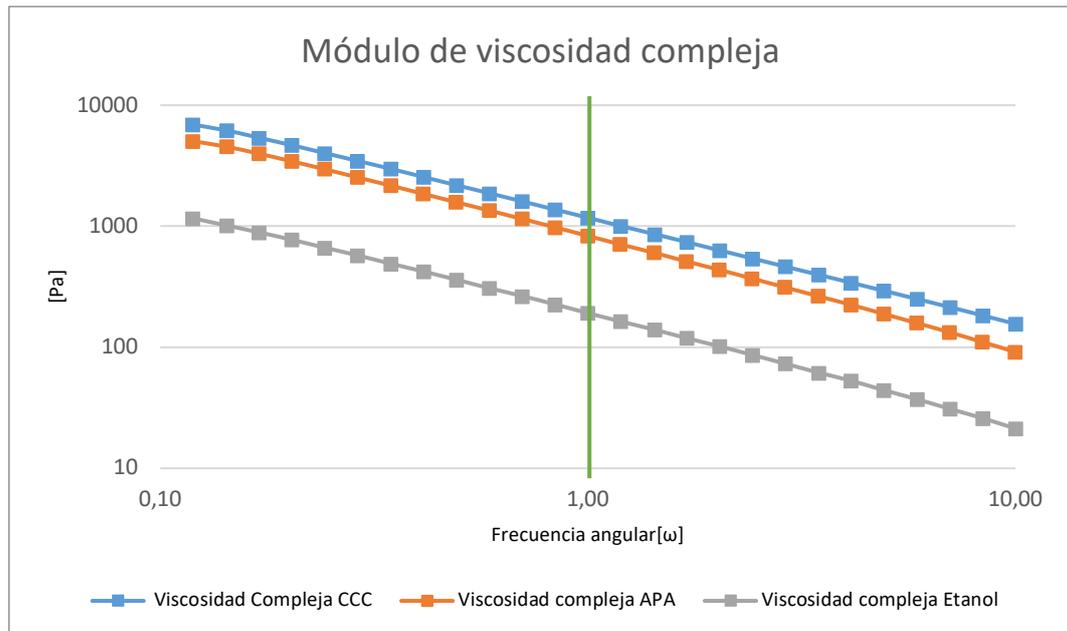


Figura 33: Gráfico de viscosidad compleja para el tejido control(azul), dMEC desinfectada con APA(naranja), y dMEC desinfectada con Etanol(gris).

Un ANOVA de una vía de los estudios cuantitativos del módulo elástico a 1 Hz reveló un efecto significativo de la capacidad de almacenamiento en las muestras de tejidos tratados ( $F(2, 6) = 8.001$   $p < 0,05$ ). El análisis de Bonferroni mostró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre el control y las muestras desinfectadas con etanol al 70%. No se observaron diferencias significativas entre el control descelularizado y las muestras desinfectadas con ácido peracético 0,2% (Figura 34.)

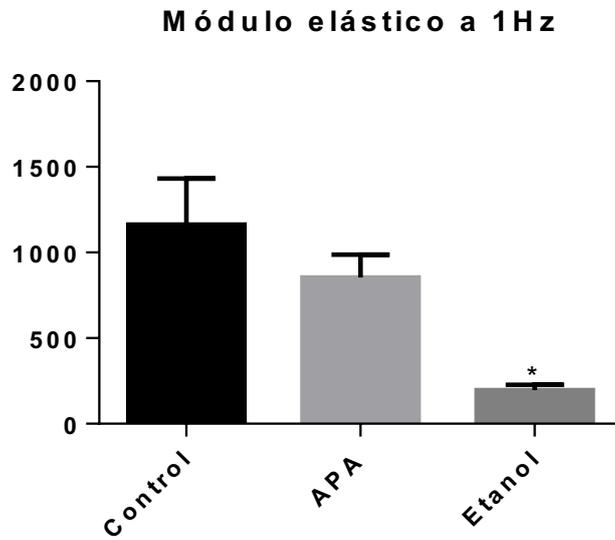


Figura 34: Módulo elástico a 1 Hz para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética  $\pm$  ESM. \*significativamente diferente del tejido control,  $p < 0,005$

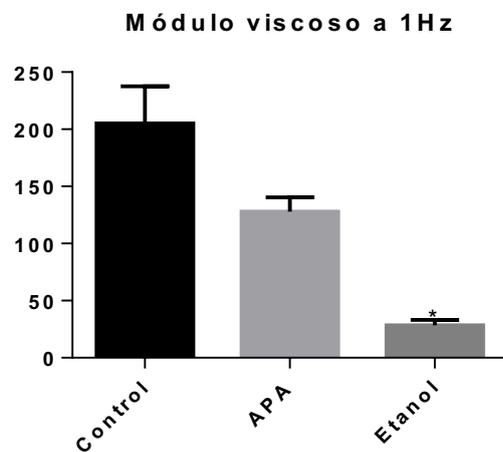


Figura 35: Módulo viscoso a 1 Hz para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética  $\pm$  ESM. \*significativamente diferente del tejido control,  $p < 0,005$

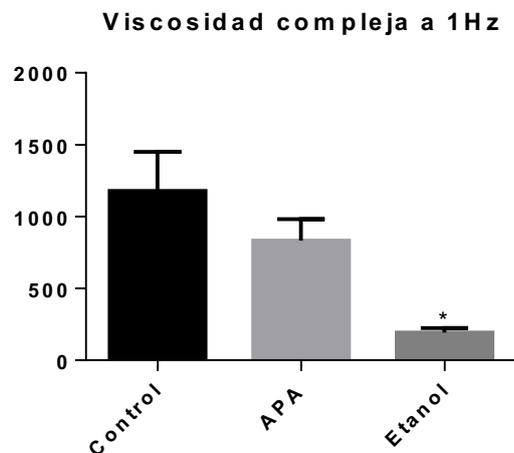


Figura 36: Viscosidad compleja a 1Hz para tejido control, tejido descelularizado, dMEC desinfectada con Etanol y dMEC desinfectada con APA. Barras representan media aritmética  $\pm$  ESM. \*significativamente diferente del tejido control,  $p < 0,005$

Los resultados obtenidos a partir del ANOVA de una vía de los estudios reométricos muestran que las matrices descelularizadas y desinfectadas posteriormente con ácido peracético al 0,2% tienen valores similares al control ( $F(2, 6) = 2,014$ ,  $p > 0,05$ ) que sugiere un comportamiento elástico similar a aquellas matrices que no fueron descelularizadas. El test de comparaciones múltiples *a posteriori* de Bonferroni no mostró diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento de ácido peracético  $128 \pm 21.60$  Pa/ω ( $p > 0,05$ ) con el control  $205 \pm 56.51$  Pa/ω. En concordancia con los resultados de que el módulo viscoso a 1Hz no presenta diferencias estadísticas entre el tratamiento de ácido peracético al 0,2% y el control (Figura 35), una ANOVA de una vía reveló que el efecto sobre el comportamiento en la viscosidad compleja indica que las matrices descelularizadas y desinfectadas con ácido peracético al 0,2% pertenecen al mismo conjunto de las matrices controles ( $F(2, 6) = 7,753$ ,  $p = 0,0217$ ). El test *a posteriori* de Bonferroni no mostró diferencias significativas sobre la viscosidad compleja entre las matrices desinfectadas con APA al 0,2% ( $833 \pm 148,2$  Pa/ω,  $p > 0,05$ ) con las matrices controles ( $1178 \pm 271,8$  Pa/ω) (Figura 36.)

La caracterización química de los andamios se realizó mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Los espectros infrarrojos de las muestras fueron obtenidos utilizando la técnica de reflectancia difusa. Los espectros de las muestras de las membranas descelularizadas sin desinfectar y desinfectadas con APA fueron graficados como porcentaje de transmitancia entre número de onda comprendida entre  $800$  y  $1800$   $\text{cm}^{-1}$  (Figura 37). Se muestran las bandas observadas como así también su intensidad en la zona de mayores diferencias entre los espectros.



Se observa una banda de absorción a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y otra a  $1550\text{ cm}^{-1}$ , las cuales están relacionadas con los grupos funcionales de proteínas, amida I y amida II, respectivamente. Posteriormente, el intervalo espectral entre  $1300\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$  está relacionado con la vibración del grupo funcional amida III del colágeno. La banda de absorción entre  $1180\text{-}1140\text{ cm}^{-1}$ , estaría relacionada con las vibraciones de extensión C-O de los residuos de carbohidratos correspondientes a glicosaminoglicanos. Después del tratamiento con APA 0,2% puede observarse una disminución en la absorbancia de todas las bandas que podría estar indicando un grado de entrecruzamiento o desnaturalización debido al efecto oxidativo del agente desinfectante utilizado. El tratamiento resultó en cambios distintos en la región espectral alrededor de  $1680\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$  que contiene las bandas de absorbancia de amida I. Esto sugiere que la oxidación provocaría cambios estructurales de la proteína afectando principalmente al esqueleto de la triple hélice del colágeno, mientras que podrían estar conservándose las estructuras  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegamiento.

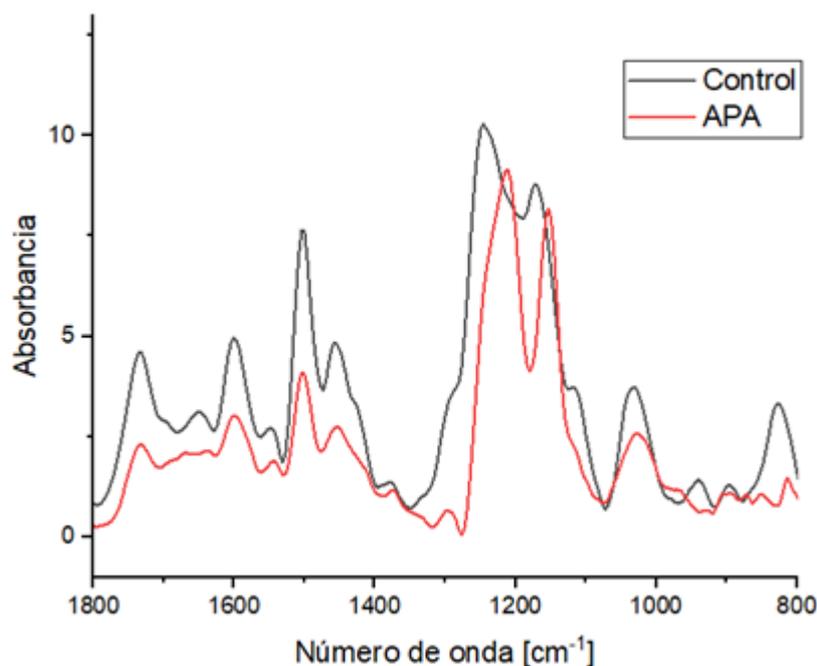


Figura 37: Espectros FTIR para MEC desinfectada con APA al 0.2%(rojo) y el control(gris)



## Discusión y Conclusión

La descelularización, como describimos anteriormente, es una metodología desarrollada para la obtención de la matriz extracelular como andamio natural para la repoblación de células con objetivo final de la eliminación celular completa sin afectar negativamente la composición, la actividad biológica o la integridad mecánica del resto de la matriz tridimensional [36]. Las técnicas y los tiempos descritos en la literatura son amplios y la optimización de una metodología simple y en tiempos cortos se constituyó en nuestro objetivo principal. Entre todos los métodos de descelularización descritos en la literatura, decidimos incluir una combinación de técnicas con agentes físicos como congelación y descongelación, agitación mecánica para romper las membranas celulares, y la perfusión de agentes químicos mediante detergentes para liberar el contenido de las células y facilitar el enjuague y la eliminación de restos celulares desde la MEC. En este trabajo, se alcanzó la eliminación completa del componente celular de corazón completo de conejo (Figura 13 A-C) con el uso combinado de congelamiento durante 24 h a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posterior descongelamiento a temperatura ambiente. La estructura interna se mantuvo intacta para facilitar la perfusión con el detergente SDS a 1%. Ha sido descrito que la preparación de una MEC 3D de órgano completo requiere varios pasos de procesamiento, cada uno de los cuales puede afectar notablemente la estructura y composición del andamio resultante. Así, el proceso de eliminar todas las células del órgano conservando la composición nativa y la estructura es fundamental para la reconstrucción final de órganos. La observación macroscópica resultó sustancial en la valoración de la eficacia del protocolo desarrollado. La coloración translúcida que adquirió el corazón posterior al tratamiento de descelularización (Figura 13 C) estuvo de acuerdo con trabajos previos de autores que investigaron con un órgano similar [11], [29], [37].

Las combinaciones de diversas técnicas para la descelularización se utilizan típicamente para maximizar la eficiencia del proceso para cada tejido y órgano. El corazón es una estructura con parénquima grueso en los ventrículos y con dos circulaciones independientes izquierda y derecha para la perfusión vascular. Nuestro protocolo consistió, además del procedimiento físico, la inclusión de perfusión retrógrada con SDS 1% y posteriores lavados sucesivos con PBS para arrastrar los restos celulares. La aplicación de esta metodología está de acuerdo con trabajos reportados por diferentes autores que trabajaron con corazón completo [54], [89]. Aunque la optimización en la combinación de técnicas difiere entre los autores, nuestro protocolo demostró por primera vez que el uso de una combinación de métodos físicos y químicos en un corazón de conejo fueron eficaces para eliminar completamente los componentes celulares sin modificar la microestructura del andamio descelularizado cuyo aspecto macroscópico fue similar al corazón con una apariencia blanca translúcida en toda su conformación (Figura 13) [90]. Asimismo, con motivo de preservar la matriz nativa trabajamos a flujo de perfusión constante y



presiones fisiológicas bajas ya que la resistencia vascular cambia durante el proceso de descelularización. La misma tendió a ser mayor al comienzo de la perfusión debido al mayor contenido celular del órgano y mayor viscosidad del detergente, pero fue disminuyendo gradualmente a medida que el contenido celular fue eliminándose. Por el contrario, el flujo a través de la vasculatura nativa fue menor al comienzo de la descelularización de la perfusión y aumentó paulatinamente a medida que se eliminaron las células y los conductos vasculares estuvieron menos obstruidos. Sobre la base de estas observaciones, sospechamos que el flujo persistente, especialmente al comienzo de la descelularización podría dañar la membrana basal de la vasculatura nativa debido a la aplicación directa de fuerza mecánica. Sobre la base de estudios previos de nuestro grupo [91], se optó por un flujo de perfusión suave que aumentó la distribución y exposición de todo el tejido para lograr una descelularización completa, que resulta especialmente ventajoso en órganos muy vascularizados, como el corazón, donde una alta densidad vascular está de acuerdo a una densa celularidad y para limitar las posibilidades de daño de la MEC debido a fuerzas mecánicas excesivas mientras se maximiza la entrega de agentes descelularizantes y facilita la eliminación de los desechos celulares.

La evaluación histológica con hematoxilina/eosina mostraron en la Figura 15 que las secciones de tejido cardíaco posterior a la descelularización (paneles D-F) sin contenido celular ni núcleos presentes en la dMEC respecto a las secciones sin descelularizar (Paneles A-C) que sugiere que la exposición de las células del parénquima cardíaco al SDS fueron removida de la vasculatura nativa en el tiempo empleado. En el tejido control pueden observarse claramente las estructuras citoplasmáticas coloreadas con eosina además de los núcleos basófilos de los cardiomiocitos. La tinción tricrómica de Masson confirmó la conservación del tejido conectivo en la muestra proveniente de tejido descelularizado (Figura 16 D-F) respecto de las muestras de músculo cardíaco control (Figura 16 A-C) con una distribución, organización y orientación de las fibras de colágeno de la MEC similar a las del miocardio control. La prevalencia del color azul en los cortes histológicos de tejido acelular (Fig. 28 D-F) confirman, además, la presencia de las fibras de colágeno y elastina sin la presencia de citosol y núcleos celulares. Estos resultados son similares a los presentados para corazón de ratas y humanos descelularizados con una preservación completa de estas fibras [29], [92], [93]. La microscopia electrónica de barrido corrobora las observaciones de la histología tradicional mostrando las fibras intactas luego del protocolo de descelularización empleado (Figura 17 C-D). Además, el mayor aumento permitió verificar la adecuada conservación de la arquitectura microscópica de la MEC con la distribución, orientación, dimensión y grado de agregación de la organización tridimensional de la ultraestructura de las fibras reticulares posterior al proceso de descelularización tanto físico como químico. Resultados similares reportados por otros autores permitieron verificar la retención de



tejidos característicos como fibras epicárdicas densas y espirales, entre otras, en la MEC cardíaca luego de la descelularización [29], [94].

