



**Universitat de les
Illes Balears**
Facultat de Ciències

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Actualización bibliográfica sobre la regeneración cardíaca y propuesta técnica para el desarrollo de un corazón bioartificial apto para el trasplante

Laura Vidaña Martínez

Grado de Bioquímica

Año académico 2012-13

DNI del alumno: 47664099A

Trabajo tutelado por Francisco José García Palmer
Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud

El autor autoriza el acceso público a este Trabajo de Fin de Grado.

Palabras clave del trabajo:

Regeneración cardíaca, corazón bioartificial, terapia celular, células madre, cultivo y diferenciación de células madre mesenquimales.

Índice

1. Introducción	4
2. Enfermedad cardíaca	4
3. Regeneración cardíaca	5
3.1 Terapia celular	6
3.1.1 Células madre	6
3.1.2 Procedimiento	7
3.1.2.1 Regeneración mediante células madre embrionarias	8
3.1.2.1 Regeneración mediante células madre mesenquimales	8
3.1.2.3 Regeneración mediante mioblastos esqueléticos	8
3.1.2.4 Regeneración mediante células madre residentes en el corazón	9
3.1.2.5 Regeneración mediante iPSCs	9
3.1.3 Pros y contras de la terapia celular	10
3.2 Parches cardíacos para la reparación local	10
3.2.1 Pros y contras del uso de parches cardíacos	12
3.3 Corazón bioartificial	13
4. Creación de un corazón bioartificial	13
4.1 Matriz extracelular como andamiaje para la construcción de un corazón	15
4.1.1 Importancia de la matriz extracelular	15
4.1.2 Componentes principales de la matriz extracelular y su función	15
4.1.3 Fuentes de obtención de la matriz extracelular	16
4.1.3.1 Matrices obtenidas de intestino	16
4.1.3.2 Matrices cardíacas de cerdo y proceso de obtención	16
4.1.3.3 Matriz de corazón humano	18
4.2 Obtención, cultivo y diferenciación de las células del paciente	18
4.2.1 Utilidad de los distintos tipos celulares	19
4.2.2 Obtención, cultivo y diferenciación de las células madre mesenquimales	20
5. Propuesta técnica	20
5.1 Descelularización de la matriz	21
5.2 Obtención y adaptación de las células del paciente	23
5.3 Recelularización de la matriz	23
5.4 Comprobación de la viabilidad	24
6. Discusión	26
7. Conclusiones	27
8. Bibliografía	28
9. Abreviaturas	30

Resumen

La cardiopatía isquémica, producida por una falta de suministro de oxígeno y nutrientes a las células cardíacas, causa unos 7,25 millones de muertes al año.

El procedimiento actual más utilizado para el tratamiento de la disfuncionalidad cardíaca derivada es el trasplante de corazón.

Debido al envejecimiento de la población y la disminución de accidentes, los corazones aptos para el trasplante no abastecen la demanda, por lo que se estudian nuevas líneas de tratamiento: la terapia celular, los parches cardíacos y la creación de corazones bioartificiales.

En el presente trabajo se analizan los pros y contras de las terapias regenerativas mencionadas y se propone un protocolo para el desarrollo de un corazón bioartificial, el cual se divide en: Obtención de una matriz de soporte, obtención de células cardíacas a partir de tejido adiposo del paciente y recelularización de la matriz con estas células.

El protocolo se basa en las últimas técnicas descritas para la regeneración cardíaca y permite una nueva fuente de órganos, que además tienen como ventaja evitar el rechazo inmune, pues sus células contienen la misma información genética del paciente

Abstract

Ischemic heart disease, derived from a lack of oxygen and nutrients in heart cells, results in about 7.25 million deaths annually.

Nowadays, heart transplantation is the most used procedure for the treatment of cardiac dysfunction derived from ischemia.

Due to the increase of old population and the decrease of traffic accidents, hearts for transplantation don't supply the demand, so that new lines of treatment are being studied: cell therapy, cell sheets and bioartificial hearts creation.

In this paper the advantages and disadvantages of regenerative therapies mentioned before are analyzed, and a protocol for the development of a bioartificial heart is proposed. This protocol is divided into the following points: Getting a support matrix, obtaining cardiac cells from patient adipose tissue and matrix recellularization with these cells.

This protocol is based on the latest described techniques of cardiac regeneration and allows a new source of organs with an important advantage; these bioartificial organs contain cells with the same genetic information of the patient, avoiding immune rejection and use of immunosuppressor treatments.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial. La cardiopatía isquémica causa unos 7.25 millones de muertes al año, seguida de la afección cerebro vascular, que causa 6.15 millones de muertes anuales^{1,2}.

En los últimos años se ha conseguido reducir la mortalidad por cardiopatía isquémica. No obstante, las personas que han sobrevivido al infarto de miocardio sufren una disfuncionalidad cardíaca que no siempre es reversible y que comporta complicaciones a largo plazo, creándose un nuevo grupo de población con disfunción cardíaca³.

Hoy en día, las personas con este tipo de disfuncionalidad avanzada, se tratan con gran cantidad de medicamentos. Al mismo tiempo aguardan, tras una larguísima lista de espera, un nuevo órgano que les permita recuperar su calidad de vida⁴.

Aunque en España seamos pioneros en trasplantes y con una sociedad bastante concienciada de la importancia de la donación de órganos, las listas y tiempo de espera para un trasplante siguen aumentando. Esto es debido a que, con una población más longeva, cada año aumenta el número de pacientes afectados sin que aumente el número de órganos disponibles⁵. Cabe tener en cuenta que tan solo un 60% de los órganos donados son aprovechables⁶.

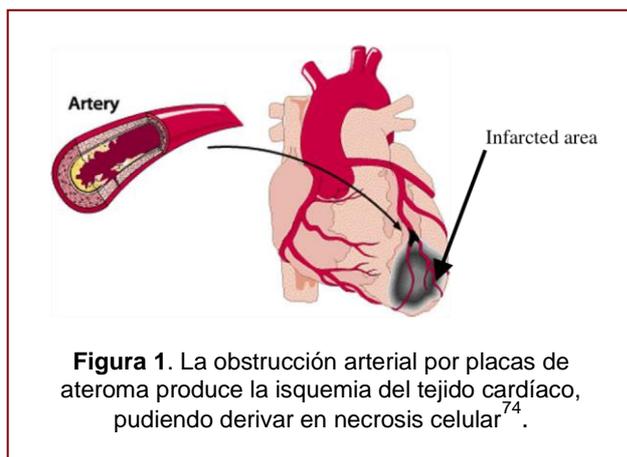
Además, el paciente que consigue un trasplante, tras la operación debe llevar a cabo un exhaustivo tratamiento con inmunosupresores para evitar el rechazo, puesto que al introducir células exógenas, el sistema inmune puede actuar sobre ellas al igual que sobre cualquier otro cuerpo extraño, induciendo su destrucción⁷. El tratamiento con inmunosupresores debilita las defensas del organismo para que no ataque al nuevo órgano, pero también le deja desprotegido frente a patologías que en la población sana son inofensivas, pudiendo convertirse en un peligro mortal⁸.

Con estos datos, podemos entender que hoy en día se intente apostar cada vez más por la innovación en técnicas de recuperación de la funcionalidad cardíaca, buscando nuevas terapias que disminuyan la mortalidad y las complicaciones a largo plazo de los pacientes con disfuncionalidad cardíaca. Cada vez son más los ensayos clínicos que se ponen en marcha para evaluar la viabilidad de utilizar tratamientos con terapia celular con dicho fin, al igual que las investigaciones que proponen y testan nuevas técnicas como los parches celulares o la creación de órganos bioartificiales.

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica exhaustiva para conocer los procedimientos existentes de regeneración cardíaca, en base a la cual, se realizará la propuesta de un procedimiento para la creación de un corazón bioartificial apto para el trasplante.

2. Enfermedad cardíaca

Conocemos como cardiopatía isquémica al conjunto de síndromes originados por isquemia miocárdica, es decir, producidas por una falta de suministro de oxígeno y nutrientes a las células cardíacas⁹. En más del 90% de los casos, la isquemia miocárdica se produce por una obstrucción de las arterias coronarias ateroscleróticas². Las arterias coronarias son las encargadas de proporcionar



sangre al músculo cardíaco, y se las denomina ateroscleróticas cuando presentan placas de ateroma en su interior. Las placas de ateroma, cúmulos de grasa y células inmunes que quedan adheridas lenta y progresivamente a las paredes de los vasos sanguíneos, pueden llegar a obstruir totalmente el conducto. Además, también pueden romperse, formando trombos de plaquetas y fibrina, y viajar a través del torrente sanguíneo hasta llegar a un vaso de menor diámetro, obstruyéndolo¹⁰. Cuando

se da la obstrucción podemos hablar de 4 síndromes: El infarto de miocardio, en el que la obstrucción se da de forma súbita, con una duración e intensidad que puede conllevar a la necrosis de las células del miocardio; la angina de pecho, que es una forma menos intensa del infarto de miocardio, y que no conlleva la muerte celular; la cardiopatía isquémica crónica con insuficiencia cardíaca y la muerte súbita cardíaca⁹.

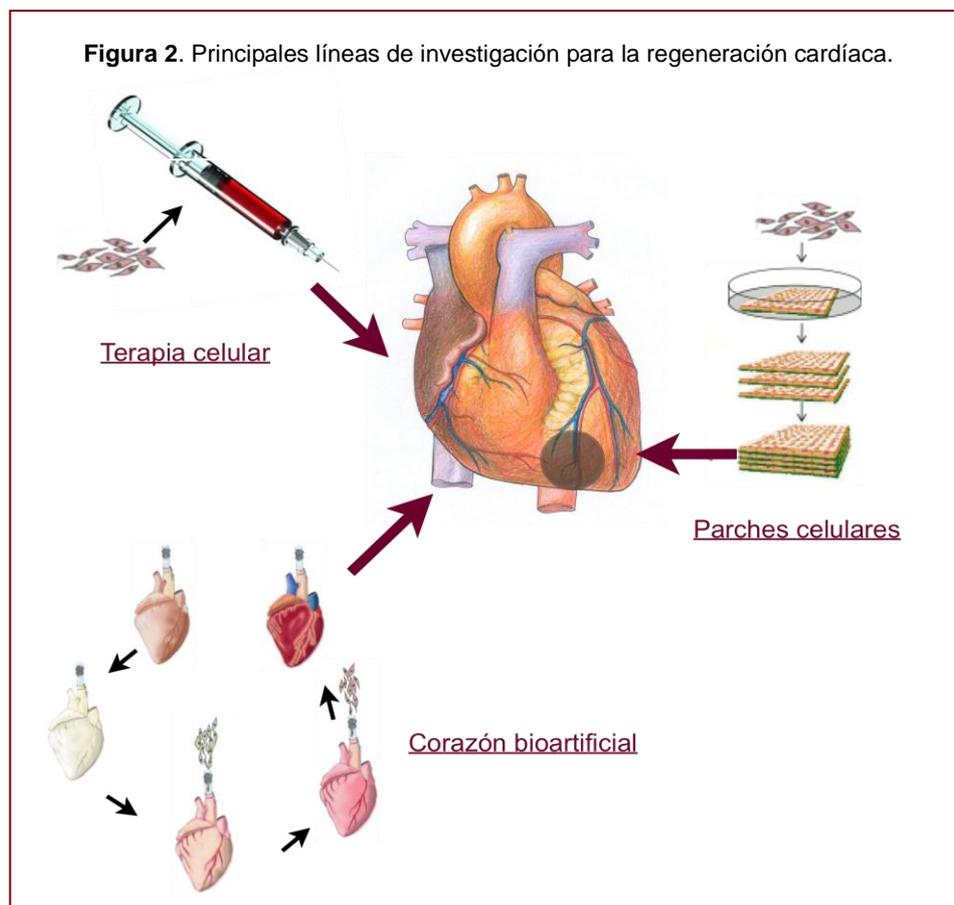
Si el riego sanguíneo no se restablece rápidamente, se da la muerte celular irreversible de la zona afectada. El corazón iniciará una serie de respuestas compensatorias para mantener la función cardíaca a unos niveles medianamente aceptables. No obstante, estas respuestas compensatorias conllevarán importantes consecuencias a nivel bioquímico, morfológico y funcional. A nivel bioquímico, la primera respuesta será el inicio de la glucólisis anaerobia, que aunque permita la obtención de energía en situación de déficit de oxígeno, provocará la producción inadecuada de ATP y creatinina y la acumulación de productos perjudiciales como el ácido láctico. Estos cambios a nivel bioquímico son reversibles al restablecerse el riego, pero si se mantienen terminan por inducir la muerte celular. A nivel morfológico, la necrosis de una región celular conducirá a la relajación de miofibras, pérdida de glucógeno y tumefacción con posterior formación de densidades amorfas en las mitocondrias. Pasado un día tendrá lugar la infiltración de neutrófilos, y al cabo de tres días, la desintegración progresiva de miofibras muertas y fagocitosis de células muertas por macrófagos. En una semana se observará la formación precoz de tejido de granulación fibrovascular y depósito de colágeno. A partir de las dos semanas se formará una cicatriz de colágeno denso. A nivel funcional, esta cicatriz no tendrá la capacidad contráctil, mecánica o eléctrica propia del músculo cardíaco, aportando más carga de trabajo al corazón, aumentándose la disfunción y apareciendo signos claros de fallo cardíaco^{9,11}.

3. Regeneración cardíaca

Cuando tenemos el caso de un paciente en las últimas fases de un fallo cardíaco, solo podemos recurrir a dispositivos de asistencia ventricular mecánica o al trasplante de corazón. No obstante, dado el alto coste de la implantación y mantenimiento de los dispositivos de asistencia ventricular, que pueden llegar a rondar los 100.000 euros¹², y a la baja disposición de órganos de donantes,

muchos pacientes mueren esperando una solución⁴. Por esta razón, son muchas las investigaciones puestas en marcha para aportar nuevas terapias que regeneren el tejido cardíaco.

A continuación se detallan algunas de las nuevas líneas de investigación propuestas para la regeneración cardíaca, como son la terapia celular, la utilización de parches celulares y la creación de órganos bioartificiales:



3.1 Terapia celular:

La terapia celular se basa en la utilización de células madre como tratamiento para sustituir células dañadas por células nuevas, y por eso, hoy en día se consideran a las células madre como medicamentos, estando sujetas a la normativa española y europea que regula ensayos clínicos con medicamentos^{7,13}. Para entender mejor este tipo de terapia antes se deben conocer varios conceptos clave:

3.1.1. Células madre

Las **células madre** son un tipo celular indiferenciado caracterizado por su capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares, su capacidad de autorrenovación, es decir, dividirse y hacer copias de sí mismas de forma indefinida, y por su capacidad de colonizar, integrarse y originar nuevos tejidos¹³.

En animales superiores, las células madre se han clasificado en dos grandes grupos, las células madre embrionarias y las células madre adultas³.

Las **células madre embrionarias**, como su nombre indica, proceden del embrión³. Si proceden del cigoto o los primeros estadios del embrión tienen capacidad totipotente. En cambio, si proceden de la masa interna del blastocisto, que es el embrión que tiene entre 60 y 200 células, tendrán capacidad pluripotente¹⁴. Tanto las células totipotentes como pluripotentes son capaces de dar lugar a todos los tipos de células del organismo, pero sólo las totipotentes pueden además formar las células placentarias. Por tanto, a partir de las células embrionarias se podrán formar células de las tres capas embrionarias encargadas de formar los distintos tejidos del organismo: el endodermo (tejido pulmonar y gastrointestinal), mesodermo (sistema cardiovascular, sangre, sistema urogenital, músculos, cartílago y hueso) y ectodermo (tejido nervioso)^{3,13}.

Las **células madre adultas**, por otro lado, son células que proceden de un tejido de un organismo adulto³. Estas células tienen capacidad multipotente o unipotente¹⁵. Las células madre multipotentes también pueden dar lugar a diferentes tipos celulares, pero normalmente de una única capa embrionaria, es decir, de un sistema fisiológico, órgano o tejido concreto. Por otro lado, las células madre unipotentes son aquellas que solo podrán diferenciarse en un tipo celular^{3,13,15}.

Las células madre embrionarias se obtienen de embriones sobrantes tras la fertilización *in vitro* en las clínicas de reproducción humana. Aunque en teoría es factible aislarlas sin dañar el embrión, su uso plantea muchos problemas éticos y legales, y suelen utilizarse únicamente en investigación^{13,14}.

Las células madre adultas se obtienen de los diferentes tejidos. Se han aislado más de 20 tipos de células madre adultas, como las de médula ósea, sangre periférica, piel, cerebro, corazón, pulmón, páncreas, cartílago, músculo esquelético, tejido adiposo o cordón umbilical^{13,15}.

Las primeras células madre que se utilizaron, y continúan siendo las más utilizadas en la clínica, son las células madre sanguíneas, formadoras de sangre o hematopoyéticas, utilizándose para enfermedades hematológicas como las anemias, leucemias, inmunodeficiencias o en la aplasia medular¹³.

Hay cerca de 2000 ensayos clínicos que tratan de demostrar la bondad del tratamiento con células madre para múltiples afecciones^{13,14}.

3.1.2. Procedimiento

La terapia celular pretende la utilización de las células madre para la reparación de los tejidos dañados¹⁶. En teoría, esto puede hacerse por estimulación de células madre residentes en un tejido (mediante estimulación con factores tróficos o extracción, expansión *in vitro* y posterior retorno al paciente), con células madre adultas (extrayéndolas, expandiéndolas y diferenciándolas o transdiferenciándolas *in vitro* en el tipo celular deseado y finalmente transfiriéndolas al paciente), o con células madre embrionarias (mediante diferenciación *in vitro* y posterior transferencia al paciente). Utilizar un tipo u otro de célula madre variará principalmente en el proceso de obtención y de diferenciación celular^{7,14}.

Vía de administración: Es primordial intentar que las células madre se depositen sobre la zona dañada, y que permanezcan ahí, aunque esto no es nada fácil. Se realizan principalmente

inyecciones intracoronarias, que son las más utilizadas, inyecciones intramiocárdicas e inyecciones transendocárdicas^{3,16}.

3.1.2.1. Regeneración mediante células madre embrionarias

Las células madre embrionarias son las de mayor capacidad de regeneración tisular, pues a partir de ellas se pueden obtener una cantidad indeterminada de cardiomiocitos. Además, al tener menor cantidad de antígenos de superficie en sus membranas celulares, presentan otra principal ventaja, su menor inmunorreactividad. No obstante, su uso se ha visto limitado por su riesgo a formar teratomas, es decir, la diferenciación de las células en un tejido distinto al que les rodea, o por temas éticos^{3,14}.

3.1.2.2. Regeneración mediante células madre mesenquimales

En la extracción de células de médula ósea obtenemos dos tipos de células madre, hematopoyéticas y mesenquimáticas. Las primeras se encargarán de generar células sanguíneas o epiteliales¹³, mientras que las células mesenquimáticas podrán diferenciarse en cardiomiocitos, células endoteliales o adipocitos entre otros. Este tipo celular no sólo se obtiene de la médula ósea, sino que también del tejido adiposo, y por su facilidad de obtención son muchos los ensayos que se decantan hacia esta fuente¹⁷.

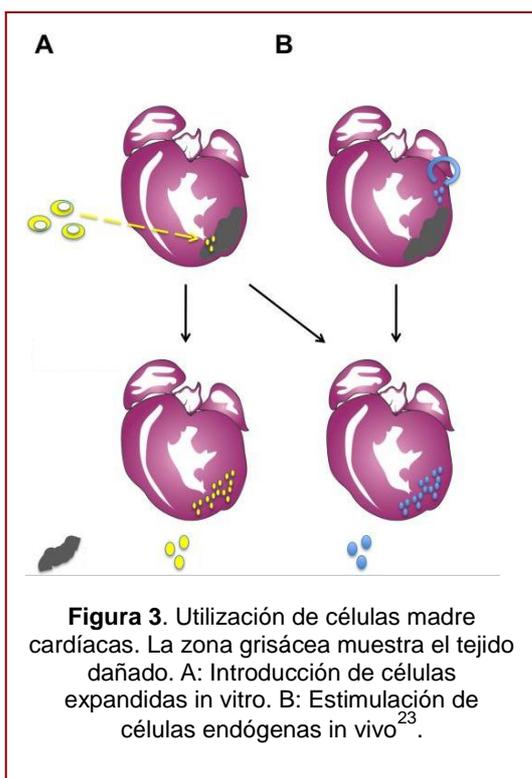
Las células madre mesenquimales pueden diferenciarse a cardiomiocitos, previniendo la remodelación (conversión de tejido muscular a cicatricial) y mejorando la movilidad miocárdica, o en células endoteliales y de músculo liso, incorporándose a la formación de nuevo tejido cardiovascular^{14,17}.

En el caso de las células madre de médula ósea, los estudios se dirigen más hacia la inyección directa de las células madre sobre el tejido cardíaco, en lugar de diferenciarlo previamente, puesto que se ha demostrado su capacidad de diferenciarse en cardiomiocitos *in vivo*^{11,17}. Algunos investigadores han probado con éxito la manipulación génica de estas células con vectores para mejorar la anidación celular y supervivencia tras el trasplante celular¹⁸.

3.1.2.3. Regeneración mediante mioblastos esqueléticos

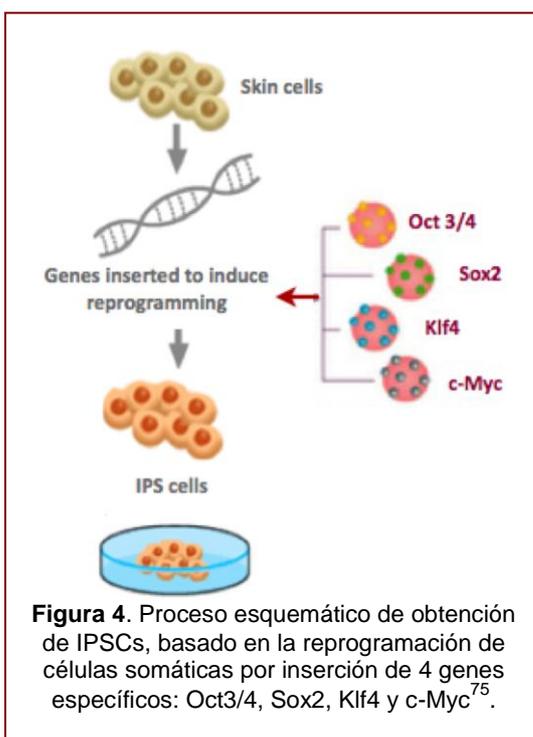
Los mioblastos esqueléticos son células que se encuentran en las fibras musculares, pueden ser utilizados como precursores celulares para formar nuevos miocitos¹⁹. Se obtienen mediante biopsia muscular, lo cual facilita su trasplante autólogo³. Tienen capacidad de crecer *in vitro* permitiendo la obtención de cantidades en número elevado; capacidad de continuar replicándose *in vivo* y relativa resistencia a la isquemia, lo que permite su integración a tejidos con pobre irrigación sanguínea o que han sufrido hipoxia como la del miocardio que ha sufrido un infarto²⁰. Han demostrado disminuir la disfunción ventricular izquierda y mejorar la función sistólica, aumentando la capacidad de ejercicio, aunque siguen habiendo resultados dispares, posiblemente por la técnica de cultivo o inserción celular utilizada^{3,19}. Gracias a estudios con esta tipología celular se ha visto que otro factor importante en la regeneración del tejido es la zona de inyección, pues los beneficios de la terapia celular han sido mayores al realizar inyección en la cicatriz periférica que al realizarla de forma directa en el centro de la cicatriz²⁰.