Este resultado es fundamental para poder proyectar una exitosa recelularización, guiada por la capacidad del andamio para promover la remodelación constructiva a través de la serie de eventos biológicos que ocurren durante este proceso, como la liberación de péptidos bioactivos de las moléculas originales de la MEC, promover la angiogénesis después de la implantación y responder al microambiente mecánico donde será inserto. Ozlu y cols (2019), demostraron que la alineación y el diámetro de las fibras proporcionan información valiosa para evaluar la preservación estructural del corazón descelularizado [93], además otros autores resaltan la importancia de esta capacidad de la MEC como también para degradarse rápida y completamente aumentando las propiedades bioinductivas funcionales propias de la MEC nativa [36], [95].

El material celular residual dentro de la MEC puede contribuir a problemas de citocompatibilidad e incluso generar respuestas adversas del huésped tras la repoblación celular. Aunque las técnicas de descelularización no pueden eliminar el 100% del material celular, la bibliografía reporta que la cantidad de ADN remanente no puede exceder los 50 ng/gr de tejido seco [81], [96]. La Figura 18 muestra que el contenido de ADN residual de la MEC luego de la descelularización fue de  $7,68 \pm 0,42$  ng de ADN/gr de tejido seco indicando que el proceso de lavado exhaustivo y los procedimientos físicos empleados lograron remover la mayor parte del contenido celular. Estos resultados corroborarían la falta de presencia nuclear observada histológicamente por las diferentes microscopías ópticas (Figura 15 Figura 16 Figura 22 y Figura 23) y electrónicas de barrido (Figura 17 y Figura 24). La eliminación del detergente también marca un punto importante para la resiembra posterior de la MEC, la presencia de SDS residual no posibilitaría la existencia de un andamio biocompatible, es decir, que el ingreso de nuevas estirpes celulares en la etapa de recelularización podría presentar algún tipo reacción de histocompatibilidad negativa en el huésped. Por lo que, en primera instancia, evaluamos el contenido de SDS luego de los lavados de la MEC, antes de su desinfección final. La Fig. 29 muestra que el contenido de SDS residual en la MEC fue de  $0,009 \pm 0,001$  % P/V, comparado con la concentración inicial de lavado (1% P/V). En segundo lugar, nos propusimos examinar la citobiocompatibilidad de la MEC, es decir, que la matriz cardíaca descelularizada no presentaba citotoxicidad. Los resultados observados en la Fig. 30 demuestran que la MEC no presenta citotoxicidad bajo las condiciones ensayadas de acuerdo a lo recomendado por la Norma 10993-5 [84] donde la viabilidad celular fue superior al 70 %. Los valores de viabilidad celular encontrados no presentaron diferencias significativas con el control negativo por lo que la MEC obtenida podría ser utilizada como andamio para un proceso de recelularización posterior. Los resultados microscópicos Figura 22, Figura 23, Figura 24 y el contenido de ADN remanente (Figura 25) de los parches de ventrículo cardíaco fueron similares a los reportados para el



órgano completo evidenciando una completa descelularización, la que puede observarse macroscópicamente en la Figura 21 con la decoloración total de cada parche luego del protocolo empleado. Por lo tanto, mediante el uso de la descelularización por perfusión más la combinación de agentes físicos previos, obtuvimos un andamio de MEC cardiaco con una microarquitectura conservada, libre de restos celulares, con un árbol vascular conservado y biocompatible.

El paso final de la descelularización consiste en la desinfección del tejido acelular, paso esencial cuya acción podría ejercer cambios físicos y químicos en la integridad mecánica de las matrices debido a su potencial mecanismo de acción agresivo desfavoreciendo la adhesión celular posterior. Por esta razón, para la caracterización mecánica, química e histológica optamos por 2 tipos de desinfección final de los parches de MEC cardiacas. La desinfección con etanol 70% y el enjuague final con APA 0,2%, es la metodología más utilizada en los laboratorios de preparación de tejidos cardíacos acelulares provenientes de válvulas [97], vasos sanguíneos [98] y pericardio [99]. Ambos tratamientos no evidenciaron cambios en la microestructura de la MEC (Figura 22 y Figura 23), tampoco se observaron cambios morfológicos, de orientación y tamaño en las fibras reticulares luego del proceso de descelularización y desinfección con etanol o APA con respecto de los controles no descelularizados (Figura 24), que marcaría que ambos métodos de desinfección no alterarían la microarquitectura y composición de las matrices. De acuerdo con esto, Fidalgo y cols (2018) encontró que los andamios asépticos luego de la desinfección con APA mantenían la integridad estructural y biocompatibilidad del tejido. También, Huang y cols (2004) usando el mismo agente desinfectante en tejido dérmico, no observaron la presencia de componentes ni restos celulares así también como verificaron la correcta integración de su ultraestructura. Los ensayos bioquímicos van en la misma línea que los histológicos, APA y etanol 70 % no afectaron la cantidad de ADN remanente luego del proceso de descelularización, con valores finales de  $8,874 \pm 0,184$  y de  $5,150 \pm 0,259$  ng de ADN/gr de tejido seco, respectivamente (Figura 25). Las Figura 26 y Figura 27 muestran muy buena viabilidad celular de las MEC posterior a la desinfección con etanol 70% y con ácido peracético (APA) 0,2% evidenciado por la falta de citotoxicidad en ambos ensayos de biocompatibilidad de la Norma 10993-5 [84], las cuales en ambos tratamientos fueron superior al 70% recomendado.

En las pruebas mecánicas de tracción mediante la aplicación de una fuerza uniaxial, las matrices controles (no descelularizadas) y aquellas descelularizadas sin desinfectar mostraron un comportamiento similar según se observa en las curvas de tensión-deformación (Figura 28). Sin embargo, las MEC desinfectadas, tanto con etanol como con ácido peracético, mostraron un comportamiento diferente. Las MEC que fueron desinfectadas con ácido peracético exhibieron una resistencia mayor a la tracción ejercida comparada con las membranas sin desinfectar e incluso aquellas tratadas con etanol. Los valores del módulo de Young para los diferentes tratamientos (Figura 29) revelaron un comportamiento diferente en la elasticidad dependiendo del



método de desinfección empleado. El etanol ejerció una disminución significativa en las propiedades mecánicas respecto de las MEC sin desinfectar, mientras que el APA tuvo el valor mayor del módulo, indicando una mayor rigidez, la cual podría estar correspondiendo a cambios químicos del agente con la superficie de la membrana acelular. La Figura 30 nos muestra que desde el punto de vista reométrico la matriz se comporta como un sólido viscoelástico muy parecido a un gel-débil ya que los módulos viscosos y elásticos no se cruzan entre ellos, además este patrón nos indica que las matrices desinfectadas con ácido peracético es muy similar al tejido control sin descelularizar, esto le brinda una ventaja biomecánica ya que los módulos elástico (Figura 31) y viscoso (Figura 32) superiores a los obtenidos con la desinfección por etanol al 70% lo hace más adecuado para aplicaciones cardíacas[100]. Estos resultados son consistentes con lo reportado por el grupo de Trappmann y cols(2012), donde células madres sembradas en un sustrato de bajo módulo elástico no pudieron establecer una correcta adhesión al sustrato y lograron una pobre diferenciación, pero al usar un gel entrecruzado y con un módulo elástico mayor, se logró una mayor diferenciación celular[101].

El APA es muy usado como agente desinfectante químico en diversos tejidos como por ej. válvulas cardíacas [97] debido a su fuerza como agente oxidante y a su pH ácido que le otorga un gran poder bactericida, fungicida y de inactivador viral. Ha sido descrito que el uso de APA en la desinfección final de una MEC de vejiga urinaria modificó el módulo de elasticidad sin mostrar un efecto citotóxico e incluso permitiendo la proliferación celular posterior en cultivo [102]. De manera similar, Eras y cols (2021) demostró que meniscos tratados con APA como agente desinfectante final mostraron menor relajación y una mayor tensión en comparación con los meniscos no tratados, que podrían exhibir propiedades que influyan positivamente en la extrusión del menisco después del trasplante. Del mismo modo, el incremento en el módulo de elasticidad posterior a la desinfección con APA podría estar significando modificaciones en la química de superficie de los andamios, la cual podría resultar beneficioso para una futura repoblación celular. Un estado aséptico obtenido por esterilización y desinfección eficaces es la premisa para la utilización de la MEC [103].

La aplicación de la técnica FTIR permitió analizar la distribución de componentes biológicos, como el colágeno y los proteoglicanos, dentro de la microestructura de los bioandamios descelularizados. Los espectros infrarrojos mostraron un patrón semejante entre la matriz descelularizada y desinfectada con APA en comparación con el control descelularizado (Figura 37). Resultados similares, en MEC de corazón y aorta, fueron reportados con la presencia de bandas en áreas asociadas con proteínas estructurales como el colágeno y la elastina, sugiriendo que el proceso de descelularización mantuvo la integridad de la proteína [104]. Además, ha sido descrito que el APA usado como un agente desinfectante presenta un efecto mínimo sobre la composición y estructura de la MEC [96]. Se ha descrito que la fuerza ácida del APA produce una reducción de la fuerza de la MEC, al interactuar con



proteínas como el colágeno sin afectar a los glicosaminoglicanos [105]. Se ha reportado también que la exposición al estrés oxidativo provoca la reticulación de las fibras de colágeno y elastina en los tejidos de las válvulas cardíacas. Esto último daría como resultado la formación de una red de elastina más apretada y un tejido menos elástico [106]. El FTIR confirmó, además, que no se introdujeron otras entidades químicas en los andamios por acción de la desinfección final con APA. De acuerdo a esto, Fidalgo y cols (2018) utilizó APA para esterilizar pericardio porcino y bovino junto con antibióticos/antimicóticos obteniendo andamios que conservaban la integridad estructural y la biocompatibilidad del tejido. Se ha reportado que el APA junto al etanol es una opción para la desinfección y esterilización de órganos parenquimatosos delgados y pequeños y en órganos huecos, ya que se puede obtener una esterilización efectiva y en menos tiempo [107]. De esta forma, el protocolo desarrollado en este trabajo permitió obtener un bioandamio a partir de corazón descelularizado y desinfectado sin pérdidas considerables de matriz extracelular, microestructuralmente preservada, sin presencia celular y biocompatible.



## Capítulo II: Obtención y aislación de células madre mesenquimales de origen adiposo

### Materiales y métodos

#### Obtención de la grasa y aislación de células madre

Una muestra de aproximadamente 6 ml de tejido adiposo pericárdico se obtuvo durante la cardiectomía, se colocó en un tubo con 20 ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) y se conservó a 4°C. Posteriormente, se procedió al lavado del tejido dos veces con DMEM y se centrifugó a 100 x g durante 10 min, descartando el sobrenadante y reemplazando el medio de cultivo en cada uno de los lavados. A continuación, se disgregó mecánicamente y luego enzimáticamente con colagenasa tipo I (SIGMA) a una concentración de 1 mg/ml en medio DMEM estéril, durante 45 min a 37°C, con una agitación suave y continua. Se centrifugó a 100 x g durante 15 min, se recogió el pellet con la SVF (fracción estroma-vascular). Este pellet fue filtrado a través de una malla de nylon de 50 µm. Se centrifugó nuevamente a 100 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se lavó tres veces y se resuspendió en medio DMEM-Hepes (10 mM) suplementado con 10% de SFB (Suero Fetal Bovino, Internegocios), 1% de glutamina (Sigma) y 1% gentamicina (Ritcher) [59]. Se tomó una muestra de 30 µl del SVF resuspendido en medio completo y se evaluó la viabilidad por medio de una evaluación de tinción vital (Trypan Blue). Posteriormente, se sembró e incubó a 37°C, bajo una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Se mantuvieron en el mismo medio, renovando cada 48 h, hasta llegar a un 90 % de confluencia para su pasaje aproximadamente en el día 5.

#### Diferenciación cardíaca

En una placa de Petri de 35 mm se sembraron  $8 \times 10^5$  células y se mantuvieron por 24 h. El día siguiente se removió el medio de cultivo y se agregó 1,5 ml de medio de diferenciación (medio completo de cultivo + 5-azacitidina 10 µM (Sigma)) y se incubó durante 24h. Luego se removió el medio de diferenciación, se adicionó 1,5 ml de medio completo y se continuó como un cultivo normal durante 15 días [108].

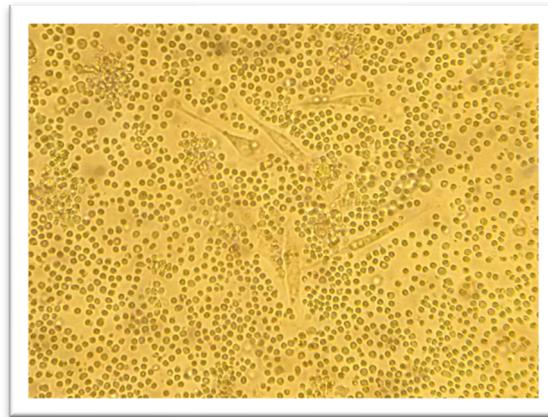
#### Concentración de Troponina T

Para determinar la concentración de Troponina T cardíaca se recuperó el sobrenadante del medio celular residual de la placa de cultivo y se procedió a recolectar las células por medio de una solución de Tripsina/EDTA durante 5 min a 37°C. Posteriormente, se agregó a la placa 1 ml de medio celular completo, se centrifugó a 100 x g por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue homogeneizado en 1 ml de DMEM y nuevamente centrifugado a 4°C durante 10 min a 10000 x g en una ultracentrífuga refrigerada (Jouan). Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó en un sistema cobas e 601.



## Resultados

De acuerdo con el protocolo descrito en materiales y métodos, la Fracción de Estroma Vascular (FEV) obtenida a partir de tejido adiposo pericárdico de conejo, se sembró en una placa de Petri P-35 con medio de cultivo completo. La Figura 38 muestra una imagen heterogénea del cultivo primario con la presencia de linfocitos, eritrocitos y de células alargadas con fenotipo de fibroblastos adheridas a la placa, a las 5 h de cultivo. Sin embargo, el cambio del medio permitió 48 h después (Figura 39), remover los eritrocitos de la placa de Petri facilitando la identificación de las células fusiformes a lo largo del todo el campo. Así también como su proliferación.

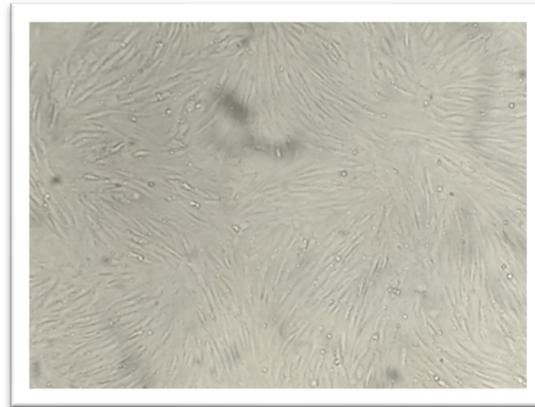


*Figura 38: Observación por microscópio óptico invertido a 10X a las 5 h de terminado el protocolo de aislación de ASC.*

Al cabo de 120 h de incubación en medio suplementado, se observa el crecimiento de las células fusiformes con una distribución radial, característica propia de células formadoras de colonias con una adherencia propia al sustrato característica principal de las células madre (Figura 39).



*Figura 39: Observación por microscopio óptico invertido a 10X a las 48h de aislación del tejido adiposo.*



*Figura 40: Observación por microscopio óptico invertido a 10X a las 120h de aislación del tejido adiposo*

La expresión fenotípica de marcadores de superficie no se pudo realizar debido a que estas células tienen como origen animal el conejo, y los anticuerpos de los marcadores de superficie se obtienen por medio de conejos, por lo tanto, no tienen reactividad sobre esta especie. y los marcadores propios de conejos excedían nuestro presupuesto.

#### Diferenciación cardíaca y cuantificación de troponina

Al final del protocolo de diferenciación se observaron cambios morfológicos, en comparación con el control, de las células tratadas con medio de cultivo complementado con 5-azaticidina 10mM, que se pueden contrastar con la figura siguiente en donde se puede observar las diferencias entre el día de inicio y de finalización del protocolo.

Cualitativamente se observa que aquellas células que fueron expuestas a un medio de cultivo con 5-azaticidina tienden a ser más alargadas y alineadas. Además de que forman una colonia orientada en un solo sentido (Figura 41).