3.1.2.4. Regeneración mediante células madre residentes en el corazón



Estas células han sido aisladas en el tejido cardíaco con la posibilidad de expansión *in vitro*²¹. Pueden diferenciarse a células endoteliales, de músculo liso y cardiomiocitos, además de poder integrarse funcionalmente en el tejido miocárdico local^{3,22}. Se han descrito cúmulos celulares de origen atrial o ventricular de corazones adultos de humanos y murinos, estos cúmulos demostraron marcadores de células progenitoras vasculares. Además, tienen propiedades de células madre cardíacas y se diferencian en cardiomiocitos y células vasculares^{22,23}. Se barajan dos opciones de terapia con este tipo de células madre: por un lado su extracción, expansión *in vitro* y posterior implantación en el paciente, y por otro lado, una opción que parece ser menos invasiva, la estimulación de estas células madre in vivo con

factores de crecimiento para que formen nuevos cardiomiocitos sin necesidad de cirugía^{21,23}. Esta segunda opción deriva de los estudios con zebrafish y mamíferos neonatales²⁴, pero aún no se ha logrado demostrar que la división de este tipo celular, pueda ser estimulada de forma efectiva o fiable en el corazón de un humano adulto.



3.1.2.5. Regeneración mediante células madre de pluripotencia inducida (iPSCs)

Los últimos avances científicos han demostrado que podemos obtener células indiferenciadas, con las características de una célula madre, denominadas iPSCs (del inglés "induced pluripotent Stem Cells") a partir de células ya diferenciadas²⁵.

A través de una reprogramación, que se basa en la introducción de 4 genes específicos, se consigue la desdiferenciación de células somáticas, permitiendo seguidamente la diferenciación de estas células reprogramadas en el tipo celular que deseemos. Esto nos permitiría, por ejemplo, la formación de células cardíacas a partir de células de la piel de un paciente, sin que se diera rechazo al implantarlas^{25,26}.

Se prevé que las iPSCs pueden abrir enormes oportunidades en la regeneración tisular²⁵, no obstante, son muchos los puntos débiles de la técnica que se interponen en que pueda ser un tratamiento seguro en humanos. Los problemas en la aplicación de iPSCs incluyen el desarrollo de cáncer y teratomas, problemas de inmogenecidad con los genes insertados para la reprogramación e incluso, se han descrito problemas epigenéticos, que influyen en la regulación de la transcripción génica de las células reprogramadas²⁶⁻²⁸. Poco a poco se van estudiando modificaciones de la técnica que disminuyan su riesgo, y se van aportando datos preclínicos que apoyan la seguridad y eficacia de las iPSCs^{26,29}.

3.1.3 Pros y contras de la terapia celular

Como hemos visto, la terapia celular tiene un gran potencial, pues nos permite obtener por diferenciación el tipo celular deseado. No obstante, son muchos sus puntos débiles.

En primer lugar debemos tener en cuenta problemáticas de desdiferenciación o formación de teratomas una vez insertadas en el tejido dañado. Este proceso tiene mayor o menor probabilidad dependiendo del tipo de célula madre de partida. El tipo celular que menos problemática tendría en este aspecto serían las células residentes en el corazón, no obstante su número y capacidad de división es muy limitada, y la estimulación in vivo de esta división aún no ha sido bien estudiada en humanos.

En segundo lugar debemos tener en cuenta la dosis celular administrada. El porcentaje de retención celular después del trasplante es menor al 10%. Por lo que podríamos decir que se trata de una técnica muy poco eficiente, con una pérdida muy importante de células en el proceso³⁰. Las dosis empleadas en los ensayos clínicos varían desde $7 \cdot 10^7$ hasta $2.5 \cdot 10^9$ con resultados variables en cuanto a la mejoría del tejido y supervivencia de las células trasplantadas, por lo que podemos decir que no existe una dosis perfecta para cada tipo celular, aunque los resultados tiendan a ser mejores cuanto más cantidad de células utilizemos³.

Sería interesante seguir investigando procedimientos que disminuyeran la probabilidad de transdiferenciación, para aumentar la viabilidad de esta técnica, así como investigar métodos que permitieran una mejor adhesión al tejido. Un aumento en el porcentaje de retención sería uno de los puntos más interesantes, puesto que con las características actuales, la terapia celular, de forma exclusiva, no permitiría una regeneración del tejido cicatricial en pacientes con un fallo cardíaco avanzado.

3.2 Parches cardíacos para la reparación local

En la terapia celular buscamos la inyección de células suspendidas o libres en el tejido dañado, pero existe otra técnica basada en la preparación de un "parche celular", más conocido como cell sheet³¹. Se trata una lámina de células comunicadas entre sí, dispuestas sobre un soporte o matriz que les proporciona estructura, adecuándolas a la posterior implantación sobre el tejido dañado³². Esta técnica se ha estudiado y utilizado en modelos animales para la reconstrucción de varios tejidos³³, tales como la córnea, el tejido hepático, el tejido peridental o el tejido cardíaco, tejido en el que nos centraremos a continuación.

Para la formación de láminas cardíacas se han utilizado células precursoras de cardiomiocitos, y, más recientemente, células madre mesenquimales, que se van diferenciando a medida que crecen sobre la matriz^{31,34}.

Se han estudiado diferentes materiales y tipos de matriz, desde matrices biodegradables que una vez implantadas se van consumiendo, hasta matrices termo-sensibles que permiten separarse de la capa celular justo antes del trasplante, evitando que los compuestos de desecho interfieran en la correcta adaptación al tejido dañado³². Estas últimas son de las más estudiadas hoy en día, y se conocen como polímeros PIPAAm³⁴.

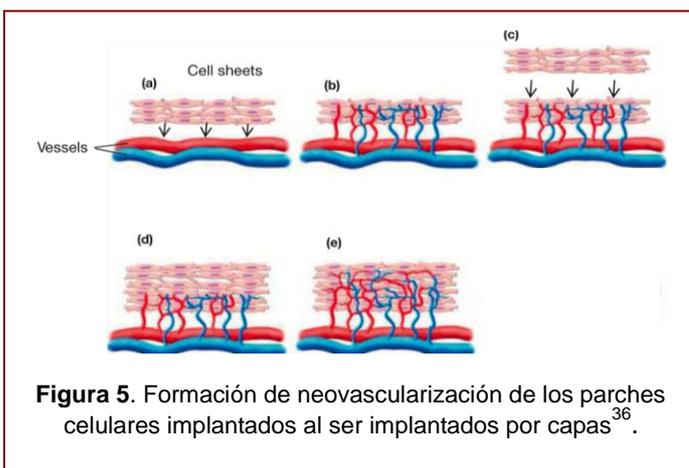


Figura 5. Formación de neovascularización de los parches celulares implantados al ser implantados por capas³⁶.

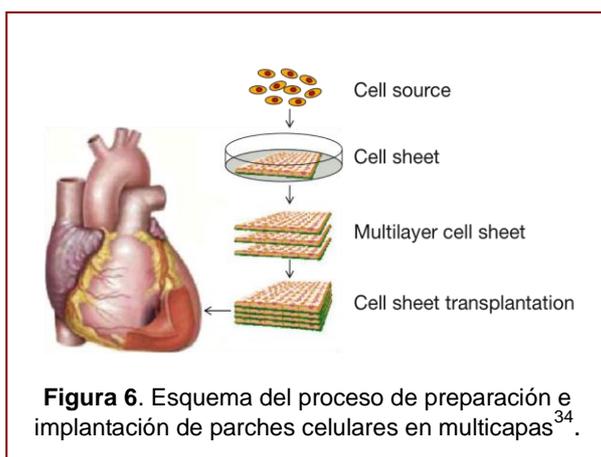
Los diferentes estudios nos muestran como estas láminas celulares son capaces de latir de forma sincronizada, antes incluso de introducirlas en el tejido dañado³⁵. Se ha observado que para que la contracción sea sincronizada, al superponer varias láminas es imprescindible que se formen uniones tipo Gap (Figura 5), y que la formación

de estas uniones entre células, se ve favorecida por proteínas secretadas por la matriz extracelular (proteínas que se incluyen en la matriz y el medio utilizados para la formación de las láminas celulares)^{34,35}.

En las láminas de células cardíacas se observó la formación de agrupaciones de células epiteliales. Esto sugiere que la formación de redes epiteliales se activa por interacciones célula-célula y proteínas secretadas por cardiomiocitos para favorecer la neovascularización. Esta neovascularización ocurre in vivo inmediatamente después de implantar las láminas celulares sobre el tejido, generándose, en unos pocos días, la reconstrucción y organización de vasos sanguíneos en el interior del injerto³⁶.

Hay que tener en cuenta que no se pueden cultivar láminas muy gruesas sobre las matrices, puesto que el centro de la masa celular que estamos elaborando se queda sin nutrientes. Por ello, una de las opciones para conseguir un injerto grueso se basa en la superposición de capas delgadas. Las capas individuales se injertan con una distancia temporal determinada entre ellas que permita la formación de nuevos vasos capaces de irrigarlas (ver figura 5).

Para evitar la múltiple intervención se ha propuesto hasta la fecha es la formación de multicapas, intercalando células endoteliales, como por ejemplo de cordón umbilical, entre dos capas de mioblastos (ver figura 6). Así se consigue que las células endoteliales insertadas formen redes vasculares y se ha demostrado que se da un aumento de la neovascularización y mejora de la función cardíaca en corazones isquémicos³⁴.



La mayoría de estos estudios se han hecho en murinos, no obstante, se ha descrito algún caso en humanos. Un ejemplo, es el de un paciente con disfunción cardíaca que utilizaba marcapasos a la espera de un trasplante de corazón. A este paciente se le trasplantó un parche cardíaco de mioblastos esqueléticos, obtenidos del muslo del propio paciente. Se le injertó un parche de unos 4cm de diámetro aproximadamente, el cual había sido cultivado en una matriz termosensible. Tras la

separación de las células de la matriz se injertó la lámina con ayuda de una membrana de soporte. Las células de la lámina fueron capaces de regenerar el tejido cardíaco dañado en gran medida. Tres meses después de la intervención, las ecocardiografías mostraban que se había reducido la dilatación del ventrículo derecho provocada por la insuficiencia. La mejora llevó a los médicos a retirar el marcapasos. Pasados seis meses el paciente salía del hospital, aunque en la bibliografía no se indica la evolución posterior del paciente³⁴.

Además de la reconstrucción del tejido, esta técnica permite otra gran ventaja, puede aprovecharse para probar fármacos sobre el tejido cardíaco *in vitro*, asegurando una mayor viabilidad antes de empezar un ensayo clínico en humanos³⁷.

3.2.1 Pros y contras del uso de parches cardíacos

Esta técnica evita en gran medida los problemas que observábamos con la terapia celular. En primer lugar, con la terapia celular teníamos graves problemas por una retención celular menor al 10%. Con la realización de parches, estas células ya están organizadas, han crecido en una matriz que ha permitido la interacción y unión entre células, por lo que al introducirlas en parche y no en suspensión, la adhesión al tejido dañado será mucho más efectiva.

En segundo lugar, otro problema de la terapia celular era la posible transdiferenciación *in vivo*, una vez insertadas en el tejido. Con esta técnica no se evita esta transdiferenciación, pero sí se reduce el riesgo, puesto que tenemos en observación a las células durante su crecimiento y formación del parche, por lo que podemos ver antes de insertarlo en el tejido si hay cambios en las células. Y por otro lado, al hacer crecer las células en conjunto y continua comunicación, les proporcionamos un medio constante, que disminuirá la probabilidad de transdiferenciación, puesto que las señales que inducen este proceso suelen ser cambios en el ambiente que rodea la célula en cuestión.

A pesar de todo, se debe seguir investigando, puesto que estos procedimientos se han estudiado ampliamente en murinos, pero son escasos los estudios en humanos, desconociéndose la duración de la viabilidad de los parches, o la superficie máxima o profundidad del daño que podrían regenerar, por ejemplo.