Desarrollo de un corazón bioartificial a partir  
de recelularización con células madre de origen adiposo

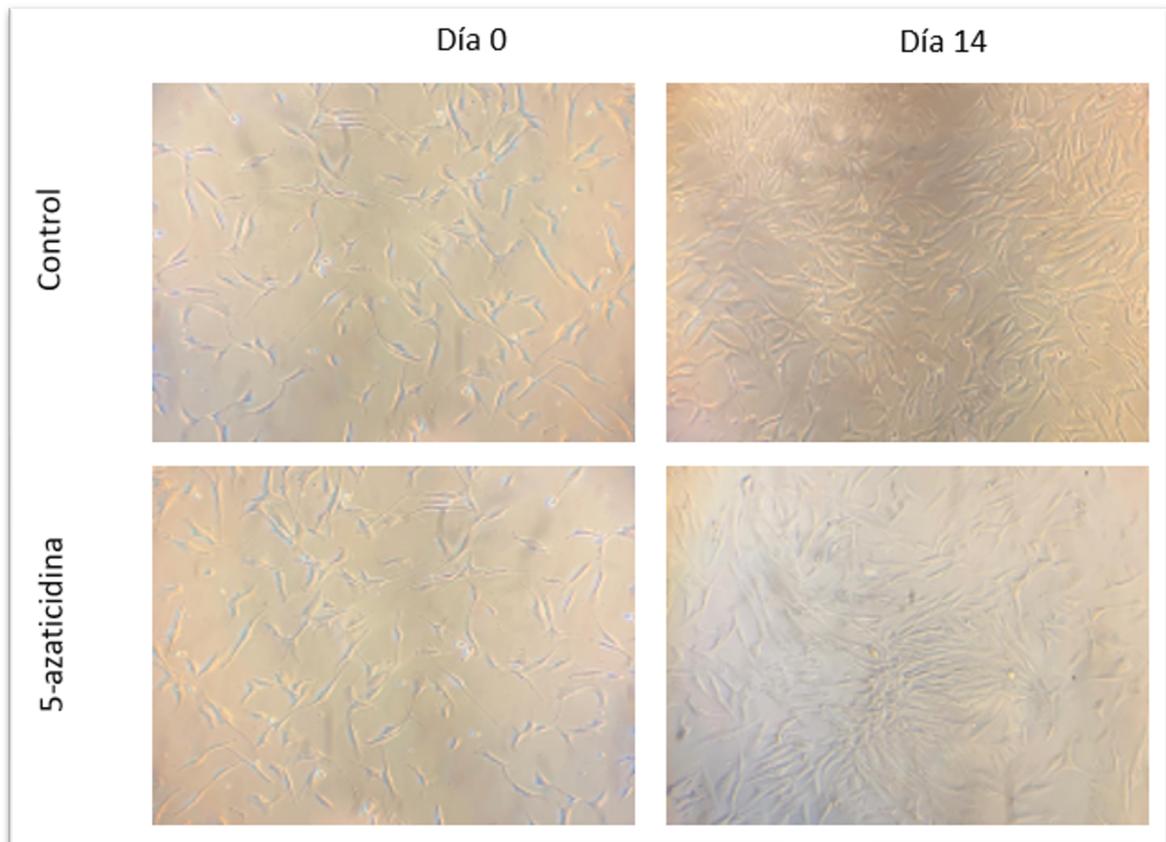


Figura 41: Microscopía óptica a 10X de control en día 0, y 14 y de cultivo suplementado con 5-azaticidina día 0 y 14

Cuantitativamente se realizaron cuantificaciones de Troponina T cardíaca, proteína propia de las células de cardiomiocitos, la cual nos permitió observar un aumento de la concentración de esta a medida que pasaban las semanas. Se realizó una ANOVA de una vía con un test de Bonferroni *a posteriori*, para evaluar si existe diferencia estadística significativa.

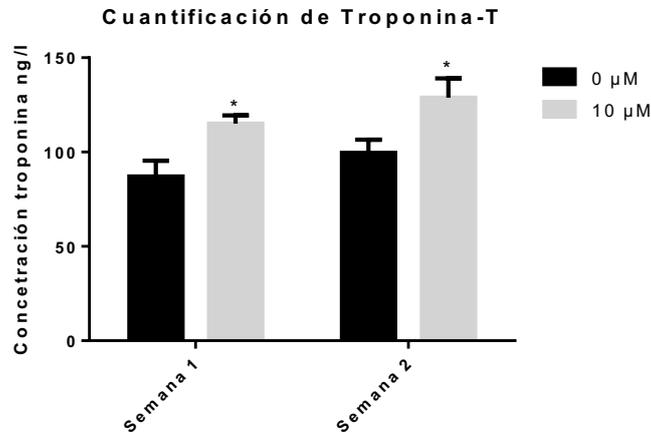


Figura 42: Concentración de Troponina a 1 y 2 semanas posteriores al inicio del tratamiento con 5-azaticidina al 10mM. Barras representan media aritmética +- ESM. n= 3 \*significativamente diferente del control,  $p < 0,005$

Un ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo en el tratamiento del suplemento de medio de cultivo 5-azaticidina como agente inductor de diferenciación cardíaca ( $F(1, 8) = 13,40$ ,  $p < 0,0064$ ). La Figura 42 nos permite observar que no existen diferencias significativas en la variable tiempo ( $F(1, 8) = 2,85$ ,  $p = 0,13$ ) ni en la interacción tiempo vs tratamiento ( $F(1, 8) = 0,0006$ ,  $p = 0,94$ ). El test *a posteriori* de Bonferroni mostró que la 5-Aza al 10% indujo un incremento significativo en la producción de Troponina T Cardíaca en ambas semanas.

### Discusión y Conclusión

Una vez obtenido el andamio, nos encaminamos a lograr su repoblación con células madre mesenquimales de origen adiposo. Badylak y cols, (2011) sostiene que las células y la MEC tienen una relación intrínsecamente cercana y dependiente. Por lo tanto, el tipo y la fuente de las células utilizadas para repoblar una MEC tridimensional son fundamentales para la eventual funcionalidad y el éxito clínico. De acuerdo con esto, las estirpes celulares necesarias para recolonizar un corazón son de varios tipos dependiendo del tejido diferenciado y su función dentro del órgano. En primer lugar, fue la elección de tipo de células madre del cual partíamos para diferenciarlas en cardiomiocitos. La opción estuvo orientada hacia células mesenquimales de tejido adiposo adulto autólogas, por su rápida recolección a partir del tejido adiposo circundante al corazón que pueden aislarse y expandirse fácilmente, de elevada



disponibilidad, multipotentes y con baja respuesta inmunológica [109] y pueden ser utilizadas para la organogénesis in vitro [110].

Las Figura 38, Figura 39, Figura 40 muestran diferentes etapas del proceso de proliferación de las células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo pericárdico. De acuerdo con el protocolo empleado, observamos que después de 5 horas del inicio de la incubación, las células sembradas se adhirieron a la placa, llegando a la confluencia al quinto día y formando colonias de características fenotípicas de células madre mesenquimales. Resultados similares en la aislación e identificación de células madre estromales fueron hallados por otros grupos [111], [112]. Una vez identificadas morfológicamente las células madre provenientes de tejido adiposo pericárdico, las mismas fueron suplementadas para su diferenciación in vitro a cardiomiocitos. Varios autores demostraron que las células del estroma del tejido adiposo pueden diferenciarse espontáneamente en cardiomiocitos después de varios días medidos por la actividad contráctil y estructuras similares a miotubos utilizando extractos de cardiomiocitos de rata [113] o distintos tipos de suplementación exógena. La 5-azacitidina es un agente de metilación del ADN que es un importante mecanismo epigenético, que está involucrado no solo en la expresión y silenciamiento génicos endógeno sino es importante para mantener la pluripotencialidad y autorrenovación de las células madre. Rangappay cols., (2003) describieron que células madre mesenquimales del tejido adiposo de conejos tratadas con 5-azacitidina se pueden diferenciar en cardiomiocitos y comenzar a latir espontáneamente a las 3 semanas. Nosotros observamos que la suplementación con 5-aza indujo un incremento significativo de la secreción de troponina-T en el cultivo celular a los 7 y 14 días indicando una cardiomiogénesis positiva. Otros autores observaron un fenotipo cardiomiocítico similar medidos a través de la expresión génica de marcadores miogénicos específicos [114], [115].



## Capítulo III: Desarrollo de un biorreactor con estimulación mecánica

### Materiales y métodos

#### Especificaciones del biorreactor

##### *Magnitud, frecuencia y modo de estiramiento*

Se determinó el uso de estimulación mecánica de tipo estiramiento uniaxial, en cuanto a la magnitud del estiramiento se fijó un rango desde el 1 al 12% de estiramiento con un paso de 0,5%. Se optó por usar una frecuencia de 1 Hz, equivalente a 60 latidos en 60 segundos correspondiente a la frecuencia cardíaca mínima sinusal. Debido a que se estimularán células cardíacas se fijó una frecuencia de trabajo del biorreactor en un rango entre 0,1 y 2 Hz. Respecto del modo de estiramiento, se usó un tipo de onda muy similar a una onda cuadrada. Por lo tanto, se programó el biorreactor, desde la respuesta a una rampa inicial lo más rápida posible, una fase de estiramiento y una rampa de relajación.

Se trabajó en un diseño de biorreactor que deba estimular células alojadas en cámaras de cultivo en forma de pocillos anexas al equipo y dentro de una incubadora para brindar las condiciones normales de cultivo *in vitro*. Además, que cuente con la posibilidad de realizar por triplicado la estimulación, posea un funcionamiento automático y de programación inalámbrica de las rutinas de estiramiento.

#### Sistema de actuación

Se eligió trabajar con el motor paso a paso (PaP) JK42HS34-0404 para inducir movimiento giratorio en un husillo trapecoidal ACME de 8 mm de diámetro; se optó por un husillo de estas características por el buen balance entre avance rápido, precisión y torque que ofrece. Una tuerca trapecoidal con paso de 2 mm y 4 entradas se fijó en la pieza móvil para transformar el movimiento giratorio en un desplazamiento longitudinal, provocando así el estiramiento de los pocillos. La junta entre el motor paso a paso y el husillo se realizó con un acoplamiento flexible de 8 x 5 mm.

La deformación de los pocillos se logró con el motor paso a paso unido a un sistema tuerca-husillo, encargado de desplazar una pieza móvil ligada a un extremo de las cámaras de estiramiento, produciendo así su deformación. El extremo opuesto de las cámaras de estiramiento se atornilló en una pieza fija, donde además se empotraron sensores de posición, de temperatura y humedad.



## Control electrónico

### Ajuste de la corriente de salida del Driver

El control de la corriente entregada al motor paso a paso se realizó con el *driver* A4988 de Stepsticks. Previo a la conexión del motor, se ajustó la corriente de salida del *driver*, para evitar que el motor pierda pasos o se queme por exceso de corriente. Para ello, se midió la diferencia de potencial entre el potenciómetro de ajuste y el pin de tierra (GND) del chip, obteniendo así el valor del potencial de referencia ( $V_{ref}$ ). La corriente por fase del motor se calculó a partir de  $V_{ref}$  y la resistencia de sensibilidad ( $R_s$ ), como se indica en la Ecuación 1.

$$I_f = \frac{V_{ref}}{8 \times R_s}$$

*Ecuación 1: corriente por fase ( $I_f$ ) de salida del driver a4988, donde  $V_{ref}$  = Voltaje de referencia,  $R_s$ =Resistencia de sensibilidad.*

El *driver* A4988 de Stepsticks tiene un  $R_s$  de 0,2  $\Omega$ , y la corriente máxima por fase del motor paso a paso seleccionado es 0,4 A. Se decidió trabajar con pasos completos, con el propósito de que el motor genere el máximo torque durante los ciclos de estiramiento, y para disminuir la pendiente del estiramiento hasta alcanzar el valor final de retención. Por ello, se limitó la tensión al 70%, que es lo máximo que entrega el *driver* en modo pasos completos.

$$V_{ref} = \frac{0,4A}{8 \times 0,2\Omega} \times 0,7 = 0,175V$$

*Ecuación 2: cálculo del voltaje de referencia ( $V_{ref}$ ) para la limitación de corriente del driver en modo pasos completos.*

### Sensor de final de carrera

Se seleccionó un sensor de efecto Hall posicionado sobre la estructura fija del biorreactor para cumplir la función de sensor de final de carrera. El mismo actúa en conjunto con un imán de neodimio que se encuentra adherido en la ranura de parte móvil diseñada.

### Encoder

Con los motores paso a paso, contar los pasos del motor es relativamente sencillo, porque el microprocesador que genera los impulsos para mover el motor puede al mismo tiempo contarlos. Eso eliminaría la necesidad de instalar sensores de



posición; sin embargo, se decidió diseñar un *encoder* incremental, para aquellas circunstancias en las que el motor pierde pasos, es decir, que, por diversos motivos, generalmente mecánicos, no logra girar mientras que el sistema de control considera que el movimiento está ocurriendo. Esto produciría un estiramiento erróneo del pocillo, alterando las condiciones del protocolo definido para el experimento. Al trabajar con un elastómero cuya resistencia a la tracción es superior a la del PDMS, se introdujo una variable extra, ya que el motor paso a paso debió soportar una mayor tensión ejercida por el pocillo en sentido contrario.

Se diseñó un disco con zonas opacas y huecas alternadas y equidistantes, de diámetro interno igual al de la varilla roscada, es decir 8 mm (Figura 43). El mismo fue impreso 3D con filamento de ácido poliláctico y acoplado a un circuito óptico de lectura fijo, constituido por un emisor infrarrojo (IR) y un fototransistor. El disco detecta 40 posiciones en una vuelta de 360 grados de la varilla roscada, lo que equivale a 200 pasos dados por el motor paso a paso. Es decir que, por cada 5 pasos dados por el motor, el conteo del *encoder* se incrementa en una unidad. Se decidió esta resolución porque el mínimo porcentaje de estiramiento que puede ingresar el usuario del biorreactor es 1%, y se necesitan 5 pasos para generar ese estiramiento; el error en la posición detectado por el *encoder* es por lo tanto  $\pm 5$  pasos.

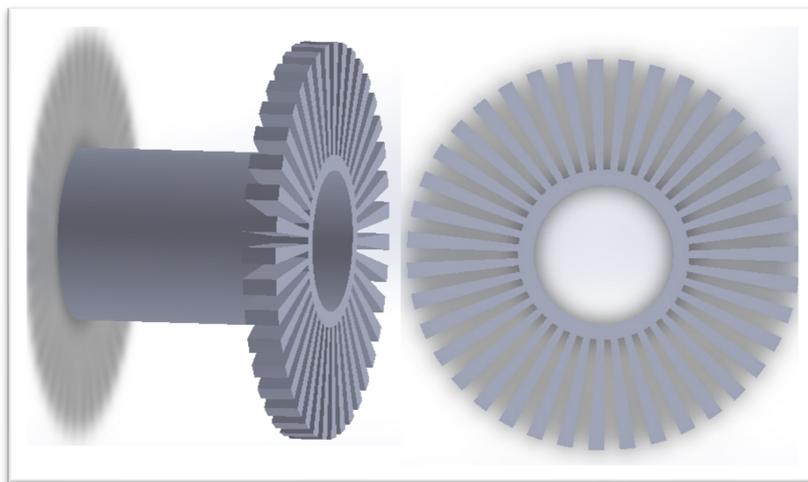


Figura 43: Impresión 3D de disco para el *encoder*.

#### Programación Arduino

Se utilizaron las dos interrupciones por *hardware* que admite la placa Arduino Uno, una para el *encoder* incremental (pin digital 2) y otra para el sensor de efecto Hall de final de carrera (pin digital 3). Para ambas se definió la condición de disparo y la función que se ejecuta cada vez que se dispara la interrupción (*callback function*). Esta

---



última debe ser lo más acotada posible para garantizar que no se pierda información de las demás interrupciones mientras el microcontrolador ejecuta las instrucciones contenidas dentro de la misma.

- *Encoder* incremental: la interrupción se dispara por flanco de subida y la función que se ejecuta luego consiste en el incremento de una variable que es proporcional a la cantidad de pasos dados por el motor.
- Sensor de efecto Hall: la interrupción se dispara por flanco de bajada y la función que se ejecuta levanta una bandera indicando la ocurrencia del evento que luego se interpreta en el programa principal.

Dentro de las especificaciones del biorreactor se encuentra la posibilidad de detener el estiramiento de manera de poder acceder a los pocillos para la realización de tareas rutinarias, como el cambio de medio de cultivo. Al no contar con más pines para interrupción externa, se optó por hacer *polling* al pulsador que se presiona para detener el estiramiento. Lo óptimo es consultar el estado del pin al finalizar un ciclo de estiramiento, para que los pocillos se encuentren ya en estado de reposo.

Otra clase de interrupciones utilizada fue la de *timer 1*, el cual se dispara cada 4,194 segundos. La función que se ejecuta a continuación consiste en el incremento de una variable que se interpreta luego en el programa principal. Cuando la variable es igual a 855, el tiempo transcurrido es 3590,064 segundos (aproximadamente una hora). En ese momento se realiza la lectura de temperatura y humedad en el recinto donde se encuentran las células con el sensor DHT22 y se envían los valores leídos por el puerto serie, para llevar a cabo un seguimiento de las condiciones físicas en las que se cultivan las células.