3.3. Corazón bioartificial

Cada año son muchas las personas que mueren esperando un nuevo órgano, única forma actual de sobrevivir a un fallo cardíaco avanzado¹. Además, las personas que consiguen un nuevo corazón requieren del tratamiento prolongado con inmunosupresores, que debilitan sus defensas y pueden producir hipertensión o enfermedades renales, entre otros efectos adversos^{8,38}. En vista de la falta de órganos se plantea un nuevo procedimiento: la creación de órganos bioartificiales.

El fundamento, de forma sencilla, se basa en utilizar una matriz como andamiaje para la construcción de un nuevo corazón, cuyas células, que provienen del propio paciente, han sido procesadas y dirigidas para cubrir la matriz. Una vez verificada la viabilidad del órgano, sería trasplantado al paciente, el cual no tendría porque tener problemas de rechazo, puesto que las células cardíacas tendrían la misma información genética³⁸.

Por tanto, para la construcción de este órgano artificial se precisan tres cosas: Una matriz para el soporte, obtener y adecuar las células del paciente para recubrir el corazón y, por último, testar la funcionalidad del órgano antes de ser trasplantado.

El presente trabajo se centrará en esta última opción para la regeneración cardíaca, estudiando paso a paso, y de forma exhaustiva, todo lo necesario para poder llevar a cabo la creación de un corazón bioartificial.

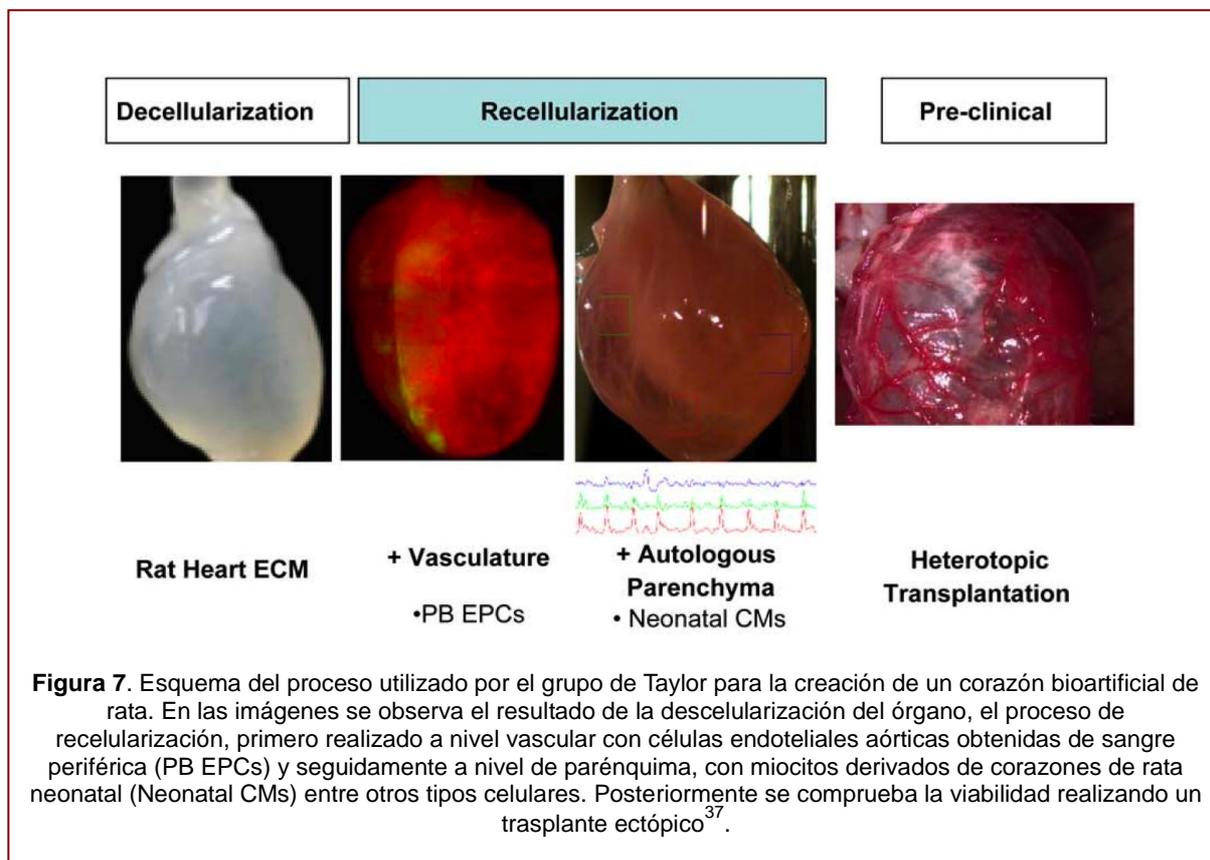
4. Creación de un corazón bioartificial

En 1993, Langer y Vacanti publicaron una novedosa estrategia para la ingeniería de tejidos³⁹. Su propuesta se basaba en la creación de una estructura tridimensional, obtenida por la combinación de células, matriz extracelular (MEC) y factores de crecimiento, que permitieran crear órganos bioartificiales en el laboratorio. Desde entonces son muchos los estudios que se han puesto en marcha para desarrollar esta idea a nivel de los distintos órganos del cuerpo humano^{40,41}.

Los estudios más significativos en la creación de corazones bioartificiales han sido los realizados en ratas por Doris A. Taylor en la universidad de Minnesota, los de Wainwright y Weymann con matrices de corazón porcino y los realizados con matrices de corazones humanos por el Dr. Francisco Fernández-Avilés del Hospital Gregorio Marañón, en Madrid.

Por un lado, el grupo de investigación de Doris A. Taylor consiguió demostrar la posibilidad de crear un corazón bioartificial viable de rata⁴². Para ello, en primer lugar realizó la descelularización total de un corazón cadavérico de rata. La descelularización es el proceso por el cual, a partir de detergentes, eliminamos todas las células y material genético de un tejido, dejando una estructura o matriz formada por colágeno, entre otros componentes proteicos, que servirá como soporte del nuevo órgano^{43,44}. Seguidamente, procedió a la recelularización de los conductos vasculares de la matriz a través de la perfusión arterial y venosa con células endoteliales de aorta de rata. El siguiente paso fue la adición de aproximadamente 120 millones de miocitos cardíacos neonatales, fibroblastos y células madre en el ventrículo izquierdo seguido por la estimulación eléctrica y mecánica durante 4 días.

Al cuarto día se observaba un órgano contráctil (movimiento representado en las líneas de color en la figura 7. Para demostrar la compatibilidad biológica, este órgano fue trasplantado en el abdomen de una rata, conectado directamente a la aorta. El procedimiento se realizó repetidas veces y se observó que la persistencia media in vivo era de 7 días^{37,42}.



Posteriormente, los estudios de Wainwright y Weymann demostraron la posibilidad de descellularizar corazones de mayor tamaño, corazones de cerdo^{45,46}.

El siguiente paso, la experimentación a nivel humano, la llevo a cabo el grupo de investigación del Dr. Francisco Fernández-Avilés. Sus estudios parecen demostrar la posibilidad de la descellularización de corazones humanos cadavéricos, siguiendo los pasos realizados en ratas del equipo de Doris A. Taylor, y obteniendo matrices celulares que podrían servir como base para la futura creación de corazones bioartificiales. Los estudios del Dr. Francisco Fernández-Avilés no se encuentran publicados como artículos científicos, posiblemente por problemáticas asociadas a las patentes de la técnica. No obstante, en la web se encuentran publicación de pósters y documentales interesantes en los que el Dr. Avilés en persona explica el fundamento de estos estudios^{47,48}.

En los apartados subsiguientes se detallan todas las opciones y procedimientos estudiados para llevar a cabo la creación de un corazón bioartificial, desde la obtención de la matriz, la obtención, cultivo y diferenciación de las células del paciente y la comprobación de la viabilidad del órgano.

4.1 Matriz extracelular como andamiaje para la construcción de un corazón

4.1.1 Importancia de la matriz

La MEC juega un papel fundamental en la organización tisular. Consiste en una compleja red de macromoléculas que desarrollan diferentes funciones, la primera y principal es la de sostén, gracias a su organización en una única estructura tridimensional tejida específica⁴⁹. Esta estructura no solo facilita la cohesión de células y tejidos, sino que proporciona una adecuada organización para que las células en migración puedan desplazarse e interactuar entre sí de manera ordenada. Esto se consigue gracias a que la MEC sirve como lugar de unión de múltiples receptores de superficie celular, como reservorio para factores de señalización que modulan procesos como la angiogénesis o la vasculogénesis, migración celular, proliferación y orientación celular, inflamación, respuestas inmunes o procesos de regeneración cuando se produce una herida^{44,49}.

Desde el descubrimiento de que los componentes de la MEC jugaban un papel en la conversión de los mioblastos a miotúbulos⁵⁰, o en la morfogénesis de las glándulas salivares⁵¹, entre otros efectos, se cambió la idea de que la matriz solo es un sistema de soporte, pasando a realizar numerosos estudios para averiguar su potencial y aplicaciones en el desarrollo y regeneración de órganos y tejidos⁴⁴.

4.1.2 Componentes principales de la matriz extracelular y su función

Como se comenta anteriormente, la MEC es tejido específica, pues las concentraciones de sus componentes varía según la función y estructura que precisa el órgano o tejido. El principal componente de la MEC es el colágeno^{52,53}. Se trata de una proteína de secuencia aminoacídica muy conservada, por lo que las matrices de algunos órganos animales presentan proteínas extremadamente similares, como es el caso de matrices bovinas^{44,54}.

Otra proteína muy abundante de la MEC es la fibronectina⁵⁴, que gracias a su papel como ligando para la adhesión de diferentes tipos celulares, tiene relevante importancia en la reparación tisular⁴⁴.

La laminina tiene un rol importante en la formación y mantenimiento de estructuras vasculares. La vascularización de las matrices de parches celulares (como se vio en apartados anteriores), y de órganos bioartificiales suele ser uno de los pasos limitantes para conseguir resultados viables^{44,53}.

Los glicosaminoglucanos son otro componente importante de la MEC, pues permiten la retención de agua, aportan las características de gel a la MEC y permiten la unión de factores de crecimiento y citocinas⁵³. Este último punto es muy importante, puesto que, aunque estén en muy bajas concentraciones, los factores de crecimiento y citoquinas tienen un fuerte impacto en la modulación del comportamiento celular. Por ejemplo, en la MEC encontramos VEGF (factor de crecimiento endotelial y vascular) encargados de fomentar la formación de vasos sanguíneos, o el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), que fomenta la epitelización cuando se produce una herida⁴⁴.

4.1.3 Fuentes de obtención de la matriz extracelular

Existen diferentes fuentes para la obtención de matrices extracelulares:

En cuanto a las **matrices sintéticas**, en 2003 se empezó por crear estructuras o matrices tubulares. Desde entonces, diferentes investigadores utilizaron colágeno tipo I, o hidrogeles de fibrina y silicona biodegradables que se recubrían con células cardíacas con el objetivo de formar vasos sanguíneos similares a la aorta^{4,27,30,33,39-41,44,55,56}. Estas estructuras de generación de presión cardíacas mostraban movimientos contráctiles de las células miocárdicas y se demostró la resistencia y funcionalidad de estas estructuras al trasplantarlas en ratas y ratones.

Es mucha la bibliografía científica en la que se habla de diferentes polímeros, tanto naturales como sintéticos, y constituyentes de las MEC para la formación de matrices sintéticas que servirían como andamiaje para la construcción de nuevos órganos. No obstante, no se han descrito estudios que demuestren poder construir matrices sintéticas de órganos completos.

Parece ser que los estudios de obtención de **matrices naturales** han tenido más éxito en la adquisición de una matriz de un órgano completo. En cuanto al origen de obtención de estas matrices, concretamente para la regeneración cardíaca, podemos encontrar desde partes de distintos órganos animales, como el intestino⁴⁴ o las válvulas cardíacas⁵⁷ hasta la obtención de la matriz de un corazón completo de cerdo^{45,46}.