La lógica del programa simplificada se muestra en la Figura 44 y en el anexo I. El usuario del biorreactor debe ingresar el porcentaje de estiramiento deseado y la frecuencia, es decir, el número de ciclos de estiramiento y relajación por unidad de tiempo. Con estos valores se calcula la deformación del pocillo (Ecuación 4), la cantidad de pasos que debe dar el motor para alcanzar un valor en particular (Ecuación 5) y el tiempo de retención del estiramiento, que coincide con el de reposo (Ecuación 6).

$$\%_{estiramiento} = \frac{x_2 - x_1}{x_1} \times 100$$

*Ecuación 3: Estiramiento del pocillo.*



Desarrollo de un corazón bioartificial a partir  
de recelularización con células madre de origen adiposo

---

$$\text{deformación} = \frac{\% \text{estiramiento}}{100} \times 20 \text{ mm}$$

*Ecuación 4: Cálculo de la deformación del pocillo.*

$$\text{cantidad de pasos} = \text{deformación} \times \frac{200 \text{ pasos}}{8 \text{ mm}}$$

*Ecuación 5: Cálculo de la cantidad de pasos que debe dar el motor.*

$$\text{tiempo de retención} = \frac{\frac{1 \text{ ms}}{\text{frec}[\text{Hz}] \times 0,001 \text{ s}} - 4 \times 2 \text{ ms} \times \text{cantidad de pasos}}{2}$$

*Ecuación 6: Cálculo del tiempo de retención del estiramiento*

El microcontrolador verifica que la parte móvil del biorreactor se encuentre en la posición inicial, correspondiente al estado de reposo del pocillo, a través de la lectura del pin que recibe la señal proveniente del sensor de efecto Hall. En caso de no ser así, el microcontrolador envía las señales correspondientes a los pines *step* y *dir* del *driver* para que el motor gire en sentido horario hasta que se produzca el flanco de bajada en el pin digital 3 que desencadene la interrupción de final de carrera.



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

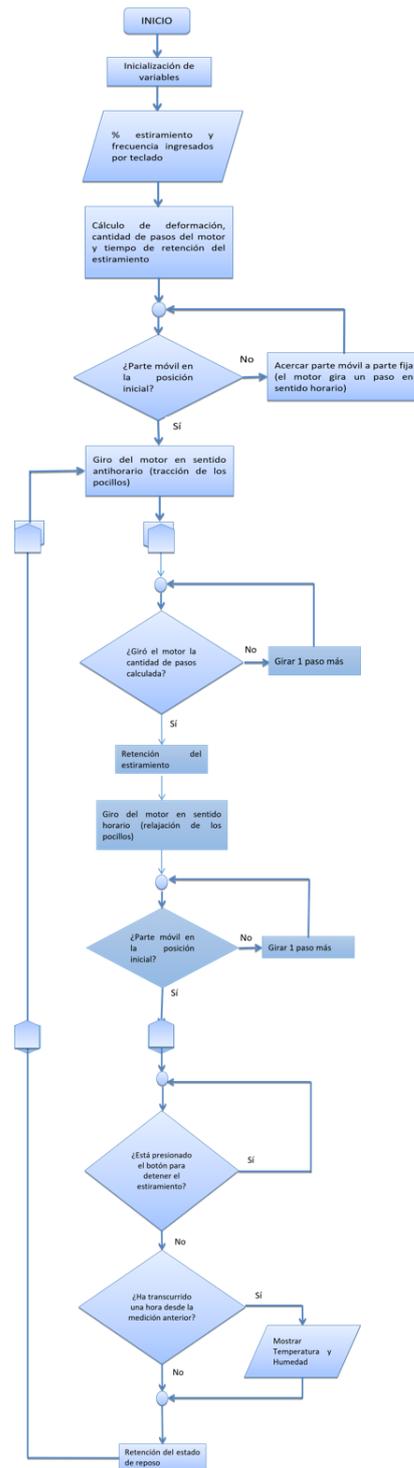


Figura 44: Lógica de programación del microcontrolador



Para proceder al estiramiento de los pocillos, el motor gira la cantidad de pasos calculada por la Ecuación 5, y se detiene una vez alcanzado el estiramiento adecuado. Para verificar que esos pasos fueron efectivamente dados por el motor, el sistema cuenta con un *encoder* incremental que gira solidariamente con la varilla roscada; si el motor ha perdido pasos por algún motivo, continúa girando en el mismo sentido hasta que se alcanza el estiramiento esperado. Posteriormente, el motor se detiene durante el tiempo de retención calculado; luego el *driver* le ordena un cambio en el sentido de giro, iniciando el acercamiento de la parte móvil a la parte fija del biorreactor hasta que se alcance la posición inicial. En ese instante se verifica que el sensor de efecto Hall haya desencadenado la interrupción indicando el estado de reposo; en caso contrario el motor continúa girando en el mismo sentido hasta que ese evento se produzca.

El programa continúa con la consulta (*polling*) del estado del pulsador para detener el estiramiento; en caso de que el mismo haya sido presionado durante el ciclo de estiramiento-relajación (se trata de un pulsador con retención), la estimulación mecánica se detiene. Una vez liberado el pulsador, se evalúa el valor de la variable que se incrementa con las interrupciones por *timer 1*, y se lee la temperatura y humedad del recinto donde se encuentran las células en caso de haber transcurrido una hora desde la medición anterior. El motor se detiene por el tiempo de retención calculado, completando así el ciclo de estimulación-relajación. Una vez transcurrido ese tiempo, se inicia un nuevo ciclo. Para modificar los parámetros de estiramiento, el sistema debe resetearse presionando un botón que conecta el pin de *Reset* de Arduino con el pin GND.

#### *Estructura del biorreactor*

Una vez definido el sistema de actuación y de control del movimiento, se procedió al diseño de la estructura del biorreactor utilizando un programa de diseño asistido por computadora (CAD, por sus siglas en inglés). Se obtuvieron dos piezas, una de ellas fija y la otra móvil, y se imprimieron usando una impresora 3D y ácido poliláctico (PLA). Sobre la pieza móvil se atornilló el extremo móvil la cámara de estiramiento, mientras que sobre la pieza fija se atornilló el extremo opuesto de la cámara. Para hacer posible la fijación de los tornillos, se realizaron seis orificios en cada una de las piezas, donde posteriormente se introdujeron las tuercas, como puede observarse en las Figura 45 y Figura 46.



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

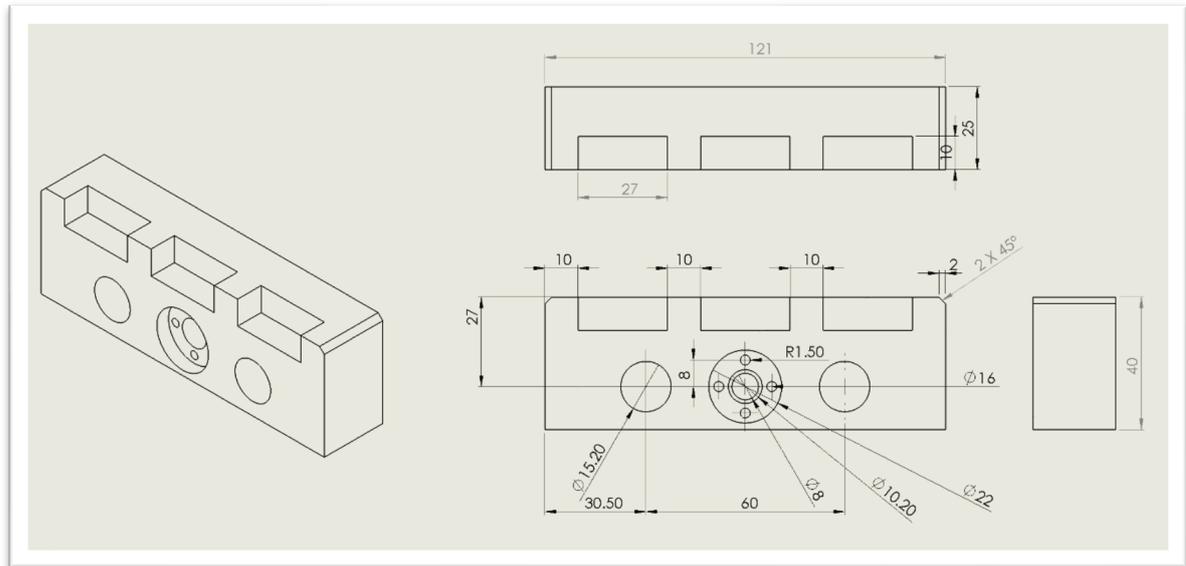


Figura 45: Parte móvil del biorreactor

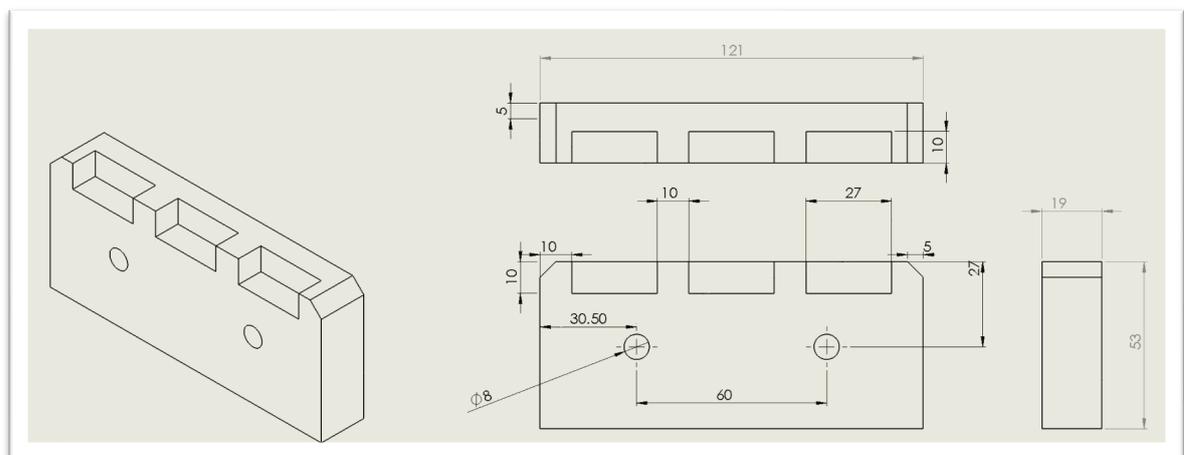


Figura 46: Parte fija del biorreactor

La pieza fija se diseñó además con orificios en las paredes laterales para la introducción del sensor de final de carrera y el de temperatura y humedad (Figura 47). Al trabajar con un sensor de efecto Hall, fue necesario realizar una ranura en la parte móvil del mismo lado y a la misma altura del extremo superior del orificio de la parte fija, para posteriormente colocar el imán en el punto adecuado (Figura 48).



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

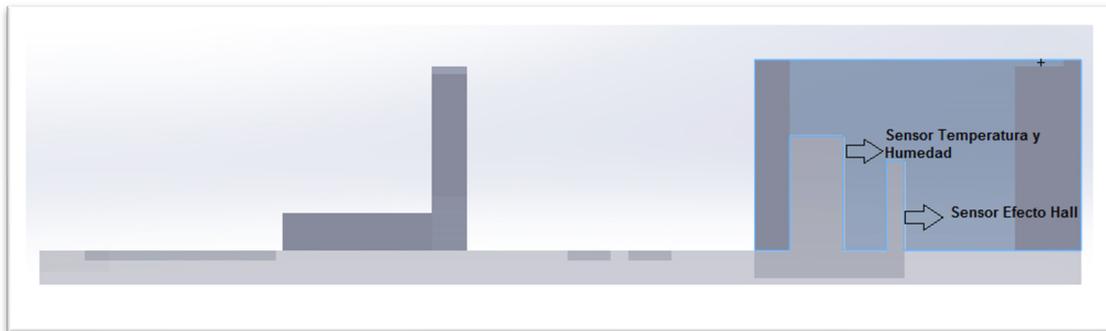


Figura 47: Orificios para los sensores de temperatura y humedad y de final de carrera (Hall).

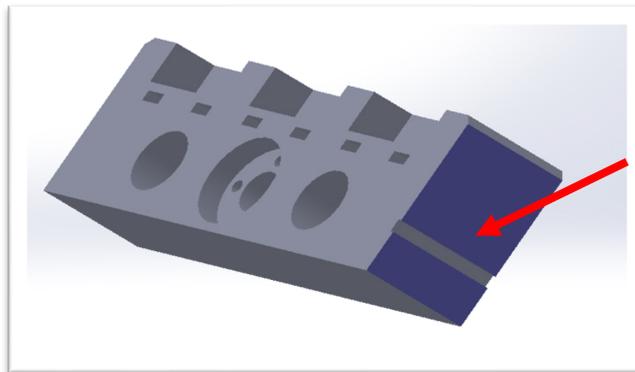


Figura 48: Ranura en la parte móvil para alojamiento del imán señalada con la flecha en rojo.

La región destinada al cultivo celular fue delimitada como se observa en la Figura 49, con el propósito de disminuir el riesgo de contaminación del cultivo celular. En la pieza fija se incluyó un soporte para el motor paso a paso, y una base para el posicionamiento de la placa Arduino (Figura 49). Entre el soporte del motor y el límite del área de cultivo se previó colocar el *encoder*, y por ello se delimitó una zona para el montaje de la electrónica correspondiente al circuito óptico (Figura 49).



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

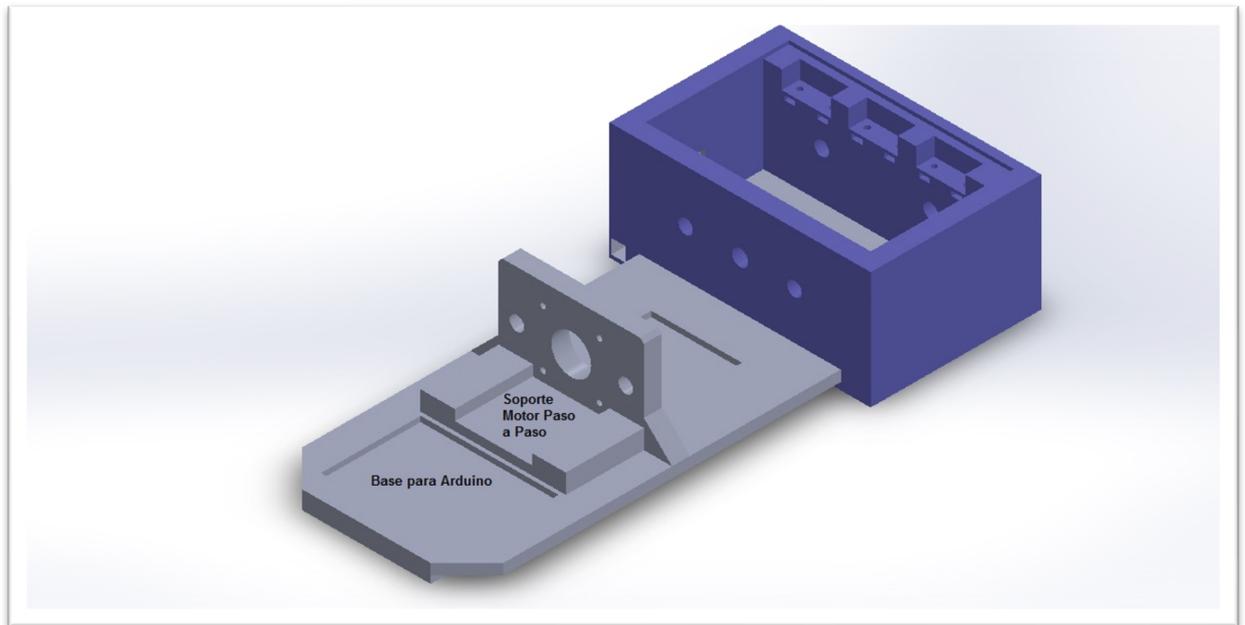


Figura 49: Esquema representativo de la estructura del biorreactor, en gris área donde se ubicará el motor y en púrpura, la región destinada al cultivo celular

Para resguardar de la contaminación a las células en cultivo dentro de los pocillos de PDMS y a la vez permitir la ventilación y la difusión de CO<sub>2</sub> hacia el medio celular, se diseñó una tapa como se puede observar en la Figura 50, y luego se obtuvo por corte laser de una plancha de acrílico.