4.1.3.1 Matrices obtenidas de intestino

Uno de los mayores problemas de la creación de órganos bioartificiales, como hemos ido comentando en otros apartados, es la vascularización. Para conseguir una rápida vascularización de las células que sostiene la matriz, una vez implantada en el huésped, se ha pensado en usar matrices de tejidos que fueran irrigados en una gran superficie, aunque con conductos vasculares pequeños, como los intestinos. Así pues, algunos estudios han probado que es posible la obtención de MEC de tejido intestinal a partir de procesos de descélularización⁵⁸. Estas MEC podrán luego ser adaptadas a la creación de distintos órganos bioartificiales. Este tipo de MEC las podemos encontrar registradas como BioVaM®⁵⁵.

4.1.3.2 Matrices cardíacas de cerdo y proceso de obtención

Se han realizado numerosos estudios sobre la utilización de matrices porcinas para la regeneración de varios tejidos del cuerpo, como estructuras musculares, tendones y válvulas cardíacas^{4,44,55}. Gracias a estos estudios se conocieron aspectos muy interesantes en cuanto a la utilización de matrices porcinas. Algunos de estos aspectos incluyen que estas matrices apenas precisan de modificación para su uso como andamiaje, simplemente se realiza una descélularización y un proceso de esterilización. Además se ha visto que, tras la recélularización de las matrices, el proceso de remodelación suele ser siempre similar: Inmediatamente después de la implantación in vivo, se produce un intenso infiltrado de leucocitos polimorfonucleares y células mononucleares. Pasadas 72h desde el trasplante, la infiltración pasa a ser casi completamente de células mononucleares y se observa primeras evidencias de neovascularización. Entre los días 3 y 14 del trasplante, el número de células mononucleares

aumenta, la neovascularización se vuelve intensa, y se observa una progresiva degradación de la matriz xenogénica asociada a una deposición de nueva matriz producida por el huésped. Pasados los 14 días, se observa una disminución de la infiltración de células mononucleares y se observa la formación de parénquima tejido específico, formado por fibroblastos, células musculares lisas,

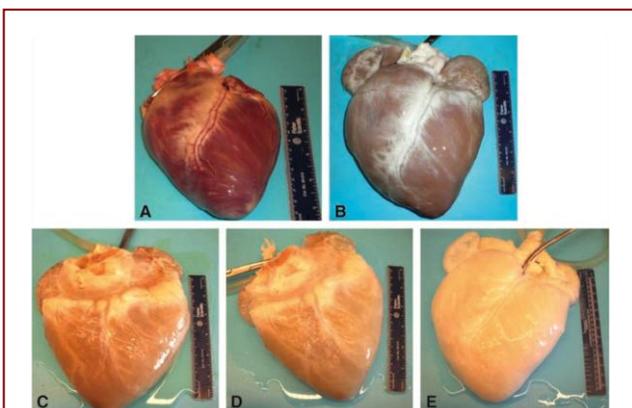


Figura 8. Resultado de la descelularización de un corazón de cerdo. Las imágenes de la A a la E representan el estado del órgano a distintos tiempos del proceso, desde el corazón intacto (A) hasta una vez finalizada la descelularización (E)⁴⁵.

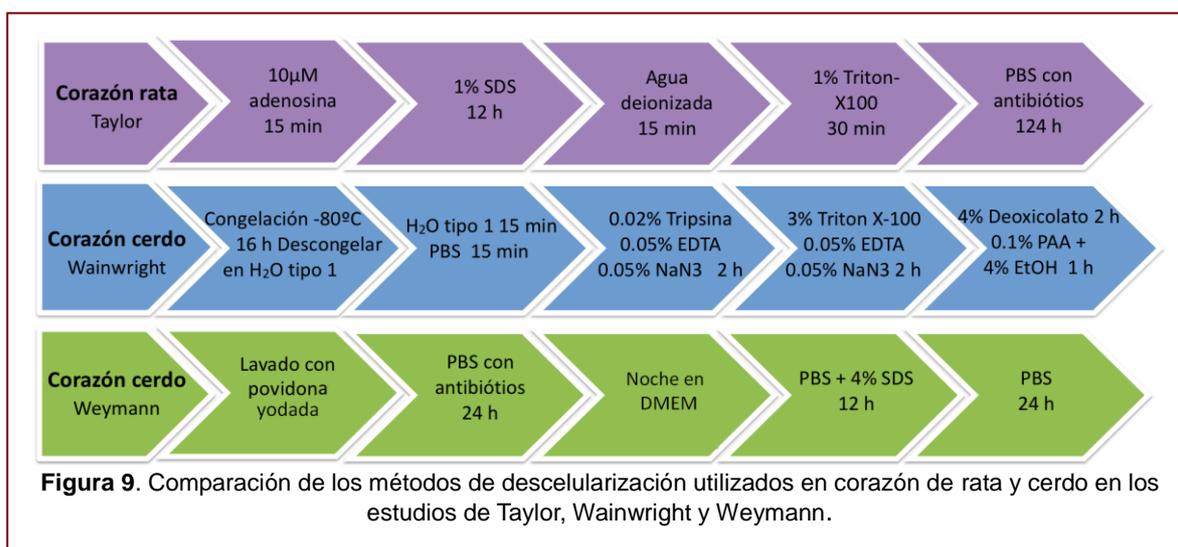
células musculoesqueléticas y/o células epiteliales, dependiendo del lugar donde se haya hecho el implante. No se suele observar necrosis celular ni formación de tejido cicatricial en el proceso⁴⁴.

En 2010 se realiza un gran avance en la obtención de matrices porcinas gracias a los estudios de Wainwright, y es que se consigue la descelularización del corazón completo, manteniendo su estructura y funcionalidad⁴⁵. Puesto que no es nada sencilla la fabricación de una matriz tridimensional de dimensiones equivalentes a un órgano completo, pensar en utilizar la propia matriz que nos brinda la naturaleza, en lugar de intentar imitar su estructura, parece ser la opción más viable.

Anteriormente, diferentes estudios habían demostrado poder descelularizar un corazón por completo. Los primeros estudios en ratas fueron los realizados por Ott et al. en 2008⁴², en los que se basaron los estudios posteriores de Doris A. Taylor, quien consiguió la recelularización de la matriz y trasplante en ratas. Pero en 2010 se consigue extrapolar el proceso de descelularización a corazones porcinos. El proceso estándar lo establecieron los estudios de Wainwright⁴⁵, y en 2011 los estudios de Weymann⁴⁶. parecen haber conseguido una simplificación del proceso de descelularización.

Para la obtención de esta matriz se utiliza la perfusión de detergentes en el tejido que eliminan por completo las estructuras celulares. Esta descelularización no altera significativamente las

Para la obtención de esta matriz se utiliza la perfusión de detergentes en el tejido que eliminan por completo las estructuras celulares. Esta descelularización no altera significativamente las



concentraciones de colágeno o glucosaminoglucanos, entre otros componentes imprescindibles de la matriz^{42,45,46}. Las diferencias entre los procesos de descelularización de corazón de rata y cerdo se describen en la figura 9.

Para demostrar la integridad de estas matrices se realizan infusiones de resina para generar moldes que muestren el entramado vascular de la matriz obtenida, observándose que se mantienen desde las estructuras coronarias principales hasta los vasos de cuarto y quinto orden. Además se realizan trasplantes heterotópicos de estas matrices conectándolas al sistema circulatorio de ratas y observándose un flujo de entrada de sangre normal^{20,42}. Para comprobar que se ha eliminado el material génico se realizan cuantificaciones de ADN de distintas zonas de la matriz. Finalmente se realizan una serie de mediciones de estabilidad mecánica, que se basan en la medición de presión de la matriz al pasar líquido por los conductos vasculares a alta presión^{42,45,46}.

4.1.3.3 Matriz de corazón humano

Los estudios para la obtención de una matriz cardíaca completa han ido evolucionando, desde la obtención de una matriz cardíaca de rata hasta la de una de tamaño similar a la humana, la matriz cardíaca de cerdo.

Siguiendo la línea de los anteriores descubrimientos, parece ser que el equipo del Dr. Avilés ha conseguido la descelularización de corazones humanos. Aunque, como se comentó anteriormente, no existen publicaciones científicas que muestren el proceso y estado de la investigación, en el resumen del póster publicado indican que consiguieron descelularizar con SDS 19 corazones humanos en un tiempo de entre 4 y 8 días. Indican que obtuvieron matrices de arquitectura intacta y que comprobaron la biocompatibilidad utilizando células madre mesenquimales humanas procedentes de médula ósea y cardiomiocitos de ratón, observando su supervivencia y proliferación sobre la matriz⁴⁸.

Teniendo en cuenta la función de la matriz extracelular, que facilita la organización y cohesión celular^{44,49}, la utilización de una matriz cardíaca humana completa parece ser la opción óptima de andamiaje para la creación de un nuevo corazón.



Figura 10. Proceso de descelularización en corazones humanos⁷⁶.

Por esta razón, en este trabajo se intentará proporcionar una propuesta técnica para la obtención de una matriz cardíaca humana basada en los estudios realizados por Ott, Taylor, Wainwright y Weymann.

4.2 Obtención, cultivo y diferenciación de las células del paciente.

Al igual que sucedía en la terapia celular, para la recelularización de la matriz podemos utilizar distintos tipos celulares. La diferencia principal será que, en lugar de cubrir la zona dañada del corazón in situ, debemos formar el órgano por completo, lo que incluye mayor número de células y de más de una tipología celular. En el caso del desarrollo de un corazón necesitaremos,

concretamente, células musculares cardíacas y células endoteliales para el entramado vascular^{20,42}.

A continuación se analiza la utilización de los distintos tipos celulares para la creación de un órgano completo y se describe el proceso de obtención, cultivo y diferenciación de aquellos que parecen viables para dicho fin.

4.2.1 Utilidad de los distintos tipos celulares

Como se comentaba al analizar los pros y contras de la terapia celular, las células madre embrionarias y las iPSCs permitirían la obtención de cualquier tipo celular, aunque acarrear muchos problemas en cuanto al control de la diferenciación/desdiferenciación y la formación de teratomas. Además, en el caso de las embrionarias existe un gran debate ético alrededor de su utilización, estando prohibido su uso en clínica en muchos países.

En cuanto a las células madre residentes en el corazón, podemos decir que su utilización es muy atractiva, puesto que estas células se diferencian por sí solas y de forma rápida en los dos principales tipos celulares que precisamos, las células musculares cardíacas y las endoteliales. Son el tipo celular utilizado mayoritariamente en la formación de corazones bioartificiales de rata^{20,42}. No obstante, su utilización para la creación de un corazón humano acarrea grandes inconvenientes.

En primer lugar, la obtención de células del corazón del paciente implica una cirugía importante en una situación muy arriesgada, puesto que estamos hablando de individuo con una funcionalidad muy disminuida de este órgano, y podemos poner la vida del paciente en riesgo.

Por otro lado, si obtenemos las células cardíacas de otro corazón, perdemos la posibilidad de realizar un trasplante "autólogo", por lo que no evitaríamos el riesgo de rechazo ni la problemática de los tratamientos inmunosupresores.

Además, las células madre cardíacas están presentes en muy pequeñas cantidades y presentan capacidad de división muy limitada⁵⁹, por lo que conseguir una cantidad adecuada para su posterior cultivo y recelularización de un órgano completo sería muy complicado.

Otra opción interesante son los mioblastos esqueléticos. La utilización de estas células en la terapia celular ha dado grandes resultados, demostrándose en muchos estudios una regeneración del tejido dañado^{4,20,60}. No obstante, aunque este tipo celular sea de mejor acceso que las células madre cardíacas, sigue habiendo problemas con la cantidad de células necesarias para la regeneración del corazón por completo.