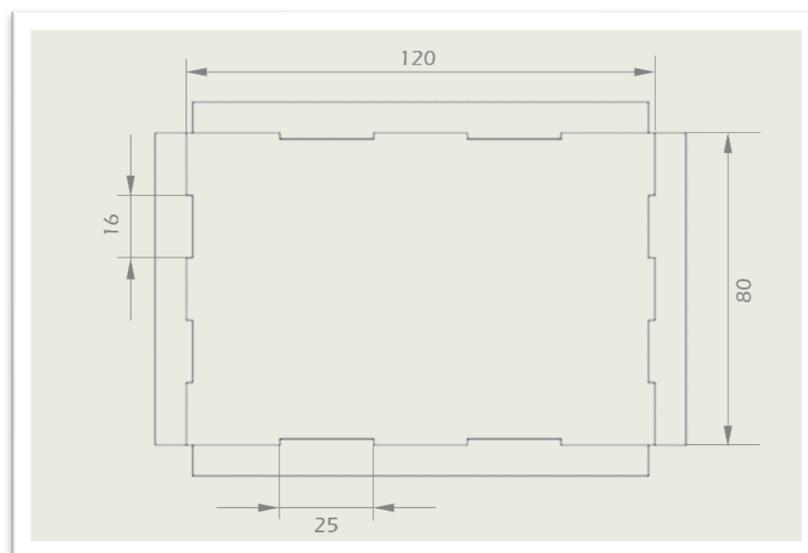
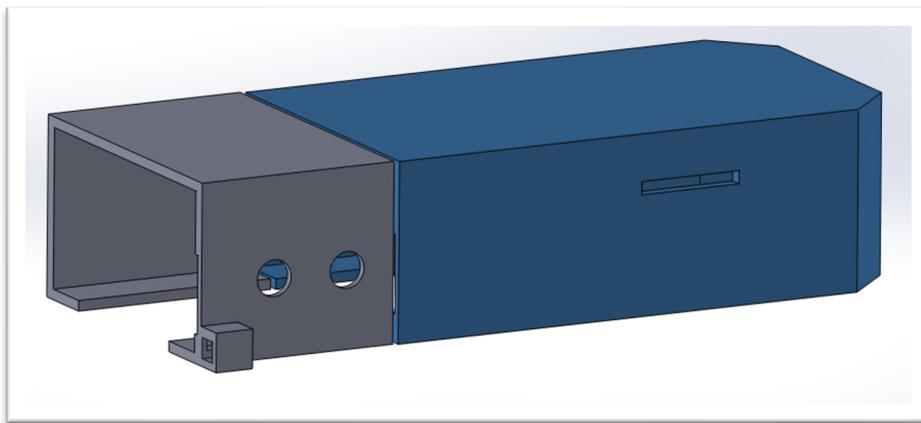


Figura 50: Diseño de la tapa para resguardo de células



Se diseñó un resguardo móvil deslizante para proteger todo el control electrónico del biorreactor e impedir el acceso al mismo, tanto a su usuario como al resto del personal de laboratorio que comparte la incubadora. Esta pieza fue dividida en dos partes para mayor facilidad del montaje final del dispositivo y del acceso a los componentes para su reparación y reemplazo ocasional en el futuro. Se incluyeron dos orificios para la colocación de botones con tuercas, con los que interactúa el usuario durante la operación normal del biorreactor, y un orificio rectangular que es atravesado por los cables de alimentación de 5 V y 12 V (Figura 51).



*Figura 51: Resguardo móvil del biorreactor.*

En última instancia, se ideó una base para dar soporte a todo el biorreactor y facilitar su traslado desde la incubadora a la campana de flujo laminar, donde se realizan los cambios de medio de cultivo y demás tareas de rutina y viceversa. Se optó por una estructura rectangular de vidrio de 4mm de espesor por su fácil limpieza y su bajo costo. Entre el vidrio y el dispositivo se dispuso una capa de espuma de polietileno expandido de 10 mm de espesor para prevenir que pequeñas vibraciones provenientes de la estimulación mecánica provoquen un crecimiento celular desigual sobre la superficie de los demás recipientes de cultivo presentes en la incubadora.

#### Desinfección y Prueba de uso

Previo a su introducción del biorreactor a la sala de cultivo, la estructura del mismo y su soporte se desinfectaron con monopersulfato de potasio 20%. Los componentes electrónicos fueron irradiados con luz UV [116] durante 15 min y los tornillos de sujeción de la cámara de estiramiento se desinfectaron utilizando etanol al



70% con agitación durante 15 min. Las cámaras de estiramiento se desinfectaron con ácido peracético al 0,2 % con agitación durante 1 h.

Para la prueba de uso del biorreactor, las matrices conservadas a 4°C se sumergieron en ácido peracético al 0,2 % y posteriormente se lavaron con PBS estéril. A continuación, dos de ellas (elegidas al azar o aleatoriamente para ser sometidas a estiramiento estático y estiramiento cíclico) fueron posicionadas sobre el pocillo de la cámara de estiramiento, utilizando agujas 30 G; otra matriz (control) se posicionó sobre una placa de Petri y se dejó secar bajo campana junto a las dos anteriores durante 1 h.

Aplicando técnicas de cultivo tridimensional, se sembraron 100  $\mu$ l de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células de la línea celular Vero por ml en cada una de las matrices y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. La elección de este linaje celular es en función del uso de estas para ensayos de biocompatibilidad estandarizados. Para favorecer la adherencia celular a las matrices se dejó reposar por 30 min, luego se agregó medio de cultivo completo y se incubaron a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>. Cuarenta y ocho horas después, la matriz posicionada sobre el biorreactor fue estimulada mecánicamente al 5% y a una frecuencia de 1 Hz durante cultivo de tejido, mientras que la frecuencia fue fijada en 1 Hz ya que, como se busca imitar el comportamiento del corazón adulto, y el mismo late entre 60-100 veces por minuto, un ciclo de estiramiento por segundo (o 60 ciclos por minuto) como se detalló anteriormente.

#### Análisis microscópico de células viables y apoptóticas

Para determinar la presencia y supervivencia celular se utilizaron dos fluorocromos aplicados conjuntamente para determinar la presencia y supervivencia celular: el diacetato de fluoresceína (25  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> de MEC) y el yoduro de propidio (25  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> de MEC a 1 mg/ml). El diacetato de fluoresceína penetra las células por difusión facilitada y es transformado por las estereasas celulares en fluoresceína, la cual emite fluorescencia amarillo-verdosa ( $\lambda = 514$  nm). En forma de diacetato de fluoresceína no emite fluorescencia, por lo tanto, sólo aparecerán marcadas las células metabólicamente activas (viables). El yoduro de propidio es un fluoróforo impermeable a membranas celulares vivas, sólo atraviesa las membranas de las células muertas, interacciona con los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja ( $\lambda = 617$  nm).

En primera instancia se lavaron las matrices con PBS y se adicionaron los fluorocromos, dejándolas reposar posteriormente por 15 min a 4°C en oscuridad. Luego se procedió a realizar un lavado con PBS y finalmente se observaron las muestras bajo microscopio confocal de fluorescencia IX83; *Olympus*; Japón, CIQUIBIC-



CONICET. Como técnica complementaria, las matrices recelularizadas fueron coloreadas con la técnica de tinción histológica con hematoxilina y eosina para ser comparadas contra una matriz descelularizada.

## Resultados

El prototipo diseñado y desarrollado en esta tesis fue concebido como un producto mínimo viable indispensable en la estimulación mecánica celular con la finalidad de coadyuvar al proceso de diferenciación hacia el linaje cardiomiocítico. A continuación, se describirán los resultados de cada proceso de fabricación, montaje final y funcionamiento.

### Impresión y ensamblaje

Las piezas que forman la estructura del biorreactor y el disco ranurado del *encoder* incremental fueron impresas en 3D. El ensamblaje de la pieza fija, la pieza móvil y el *encoder* puede observarse en la Figura 52. En la pieza móvil se empotraron la tuerca trapezoidal y dos rodamientos lineales para guiar el desplazamiento; la longitud de las varillas lisas y del husillo se ajustó posteriormente y se ligó el motor al husillo, sujetándolo luego con cuatro tornillos como se muestra en la Figura 52.

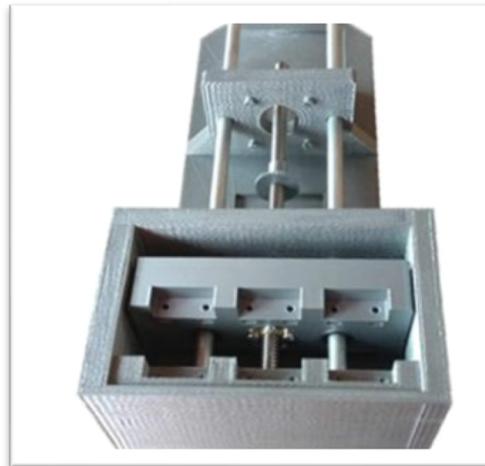


Figura 52: Ensamblaje de las piezas impresas del biorreactor

El montaje final del dispositivo, incluyendo la tapa confeccionada en acrílico, el resguardo móvil y el soporte de vidrio puede observarse en la Figura 53.

---



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo



Figura 53: Montaje final del biorreactor mecánico

### Control electrónico

Los componentes electrónicos necesarios para la creación del estímulo mecánico y el monitoreo de las condiciones de cultivo se interconectaron como se indica en la Figura 54. El montaje final se logró con el diseño de una placa de circuito impreso (PCB, del inglés *Printed Circuit Board*) en forma de *shield*, de manera de poder acoplarla en la parte superior de la placa Arduino Uno R3.

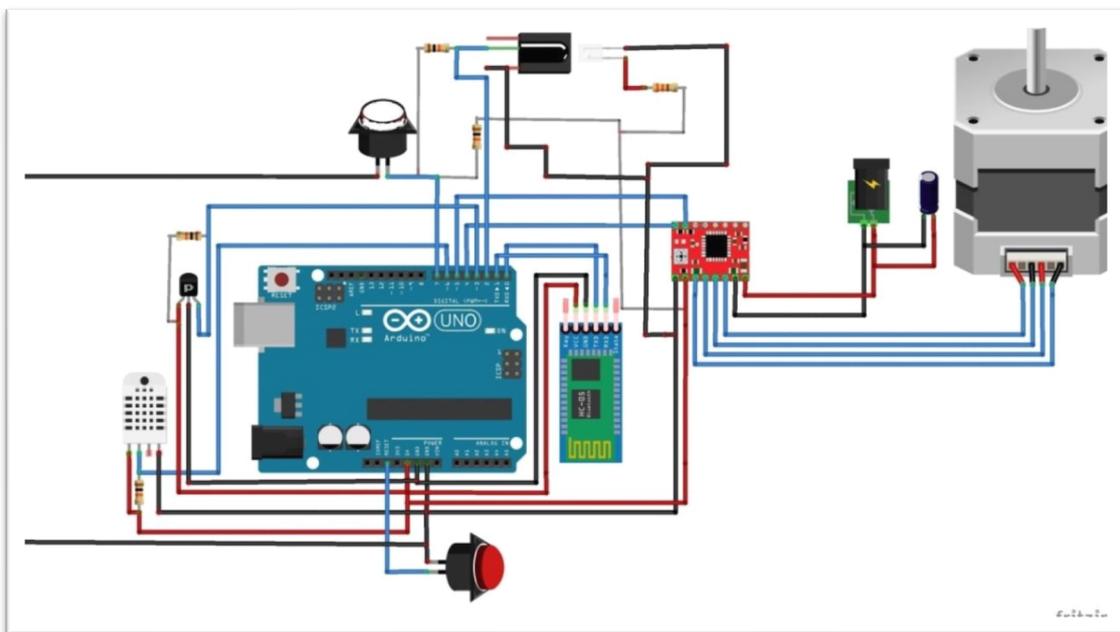


Figura 54: Esquemático del circuito eléctrico del biorreactor



#### Calibración del sistema de estiramiento

Se fabricaron las cámaras de estiramiento utilizando silicona de adición de consistencia liviana 3M Imprint II de baja viscosidad, esta es un elastómero muy utilizado como material de impresión en la odontología para obtener al máximo de detalle dental para la fabricación de coronas y puentes fijos, en impresiones de prótesis totales o parciales y para registro de mordida, razón por la cual suele recibir los nombres de materiales de impresión de polivinilsiloxano (PVS) o vinil polisiloxano (VPS).

La mezcla de los componentes del cartucho se realizó utilizando el dispensador tipo HP y las puntas para mezcla grandes y pequeñas. Las cámaras de estiramiento se obtuvieron por el método de colada, con un molde negativo diseñado en un *software* CAD (Figura 55 Panel A), con las medidas de las cámaras comerciales. El molde fue luego impreso en 3D (impresora Prusa i3) utilizando el filamento *Polysmooth* PVB 3D, y posteriormente se eliminaron las capas de impresión utilizando una unidad de limpieza (*Polysher*; *Poly-maker*; China) (Figura 55 Panel B).

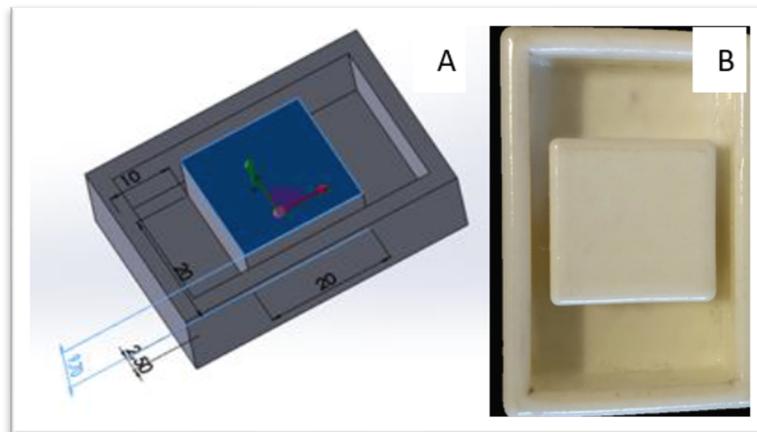


Figura 55 A: CAD de los moldes en negativo. B: Molde impreso y pulido

Con el molde negativo impreso en 3D preparado, se fabricaron las cámaras de estiramiento en PVS, como se indica en la Figura 56. Quince min después, cada una de las piezas polimerizadas se quitaron del molde y se les realizaron 4 perforaciones de 3 mm de diámetro a cada cámara para su sujeción futura a la estructura del biorreactor.



## Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recellularización con células madre de origen adiposo

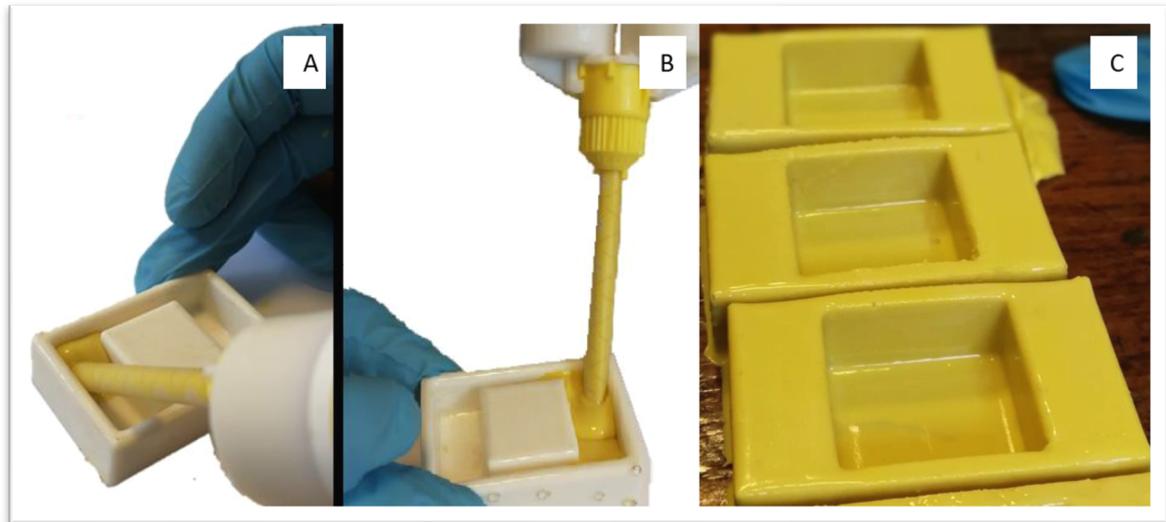


Figura 56: Proceso de fabricación de las cámaras de estiramiento

Las cámaras fueron luego sometidas a una evaluación mediante un sistema de estiramiento que incluyó la verificación del comportamiento del motor PaP, especialmente bajo la tensión ejercida por las cámaras de estiramiento, a través del monitoreo por *encoder* incremental de los pasos efectivamente dados en cada ciclo. Así, se decidió trabajar con una sola cámara, ya que la elección del motor se efectuó en base a las propiedades mecánicas del PDMS, que es el biomaterial más difundido y validado para su aplicación en biorreactores mecánicos. El PDMS tiene un módulo de elasticidad considerablemente menor al del PVS que presenta una mayor rigidez.

Esto se puso de manifiesto al ingresar un determinado porcentaje de estiramiento y se observó un desplazamiento menor al calculado. Por lo tanto, se realizó una curva de calibración propia para las cámaras de estiramiento de PVS donde se determinaron los valores de estiramiento que deben ser ingresados en la configuración del biorreactor para obtener la deformación óptima de trabajo. La razón fundamental por la cual se procedió de esta manera yace en que el biorreactor desarrollado prevé ser utilizado en el futuro con las cámaras de estiramiento de PDMS comerciales.

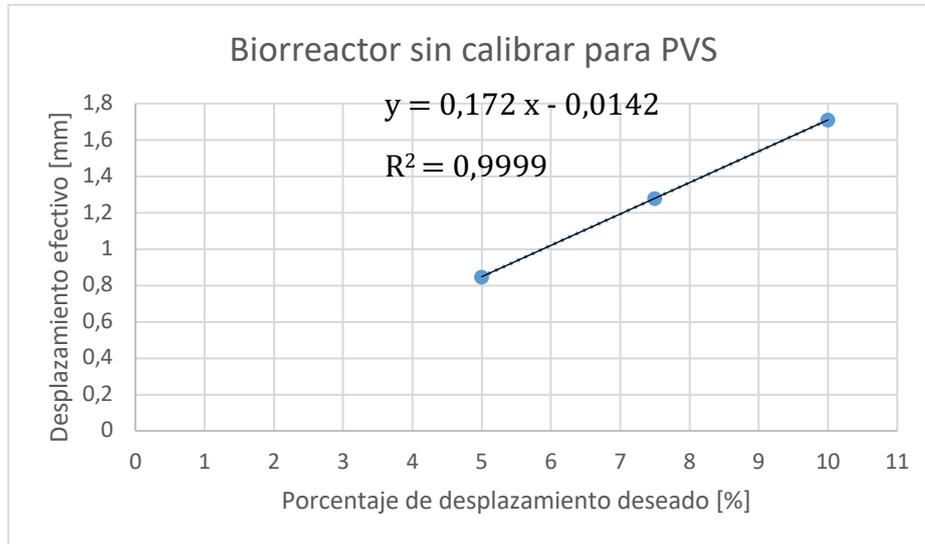


Figura 57: Valores obtenidos para biorreactor sin calibrar para PVS

Para el cálculo de estiramiento real del pocillo de PVS, se configuraron distintos porcentajes de estiramiento a baja frecuencia (0,1 Hz) y se midió con un calibre digital la relación de estiramiento para cada caso. Se determinaron los porcentajes de estiramiento que debían ingresarse al sistema para conseguir un estiramiento del 5%, 7,5% y 10%. Luego, se graficaron estos puntos y se trazó una línea de tendencia; al calcular el coeficiente de correlación de Pearson ( $R^2$ ) resultó ser muy próximo a 1, con lo cual se infiere que el comportamiento del sistema es lineal. Por lo tanto, a través de la ecuación de la recta (Figura 57) pudo obtenerse el porcentaje de estiramiento para introducir (x) en el sistema y alcanzar un determinado estiramiento efectivo (y) de una cámara de estiramiento de PVS (Figura 58).

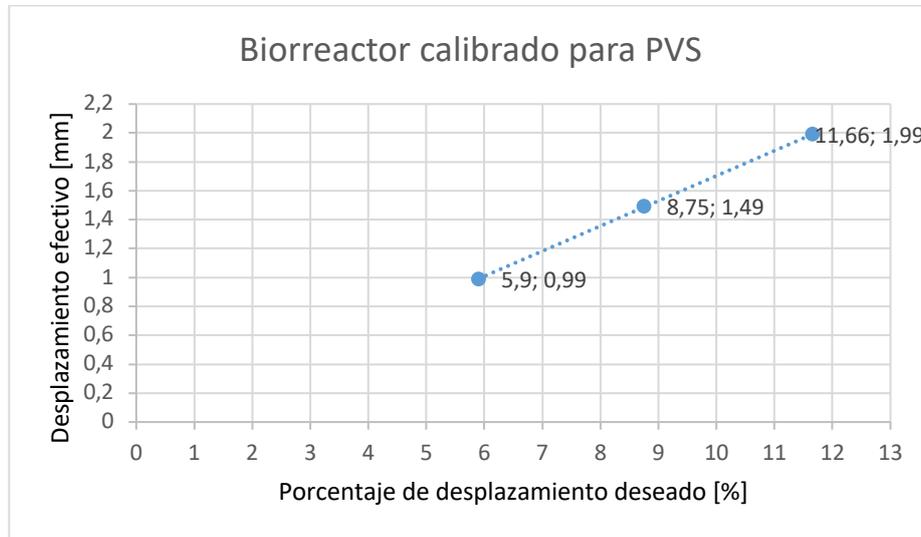


Figura 58: Valores obtenidos y recta de tendencia para biorreactor calibrado.

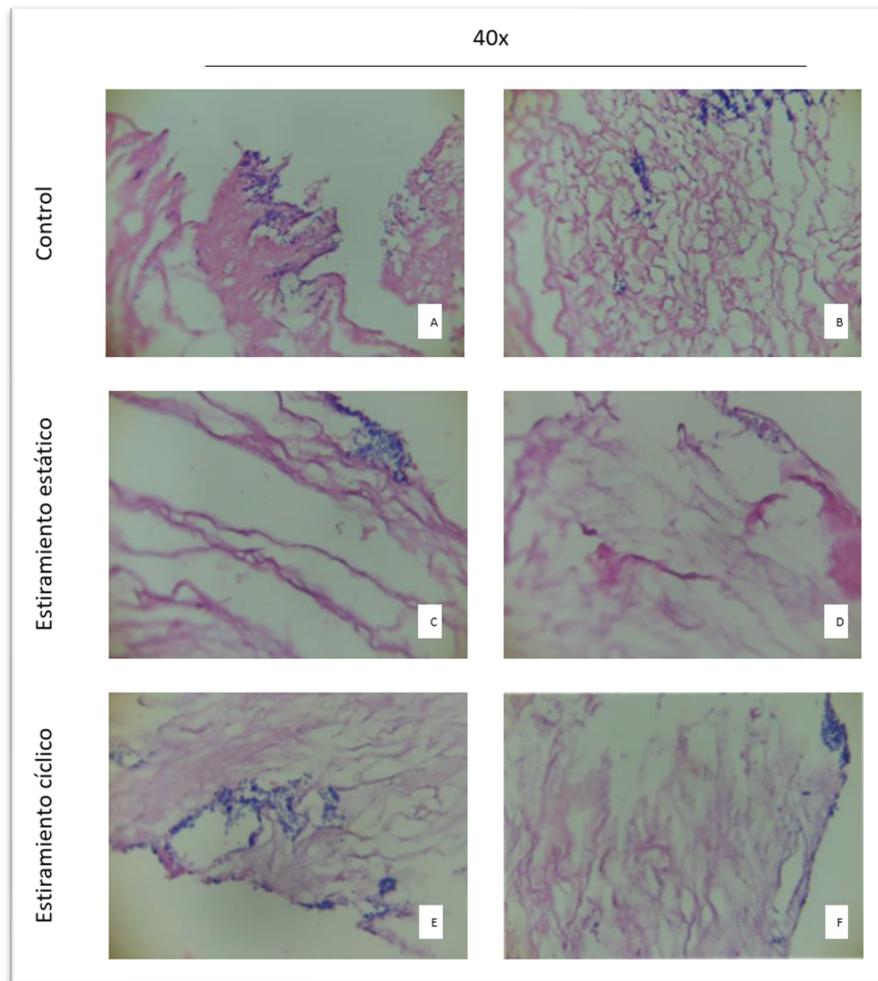
#### Prueba de concepto

La MEC recelularizada con células Vero fue sometida a una estimulación cíclica. Previamente al análisis de la adaptación celular a la matriz descélularizada se monitoreó la temperatura y humedad del interior del biorreactor ubicada dentro de la incubadora. La temperatura osciló entre 35,7 y 36,5 °C, mientras que la Humedad Relativa se cuantificó entre 91,1 y 91,7%.

Posterior al protocolo de estimulación ensayado como prueba del biorreactor mecánico, se desmontó la cámara de estiramiento y se inspeccionó visualmente toda la electrónica involucrada en el control de la estimulación. No se observaron signos de corrosión del material del equipo expuesto a la cámara de cultivo celular durante el tiempo del protocolo, tampoco se verificó cambios en los pocillos que contenían la MEC en proceso de recelularización. No se observaron alteraciones visibles de sobrecalentamiento del motor luego de la estimulación cíclica al cabo de 48 horas.

El comportamiento de las matrices sometidas a experimentación fue evaluado mediante microscopía óptica y microscopía confocal de fluorescencia.

La Figura 60 muestra las matrices con la presencia de los núcleos celulares, con el citoplasma y el colágeno de la MEC se observan en color rosado. Como puede verificarse, en los tres casos hubo adhesión celular al andamio.



*Figura 59: MEC recelularizada a 40x A y B: Control; C y D: Estiramiento estático; E y F: Sometidas a estiramiento cíclico. Tanto en el control como en los resultados de los ensayos, se observa la presencia de células adheridas a las matrices en púrpura.*

Las imágenes obtenidas del microscopio confocal correspondientes a la MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico muestra la presencia de células vivas y apoptóticas a lo largo de toda la profundidad de exploración. En la Figura 60 se evidencia la penetración de células en la MEC hasta 53,46  $\mu\text{m}$  desde la superficie en la cual fueron sembradas.

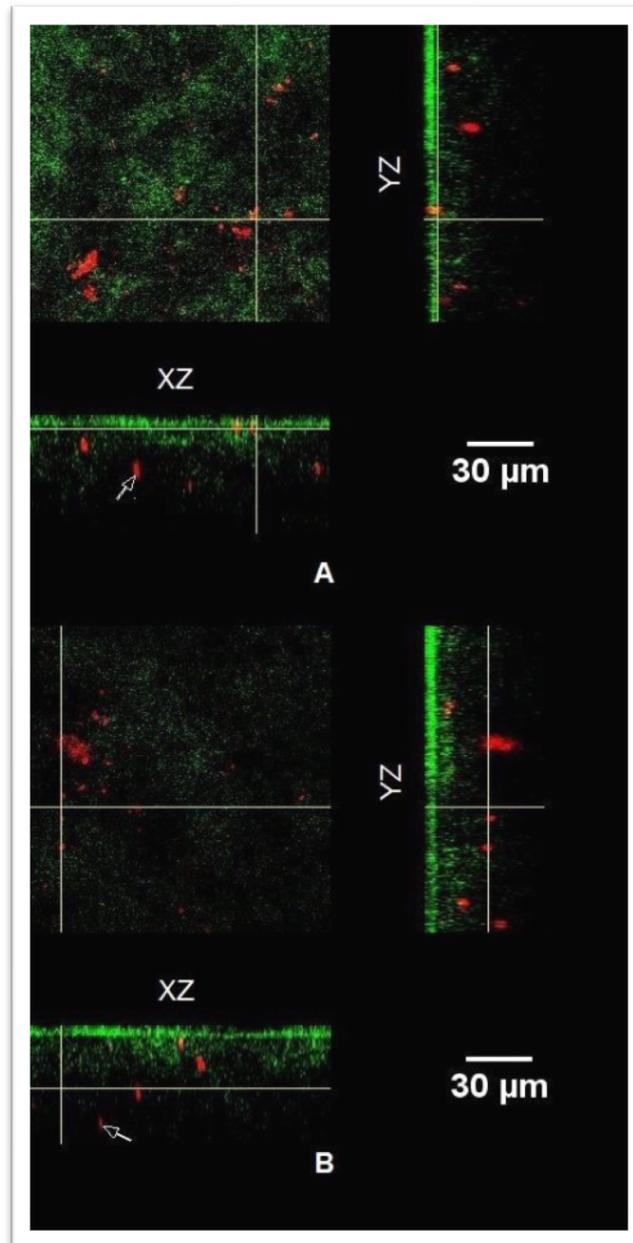
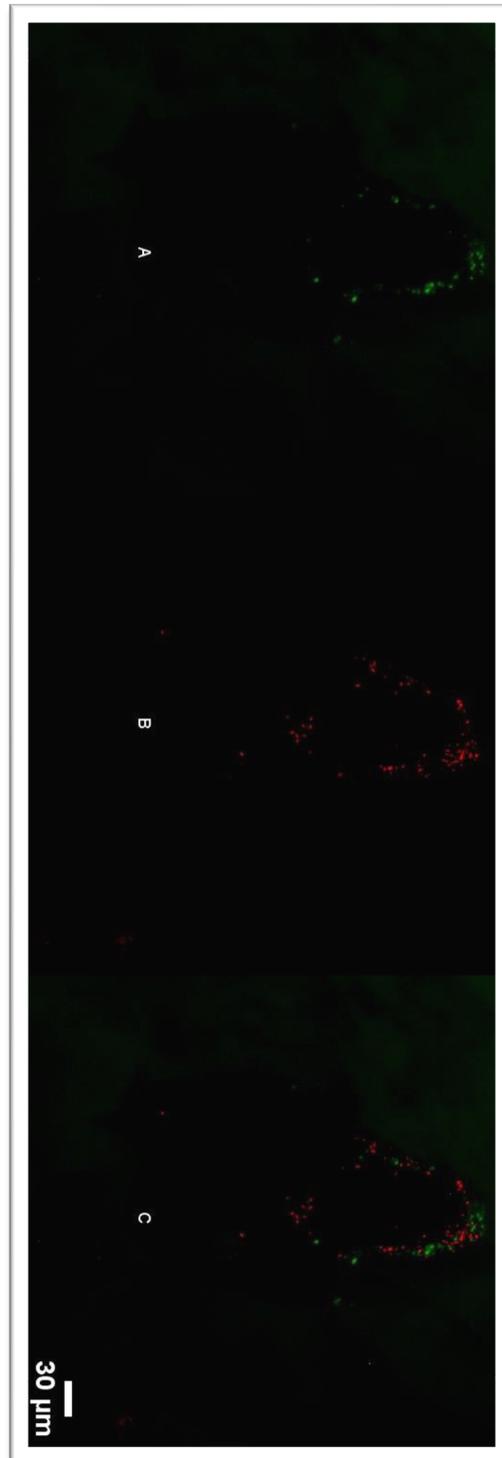


Figura 60: Micrografías de microscopio de fluorescencia confocal de la MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico, con las correspondientes vistas ortogonales de 53,46  $\mu\text{m}$  de espesor. Para ambos casos, se observa penetración celular, en panel A la flecha indica célula a 28,85  $\mu\text{m}$  de profundidad. En panel B la flecha indica célula a 44,82  $\mu\text{m}$  de profundidad.

En la Figura 61 se observa una imagen resultante de realizar una proyección a lo largo de toda la profundidad de exploración, evidenciando la presencia de células teñidas con fluoresceína y con IP.

---



*Figura 61: MEC recelularizada sometida a estiramiento cíclico. (A) Células penetradas por la fluoresceína. (B) células penetradas por el IP. (C) Fusión (Merge).*



## Discusión y Conclusión

Diferentes publicaciones han demostrado que el uso de matrices extracelulares miocárdicas con su arquitectura tridimensional preservada es una alternativa clave para facilitar el soporte y la diferenciación celular necesarios para favorecer el proceso de regeneración cardíaca, con la presencia de factores de crecimiento y citoquinas ([29], [117]). En condiciones fisiológicas, el estiramiento mecánico de los cardiomiocitos está inducido por señales eléctricas cardíacas y el acoplamiento entre el pulso eléctrico y las contracciones celulares, siendo crucial para el desarrollo del miocardio ([118]). Es de vital importancia que se garanticen un acoplamiento celular electromecánico y una función contráctil, adecuadas dentro de los constructos generados. Para ello, es fundamental la existencia de estímulos mecánicos que imiten la actividad cardíaca, por lo que los biorreactores mecánicos han tomado importancia dentro de este campo. Parámetros del estiramiento como el modo (uniaxial, biaxial), la magnitud, la velocidad, la frecuencia, la forma de onda (sinusoidal, rampa, estática), y la inserción de períodos de reposo, inducen efectos reguladores significativos a nivel celular ([119]). La técnica de cultivo tridimensional se aplicó en la recelularización de matrices que luego fueron sometidas a estimulación mecánica para verificar la adhesión y supervivencia celular en el biorreactor implementado. El estiramiento uniaxial de las matrices se logró gracias a la confluencia de un motor paso a paso comandado por un *driver*, un sistema tuerca-husillo, sensores de posición y un microcontrolador encargado de gobernar el funcionamiento global del sistema. El elevado costo de sensores de desplazamiento para medir pequeñas distancias llevó al diseño y la implementación de un *encoder* incremental como sensor de posición, a partir de un disco impreso 3D y un circuito óptico; si bien las prestaciones de este último son más limitadas, resultaron suficientes para los requerimientos previamente planteados. Los resultados de microscopía convencional y confocal obtenidos luego de las pruebas preliminares de viabilidad celular en la matriz 3D (Figura 59, Figura 61) permiten concluir que el biorreactor mecánico desarrollado permitió la adherencia y la supervivencia celular, evidenciado cualitativamente mediante la presencia de células metabólicamente activas y apoptóticas.



## Conclusiones finales

La escasez de órganos para trasplantes es cada vez más crítica y acarrea un aumento de la morbi-mortalidad de miles de pacientes cada año. A pesar del incremento de trasplantes en los últimos años asociados a la implementación de la Ley Justina, el número de pacientes en espera es elevado y no todas estas personas logran recibir un órgano. Por esta razón, la generación de órganos completos para su reemplazo representa un gran avance de la medicina regenerativa. A diferencia de los procedimientos de reparación quirúrgica convencionales donde el biomaterial seleccionado necesita cumplir con los requerimientos estructurales y mecánicos para tolerar el crecimiento y función normal de los tejidos y evitar así una respuesta adversa del huésped; en este trabajo nos propusimos desarrollar mediante ingeniería de tejidos un andamio tridimensional a partir de la descelularización de un corazón de conejo para proponerlo como restauración de la estructura y función de un corazón deteriorado por una patología coronaria, mediante la generación de células cardíacas a partir de células madre de origen adiposo.

La combinación de los distintos agentes descelularizantes nos permitió desarrollar y optimizar un protocolo propio para obtener una matriz extracelular cardíaca traslúcida, acelular, desinfectada, con una microarquitectura conservada, el sistema vascular preservado y biocompatible. Los tiempos de obtención de la misma fueron incluso menores a lo reportado en bibliografía, lo que implicó una disminución de la matriz extracelular en contacto con agentes químicos y físicos que pudieran ocasionar el deterioro de la misma. La caracterización de esta matriz extracelular descelularizada de tejido cardíaco contribuyó a generar mayor conocimiento de la organización, composición y preservación de la ultraestructura, indispensable para una futura remodelación. Asimismo, la dMEC obtenida conserva propiedades mecánicas similares a su contraparte nativa que marcan un futuro alentador y promisorio para el desarrollo de matrices que mejoren la adherencia, la migración y la diferenciación celular, es decir, un mejor comportamiento celular durante el proceso de recelularización. Actualmente el principal uso de los parches de dMEC cardíacos es como medio de entrega de células. Sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo, especialmente en la resiembra celular exitosa sugieren el uso potencial de los parches como andamio reemplazo de tejido miocárdico dañado. También, demostramos, por primera vez, que el agente desinfectante de la dMEC, ácido peracético al 0,2 %, fue determinante en la elección para la desinfección final de las matrices no solo porque favorece el proceso de desinfección sino que mejora además, las propiedades mecánicas y de citocompatibilidad.



Los resultados obtenidos en cuanto a la aislación de células tipo madre de origen adiposo son muy promisorios y alentadores, ya que pudimos observar que estas células una vez estimuladas químicamente pudieron diferenciarse en cardiomiocitos. Sin embargo, es importante destacar que la diferenciación en cardiomiocitos a partir de células madre de origen adiposo debe ser complementada para mejorar los parámetros de diferenciación, así como los tiempos para optimizar la eficiencia celular de la recelularización

En última instancia, diseñamos y desarrollamos un biorreactor de estiramiento uniaxial para cultivo celular 3D, que simuló las condiciones fisiológicas de temperatura, humedad y pH en el correcto mantenimiento celular. Este prototipo permitió que las células sembradas en las matrices y sometidas a un estiramiento uniaxial, logaran una buena adherencia y supervivencia celular con una estimulación continua del biorreactor.



## Proyecciones a futuro

Desde el punto de vista bioquímico, definir la interacción química del APA sobre la superficie de las matrices celulares que permite el cambio de propiedades mecánicas.

Desde el punto de vista celular, optimizar la técnica de diferenciación celular cardíaca para caracterizar completamente la funcionalidad de los cardiomiocitos.

Desde el punto de vista del biorreactor, concluir con los estudios de diferenciación de las células madre de origen adiposo por medio de estimulación mecánica, además de la inducida química suplementada con 5-azaticidina con el polímero correcto (PDMS), ya que mantendría constante la estimulación uniaxial sin agotar el motor pap.

Desde el punto de vista tecnológico analizar si la técnica de obtención de matrices celulares descellularizadas desinfectadas es extrapolable a otras especies que potencialmente aumentarían la cantidad de matrices a obtener, de variadas dimensiones. Este paso es interesante ya que ayudaría a la posible formación de un servicio brindado por el laboratorio hacia otros laboratorios, de esta forma poder costear los costos de los ensayos necesarios por las distintas organizaciones de certificación para poder llevar a la vida real matrices extracelulares esterilizadas listas para su aplicación médica.



## Bibliografía

- [1] L. R. Cochard and F. H. Netter, *Netter atlas de embriología humana*. Barcelona : Masson, 2005.
- [2] J. Hib, *Embriología médica*, no. 611.013. Clareo, 2006.
- [3] H. Rouvière, A. Delmas, V. Götzens García, and others, *Anatomía humana: descriptiva, topográfica y funcional*, no. 611. Masson, 1999.
- [4] W. Ross, M. H., & Pawlina, *Histology: A text and atlas: With correlated cell and molecular biology*. Elsevier Ltd, 2010.
- [5] J. E. Hall, *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. Elsevier Health Sciences, 2011.
- [6] V. Kumar, A. K. Abbas, and J. C. Aster, *Robbins basic pathology*. Elsevier Health Sciences, 2017.
- [7] J. Viola, B. Lal, and O. Grad, "The Emergence of Tissue Engineering as a Research FieldTitle," *National Science Foundation*, 2003. .
- [8] SINTRA, "Memoria 2018: Procuración y trasplante de órganos, tejidos y células en Argentina," Argentina, 2018.
- [9] N. L'Heureux, T. N. McAllister, and L. M. De La Fuente, "Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization [10]," *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 14, pp. 1451–1453, Oct. 2007.
- [10] A. Atala, S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik, "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty," *Lancet*, vol. 367, no. 9518, pp. 1241–1246, Apr. 2006.
- [11] P. Macchiarini *et al.*, "Clinical transplantation of a tissue-engineered airway," *Lancet*, vol. 372, no. 9655, pp. 2023–2030, Dec. 2008.
- [12] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [13] J. E. M. Souren, C. Schneijdenberg, A. J. Verkleij, and R. van Wijk, "Factors controlling the rhythmic contraction of collagen gels by neonatal heart cells," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, vol. 28, no. 3, pp. 199–204, 1992.
- [14] J. E. M. Souren, R. C. Peters, and R. Van Wijk, "Collagen gels populated with rat neonatal heart cells can be used for optical recording of rhythmic contractions which also show ECG-like potentials," *Experientia*, vol. 50, no. 8, pp. 712–716, 1994.
- [15] W. H. Zimmermann, C. Fink, D. Kralisch, U. Remmers, J. Weil, and T.



- Eschenhagen, "Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 68, no. 1, pp. 106–114, 2000.
- [16] T. Eschenhagen *et al.*, "Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system.," *FASEB J.*, vol. 11, no. 8, pp. 683–694, 1997.
- [17] J. Gao *et al.*, "A myocardial patch made of collagen membranes loaded with collagen-binding human vascular endothelial growth factor accelerates healing of the injured rabbit heart," *Tissue Eng. Part A*, vol. 17, no. 21–22, pp. 2739–2747, 2011.
- [18] M. Radisic *et al.*, "Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 52, pp. 18129 LP – 18134, Dec. 2004.
- [19] G. Avendaño-Romero, A. López-Malo, and E. Paolu, "Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos," *Temas Sel. Ing. Aliment.*, vol. 7, no. 1, pp. 87–96, 2013.
- [20] N. Landa *et al.*, "Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat," *Circulation*, vol. 117, no. 11, pp. 1388–1396, 2008.
- [21] J. Yu, Y. Gu, K. T. Du, S. Mihardja, R. E. Sievers, and R. J. Lee, "The effect of injected RGD modified alginate on angiogenesis and left ventricular function in a chronic rat infarct model," *Biomaterials*, vol. 30, no. 5, pp. 751–756, 2009.
- [22] E. Ruvinov, J. Leor, and S. Cohen, "The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction," *Biomaterials*, vol. 32, no. 2, pp. 565–578, 2011.
- [23] J. T. Hjelle, E. C. Carlson, K. Brendel, and E. Meezan, "Biosynthesis of basement membrane matrix by isolated rat renal glomeruli," *Kidney Int.*, vol. 15, no. 1, pp. 20–32, 1979.
- [24] S. F. Badylak *et al.*, "The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achille's tendon repair in a dog model," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 29, no. 8, pp. 977–985, 1995.
- [25] R.-N. Chen, H.-O. Ho, Y.-T. Tsai, and M.-T. Sheu, "Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 25, no. 13, pp. 2679–2686, 2004.
- [26] C. E. Schmidt and J. M. Baier, "Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 21, no. 22, pp. 2215–
-



2231, 2000.

- [27] R. C. Elkins, P. E. Dawson, S. Goldstein, S. P. Walsh, and K. S. Black, "Decellularized human valve allografts," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 71, no. 5, pp. S428–S432, 2001.
- [28] D. Schulthesis, A. I. Gaboue, I. Cebotari, Serghei Tudorache, and T. Walles, "Biological vascularized matrix for bladder tissue engineerin: Matrix preparation, reseedin technique and short-term implantation in a porcine model.," *J. Urol.*, vol. 173, no. 1, pp. 276–280, 2005.
- [29] H. C. Ott *et al.*, "Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 213–221, 2008.
- [30] G. Mazza *et al.*, "Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 13079, 2015.
- [31] P. L. Sánchez *et al.*, "Acellular human heart matrix: A critical step toward whole heart grafts," *Biomaterials*, vol. 61, pp. 279–289, 2015.
- [32] J. E. Nichols *et al.*, "Production and Assessment of Decellularized Pig and Human Lung Scaffolds," *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, no. 17–18, pp. 2045–2062, Sep. 2013.
- [33] G. Orlando *et al.*, "Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies," *Biomaterials*, vol. 34, no. 24, pp. 5915–5925, 2013.
- [34] M. J. Bissell, "Thinking in three dimensions: Discovering reciprocal signaling between the extracellular matrix and nucleus and the wisdom of microenvironment and tissue architecture," *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 21, pp. 3205–3209, 2016.
- [35] R. Londono and S. F. Badylak, "Biologic Scaffolds for Regenerative Medicine: Mechanisms of In vivo Remodeling," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 43, no. 3, pp. 577–592, 2015.
- [36] S. F. Badylak, D. Taylor, and K. Uygun, "Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 13, no. 1, pp. 27–53, Jul. 2011.
- [37] J. J. Song and H. C. Ott, "Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds," *Trends Mol. Med.*, vol. 17, no. 8, pp. 424–432, 2011.
- [38] M. P. Bernard, M. L. Chu, J. C. Myers, F. Ramirez, E. F. Eikenberry, and D. J. Prockop, "Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro. alpha. 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of



- structures that are conserved during evolution," *Biochemistry*, vol. 22, no. 22, pp. 5213–5223, 1983.
- [39] M. I. S. Chung, Ming Miao, R. J. Stahl, E. Chan, J. Parkinson, and F. W. Keeley, "Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: Clues to the evolutionary history of elastins," *Matrix Biol.*, vol. 25, no. 8, pp. 492–504, 2006.
- [40] T. Luque *et al.*, "Local micromechanical properties of decellularized lung scaffolds measured with atomic force microscopy," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 6, pp. 6852–6859, 2013.
- [41] D. Shum-Tim, K. Ridwan, M. Alrefai, J. Connell, A. Paul, and D. Murali, "Cardiac tissue engineering and regeneration using cell-based therapy," *Stem Cells Cloning Adv. Appl.*, vol. 8, p. 81, May 2015.
- [42] Y. K. Wu and J. Yu, "The role of tissue engineering in cellular therapies for myocardial infarction: A review," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 31, pp. 6401–6410, 2015.
- [43] Q.-Z. Chen, S. E. Harding, N. N. Ali, A. R. Lyon, and A. R. Boccaccini, "Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 59, no. 1, pp. 1–37, 2008.
- [44] C. S. Potten and M. Loeffler, "Stem cells and cellular pedigrees—a conceptual introduction," *Stem cells*. Elsevier, pp. 1–27, 1997.
- [45] S. Avasthi, R. N. Srivastava, A. Singh, and M. Srivastava, "Stem cell: past, present and future—a review article," *Internet J. Med. Updat.*, vol. 3, no. 1, pp. 22–31, 2008.
- [46] K. R. Boheler, J. Czyz, D. Tweedie, H.-T. Yang, S. V Anisimov, and A. M. Wobus, "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes," *Circ. Res.*, vol. 91, no. 3, pp. 189–201, 2002.
- [47] P. Menasché, "Skeletal myoblasts and cardiac repair," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 45, no. 4, pp. 545–553, 2008.
- [48] S. K. Sanganalmath and R. Bolli, "Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions," *Circ. Res.*, vol. 113, no. 6, pp. 810–834, 2013.
- [49] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, 2006.
- [50] J. Lewandowski, T. J. Kolanowski, and M. Kurpisz, "Techniques for the induction
-



- of human pluripotent stem cell differentiation towards cardiomyocytes," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 11, no. 5, pp. 1658–1674, 2017.
- [51] B. Dai *et al.*, "Reduced collagen deposition in infarcted myocardium facilitates induced pluripotent stem cell engraftment and angiomyogenesis for improvement of left ventricular function," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 58, no. 20, pp. 2118–2127, 2011.
- [52] C. Mauritz *et al.*, "Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction," *Eur. Heart J.*, vol. 32, no. 21, pp. 2634–2641, 2011.
- [53] O. Iglesias-García, B. Pelacho, and F. Prósper, "Induced pluripotent stem cells as a new strategy for cardiac regeneration and disease modeling," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 62, pp. 43–50, 2013.
- [54] P. Menasché *et al.*, "The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation," *Circulation*, vol. 117, no. 9, pp. 1189–1200, 2008.
- [55] V. Jeevanantham, M. R. Afzal, E. K. Zuba-Surma, and B. Dawn, "Clinical trials of cardiac repair with adult bone marrow-derived cells," in *Cellular Cardiomyoplasty*, Springer, 2013, pp. 179–205.
- [56] A. J. Friedenstein, I. I. Piatetzky-Shapiro, and K. V Petrakova, "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.," *J. Embryol. Exp. Morphol.*, vol. 16, no. 3, pp. 381–390, Dec. 1966.
- [57] J. Bartunek *et al.*, "Cardiopietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 61, no. 23, pp. 2329–2338, 2013.
- [58] L. Frese, P. E. Dijkman, and S. P. Hoerstrup, "Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine.," *Transfus. Med. hemotherapy Off. Organ der Dtsch. Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, vol. 43, no. 4, pp. 268–274, Jul. 2016.
- [59] P. A. Zuk *et al.*, "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells," *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, no. 12, pp. 4279–4295, Dec. 2002.
- [60] T. Ma *et al.*, "A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases.," *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 8, no. 1, p. 124, Jun. 2017.
- [61] B. A. Bunnell, M. Flaatt, C. Gagliardi, B. Patel, and C. Ripoll, "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation.," *Methods*, vol. 45, no. 2, pp.
-



115–120, Jun. 2008.

- [62] S. Rangappa, C. Fen, E. H. Lee, A. Bongso, and E. S. K. Wei, “Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes,” *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 75, no. 3, pp. 775–779, 2003.
- [63] K. Song, Z. Wang, W. Li, C. Zhang, M. Lim, and T. Liu, “In vitro culture, determination, and directed differentiation of adult adipose-derived stem cells towards cardiomyocyte-like cells induced by angiotensin II,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 170, no. 2, pp. 459–470, 2013.
- [64] M. Yang *et al.*, “TBX18 gene induces adipose-derived stem cells to differentiate into pacemaker-like cells in the myocardial microenvironment,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 38, no. 5, pp. 1403–1410, 2016.
- [65] W. Wagner *et al.*, “Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood,” *Exp. Hematol.*, vol. 33, no. 11, pp. 1402–1416, Nov. 2005.
- [66] S. Banai *et al.*, “Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs,” *Circulation*, vol. 89, no. 5, pp. 2183–2189, 1994.
- [67] X. Li *et al.*, “Exogenous bFGF promotes articular cartilage repair via up-regulation of multiple growth factors,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 21, no. 10, pp. 1567–1575, 2013.
- [68] L. L. Y. Chiu, M. Radisic, and G. Vunjak-Novakovic, “Bioactive scaffolds for engineering vascularized cardiac tissues,” *Macromol. Biosci.*, vol. 10, no. 11, pp. 1286–1301, Nov. 2010.
- [69] D. Hubmacher and S. S. Apte, “The biology of the extracellular matrix: novel insights,” *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 25, no. 1, pp. 65–70, Jan. 2013.
- [70] J. J. Rice, M. M. Martino, L. De Laporte, F. Tortelli, P. S. Briquez, and J. A. Hubbell, “Engineering the Regenerative Microenvironment with Biomaterials,” *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 2, no. 1, pp. 57–71, 2013.
- [71] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, “The extracellular matrix at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 123, no. 24, pp. 4195 LP – 4200, Dec. 2010.
- [72] S. S. Nunes *et al.*, “Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. 8, pp. 781–787, 2013.
- [73] W. H. Zimmermann *et al.*, “Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct,” *Circ. Res.*, vol. 90, no. 2, pp. 223–230, Feb. 2002.



- [74] L. D. Black 3rd, J. D. Meyers, J. S. Weinbaum, Y. A. Shvelidze, and R. T. Tranquillo, "Cell-induced alignment augments twitch force in fibrin gel-based engineered myocardium via gap junction modification," *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, no. 10, pp. 3099–3108, Oct. 2009.
- [75] K. Baar, R. Birla, M. O. Boluyt, G. H. Borschel, E. M. Arruda, and R. G. Dennis, "Self-organization of rat cardiac cells into contractile 3-D cardiac tissue," *FASEB J.*, vol. 19, no. 2, pp. 275–277, Feb. 2005.
- [76] W. J. de Lange *et al.*, "Neonatal mouse-derived engineered cardiac tissue: a novel model system for studying genetic heart disease," *Circ. Res.*, vol. 109, no. 1, pp. 8–19, Jun. 2011.
- [77] C. Fink, D. Kralisch, U. Remmers, J. Weil, and T. Eschenhagen, "Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement."
- [78] S. Mirsadraee *et al.*, "Development and Characterization of an Acellular Human Pericardial Matrix for Tissue Engineering," *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 4, pp. 763–773, Apr. 2006.
- [79] J. D. Bancroft and M. Gamble, *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, 2008.
- [80] J. Kapuscinski, "DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe," *Biotech. Histochem.*, vol. 70, no. 5, pp. 220–233, Jan. 1995.
- [81] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, "An overview of tissue and whole organ decellularization processes," *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, 2011.
- [82] P. W. Laird, A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch, and A. Berns, "Simplified mammalian DNA isolation procedure," *Nucleic Acids Res.*, vol. 19, no. 15, pp. 4293–4293, 1991.
- [83] M. Arand, T. Friedberg, and F. Oesch, "Colorimetric quantitation of trace amounts of sodium lauryl sulfate in the presence of nucleic acids and proteins," *Anal. Biochem.*, vol. 207, no. 1, pp. 73–75, Nov. 1992.
- [84] FDA, "Biological evaluation of medical devices - Part5: Tests fo in vitro cytotoxicity," *Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm.*, 2009.
- [85] FDA, "Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials," *Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm.*, 2012.
- [86] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.
-



- [87] Twentyman PR and Luscombe M, "A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity.," *Br. J. Cancer*, vol. 56, no. 3, pp. 279–85, 1987.
- [88] A. M. Rao, "Rheology of fluid and semisolid fluids: principles and applications," *Aspen Publ. Gaithersburg, MD*, 1999.
- [89] J. M. Wainwright *et al.*, "Preparation of Cardiac Extracellular Matrix from an Intact Porcine Heart," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 16, no. 3, pp. 525–532, Jun. 2010.
- [90] E. G. Nieva and N. A. Salvatierra, "Chemical, biological and anatomical characterization of an extracellular matrix obtained from rabbit heart," *Rev. Argentina Bioingeniería*, vol. 24, no. 4, 2020.
- [91] G. A. Nari *et al.*, "Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers\rPreparación de una matriz extracelular tridimensional por descelularización de hígados de conejos," *Rev. Española Enfermedades Dig.*, vol. 105, pp. 138–143, 2013.
- [92] J. P. Guyette, S. E. Gilpin, J. M. Charest, L. F. Tapias, X. Ren, and H. C. Ott, "Perfusion decellularization of whole organs," *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 6, pp. 1451–1468, Jun. 2014.
- [93] B. Ozlu, M. Ergin, S. Budak, S. Tunali, N. Yildirim, and C. Eriskan, "A bioartificial rat heart tissue: Perfusion decellularization and characterization," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 42, no. 12, pp. 757–764, 2019.
- [94] J. P. Guyette *et al.*, "Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix," *Circ. Res.*, vol. 118, no. 1, pp. 56–72, Jan. 2016.
- [95] S. F. Badylak, "The extracellular matrix as a biologic scaffold material☆," *Biomaterials*, vol. 28, no. 25, pp. 3587–3593, Sep. 2007.
- [96] T. W. Gilbert, S. Wognum, E. M. Joyce, D. O. Freytes, M. S. Sacks, and S. F. Badylak, "Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix," *Biomaterials*, vol. 29, no. 36, pp. 4775–4782, Dec. 2008.
- [97] J. Luo, S. A. Korossis, S.-P. Wilshaw, L. M. Jennings, J. Fisher, and E. Ingham, "Development and Characterization of Acellular Porcine Pulmonary Valve Scaffolds for Tissue Engineering," *Tissue Eng. Part A*, vol. 20, no. 21–22, pp. 2963–2974, Nov. 2014.
- [98] G. R. Fercana *et al.*, "Perivascular extracellular matrix hydrogels mimic native matrix microarchitecture and promote angiogenesis via basic fibroblast growth factor," *Biomaterials*, vol. 123, pp. 142–154, Apr. 2017.
-



- [99] C. Fidalgo *et al.*, "A sterilization method for decellularized xenogeneic cardiovascular scaffolds," *Acta Biomater.*, vol. 67, pp. 282–294, Feb. 2018.
- [100] B. Peña *et al.*, "Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering," *Macromol. Biosci.*, vol. 18, no. 6, p. 1800079, Jun. 2018.
- [101] B. Trappmann *et al.*, "Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate," *Nat. Mater.*, vol. 11, no. 7, pp. 642–649, Jul. 2012.
- [102] D. J. Rosario, G. C. Reilly, E. Ali Salah, M. Glover, A. J. Bullock, and S. MacNeil, "Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract," *Regen. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 145–156, Mar. 2008.
- [103] V. Eras, J. Graffunder, N. Ahmed, and J. C. Brune, "Influence of peracetic acid-ethanol sterilisation on the biomechanical properties of human meniscus transplants," *J. Exp. Orthop.*, vol. 8, no. 1, p. 18, Dec. 2021.
- [104] R. Cheheltani, C. M. McGoverin, J. Rao, D. A. Vorp, M. F. Kiani, and N. Pleshko, "Fourier transform infrared spectroscopy to quantify collagen and elastin in an in vitro model of extracellular matrix degradation in aorta," *Analyst*, vol. 139, no. 12, pp. 3039–3047, 2014.
- [105] Y. Zhou, C. Chen, Z. Guo, S. Xie, J. Hu, and H. Lu, "SR-FTIR as a tool for quantitative mapping of the content and distribution of extracellular matrix in decellularized book-shape bioscaffolds," *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 19, no. 1, p. 220, Dec. 2018.
- [106] M. D. Rees, E. C. Kennett, J. M. Whitelock, and M. J. Davies, "Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 44, no. 12, pp. 1973–2001, Jun. 2008.
- [107] M. Tao *et al.*, "Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal," *Bioact. Mater.*, vol. 6, no. 9, pp. 2927–2945, Sep. 2021.
- [108] E. Martin-Rendon, D. Sweeney, F. Lu, J. Girdlestone, C. Navarrete, and S. M. Watt, "5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies," *Vox Sang.*, vol. 95, no. 2, pp. 137–148, Aug. 2008.
- [109] C. Gálvez-Montón, C. Prat-Vidal, S. Roura, C. Soler-Botija, and A. Bayes-Genis, "Ingeniería tisular cardíaca y corazón bioartificial," *Rev. Española Cardiol.*, vol. 66, no. 5, pp. 391–399, May 2013.
- [110] K. Jezierska-Woźniak, D. Nosarzewska, A. Tutas, A. Mikołajczyk, M. Okliński, and
-

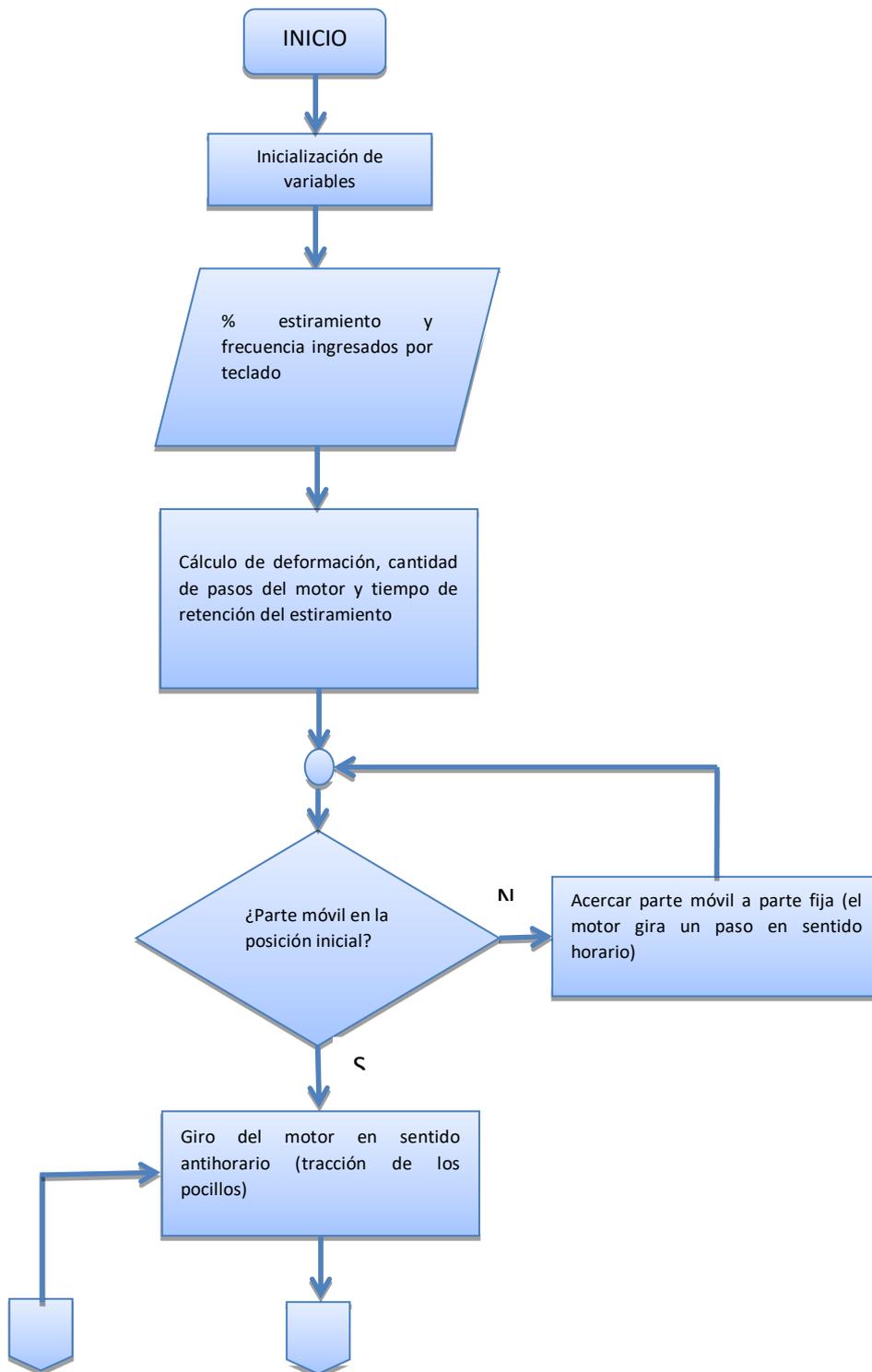


- M. K. Jurkowski, "Use of adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells.," *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*, vol. 64, pp. 326–32, Jul. 2010.
- [111] B. M. Buehrer and B. Cheatham, "Isolation and Characterization of Human Adipose-Derived Stem Cells for Use in Tissue Engineering," 2013, pp. 1–11.
- [112] S. Tapia-Rojas, A. Mayanga-Herrera, J. Enciso-Gutiérrez, P. Centurion, and J. Amiel-Pérez, "Procedimiento para el cultivo e identificación de células madre obtenidas de lipoaspirado humano con fines de investigación," *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, vol. 37, no. 3, pp. 547–53, Sep. 2020.
- [113] K. G. Gaustad, A. C. Boquest, B. E. Anderson, A. M. Gerdes, and P. Collas, "Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 314, no. 2, pp. 420–427, Feb. 2004.
- [114] W. Xu *et al.*, "Mesenchymal Stern Cells from Adult Human Bone Marrow Differentiate into a Cardiomyocyte Phenotype In Vitro," *Exp. Biol. Med.*, vol. 229, no. 7, pp. 623–631, Jul. 2004.
- [115] A. Burlacu *et al.*, "Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 87, no. 3, pp. 173–184, Mar. 2008.
- [116] and L. D. B. I. Jason J. Lau, Raymond M. Wang, "Development of an Arbitrary Waveform Membrane Stretcher for Dynamic Cell Culture," vol. 345, no. 6195, pp. 455–459, 2015.
- [117] Y. Eitan, U. Sarig, N. Dahan, and M. Machluf, "Acellular Cardiac Extracellular Matrix as a Scaffold for Tissue Engineering: In Vitro Cell Support, Remodeling, and Biocompatibility," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 16, no. 4, pp. 671–683, Aug. 2010.
- [118] G. Vunjak-Novakovic *et al.*, "Challenges in Cardiac Tissue Engineering," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 16, no. 2, pp. 169–187, Apr. 2010.
- [119] B. D. Riehl, J.-H. Park, I. K. Kwon, and J. Y. Lim, "Mechanical Stretching for Tissue Engineering: Two-Dimensional and Three-Dimensional Constructs," *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 288–300, Aug. 2012.



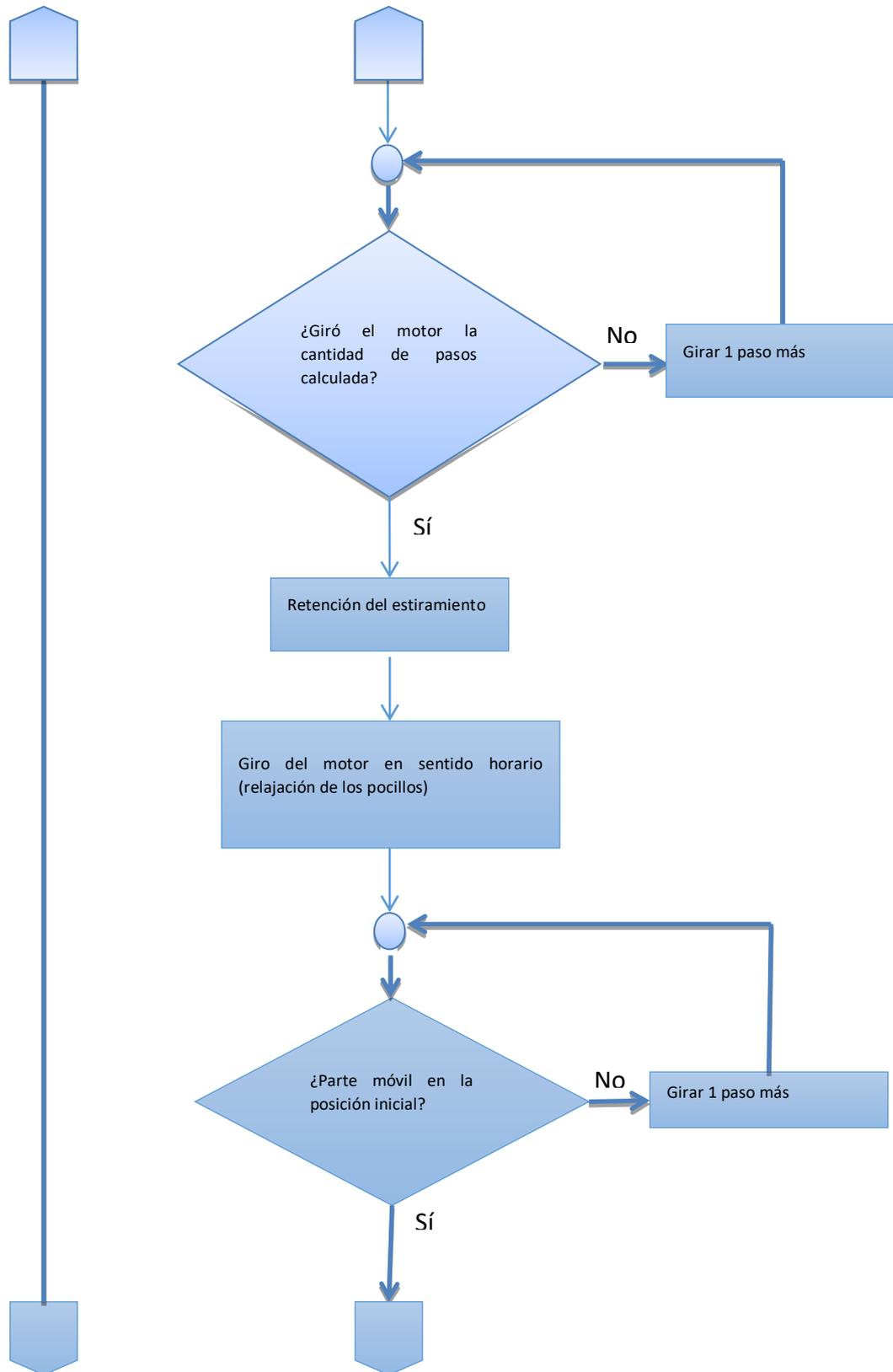
## Anexo

### Anexo I: Lógica de programación del biorreactor





Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo





Desarrollo de un corazón bioartificial a partir de recelularización con células madre de origen adiposo