Nos queda hablar de las células madre mesenquimales. Estas células se pueden diferenciar tanto en células musculares cardíacas como endoteliales y podemos obtenerlas tanto de tejido graso como de la médula ósea¹⁷. Parecen, por tanto, un tipo celular muy favorable para su utilización en la formación de un corazón completo, pues tenemos fácil obtención y gran cantidad. Dado que las enfermedades cardiovasculares suelen tener como causa principal la aterosclerosis, y esta suele ser derivada de un exceso en el consumo de grasas, la mayoría de pacientes con enfermedades

cardiovasculares, pueden presentar obesidad⁶¹. La opción de la liposucción para la extracción de las células mesenquimales podría entonces ser una doble ventaja para este tipo de pacientes. A partir de este proceso obtendríamos las células madre necesarias para la generación del nuevo órgano, y disminuiríamos las concentraciones de grasa abdominal que suelen conllevar a la aterosclerosis, mejorando el estado del paciente y previniendo la mayor acumulación de placas de ateroma.

Como contrapartida, tenemos que el proceso de diferenciación será más complicado que el de células madre residentes en el corazón o mioblastos cardíacos, aunque más fácil que en el caso de las células embrionarias o las iPSCs. Además, en los estudios con animales modelos no se ha estudiado este tipo celular para la creación de órganos completos, por lo que no se puede predecir fácilmente la evolución del proceso.

4.2.2 Obtención, cultivo y diferenciación de las células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales las podemos obtener de muestras de tejido adiposo, y en su defecto de médula ósea, tras un proceso de purificación¹⁷. El proceso de purificación se basa en una serie de lavados y centrifugaciones para eliminar restos de suero, anestésico o fracciones sanguíneas. Seguidamente se realizarán cultivos celulares, normalmente en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con suplementos de suero fetal bovino, para obtener un mayor número celular⁶²⁻⁶⁴. Finalmente se deberán realizar una serie de cultivos en condiciones concretas que permitan la diferenciación de las células mesenquimales en células musculares cardíacas y endoteliales. Concretamente se utilizan medios suplementados con 5-azacitidina para la diferenciación a células cardíacas. Se ha demostrado que la combinación de 5-azacitidina con otros componentes como inhibidores de P53 permiten la diferenciación a tipologías concretas de células cardíacas, como las células de Purkinje^{65,66}. No obstante, para la recelularización no se precisa una diferenciación tan concreta, pues en los experimentos en ratas esta se conseguía gracias a la organización de la MEC de corazón. Para la diferenciación de células a epitelio vascular también se describen varios procedimientos⁶⁷⁻⁷⁰, aunque el más sencillo se basa en la utilización de medios suplementados con FCS (suero fetal bovino) y VEGF, como sugieren los estudios de J. Oswald et al, demostrando su eficacia. Por último quedará la recelularización de la matriz con las células diferenciadas, proceso que solo a sido descrito a nivel cardíaco por los estudios del equipo de Taylor en ratas^{20,42}. Por esta razón estos estudios serán nuestra principal referencia en la propuesta del procedimiento de recelularización de un corazón humano.

5. Propuesta técnica para la realización de un corazón bioartificial

En este apartado se propone un protocolo para la realización de un corazón bioartificial, basándose en la bibliografía recogida y estimando cual debe ser la opción más viable, tanto en la elección del origen de la matriz celular, el tipo celular utilizado y su manejo y los procedimientos concretos de descelularización y recelularización. A continuación se muestra un esquema (figura 11) de la propuesta que se desarrolla y justifica en adelante:

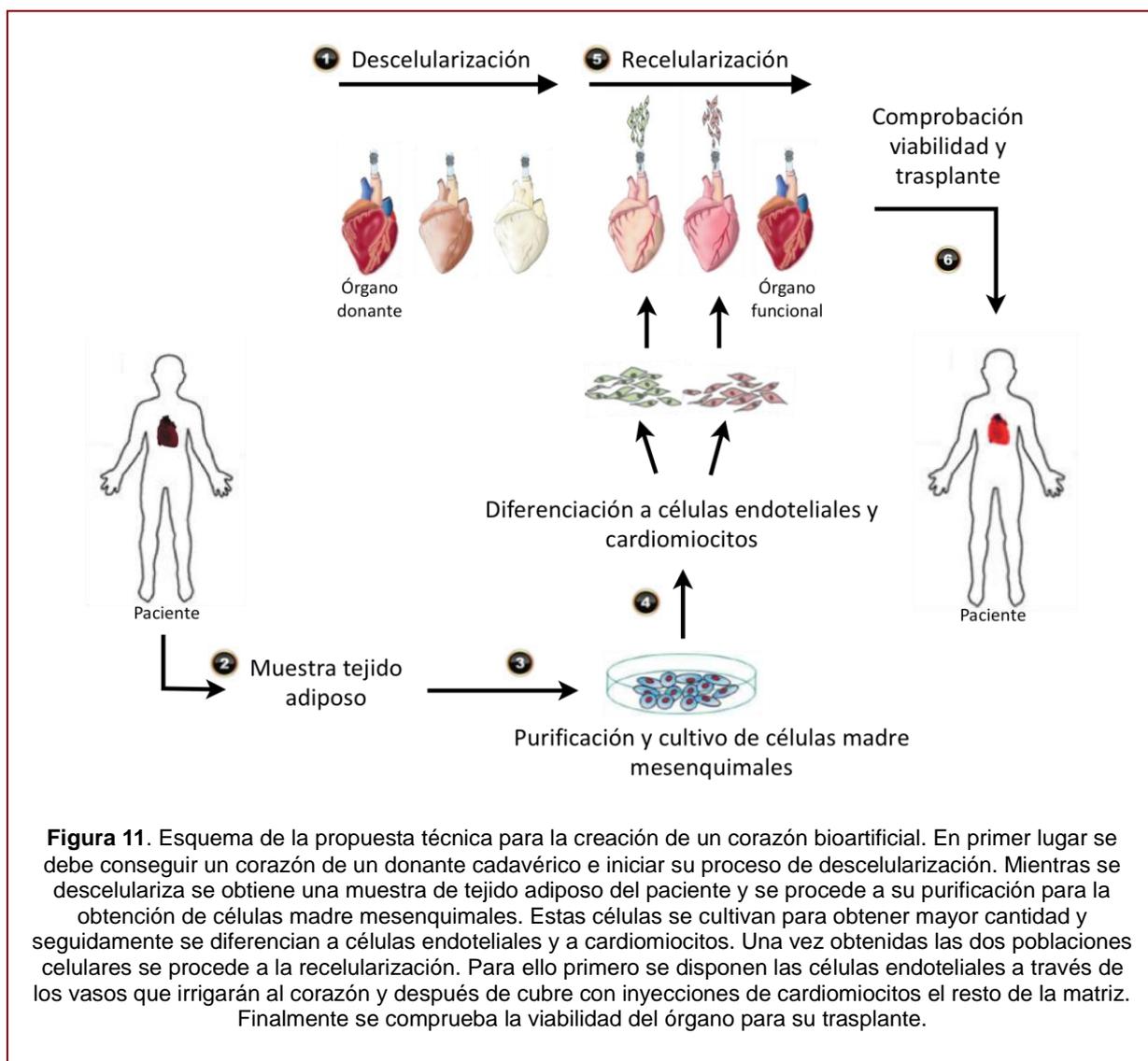


Figura 11. Esquema de la propuesta técnica para la creación de un corazón bioartificial. En primer lugar se debe conseguir un corazón de un donante cadavérico e iniciar su proceso de descclularización. Mientras se descclulariza se obtiene una muestra de tejido adiposo del paciente y se procede a su purificación para la obtención de células madre mesenquimales. Estas células se cultivan para obtener mayor cantidad y seguidamente se diferencian a células endoteliales y a cardiomiocitos. Una vez obtenidas las dos poblaciones celulares se procede a la recelularización. Para ello primero se disponen las células endoteliales a través de los vasos que irrigarán al corazón y después de cubrir con inyecciones de cardiomiocitos el resto de la matriz. Finalmente se comprueba la viabilidad del órgano para su trasplante.

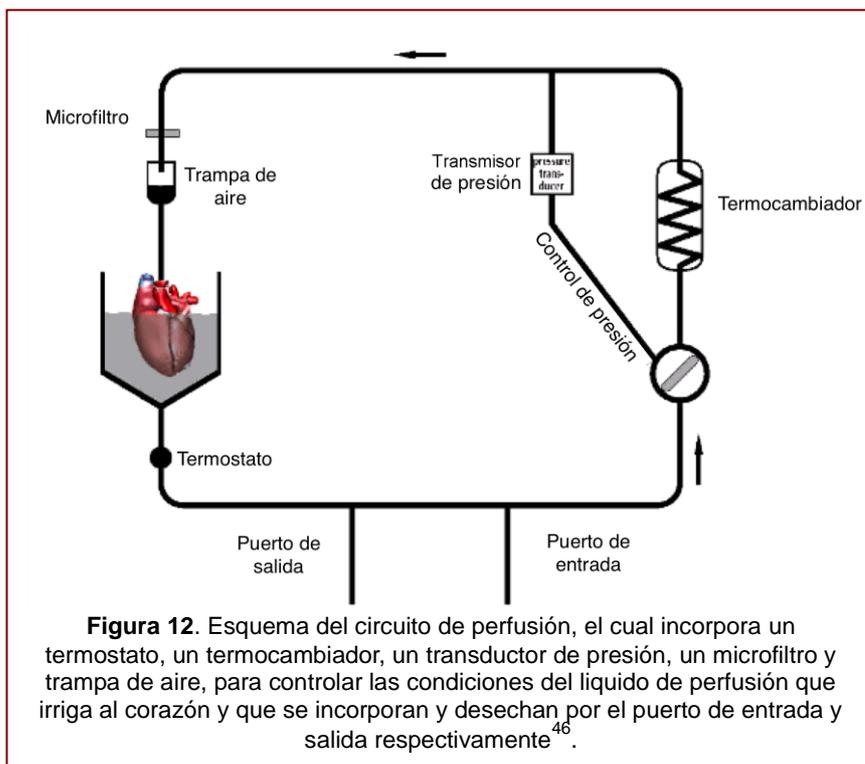
5.1 Descclularización de la matriz

El primer paso para la creación del corazón bioartificial será la descclularización de un corazón donante. Este corazón puede obtenerse de aquellos corazones que son donados para el trasplante de pacientes, pero que son desechados por problemas de compatibilidad órgano-paciente o por problemas en el tejido como necrosis producidas durante la extracción o transporte del órgano, como propuso el Dr. F. Avilés. Además, si este método de creación de órganos bioartificiales se pone en marcha de forma estandarizada, se podrían utilizar como fuente los corazones con disfuncionalidad que han sido reemplazados por un nuevo corazón. Esta última opción permitiría que no se dependiera de donantes cadavéricos, por lo que se compensaría en gran medida la problemática oferta-demanda que existe hoy en día.

Una vez tenemos el órgano donante, el procedimiento de descclularización propuesto se describe a continuación, y está basado en los estudios en cerdo de Weymann⁴⁶, los más actualizados en cuanto a descclularización de corazones de medida similar a la humana.

1. Preparación del órgano: Retirar exceso de grasa y tejido conjuntivo del corazón. Lavado en solución Ringer a 25°C para retirar coágulos de sangre.

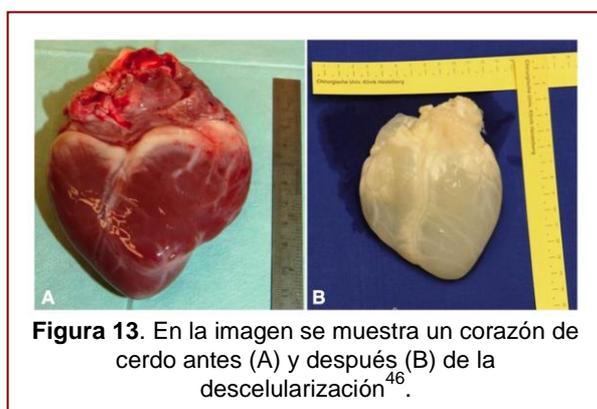
2. Lavado: Se introduce el corazón en un recipiente con solución de povidona yodada y se lava durante 30 minutos. A continuación se deja en solución con PBS y antibióticos (penicilina y estreptomycin) durante 24h, procurando que el líquido inunde el entramado vascular. Por último incubar durante la noche en DMEM a 4°C.



3. Preparación del circuito de perfusión: Conexión de la aorta con una cánula de 25 a 27mm para perfusión retrograda.

El contenido de perfusión a través de la cánula se recoge en un depósito y se bombea por el circuito, pasando por un filtro. Para evitar la formación de burbujas que alteren la circulación del líquido de perfusión, el

mecanismo contiene una trampa de aire. El líquido de perfusión estará regulado en cuanto a temperatura y presión gracias a un transmisor de presión y su correspondiente medidor, que mantendrán la presión constante a 100mmHg, y a un termocambiador y termostato de control que mantendrán la temperatura constante a 37°C. Los puertos de entrada y salida permitirán el cambio de los detergentes utilizados en la perfusión. El volumen de líquido total del circuito es de 2.5 litros. Se puede observar un esquema del circuito en la figura 12. Todos los materiales del circuito deben ser esterilizados correctamente antes de iniciar el proceso.



4. Perfusión de detergentes: Una vez preparado el circuito de perfusión procedemos a introducir solución PBS con 4% de SDS durante 12 horas. Cada 3 horas se introducirá solución de PBS durante 15 minutos para retirar residuos. Pasadas las 12 horas se realiza un lavado final con PBS durante 24h. En la figura 13 se muestra el resultado esperado.

5.2 Obtención y adaptación de las células del paciente

Mientras se realiza la descelularización del corazón, procederemos a la obtención y cultivo de las células madre mesenquimales a partir de muestra de tejido adiposo del propio paciente. El procedimiento de obtención y cultivo descrito a continuación sigue la metodología descrita por Wagner, Yoshimura y Almeida⁶²⁻⁶⁴. Una vez cultivadas, estas células deberán ser diferenciadas a células endoteliales para que, en el posterior paso de recelularización, se utilicen en el recubrimiento de los vasos que irrigarán al nuevo corazón. Por otro lado, una fracción de células mesenquimales serán diferenciadas a células musculares cardíacas o cardiomiocitos^{65,66}, las cuales recubrirán toda la estructura de la matriz.

1. **Obtención** de la muestra: La fracción de células madre mesenquimales del tejido adiposo se extrae de lipoaspirados del abdomen o muslo del paciente bajo anestesia. Los lipoaspirados se obtienen con cánulas de dos, tres o cuatro milímetros de diámetro, posteriormente se lavan con PBS y son digeridos con colagenasa tipo I durante 30 minutos a 37°C. Después son centrifugados para obtener un pellet celular. Este pellet es resuspendido en tampón de lisis de eritrocitos y la solución resultante se hace pasar a través de un filtro de 100 µm. Una vez filtrado se centrifuga de nuevo. Tras resuspender las células, estas se siembran en soportes de cultivo para la expansión celular.

2. **Cultivo** celular: Las células se cultivan como cultivos primarios durante un periodo de 5 días en un medio de crecimiento compuesto de DMEM con un 10% de Suero Fetal Bovino y un 1 % de PSA antibiótico-antimicótico en el incubador a 37°C y 5% CO₂. Pasado este tiempo han llegado a un estado de confluencia, y se procede a expandir las células para lo cual es necesario despegar las células de la superficie de cultivo mediante la utilización de una solución de 0,05% tripsina/EDTA. Se resuspende las células en medio fresco, se determina la densidad y viabilidad celular en la suspensión celular obtenida y se siembran las mismas en nuevas superficies de cultivo celular hasta que lleguen al estado de confluencia. Este proceso de expansión se repite hasta conseguir el número aproximado de células necesarias.

3. **Diferenciación a células endoteliales:** Se procederá incubando las células mesenquimales, en estado de confluencia, con un 2% de FCS y 50ng/ml de VEGF. Esta incubación se realiza durante una semana, cambiando el medio cada dos días.

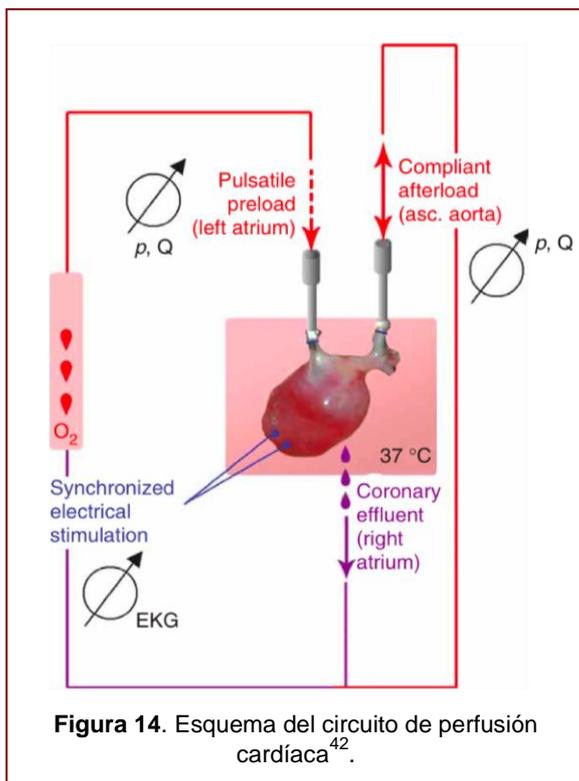
4. **Diferenciación a cardiomiocitos:** Se procederá incubando las células mesenquimales, en estado de confluencia, con 10 µmol de 5-azacitidina durante 24 horas. Tras la incubación, las células se lavan y pueden mantenerse hasta su utilización en DMEM con 1% de penicilina-estreptomina.

5.3 Recelularización de la matriz

El proceso de recelularización descrito se basa en el estudiado por Ott y Taylor en ratas⁴². 1. Canulación de la aurícula y la aorta ascendente con cánulas de 16 a 18G. Estas son suturadas a electrodos de estimulación, al igual que el ápice del corazón. Introducimos el corazón en un biorreactor y se realiza una perfusión oxigenada con medio celular a 37°C durante 24 horas. Así

establecemos una nutrición y pH fisiológico a la matriz. El biorreactor se basa en un sistema de trabajo que somete al corazón a una presión de precarga, poscarga y presión intraventricular fisiológica. Además está estimulado eléctricamente a partir de las 24 horas de perfusión a un voltaje inicial de 5V que se va incrementando progresivamente hasta los 20 V. El suero oxigenado y con antibióticos entra a través de la aurícula izquierda y sale a través de la válvula aórtica. La distensión pulsátil del ventrículo izquierdo y un bucle de llenado de fluido unido a la aorta ascendente proporcionan perfusión coronaria y poscarga que imitan la situación fisiológica. El perfundido coronario sale a través de la aurícula derecha. La precarga y poscarga se miden con transductores de presión. Este circuito puede apreciarse en la figura 14.

2. Para la reendotelización, o recubrimiento de los vasos con células endoteliales, se realiza una perfusión retrógrada en un circuito cerrado a través de la aorta. La cantidad de células endoteliales utilizadas para la recelularización en ratas fue de $2 \cdot 10^7$ células. Al no tener referencias en procesos de recelularización en corazones humanos, podríamos hacer una estimación aproximada correlacionando el peso del corazón de ambas especies. Teniendo en cuenta que el peso medio de un corazón de rata ronda $1g^{71}$, y el peso de un corazón humano oscila entre los 280g en mujeres y los 320 en hombre^{72,73}, podríamos necesitar del orden de $56-64 \cdot 10^8$ células endoteliales. Tras la perfusión de estas células se da una pausa de 45 minutos para permitir la unión y establecimiento de las células. Pasado este tiempo se inicia la perfusión con medio de cultivo



durante una semana para que estas células se mantengan bien nutridas y se favorezca su crecimiento.

3. Para la recelularización de la musculatura cardíaca podríamos necesitar del orden de $14 - 16 \cdot 10^9$ células en humanos, teniendo en cuenta que en los estudios en ratas se utilizaron de $50-75 \cdot 10^6$ células miocárdicas. Las células se inyectan suspendidas en PBS en la parte anterior del ventrículo izquierdo con una aguja de 27G y una jeringa de tuberculina de 1 cc. El diámetro de la aguja es importante por el tamaño celular, un diámetro más pequeño ejercería demasiada presión de paso para los cardiomiocitos, pudiendo inducir la rotura de sus membranas. El medio se debe ir cambiando cada 24 horas.

5.4 Comprobación de la viabilidad

En los distintos estudios de descelularización y recelularización realizados en animales se han descrito procedimientos para la comprobación del correcto proceso de formación del nuevo órgano^{20,42,45,46}. Son muchos los resultados favorables, aunque la mayoría implican una disección

del tejido para estudiarlo por porciones con métodos de tinción, técnicas moleculares o inmunoensayos. En ratas si se han realizado estudios de funcionalidad sin diseccionar el órgano, concretamente se realizaban trasplantes ectópicos, conectando el corazón artificial directamente a la aorta del animal⁴². El problema es que para comprobar la viabilidad del órgano antes del trasplante no podemos realizar este tipo de estudios, y nos deberemos limitar a imitar las condiciones fisiológicas en el interior del paciente, induciendo el bombeo de líquido a través de todos los vasos cardíacos, y comprobando la actividad contráctil del órgano mediante estímulos eléctricos. Estos procesos de ya se utilizan para la descelularización y recelularización, por lo que la comprobación de la viabilidad se da a lo largo de todo el proceso de desarrollo del corazón bioartificial. Además se estudiará en detalle la morfología celular, para detectar cualquier variación, como por ejemplo, algún cambio morfológico indicativo de desdiferenciación celular. El órgano solo podrá ser trasplantado si la morfología se observa adecuada, el flujo es el correcto y se mantiene a la presión adecuada para hacer llegar la sangre a todo el organismo, incluso realizando una actividad física moderada.

6. Discusión

La creación de órganos bioartificiales comportaría grandes ventajas, puesto que sería una solución a la limitación de la menor oferta de órganos para el trasplante, principal tratamiento hasta la fecha para la insuficiencia por cardiopatía isquémica.

Para la creación de órganos bioartificiales la fuente de obtención de estos podría provenir de los propios corazones intercambiados por el nuevo órgano, por lo que no se dependería de donantes cadavéricos. Esta opción tiene una serie de ventajas, como por ejemplo el hecho de poderse utilizar células autólogas, por lo que no hay peligro de rechazo y se repara el corazón por completo y no solo una parte. Frente a otras líneas de investigación en regeneración cardíaca vemos que la utilización de corazones artificiales presenta las siguientes ventajas:

En comparación con la terapia celular, se descartan los problemas de retención celular y se observa todo el proceso de diferenciación y reorganización de las células de la matriz antes del trasplante.

En cuanto a la utilización de parches celulares, permite la recuperación en una disfunción extendida. El parche celular solo sería útil en una zona pequeña y localizada del corazón. Además no hay que esperar a ciegas una unión y regeneración del tejido, ya vemos la salud del órgano antes del trasplante.

No obstante, al ser una propuesta pionera, tiene también sus desventajas:

Se precisa de mayor investigación con modelos animales, centrándose en estudios de riesgo de dediferenciación de las células madre miocárdicas o endoteliales implantadas, lo que conllevaría a una disfunción de órgano o a la aparición de teratomas. Cabe decir que en modelos animales este efecto no ha sido observado, aunque también es cierto que no se han realizado estudios a largo plazo. Una posible solución para este último punto sería la utilización de células cardíacas, junto con nuevas técnicas, aún no descritas, que incrementaran su capacidad proliferativa. Hoy en día, su obtención pondría más en peligro al paciente de la mejoría que se podría derivar de la intervención.

La etapa del proceso menos estudiada es la recelularización de la matriz cardíaca, puesto que solo se ha realizado en ratas. Deberían realizarse más estudios en corazones de cerdo y, una vez adaptados los procedimientos, realizar estudios en matrices obtenidas de corazones humanos.

Otros procesos no descritos en profundidad hasta la fecha son la reorganización celular y diferenciación específicas que se dan sobre la matriz. Se ha observado que existe esta diferenciación, pero se desconoce el mecanismo. Se conoce que hay una fuerte implicación de la estructura de la matriz en este proceso, aunque debería estudiarse mejor la estabilidad de estas diferenciaciones específicas.

Por otro lado, preocupa el hecho de que no haya estudios en ratas que describan la supervivencia de estos animales con un corazón artificial de forma exclusiva. Sólo se han realizado estudios con trasplantes ectópicos, en los que el corazón propio del animal seguía realizando su función. Por esta razón debería estudiarse la supervivencia de estos animales modelo con un corazón artificial, lo que también ayudaría en la investigación de posibles problemáticas posteriores a la implantación.

7. Conclusiones

En este trabajo se ha realizado un análisis de las nuevas líneas de investigación propuestas para la regeneración cardíaca, estudiando sus puntos fuertes y puntos débiles.

Además, se ha propuesto un protocolo que en el futuro podría permitir la creación de corazones bioartificiales.

Podemos concluir pues, que la propuesta técnica desarrollada en el presente trabajo, aún y precisar de mayor investigación en distintos puntos, es un conjunto de las técnicas más modernas estudiadas hasta la fecha, y por tanto, recoge un protocolo adaptado a las capacidades técnicas actuales de la sociedad científica que permitiría avanzar en una solución a un problema creciente, la muerte por cardiopatía isquémica.

8. Bibliografía

La referencia indicada en el recuadro de las imágenes se refiere a la fuente de obtención la imagen original. La mayoría de imágenes han sido modificadas o adaptadas para la presentación en este trabajo.

1. OMS | ¿Cuál es la enfermedad que causa más muertes en el mundo? <http://www.who.int/features/qa/18/es/index.html>. Accessed 3/21/2013, 2013.
2. Medrano Albero MJ, Boix Martínez R, Cerrato Crespán E, Ramírez Santa-Pau M. Incidencia y prevalencia de cardiopatía isquémica y enfermedad cerebrovascular en España: Revisión sistemática de la literatura. *Revista Española de Salud Pública*. 2006;80(1):05-15.
3. Beeres SL, Atsma DE, van Ramshorst J, Schaliq MJ, Bax JJ. Cell therapy for ischaemic heart disease. *Heart*. 2008;94(9):1214-1226.
4. Jawad H, Lyon AR, Harding SE, Ali NN, Boccaccini AR. Myocardial tissue engineering *Br Med Bull*. 2008;87:31-47.
5. Burdiles P, Rojas O. Algunas reflexiones éticas sobre los trasplantes de órganos sólidos. *RED MED CLIN CONDES*. 2010;21(2):315.
6. Fábrica de órganos humanos - la nueva España - diario independiente de Asturias <http://www.lne.es/sociedad-cultura/2010/11/03/fabrica-organos-humanos/989100.html>. Accessed 3/21/2013, 2013.
7. Rosario V, Montero R. *Tratado de trasplantes de órganos*. España: Arán ediciones; 2006.
8. Sádaba B. Monitorización y efectos secundarios de los inmunosupresores en el trasplante *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2006;29.
9. Kumar A, Fausto. El corazón. In: *Robbins y cotran. patología estructural y funcional*. Madrid: Elsevier España; 2006:561.
10. Mattson Porth C. *Fisiopatología. salud-enfermedad: Un enfoque conceptual*. Médica Panamericana; 2006.
11. Jawad H, Ali N, Lyon A, Chen Q, Harding S, Boccaccini A. Myocardial tissue engineering: A review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2007;1(5):327-342.
12. Documentos TV - corazones artificiales. impulsos de vida, documentos TV - RTVE.es A la carta <http://www.rtve.es/alacarta/videos/documentos-tv/documentos-tv-corazones-artificiales-impulsos-vida/1839609/>. Accessed 5/28/2013, 2013.
13. Lui T. M. *Células madre, preguntas y respuestas sobre la donación y conservación de sangre del cordón umbilical*. Editorial médica panamericana; 2009.
14. Hernández Ramírez P, Dorticós Balea E. Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2004;20(3):0-0.
15. Prósper F, Verfaillie CM. Células madre adultas *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2003;26(3).
16. Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, et al. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2006;29.
17. Macías-Abraham C, del Valle-Pérez LO, Hernández-Ramírez P, Ballester-Santovenia JM. Características fenotípicas y funcionales de las células madre mesenquimales y endoteliales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2010;26(4):256-275.
18. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(24):2277-2286.

19. C. Chaques J, Herreros J, C.Trainini J. Cardiomioplastia celular. *Rev Argentina de cardiología*. 2003;71 n° 2:138.
20. Taylor DA, Robertson MJ. Fundamentos de la terapia celular para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares: No hay una célula adecuada para todo. *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(09):1032.
21. Suárez de Lezo J, Torres A, Herrera I, et al. Efectos de la movilización de células madre mediante el uso de factor estimulante de colonias granulocíticas en pacientes con infarto agudo de miocardio anterior revascularizado percutáneamente *Revista Española de Cardiología*. 2005;58(3):253-261.
22. Ott HC, Matthiesen TS, Brechtken J, et al. The adult human heart as a source for stem cells: Repair strategies with embryonic-like progenitor cells *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S27-39.
23. Choi WY, Poss KD. Cardiac regeneration *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:319-344.
24. Zhen Y, Wu Q, Xiao C, et al. Overlapping cardiac programs in heart development and regeneration *Journal of Genetics and Genomics*. 2012;39(9):443-449.
25. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine *Nat Cell Biol*. 2011;13(5):497-505. http://www.nature.com/ncb/current_issue/. doi: 10.1038/ncb0511-497.
26. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells *Circ Res*. 2013;112(3):523-533.
27. Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs *J Artif Organs*. 2011.
28. Pera MF. Stem cells: The dark side of induced pluripotency *Nature*. 2011;471(7336):7336-47.
29. Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: A roadmap to safe regenerative medicine *Stem Cells*. 2009;27(5):1050-1056.
30. Atala A. Engineering organs *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(5):575-592.
31. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction *Biomaterials*. 2003;24(13):2309-2316.
32. Yang J, Yamato M, Kohno C, et al. Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds *Biomaterials*. 2005;26(33):6415-6422.
33. Yang J, Yamato M, Shimizu T, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering *Biomaterials*. 2007;28(34):5033-5043.
34. Chang D, Okano T. Medical applications of cell sheet engineering. *Elsevier*. 2011:405.
35. Shimizu T. Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces *Circ Res*. 2002;90(3):40-48.
36. Sekiya S, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;341(2):573-582.
37. Taylor DA. From stem cells and cadaveric matrix to engineered organs *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20(5):598-605.
38. Taylor DA. Cells for the treatment, prevention, and cure of cardiovascular disease (stem cell symposium 2008). *Texas Heart Institute Journal*. 2009;36 (2):148.
39. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920.
40. Bonassa LJ, Vacanti CA. Tissue engineering: The first decade and beyond. *J Cell Biochem*. 1998;30:297 – 303.
41. Lanza RP, Langer R, Vacanit J. Principles of tissue engineering. *Academic Press*. 2000.
42. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-

- decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart *Nat Med*. 2008;14(2):213-221.
43. Syedain Z, Bradee A, Kren S, Taylor DA, Tranquillo RT. Decellularized tissue-engineered heart valve leaflets with recellularization potential *Tissue Eng Part A*. 2012.
44. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(5):377-383.
45. Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, et al. Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2010;16(3):525-532.
46. Weymann A, Loganathan S, Takahashi H, et al. Development and evaluation of a perfusion decellularization porcine heart model--generation of 3-dimensional myocardial neoscaffolds *Circ J*. 2011;75(4):852-860.
47. Redes para la ciencia » corazón bio-artificial <http://www.redesparalaciencia.com/tag/corazon-bio-artificial>. Accessed 6/2/2013, 2013.
48. COMUNICACIONES I Jornadas de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Gregorio Marañón.
<http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&ved=0CEMQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.iisgm.com%2Fwp-content%2Fuploads%2F2011%2F09%2FComunicaciones-I-jornadas-Investigaci%25C3%25B3n1.pdf&ei=iRCrUen6OMnQsgbWxIGYBg&usq=AFQjCNFG61wOXG0-URv4cRq3yNEOXijupA&sig2=vv7PJAKC3uZ9Hf87nwkK9Q&bvm=bv.47244034,d.yms>
49. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Uniones celulares, adhesión celular y matriz extracelular. In: *La célula*. Barcelona: Ediciones Omega; 2004:1065.
50. Hauschka SD, Koninberg IR. The influence of collagen on the development of muscle colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966;55:119.
51. Wessells NK, Cohen JH. Effects of collagenase on developing epithelia *in vitro*: lung, ureteric bud, an pancreas. *Dev Biol*. 1968;18:294.
52. Stevens A, Lowe JS. Células de sostén y matriz extracelular. In: *Histología humana*. Elsevier:55.
53. Silvera L, Barrios C. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Revista Científica Salud Uninorte*. 2012;16.
54. Junqueira LC, Carneiro J. Histología básica. *Barcelona.España*. 1996;1:987.
55. Badylak S, Obermiller J, Geddes L, Matheny R. Extracellular matrix for myocardial repair *Heart Surg Forum*. 2003;6(2):E20-6.
56. Margariti A, Winkler B, Karamariti E, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into endothelial cells capable of angiogenesis and reendothelialization in tissue-engineered vessels *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(34):13793-13798.
57. Gojo S, Toyoda M, Umezawa A. Tissue engineering and cell-based therapy toward integrated strategy with artificial organs *J Artif Organs*. 2011. www.refworks.com. doi: 10.1007/s10047-011-0578-4.
58. Mertsching H, Walles T, Hofmann M, Schanz J, Knapp WH. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation *Biomaterials*. 2005;26(33):6610-6617.
59. Terzic A, Perez-Terzic C. Terapia celular para la insuficiencia cardíaca *Revista Española de Cardiología*. 2010;63(10):1117-1119.
60. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation *Nat Med*. 1998;4(8):929-933.
61. Aguilera E. Infarto agudo de miocardio. 2005.
62. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402-1416.

63. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates *J Cell Physiol*. 2006;208(1):64-76.
64. Almeida KA, Campa A, Alonso-Vale MIC, Lima FB, Daud ED, Stocchero IN. Fracción vascular estromal de tejido adiposo: Cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: Estudio preliminar *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*. 2008;34(1).
65. An-lin L, Jing H, Yao L, et al. Cardiac differentiation and electrophysiology characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells. *Chin Med J*. 2012;125(18):3318-3324.
66. Tokcaer-Keskin Z, Akar AR, Ayaloglu-Butun F, et al. Timing of induction of cardiomyocyte differentiation for in vitro cultured mesenchymal stem cells: A perspective for emergencies this article is one of a selection of papers from the NATO advanced research workshop on translational knowledge for heart health (published in part 1 of a 2-part special issue). *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(2):143-150.
67. Portalska KJ. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells *ONE Alerts*. 2012.
68. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-384.
69. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(2):370-379.
70. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111(2):150-156.
71. Hill RW, Wyse GA. *Fisiología animal*. Ed. Médica Panamericana; 2006.
72. Thews G, Mutscheler E. *Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre*. Reverte; 1983.
73. Zeek PM. Heart weight. I. the weight of the normal human heart. *Arch Pathol*. 1942;34:820-832.
74. HeartPoint: Myocardial infarction <http://www.heartpoint.com/mi.html>. Accessed 6/1/2013, 2013.
75. Science and today's headlines - group 3 stem cells <http://intrad187s-f12-grosovsky.wikispaces.umb.edu/Group+3+Stem+Cells>. Accessed 6/3/2013, 2013.
76. Así es el corazón bioartificial español <http://actualidad.orange.es/ciencia/asi-es-corazon-bioartificial-espanol.html>. Accessed 6/3/2013, 2013.

9. Abreviaturas

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FCS	Suero fetal bovino
IPSC	Células madre de pluripotencia inducida
MEC	Matriz extracelular
PAA	Ácido peracético
PBS	Tampón fosfato salino
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular