



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

**FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARIA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE POSGRADO**

**DESARROLLO DE BIOENSAYOS PARA EVALUAR CITOTOXICIDAD Y ESTRÉS  
OXIDATIVO PARTICIPACIÓN DE CO-CULTIVOS DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y  
MUSCULARES LISAS VASCULARES.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR**

**Q U E P R E S E N T A**

**BIOL. ABRAHAM NOÉ ANZUREZ JIMÉNEZ**

**D I R E C T O R D E T E S I S**

**DR. JESÚS SANTA OLALLA TAPIA**

Cuernavaca, Morelos, México. Noviembre, 2018

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 11 de Biología de Células Troncales en la Facultad de Medicina de la UAEM. Periodo 2016-2018

Miembros del comité tutorial:

Tutor principal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia  
Tutor personal: Dr. José Santos Ángeles Chimal  
Dr. Diego Ricardo Esquiliano Rendón  
Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Dra. Vera Lucia Petricevich

Miembros del comité revisor y jurado de examen de grado:

Presidente: Dra. Vera Lucia Petricevich  
Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández  
Primer vocal: Dr. Diego Ricardo Esquiliano Rendón  
Segundo vocal: Dr. José Santos Ángeles Chimal  
Tercer vocal: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado durante mi proyecto de maestría, al financiamiento por parte de rubio Pharma y Asociados, Red Farmed, CONACyT 241374, CONACYT 139851, CONACYT 151287, CONACYT 84193 y CONACYT 1107559

## *Agradecimientos*

*Sin bien el primer paso para iniciar un proyecto es la decisión, no existe mayor motivación para continuarlo que el apoyo de tus seres queridos, por ello, quiero agradecer inmensamente a mis padres Antonia Jiménez Campos, Reyes Anzures Trujillo y a mis seis hermanos quienes nunca dejaron de confiar en mí y que a pesar de la incertidumbre continúan brindándome su apoyo y su cariño.*

*También quiero agradecerle al Dr. Jesús Santa-Olalla T. por su guía en esta etapa educativa, a Susana Picazo por su apoyo en gestión del laboratorio y a mis sinodales la Dra. Vera Lucia Petricevich, al Dr. Juan José Acevedo Fernández, al Dr. Diego Ricardo Esquiliano Rendón y al Dr. José Santos Ángeles Chimal, quienes me aportaron una parte de su conocimiento y me apoyaron en la corrección y evaluación a lo largo de este proyecto.*

*De igual manera quiero agradecer a las diferentes instituciones que me permitieron desarrollar este proyecto: al Centro de Investigación Científica de Yucatán, CICY. En Especial al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez, al M. en C. Guido Zapata y a su equipo de trabajo de la Unidad de Materiales, por aceptarme dentro su laboratorio y realizar una estancia de investigación, así como por la donación de los poliuretanos que se evaluaron en este proyecto.*

*A la Unidad de Patología del Hospital del Niño y el Adolescente Morelense, HNAM. En especial a la Dra. Luisa Valeria Ocampo y al Biol. Carlos Mojica, por su orientación en técnicas de inmunocitofluorescencia, así como permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.*

*Al Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En especial al Dr. Luis Covarrubias, a la M. en C. Concepción Valencia y a todo tu equipo de trabajo del Laboratorio 11, por permitirme realizar parte experimental del proyecto en su laboratorio.*

*Al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). En especial a la Dra. Brenda Hideliza Camacho Díaz, al M. en C. Iván Priego Cortes por proporcionar las VSMCs y al M. en C. Daniel Tapia, por su apoyo en el área de microscopia electrónica de barrido.*

*A la Unidad de Diagnóstico y Medicina Molecular, UDMM, del Hospital del Niño y el Adolescente Morelense, en especial a Joel Esquivel por su apoyo en la parte técnica de cultivo celular e inmunocitofluorescencia.*

*Por último, quiero agradecer a mis compañeros y amigos del Laboratorio 11 de Biología de Células Troncales de la Facultad de Medicina UAEM; Jaqueline Sánchez, Tonatzin Zertuche, Nichim Gómez, Diana Toledo, Joel Esquivel, Edmundo Martínez, Christian Santander y a Sebastián Vargas por compartir su tiempo y conocimientos, además de hacer amenos los duros momentos de trabajo, de igual manera agradezco a Abigail M. Laínez por su cariño y motivación.*

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
1. RESUMEN .....	V
2. INTRODUCCIÓN .....	1
2.1. Sistema circulatorio.....	2
2.2. Biología de las células endoteliales. ....	4
2.3. Biología de las células musculares lisas .....	6
1.1. Patologías vasculares y sus tratamientos.....	7
1.2. Medicina regenerativa .....	9
1.3. Cultivos celulares.....	10
1.3.1. Cultivos bidimensionales.....	10
1.3.3. Cultivos Tridimensionales .....	12
1.4. Dispositivos médicos.....	13
1.5. Evaluación de dispositivos médicos.....	15
1.5.1. Evaluación de citotoxicidad generada por poliuretanos.....	15
1.5.2. Evaluación de estrés oxidativo por poliuretanos.....	16
1.6. Los poliuretanos.....	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS .....	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos. ....	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
5.2. Síntesis y caracterización de poliuretanos .....	21
5.2.1. Síntesis de poliuretanos.....	21
5.2.2. Elaboración de membranas de polímeros .....	22
5.2.3. Microscopia electrónica de barrido .....	23
5.2.4. Esterilizado de membranas de poliuretanos .....	23
5.3. Propagación y caracterización de los cultivos celulares.....	23
5.3.1. Obtención de los tipos celulares.....	23
5.3.2. Parámetros estadísticos.....	24

5.4.	Generación de un medio de cultivo para el cultivo de VSMCs.....	25
5.5.	Caracterización por inmunocitofluorescencia .....	27
5.6.	Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivos celulares .....	28
5.7.	Evaluación del estrés oxidativo en cultivos celulares.....	29
5.8.	Co-cultivo Celular .....	29
5.9.	Cultivo sobre membrana de poliuretano.....	30
6.	RESULTADOS.....	31
6.1.	Síntesis y caracterización de poliuretanos .....	31
6.1.2.	Microscopia electrónica de barrido .....	32
6.1.3.	Construcción de estructuras cilíndricas.....	34
6.2.	Propagación y caracterización de cultivos celulares .....	35
6.2.3.	Curva de densidad celular del cultivo de HUVECs.....	39
6.2.4.	Inmunocitofluorescencia.....	40
6.3.	Generación de un medio de cultivo para VSMCs .....	48
6.4.	Evaluación de citotóxica de poliuretanos.....	55
6.4.1.	Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivo de HUVECs .....	55
6.4.2.	Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivos de VSMCs .....	55
6.5.	Evaluación del estrés oxidativo en cultivos celulares.....	57
6.6.	Co-cultivos celulares. ....	58
7.	DISCUSIÓN.....	62
7.1.	Propagación de HUVECs.....	62
7.2.	Propagación de VSMCs.....	63
7.3.	Generación y comportamiento de co-cultivos celulares. ....	64
7.4.	Uso de poliuretanos como dispositivos médicos.....	65
8.	CONCLUSIONES. ....	67
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vasos sanguíneos. ....	3
Figura 2. Molécula de sulfurodamina B. ....	15
Figura 3. Reacción de reducción del NBT.. ....	16
Figura 4. Esquema general del proyecto de investigación. ....	21
Figura 5. Película de poliuretano en molde de teflón.. ....	22
Figura 6. Cultivo sobre membranas de Poliuretano. ....	30
Figura 7. Películas de poliuretanos. ....	32
Figura 8. Caracterización de la superficie de los poliuretanos. ....	33
Figura 9. Estructuras cilíndricas de poliuretanos. ....	34
Figura 10. Caracterización morfológica de HUVECs ATCC. ....	35
Figura 11. Rendimiento celular del cultivo de HUVECs ATCC. ....	36
Figura 12. Tiempo en días del subcultivo de HUVECs ATCC. ....	37
Figura 13. Porcentaje de viabilidad del cultivo de HUVECs ATCC. ....	37
Figura 14. Doblaje poblacional del cultivo de HUVECs ATCC. ....	38
Figura 15. Tiempo de replicación del cultivo de HUVECs ATCC. ....	38
Figura 16. Curva de densidad para la propagación de HUVEC. s. ....	40
Figura 17. Caracterización por inmunocitofluorescencia del cultivo de HUVECs ATCC. ....	41
Figura 18. Caracterización morfológica de VSMC. ....	42
Figura 19. Rendimiento celular obtenido de la propagación de las células VSMCs. ....	43
Figura 20. Tiempo de subcultivo de VSMCs. ....	44
Figura 21. Porcentaje de viabilidad de VSMCs. ....	45
Figura 22. Doblaje poblacional de VSMCs. ....	45
Figura 23. Horas de replicación de VSMC. ....	46
Figura 24. Caracterización molecular de VSMCs mediante inmunocitofluorescencia. ....	47
Figura 25. Evaluación de medios de cultivo para VSMCs. ....	48
Figura 26. Segunda evaluación de medios para el cultivo de VSMCs. ....	49
Figura 27. Morfología de VSMC obtenida de la evaluación de medios. ....	50
Figura 28. Tercera evaluación de medios de cultivo para VSMCs. ....	51
Figura 29. Reporte morfológico de la tercera evaluación de medios para el cultivo de VSMC. .	52
Figura 30. Cuarta evaluación de medios para el cultivo de VSMC. ....	53

Figura 31. Reporte morfológico de la cuarta evaluación de medios para el cultivo de VSMC. ...	54
Figura 32. Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivo de HUVECs.. .....	55
Figura 33. Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivo de VSMCs.....	56
Figura 34. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno en cultivos de HUVECs.....	57
Figura 35. Evaluación de medios para el co-cultivo de HUVECs y VSMCs. ....	59
Figura 36. Evaluación del porcentaje de crecimiento de co-cultivos de VSMCs y HUVECs. ....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los vasos sanguíneos.....	3
Tabla 2. Fármacos empleados en cardiopatías .....	8
Tabla 3. Tratamientos quirúrgicos en patologías cardiovasculares. ....	9

## 1. RESUMEN

Los vasos sanguíneos se encargan de distribuir nutrientes y oxígeno, recoger dióxido de carbono y metabolitos de desecho del organismo. Las estructuras vasculares se encuentran recubiertas internamente de células endoteliales que segregan moléculas señalizadoras como algunos radicales libres, que modulan el crecimiento y proliferación celular, la activación de la expresión de citosinas, angiogénesis y regulan el tono vascular. Relevantemente, algunos procesos patológicos como diabetes y la obesidad generan disfunción endotelial debido a la citotoxicidad causada por la hiperglicemia o hiperlipidemia, respectivamente. De esta manera la ingeniería de vasos sanguíneos resulta de gran utilidad para obtener un modelo de evaluación que permita estudiar la interacción entre diversas poblaciones celulares en un ambiente más afín a la estructura natural. El objetivo de este proyecto fue generar un modelo para evaluar citotoxicidad y estrés oxidativo generado por poliuretanos, mediante cultivos de HUVECs, VSMC y co-cultivos, donde se caracterizó su perfil molecular y se realizó la evaluación de citotoxicidad y la generación de estrés oxidativo en presencia de membranas de poliuretanos. Las condiciones de cultivo permitieron propagar las HUVECs hasta el pase 10 utilizando el medio de cultivo UDMM-ENDO, obteniendo porcentajes de viabilidad por arriba del 80%, rendimientos máximos de 40000 cel/cm<sup>2</sup>, 0.7 a 2 doblajes de la población y un tiempo de replicación 27 a 55 h. La población mostró positividad del 80% para anti-Von Willenbrand, anti-Flk-1 y 90% para Ki67 al pase 8. Las células VSMC fueron cultivadas hasta el pase número 8 en medio vascular ATCC y presentaron positividad del 100% para actina de musculo liso. Además, fue necesario generar un medio con mayor rentabilidad para la propagación de VSMCs este medio fue designado como UDMM-VSMC, mismo que fue utilizado para la evaluación de las membranas de poliuretanos en términos de citotoxicidad y generación de estrés oxidativo. Los bioensayos de citotoxicidad sobre los poliuretanos no mostraron alteración de las propiedades del cultivo de células HUVECs y VSMCs, así mismo, no se observó la generación de ROS en los cultivos cuando se incubaron con los polímeros por lo que se demuestra que los materiales analizados no generan citotoxicidad ni estrés oxidativo, por lo que se concluye que las membranas de poliuretanos evaluadas no muestran citotoxicidad y no generan estrés oxidativo, por lo que pueden ser utilizadas como andamiajes celulares.

## 2. INTRODUCCIÓN

Durante el año 2014, de acuerdo a información de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades metabólicas como diabetes y obesidad presentaron una prevalencia del 10.4 % y 27.6 % de la población en México<sup>1</sup>, donde más de 6,9 millones de mexicanos viven con diabetes<sup>2</sup>, y 48.6 millones de mexicanos presentan obesidad<sup>3</sup>. Este reporte es importante debido a que estas patologías son consideradas enfermedades predisponentes para el desarrollo de aterosclerosis y arteriosclerosis, hipertensión y sus consecuencias que conllevan a la generación de zonas isquémicas en el tejido cardiaco y nervioso, que posteriormente desarrollarán áreas de infarto, tanto cardiaco como cerebral. Así mismo, es posible que se presenten otras alteraciones de la circulación, aunado a la afectación del proceso de cicatrización, se condicionan lesiones tan graves como lo es el pie diabético<sup>4</sup>.

Se reconoce que en la fisiopatología de la diabetes se involucran daños tisulares causados por las altas concentraciones de glucosa en sangre (hiperglucemia), que son la causa de la disfunción endotelial de los vasos sanguíneos<sup>5</sup> y de tejidos adyacentes<sup>6</sup>, mientras que en el caso de la obesidad, una de las complicaciones que participa en el daño tisular es ocasionada por las altas concentraciones de lípidos en sangre (hiperlipidemia), que favorece lo que se conoce como lipotoxicidad. A su vez dichas patologías suelen generar el proceso de estrés oxidativo generando daño a moléculas como ADN, lípidos y proteínas en diferentes tejidos y órganos como el cerebro<sup>7</sup>

Actualmente los tratamientos para reducir los daños vasculares causados por la hiperglucemia o hiperlipidemia incluyen el uso de medicamentos que favorecen la normoglicemia y disminuyen la concentración de los lípidos. Sin embargo, a pesar de ello, la gran mayoría de pacientes avanza a situaciones graves de la enfermedad, que favorecen el desarrollo de isquemia, hasta generar un paro cardiaco o daño cerebrovascular<sup>8</sup>, siendo la solución más recurrida los procedimientos quirúrgicos como es la angioplastia o el “bypass”, este último procedimiento se realiza mediante el trasplante autólogo de vasos sanguíneos<sup>9</sup>, que pueden ser obtenidos de la arteria radial, que permite la derivación de irrigación a la zona que se encuentra deficiente. La alta demanda de estos procedimientos, así como la condición cardiovascular limitante de los pacientes que lo requieren, particularmente pacientes de la tercera edad, o con complicaciones adicionales de la patología de base, han generado la necesidad de desarrollar nuevos dispositivos médicos como sustitutos para el trasplante autólogo de vasos sanguíneos.

Así mismo una demanda constante de estos dispositivos por parte de pacientes pediátricos quienes

presentan malformaciones congénitas<sup>10,11,12</sup>, hacen necesario el uso de dispositivos sintéticos debido a que estas malformaciones suelen presentar grandes dimensiones por lo que la primer opción es la cirugía reconstructiva, sin en cambio al ser pacientes pediátricos y en pleno crecimiento, es necesario llevar a cabo un recambio periódico de estos dispositivos ya que estos no pueden crecer a la par del portador, además lo delicado es que la mayoría de los pacientes afectados son de bajos recursos económicos, por lo que se hace más apremiante bajar costos.

## **2.1. Sistema circulatorio.**

El sistema circulatorio es el encargado de llevar a cabo la distribución de la sangre a lo largo de todo el cuerpo humano. Este sistema está constituido por el corazón, vasos sanguíneos y el tejido sanguíneo. Los vasos sanguíneos suelen clasificarse de acuerdo con su función, en arterias las cuales se encargan del transporte nutrientes y de la sangre oxigenada, mientras que las venas son las encargadas de retornar la sangre desoxigenada, así como los productos del metabolismo celular.

El diámetro de los vasos sanguíneos, su composición celular y tejido conectivo varía dependiendo de su función específica, dentro de las vasos sanguíneos se pueden distinguir estructuras como las arterias elásticas, arterias musculares, venas, arteriolas, vénulas y capilares<sup>4</sup>, todas ellas listadas de mayor a menor tamaño. Los vasos sanguíneos suelen presentar diferentes diámetros, sus características están relacionadas con función y ubicación corpórea. Según sus dimensiones, los vasos sanguíneos se clasifican en vasos largos y vasos cortos, siendo los vasos largos las venas que usualmente presentan un diámetro entre 1 a 6 mm y las arterias con 5 a 30 mm de diámetro, por otro lado, en los vasos cortos se encuentran las arteriolas las cuales presentan un diámetro menor a 50  $\mu\text{m}$ , las vénulas con 20 – 100  $\mu\text{m}$  de diámetros y capilares con diámetros menores de 20  $\mu\text{m}$ .

Los vasos sanguíneos largos como las arterias se encuentran conformados por tres capas o laminas: la túnica íntima, túnica media y túnica externa, siendo la capa interna la túnica íntima la cual se encuentra constituida por una monocapa de células endoteliales conocido como endotelio, a continuación, se encuentra la túnica media constituida principalmente por una multicapa de células musculares lisas, siendo esta capa la encargada de proporcionar la resistencia a la tensión y moderar el tono vascular. Por último, se encuentra la túnica externa o adventicia, la cual se conforma por una gran cantidad de matriz extracelular de colágeno y elastina (Figura 1). Un caso similar son las venas que al igual que las arterias se encuentran conformadas por la túnica íntima, media y externa, sin embargo, estas cuentan con válvulas que impiden el retorno del flujo sanguíneo (Figura 1).

Los vasos sanguíneos cortos como las vénulas y arteriolas solo se encuentran constituidas por el endotelio y una menor cantidad de células musculares lisas mientras que los capilares solo están

constituidos por el endotelio y un tipo celular conocidos como pericitos (Figura1).

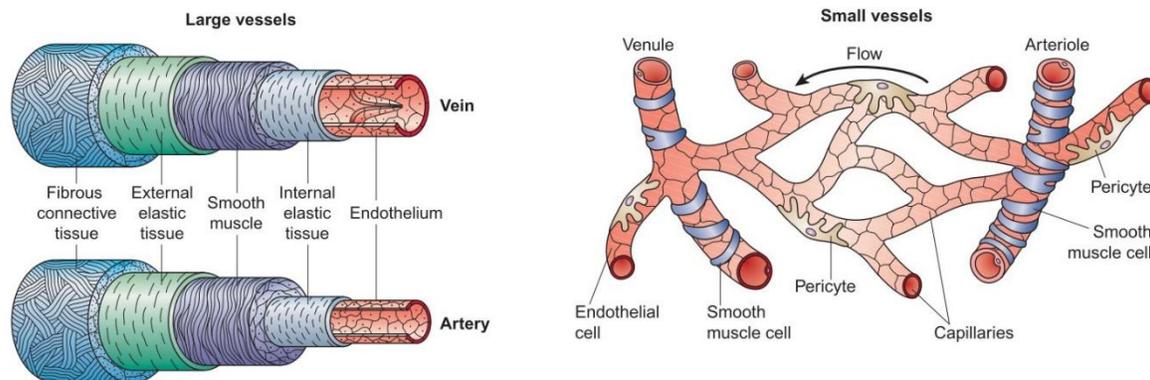


Figura 1. Vasos sanguíneos. En esta imagen se ilustran las diferentes estructuras de los vasos sanguíneos, donde se puede destacar a los vasos sanguíneos largos y cortos, como las venas, arterias, vénulas, arteriolas y a los capilares (Tomada de O. Cleaver and D. Melton, 2003<sup>13</sup>)

Como se mencionó con anterioridad los vasos sanguíneos se encuentran expuestos a diferentes condiciones dependiendo de su ubicación, una de estas condiciones es la presión sanguínea. Los vasos sanguíneos pueden soportar las diferentes presiones del flujo sanguíneo gracias a su estructura y composición, siendo los vasos largos los cuales están sometidos a una mayor presión siendo las arterias musculares y elásticas las encargadas de soportar las mayores presiones.

Una de las características con las que cuentan los vasos sanguíneos para soportar estas presiones es su composición celular y extracelular o el tejido conectivo, mismo que se encuentra constituido principalmente por proteínas como colágeno, elastina, fibronectina entre otras. Algunas características como el diámetro, la composición celular de las arterias elásticas, arterias musculares, venas, arteriolas, vénulas y capilares<sup>4</sup> se enlista en la Tabla 1.

**Tabla 1. Composición de los vasos sanguíneos**

	Arteria elástica	Arteria muscular	Venas	Arteriolas	Vénulas	Capilares	Referencia
<b>Diámetro</b>	30 - 5 mm	6 mm	1 – 5 mm	> 50 µm	20 – 100 µm	> 20 µm	4
<b>Matriz extracelular</b>	Elastina, fibronectina, fibrilina, fibulina, colágeno tipo I, II, III, IV, V, VI y proteoglicanos.	Elastina, fibronectina, fibulina, colágeno tipo I, III, IV, V, VI y proteoglicanos.	Elastina, fibronectina, colágeno tipo I, II, III, IV, VI, XII, XIV y proteoglicanos.	Elastina, colágeno tipo I, III y fibrilina.	Laminina, colágeno tipo IV y fibronectina.	Colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y HSPG.	4

Los vasos sanguíneos al igual que otros tejidos poseen la capacidad de responder a diversos estímulos, tanto externos (extracelulares) como internos (intracelulares)<sup>14</sup>, por lo tanto y específicamente el endotelio, puede responder tanto a estímulos mecánicos como a la presencia de moléculas en su entorno, lo que establece que los endotelios de cada tejido tengan comportamientos particulares. Algunos de los estímulos que pueden percibir son la turbulencia y la fricción generada por el flujo sanguíneo, de esta manera el endotelio puede regular el tono vascular mediante la producción y liberación de moléculas estimuladoras para la vasoconstricción o vasodilatación, tales como quimiocinas, citocinas, factores de crecimiento y hormonas, las cuales, dependiendo de los estímulos percibidos, ejecutan una respuesta que permite la homeostasis del organismo. De igual manera se sabe que los vasos sanguíneos se encuentran involucrados en procesos de señalización celular promoviendo el mantenimiento y renovación de células troncales en diferentes tejidos (neurales, pancreáticas, etc.) conformando los diferentes nichos troncales<sup>15</sup>.

## **2.2. Biología de las células endoteliales.**

El endotelio es un tejido compuesto por una monocapa de células endoteliales las cuales forman una interfaz entre los tejidos y el flujo sanguíneo, permitiendo la entrada y salida de células y moléculas, fungiendo como barrera permeable selectiva. Actualmente se sabe que las células endoteliales no sólo se encuentran recubriendo los vasos sanguíneos para la perfusión, sino que participan activamente en varios procesos de señalización con las células adyacentes en su entorno, que comprenden respuestas efectoras tanto de tiempo y de lugar.

Dentro de las principales funciones que presenta el endotelio es la regulación del tono vascular y por tanto la presión arterial, función que realiza mediante la secreción de moléculas vasodilatadoras como prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado de endotelio, el óxido nítrico (NO), así como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) generando la vasodilatación, mientras que la liberación de endotelina promueve la vasoconstricción<sup>14</sup>. La regulación del tono vascular se lleva a cabo mediante la secreción de moléculas vasodilatadoras como el óxido nítrico (NO) que es un gas volátil y biológicamente activo, este gas suele estar presente en todos los tejidos que gracias a su bajo peso molecular y a sus propiedades lipofílicas difunde libremente a través de las membranas. NO atraviesa el endotelio hasta el músculo liso de la pared arterial y a través de la nitrosilación la enzima guanilato ciclasa convierte al guanidil trifosfato (GTP) a guanidil monofosfato cíclico (GMPc) que es el encargado de regular la concentración del  $Ca^{2+}$  citosólico causando el relajamiento de las fibras musculares y por tanto la vasodilatación. El NO es producido por

cortos periodos de tiempo cuando la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) es inducida por los vasodilatadores acetilcolina y bradiquimina. De esta manera cuando las señales de regulación provienen del endotelio, comúnmente son designadas como dependientes del endotelio. Sin embargo, existe una producción de NO de forma prolongada cuando la NOS es estimulada con citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).

Tal vez la actividad más sorprendente, es su participación en el desarrollo temprano del organismo con señales para diferenciación celular, incluso en la etapa adulta se ha demostrado que participan activamente para secretar moléculas que regulan las vías de señalización del tejido en donde se encuentran<sup>16</sup>, para la atracción de células en la respuesta inmune, así como para atrapar moléculas de señalización necesarias para el tejido con el que interactúan. A la fecha se ha realizado la caracterización de diversas variedades de estas células como: las células endoteliales de los capilares cardiacos, de aorta, cerebrales, pancreáticos, hepáticas, etc.<sup>17</sup>. Cada una de estas poblaciones posee propiedades particulares acordes para el funcionamiento del mismo, lo que genera una vasta heterogeneidad de células endoteliales, que responden de manera diferente a moléculas señalizadoras específicas de su entorno, emitiendo respuestas vaso específicas y órgano específicas.

Otro punto de control que realiza el endotelio y de manera específica es la inhibición de la proliferación de las SMC por medio de la expresión de glucosaminoglicanos de heparán sulfato, que además cubre al endotelio proporcionando una capa antitrombogénica, así como la producción de trombomodulina que se une a moléculas de trombina y evita la coagulación a través de la vía de la proteína C, inactivando a los factores Va y VIIIa<sup>14</sup>.

Por otra parte cuando se presentan lesiones en el endotelio, las EC son capaces de producir factores de crecimiento como el derivado de plaquetas (PDGF) que funciona como quimioatrayentes promoviendo la atracción y proliferación de las SMCs y regulando con ello el proceso de angiogénesis generando nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes<sup>18</sup>, para esta función la EC secretan moléculas señalizadoras como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés Vascular Endothelial Growth Factor) un factor de crecimiento y proliferación autócrino de estas células.

A la fecha se ha realizado la caracterización de diversas variedades de estas células, mismas que han sido aisladas de fuentes tisulares como capilares cardiacos, aortas, vasos cerebrales, vasos pancreáticos, vasos hepáticas, etc.<sup>17</sup> y cada una de estas poblaciones posee propiedades particulares acordes para el funcionamiento del mismo. La vasta heterogeneidad de EC responde de manera diferente a moléculas señalizadoras emitiendo respuestas vaso y órgano específicas, sin embargo, las EC expresan marcadores comunes que permiten identificarlas, facilitando de esta manera su aislamiento y caracterización, dentro de estos marcadores se encuentran moléculas de superficie celular como CD31,

CD34, así como moléculas con actividad generadas por este tipo celular como el factor de Von Willebrand (VWF), Flk-1 y BNH9

### **2.3. Biología de las células musculares lisas**

Las células musculares lisas (SMC, smooth muscle cells) componen la pared de múltiples tejidos incluidos los vasos sanguíneos, vasos linfáticos, vejiga, vías urinarias, útero, tracto gastrointestinal y respiratorio. Las células que conforman la túnica media de los vasos sanguíneos son llamadas vasculares (VSMCs, Vascular Smooth Muscle Cells) y se encuentran rodeando al endotelio, por lo que son las encargadas de regular el tono a través de su contracción o relajamiento. Dentro de las principales características de las SMC son la presencia de dos estados fenotípicos bien identificados, el primero es el fenotipo sintético en el que las SMC poseen una capacidad proliferante, migratoria, así como productora y secretora de componentes de matriz extracelular como colágeno predominando el tipo III, elastina, proteoglicanos pero que carece de una función de contracción, en este estado las SMC suelen poseer marcadores de troncalidad y de estado proliferativo, usualmente parecidos a los expresados en las células mesenquimales <sup>19</sup>.

El segundo fenotipo de las SMC es el contráctil, que es un estado diferenciado donde estas células permanecen quiescentes, pero poseen la capacidad de contracción. Este fenotipo también suele ser considerado como el fenotipo maduro de las SMC y suelen ser identificadas por la expresión de marcadores como miosina de cadena pesada SM-MHC (smooth muscle myosin heavy chain) <sup>20</sup>,  $\alpha$ -actina de musculo liso ACTA2, MYH11, CNN1, h-caldesmon CALD1, SM22, CNN1 y MYH11 los cuales participan activamente en la contracción celular y moléculas de matriz extracelular como colágeno tipo IV<sup>19, 21</sup>. En su fenotipo maduro las SMC también suelen contar con una gran variedad de canales iónicos mediante los cuales perciben las señales circundantes<sup>22</sup>.

Las SMC han tomado gran relevancia clínica ya se ha evidenciado que este tipo celular se encuentra involucrado en procesos patológicos del sistema cardiovascular, siendo uno de los más estudiados la formación de la placa ateromatosa, donde estas células se encuentran en un estado altamente proliferativo, así como en un estado de diferenciación osteogénico y a su participación altamente activa en la secreción de colágeno y glucosaminoglicanos contribuyendo en la remodelación arterial en arterias dañadas por hipertensión y aterosclerosis. Este tipo celular, también se encuentra altamente activo en patologías vascular-pulmonar<sup>14</sup>.

Así mismo se sabe que en condiciones patológicas el exceso en la producción del anión super oxido ( $O_2^-$ ) por parte de las SMC puede causar estrés oxidativo ocasionando la inactivación del NO y con ello la alteración del tono vascular.

## 2.4. Patologías vasculares y sus tratamientos

Como se mencionó con anterioridad, los vasos sanguíneos, específicamente el endotelio es el encargado de proveer la correcta homeostasis del organismo, sin embargo, existen casos en los cuales las células endoteliales pierden la capacidad de respuesta y con ellos la capacidad de mantener la homeostasis, reflejada principalmente por la incapacidad de producir NO, citocinas, y factores de crecimiento, las fallas de esta barrera o del endotelio han sido reportadas diversas patologías como la aterosclerosis, la hipertensión, enfermedades renales y edema pulmonar<sup>14</sup>, hecho que resalta la importancia de su estudio. A este evento usualmente se le conoce como disfunción endotelial y suele ser causado por un estímulo agresivo que ocasiona un daño a las células, o bien un proceso de inflamación crónica derivado de procesos de lipotoxicidad o glucotoxicidad.

Dentro de algunas patologías que afectan a los vasos sanguíneos se encuentra la diabetes (DT) mellitus tipo 1 (DT1), una patología caracterizada por generar trastornos metabólicos por la ausencia de la hormona insulina debido a la destrucción autoinmune de células  $\beta$ -pancreáticas encargadas de sintetizar dicha hormona y debido a que esta hormona funciona como molécula señalizadora para la internalización de la glucosa a nivel celular, la ausencia de ella genera un incremento en la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo, generando así un proceso de glucotoxicidad. Por otra parte, la diabetes mellitus tipo 2 (DT2) genera altas concentración de glucosa en sangre debido a la incapacidad de respuesta a la insulina a nivel periférico (resistencia a la insulina), la hiperglucemia generada en este proceso promueve la glicosilación no enzimática de lípidos y proteínas en el torrente sanguíneo<sup>23</sup>.

Así mismos se presentan enfermedades cardiovasculares son consideradas como la principal causa de muerte a nivel mundial, dentro de estas patologías se puede mencionar a la aterosclerosis<sup>8</sup> y sus manifestaciones clínicas como la enfermedad arterial periférica caracterizada por la obstrucción de la aorta abdominal y sus terminaciones<sup>24</sup>. Enfermedad que puede clasificarse en proximal que involucra la región aortoiliaca, la femoropoplítea y la enfermedad distal que involucra la región infrapoplítea donde usualmente se acompaña de calcificaciones en la capa media arterial.

Durante los procesos patológicos de aterosclerosis se generan fuertes interconexiones con las poblaciones vecinas del músculo liso, células mesenquimales que potencian una disfunción de los macrófagos, lo que permite establecer migración de células inflamatorias y reforzar un ciclo de daño tisular, lo que a su vez favorece la generación de tejidos isquémicos, eventos trombóticos e infartos tanto cerebrales como cardiacos. Dentro de las complicaciones de la aterosclerosis se identifican patologías como síndrome coronario agudo donde se incluyen infarto agudo al miocardio con y sin elevación del segmento ST<sup>25</sup>.

Dentro de algunos de los tratamientos farmacológicos para las patologías vasculares se encuentran fármacos anticoagulantes como la heparina, la Warfarina y antiplaquetarios como el ácido acetilsalicílico. Una lista detallada de algunas de las patologías cardiovasculares se indica en la Tabla 2, donde muestra algunos fármacos, su dosis y el periodo de tratamiento.

**Tabla 2. Fármacos empleados en cardiopatías**

Tipo de patología	Fármaco	Dosis recomendada	Periodo de uso	Referencia
Enfermedad arterial periférica	Cilostazol	100 mg C/12h	3 a 6 meses	24
	Pentoxifilina	400 mg c/12h	3 a 6 meses	24
	Ácido acetilsalicílico y clopidogrel	80-150 mg p/día y 75 mg p/día	*	24
Síndrome coronario	Ácido acetilsalicílico	160 – 325 mg	*	25
	Nitroglicerina Sublingual (con sospecha)	0.4 mg	3 dosis una cada 5 min	25
	Nitroglicerina endovenosa (falla cardíaca)	10 mcg por min	*	25

\*Sin definir

Por otra parte, dentro de los principales tratamientos quirúrgicos para la reconstitución del flujo sanguíneo se encuentra el bypass el cual cuenta con reportes de al menos 570,000 realizado en arterias coronarias al año, mismo proceso que genera una importante demanda por tejidos vasculares para realizar este tipo de trasplante<sup>26</sup>. Algunos de los tratamientos quirúrgicos de estas patologías se resumen en la Tabla 3. Usualmente el uso de la cirugía depende del nivel de daño que presente el vaso sanguíneo afectado.

**Tabla 3. Tratamientos quirúrgicos en patologías cardiovasculares.**

Tipo de patología	Tratamiento quirúrgico	Indicados a pacientes con:	Referencia
Enfermedad arterial periférica	Revascularización con injertos autólogos o sintéticos	Enfermedad aortoliaca, femoropoplíteo y vasos distales	24
	Amputación de extremidad	En pacientes con isquemia critica.	24
Infarto agudo al miocardio	Revascularización con injertos autólogos o sintéticos	Oclusión de arterias coronarias	

## 2.5. Medicina regenerativa

El área de estudio de la medicina regenerativa (MR) involucra la generación de tejidos vivos y funcionales para reparar o reemplazar tejidos u órganos con pérdida de función debido a la edad, enfermedad, daño o defectos congénitos<sup>27</sup>, por lo que este proceso involucra actividades como el cultivo celular, la inducción a diferenciación de células humanas y por último, la terapia celular que consiste en la incorporación o trasplante de células a un individuo. Actualmente dentro de las estrategias de terapia celular se enlista una gran serie de trabajos de los que se puede mencionar procesos de trasplantes de células de sangre de cordón umbilical humano para el tratamiento de patologías como las leucemias<sup>28,29</sup>, así como el trasplantes alogénicos de medula ósea para el tratamiento de células falciformes donde se reporta una eficacia del 90 % realizada con pacientes emparentados<sup>30</sup>.

Para realizar este proceso se inicia con la obtención de la población celular requerida a partir de un individuo, para posteriormente ser manipuladas e inducir su proliferación celular, para regresarlas mediante técnicas de microinyección o trasplante de dispositivos celulares, que cuenten con la capacidad de poder restituir la función celular adecuada de un tejido dañado. De este modo para realizar dichos procesos, la medicina regenerativa se apoya en procesos de ingeniería tisular, en los cuales después de realizar cultivos celulares en diversas condiciones o de diferentes poblaciones, el cultivo se transfiere a andamiajes celulares con diferentes características fisicoquímicas y de biocompatibilidad.

Por otra parte, la población celular cultivada y propagada *in vitro*, puede ser empleada en dos estrategias diferentes, la primera es la de propagar las células hasta obtener el número suficiente y ser reintroducidas a un paciente mediante técnicas de inyección o trasplante. La segunda estrategia es realizar modificación genética de la población celular la cual usualmente consiste en la generación de células pluripotentes inducidas (iPCs) que cuentan con la capacidad de dar origen a los tres linajes de las capas germinativas y con ellos generar células precursoras, así como a células diferenciadas y completamente funcionales para realizar el trasplante.

Otro tipo de trasplante celular es el realizado con dispositivos celulares los cuales se construyen cultivando los tipos celulares sobre membranas de polímeros bidimensionales, creando un cultivo en monocapa que puede ser implantado directamente en el paciente, ejemplo de ello es la generación y uso de apósitos celulares de epidermis, que usualmente se encuentran conformados por queratinocitos y/o fibroblastos cultivados en membranas de polímeros biocompatibles, que también pueden ser empleados para el tratamiento de heridas dérmicas, como úlceras, quemaduras u otros traumatismos<sup>31</sup>.

Por otra parte, la medicina regenerativa ha desarrollado áreas de investigación innovadoras para proveer dispositivos médicos cada vez más complejos, la más relevante es la elaboración de órganos empleando la ingeniería tisular, que tiene como propósito la generación de diversos andamiajes con características de adherencia específica para diferentes tipos linajes celulares. Dentro de los logros reportados en la generación de órganos se enlistan la generación de esófagos (neoesófagos) para el tratamiento de enfermedades congénitas o adquiridas<sup>32</sup>, vejigas, vaginas y la elaboración y trasplante de uretras en procesos de agenesia e hipoplasia congénita en infantes<sup>33</sup>.

Así mismo, se ha realizado la generación de algunos tejidos como epidermis, lo cual se ha logrado al cultivar queratinocitos sobre membranas biocompatibles, las cuales han sido de diferentes tipos de materiales. Esto ha permitido que compañías biotecnológicas hayan desarrollado diferentes productos para la atención de heridas dérmicas. Los materiales empleados proporcionan un soporte estructural para permitir un mejor crecimiento celular que favorece la correcta proliferación celular.

## **2.6. Cultivos celulares**

### **2.6.1. Cultivos bidimensionales**

Dentro de los métodos más empleados para el cultivo celular son los realizados en condiciones de suspensión y adherencia. Para el caso de cultivo en suspensión se realiza para varias líneas celulares (un tipo de células que posee la capacidad de proliferar indefinidamente) leucémicas como BALL-1, o células troncales embrionarias o neurales. Por otra parte, en condiciones adherentes se lleva a cabo el cultivo celular en monocapa que también es considerado como cultivo bidimensional en el cual se realiza el cultivo de las células que necesitan del soporte para su crecimiento y proliferación como son las células epiteliales, musculares, endoteliales, nerviosas, entre otras.

Además, con este tipo de procedimientos se ha estandarizado el cultivo de diferentes estirpes celulares humanas *in vitro*, lo que ha permitido que se desarrollen diferentes tipos de bioensayos como la caracterización de procesos fisiopatológicos, ejemplo de ello es; la participación de LDL-oxidadas en

los procesos de calcificación de VSMC en procesos patológicos como la aterosclerosis<sup>34</sup>, así mismo ha permitido identificar que moléculas como “gingipain”, proteasa secretada por *Porphyromonas gingivalis* capaz de inducir la capacidad proliferativa de VSMC mediante la activación de integrinas como la osteopontina presente en este tipo celular<sup>35</sup>. De igual manera los cultivos en monocapa también permiten la caracterización directa de los fármacos sobre células humanas.

### **2.6.2. Co-cultivos celulares**

Los co-cultivos celulares, son aquellos donde se realiza el cultivo de dos tipos o estirpes celulares en el mismo medio de cultivo y pueden realizarse con ciertas variables, destacando el cultivo directo donde existe un contacto entre los dos tipos celulares, este tipo de co-cultivo es muy utilizado en el mantenimiento de células troncales o de células inducidas pluripotentes sembradas sobre una monocapa confluyente de fibroblastos que proveen de una gran cantidad de moléculas de señalización, mecanismos de contacto célula-célula, células-matriz celular, así como de la secreción de factores de crecimiento.

En particular el co-cultivo de células endoteliales (EC) y musculares lisas vasculares (VSMC) ha permitido la generación de modelos que permiten monitorear y evaluar algunas de las interacciones de estas poblaciones, por ejemplo se ha demostrado la capacidad de reclutamiento que poseen las EC así como de modular el fenotipo de las VSMC, de un estado quiescente y contráctil a un estado proliferativo en procesos de daño tisular<sup>36</sup>. Así mismo, se ha identificado la participación de la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa/Akt como la moduladora de la diferenciación del fenotipo de las VSMC<sup>37</sup> en condiciones patológicas como arteriogénesis, aterosclerosis<sup>38</sup> y re-estenosis en los mecanismos reguladores en EC<sup>39</sup>. Además, el co-cultivo de las células endoteliales se ha ampliado a la generación de modelos angiogénicos que pretenden mejorar el cultivo de tejidos, así como elucidar los procesos de angiogénesis tumoral<sup>40</sup> y presentarlo como un blanco terapéutico.

Por otra parte, el uso de células endoteliales en condiciones de co-cultivo con otros tipos celulares como las células troncales embrionarias de ratón (ESC, Embryonic stem cell) ha permitido la generación de progenitores pancreáticos expresando marcadores propios de progenitores pancreáticos como PDX-1, Ngn3, Nkx6.1, proinsulin, GLUT-2, and Ptf1a, hecho que contrasta con ausencia de estos marcadores cuando las ESCs son cultivadas en ausencia de células endoteliales<sup>41</sup>, demostrando de esta manera su capacidad para controlar el destino de estos tipos celulares, así como su capacidad para mantener la autorrenovación en precursores pancreáticos<sup>42</sup>, hechos atribuidos a su capacidad reguladora mediada por contacto celular.

Por otro lado, la necesidad de contar con vasos sanguíneos como dispositivos médicos dio inicio

a la propagación conjunta de los principales tipos celulares que componen a tales estructuras. Si bien el uso de co-cultivos para mantener las poblaciones celulares es importante, el uso de un andamiaje o matriz extracelular se torna indispensable para la generación de estructuras semejantes a vasos sanguíneos capaces de albergar a estos tipos celulares, ejemplo de ello es el co-cultivos de HUVECs y VSMCs sobre hidrogeles termosensibles<sup>43</sup>, ácido hialurónico<sup>44</sup>, colágeno<sup>45</sup> entre otros.

Se han descrito algunos estudios preclínicos realizados en modelos murinos que han demostrado un retraso significativo en la necrosis de extremidades inferiores mediante el uso de co-cultivos de VSMC y HUVECs crecidos en hidrogeles termosensibles logrando un incremento significativo en la formación de arteriolas y capilares comparados con los injertos de un solo tipo celular<sup>46</sup>.

### **2.6.3. Cultivos Tridimensionales**

El cultivo tridimensional (3D) tiene como propósito el cultivo celular sobre estructuras capaces de proveer un andamiaje extracelular lo más parecido a la estructura del tejido que se quiere restituir, sobre el cual las células puedan adherirse y así facilitar su proliferación y comunicación celular, además de que este tipo de cultivo posee la capacidad de desarrollar relaciones estructurales más complejas como co-cultivos de dos o más tejidos, inclusive formar órganos. Por tal motivo, el uso de andamiajes tridimensionales ha cobrado gran relevancia ya que estos pueden ser utilizados para el desarrollo de dispositivos médicos útiles para realizar trasplantes.

De esta manera, el desarrollo de condiciones de cultivo especializadas ha favorecido la construcción de estructuras como vejigas y uréteres, que presentan una mayor complejidad para su cultivo, ya que es necesario el uso de andamiajes que proporcionen un mayor volumen, además de que permitan un soporte extracelular que cumpla con el trabajo que poseen las matrices extracelulares, facilitando la interacción con diferentes moléculas solubles que participan en la comunicación intercelular, y que son necesarias para permitir el desarrollo, mantener su integridad y establecer la sobrevivencia tisular de un órgano. Por otra parte, contar con protocolos que permitan el desarrollo de órganos *in vitro*, ha abierto la oportunidad de estudiar la repercusión que podrían tener las drogas sobre la diferenciación celular, estableciendo así bioensayos de teratogenicidad, sin necesidad de exponer a fetos. Así mismo, brinda la oportunidad de demostrar los posibles efectos tóxicos de nuevos fármacos a los que se les postule efectos sobre procesos de recambio tisular. Ésta es una de las áreas de mayor oportunidad para el desarrollo de nuevos fármacos por la industria farmacéutica de uso obstétrico y en la MR.

Es importante mencionar que los andamiajes extracelulares deben de contar con una serie de

características como elasticidad, resistencia, capacidad de adherencia, sin adherencia plaquetaria, no ser tóxicas ni generar estrés celular, además de no ser trombogénicas. Algunos de los ejemplos en los cuales se ha empleado el uso de las matrices extracelulares son en la construcción de vasos sanguíneos, donde se han empleado diversos materiales sintéticos, tales como politetrafluoroetileno (PTFE), Dacron <sup>TM</sup><sup>47</sup>, y poliuretanos que se ha utilizado como sustitutos arteriales de aorta torácica (> 6 mm), abdominal, ilíaca y arterias femorales comunes<sup>48</sup>.

Actualmente el surgimiento de nuevas alternativas ha empleado el uso de tejidos y órganos descelularizados que consiste en retirar completamente las células de los tejidos y obtener la matriz extracelular que los compone, un ejemplo de descelularización de órganos animales como arterias carótidas, corazones murinos, riñones porcinos<sup>49</sup>, las cuales una vez terminado este proceso, la matriz extra celular fue repoblada con nuevas células con el objetivo de recuperar su funcionalidad y así ser utilizadas como un dispositivo de trasplante<sup>26</sup>.

## **2.7. Dispositivos médicos**

De acuerdo con la Comisión Federal de para Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) los dispositivos médicos también son denominados como insumos para la salud y son todas aquellas sustancias, material, aparato o instrumentos empleados solo o en combinación en el diagnóstico, monitoreo o prevención de enfermedades y auxiliares en el tratamiento de las mismas, así como los empleados en el remplazo, corrección o restauración de la anatomía o algún proceso fisiológico humano. Los dispositivos médicos pueden clasificarse según su función o finalidad de uso en seis categorías siendo el grupo I Equipo médico, grupo II prótesis, ortesis y ayudas funcionales, grupo III Agentes de diagnóstico, grupo IV Insumos odontológicos, grupo V materiales quirúrgicos o de curación y grupo VI productos higiénicos.

Así mismo, los dispositivos pueden clasificarse por el riesgo que implica su uso agrupándolos en tres clases, en la Clase I se enlistan todos aquellos insumos que su seguridad y eficacia está comprobada (usualmente de uso externo), en la Clase II se encuentran aquellos insumos que usualmente se introducen al organismo pudiendo permanecer menos de 30 días y en la clase III aquellos dispositivos que suelen ser los aceptados recientemente en la práctica clínica o que se introducen en el organismo permaneciendo más de 30 días<sup>50</sup>.

De esta manera, todos aquellos dispositivos destinados a sustituir la función o complementar una función de un órgano o tejido humano, como las prótesis queda ubicado en el grupo II, y dependiendo de su uso pueden ser de clase I, II y III<sup>50</sup>.

Aunado a esto es evidente que todos aquellos dispositivos médicos deben de contar con un registro sanitario el cual debe estar avalado por estudios preclínicos y de biocompatibilidad, como los son: estudios de citotoxicidad, de sensibilidad, reactividad, toxicidad sistémica entre otros<sup>50</sup>.

Dentro de los dispositivos más utilizados están aquellos fabricados a partir de materiales sintéticos que aun poseen características perjudiciales como: desarrollo de anastomosis, hiperplasia de la íntima, coagulación y trombogénesis. Dichas complicaciones han establecido la necesidad de desarrollar alternativas biotecnológicas. Una de ellas es proporcionada por parte de la MR, cuya propuesta promueven el uso de células del mismo individuo, una vez que se realiza su extracción, el siguiente paso es reprogramarlas para generar el fenotipo requerido. Así mismo, es posible, aislar la estirpe celular requerida e inducir su proliferación para contar con la población celular necesaria y de esta forma ser devueltas al paciente inicial, con lo que se pretende restituir la función original del tejido dañado, con la ventaja de evitar el rechazo inmune.

Algunas de las características con las que deben contar los andamiajes son las de ser biocompatible, hemocompatible, no trombogénicas, no inmunogénicas y biodegradables<sup>4</sup>. Además de cumplir con ciertos criterios que deben ser evaluados para el cultivo celular, dentro de los que destacan proveer una correcta adherencia celular y la carencia de efectos de citotoxicidad, así como evitar el estrés oxidativo.

De esta manera, con la intención de generar vasos sanguíneos para dispositivos médicos con uso para trasplante, se han empleado diversos andamiajes extracelulares obteniendo resultados alentadores para la construcción de estructuras cilíndricas capaces de dar soporte a células musculares<sup>21</sup>, y células endoteliales. Dentro de los materiales utilizados para la construcción de estos andamiajes se pueden encontrar dos grupos, los de origen natural como: vasos sanguíneos descellularizados y biomateriales como polímeros de colágeno y elastina, entre otros. Dentro del segundo grupo se encuentran los andamiajes biodegradables de origen sintético como poliéster y de ácido poliláctico (PLA).

Así, la MR además de proveer dispositivos de uso para trasplantes ha permitido la estandarización de cultivos celulares que ha abierto la posibilidad de generar bioensayos para evaluar la actividad de nuevos fármacos, así como sus posibles efectos tóxicos. Por ello, es relevante la generación de estructuras tridimensionales semejantes a los vasos sanguíneos tanto estructural como funcionales, ya que esto permitirá la generación de modelos donde se analicen los procesos fisiopatológicos de patologías como la aterosclerosis *in vitro*<sup>21</sup> y la evaluación de moléculas vaso reguladoras, que facilitarán por una parte su estudio, y por otra identificar blancos terapéuticos que puedan ser empleados para el desarrollo de nuevos fármacos que eviten la afectación de poblaciones aledañas.

De esta manera, ha tomado gran relevancia establecer procedimientos que proveen una forma

menos agresiva para realizar dichas cirugías, evitando así dobles intervenciones, una sobre la zona de donde se obtiene el injerto y la otra sobre la región donde se realizará el trasplante.

## 2.8. Evaluación de dispositivos médicos

### 2.8.1. Evaluación de citotoxicidad generada por poliuretanos

La medición de la actividad citotóxica es ampliamente utilizada para la evaluación de los efectos tóxicos inducidos por fármacos sobre distintas poblaciones celulares con el propósito de detectar si poseen un efecto adverso sobre las células blanco. Estos ensayos son importantes ya que permiten detectar los efectos tóxicos de diversas moléculas en cultivos celulares antes de que estos sean probados en modelos animales y por último en humanos. Así mismo, es importante mencionar que existen varios métodos para realizar estas determinaciones siendo el método de Sulfurodamina B (SRB) (Figura 2) el más empleado para esta evaluación, ya que esta molécula es considerada como no destructiva para las células, además de poseer una alta sensibilidad comparada con otros ensayos de fluorescencia.

El fundamento de este ensayo se basa en la capacidad del colorante SRB para enlazarse electrostáticamente con los residuos de los aminoácidos básicos de proteínas tiñendo de esta manera las células presentes y facilitando su medición a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 570 nanómetros (nm)<sup>51</sup>, de esta manera la intensidad de la coloración rosada medida por absorbancia, es proporcional a la cantidad de células presentes en la condición. Este método inicialmente diseñado para la evaluación de fármacos con actividad citotóxica para células cancerígenas<sup>52</sup>, mediante la cuantificación de la pérdida del número de células bajo diversos tratamientos, lo que permite evaluar la citotoxicidad generada por compuestos químicos y naturales empleados para el tratamiento de diversas enfermedades<sup>53</sup>.

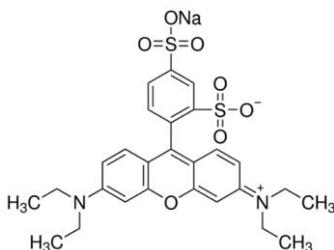


Figura 2. Molécula de sulfurodamina B. Molécula que se une a los aminoácidos de las proteínas contenidas en las células cultivadas in vitro.

### 2.8.2. Evaluación de estrés oxidativo por poliuretanos

Se reconoce que las células y los tejidos pueden sufrir daños causados por el desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés Reactive Oxygen Species) y a la incapacidad celular de poder suprimir a estas moléculas, debido a que ciertas reacciones químicas pueden provocar un incremento en la producción de ROS es posible que se favorezca un evento de estrés oxidativo. Existen diversas maneras de evaluar la capacidad funcional del endotelio y determinar las ROS una de ellas es mediante la detección por fluorescencia empleando fluorocromos afines a éstas moléculas y cuantificando la fluorescencia emitida, otro ensayo empleado para la identificación de ROS es empleando el método indirecto de oxido-reducción del nitroazul tetrasolio (NBT por sus siglas del inglés Nitroblue Tetrazolium), el cual durante su reacción es convertido a formazán en los lisosomas celulares por la enzima NADH oxidasa que transfiere un H del NADH al NBT (Figura 3)<sup>54</sup>. Otra forma de evaluar la disfunción endotelial es mediante la cantidad de óxido nítrico (NO) que se produce por las células endoteliales, lo que induce vasodilatación al relajar a las células musculares lisas, el efecto se compara por el porcentaje en el cambio del diámetro de los vasos sanguíneos, además de que ésta vasodilatación puede ser comparada con la vasodilatación generada por fármacos donadores de NO.

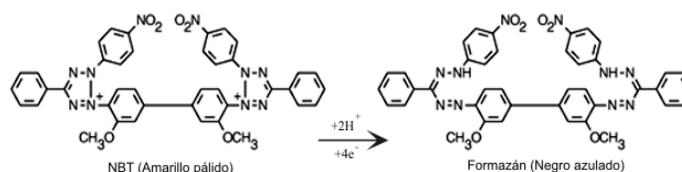


Figura 3. Reacción de reducción del NBT. Imagen que muestra la reacción de oxido-reducción que permite el cambio colorido de NTT de color amarillo a formazán de color negro azulado.

De igual manera la generación de co-cultivos de células de endoteliales y musculares lisas han demostrado ser un modelo adecuado para el estudio de procesos fisiopatológicos como el realizado por J. Jeffrey demostrando que las especies reactivas de oxígeno pueden modular la permeabilidad del endotelio hacia I-LDL en células endoteliales y co-cultivos, más no en células musculares<sup>55</sup>.

## 2.9. Los poliuretanos

Los poliuretanos son polímeros ampliamente utilizados a nivel mundial para la construcción de materiales plásticos con diferentes propiedades rígidas y flexibles. Estos polímeros pueden clasificarse dependiendo de sus características físicas en siete grupos principales: losas flexibles, espumas moldeadas flexibles, espumas rígidas, elastómeros sólidos, moldeo por inyección de reacción (RIM del inglés Reaction Injection Molding), respaldo de alfombra y formulaciones de dos componentes<sup>56</sup>. Estas características le brindan una amplia gama de usos, por lo que son empleados en diversos sectores industriales, así como en el sector salud para la generación de dispositivos médicos.

Los poliuretanos son polímeros que contienen grupos uretanos en su estructura medular, además de que pueden contener enlaces de tipo uretano, alifáticos y aromáticos, estos polímeros también pueden poseer grupos funcionales de hidrocarburos, aromáticos, éster, éter, amidas, ureas e isocianuratos<sup>56</sup>, características que dependerán del proceso de síntesis y los reactivos empleados.

Los poliuretanos son producidos por reacción de condensación de isocianatos y un material con grupos hidroxilos funcionales como lo son los polioles que son reaccionados en diferentes condiciones. Uno de los métodos de obtención de estos polímeros es la síntesis por etapas, dando como resultado la generación de presentar regiones o segmentos flexibles y segmentos rígidos dentro de su estructura química, por lo que a estos polímeros suelen denominados como poliuretanos segmentados. El proceso de síntesis por etapas cuenta con dos procesos, siendo el primer proceso la pre-polimerización y el segundo proceso de extensión de cadena. Para llevar a cabo la reacción de síntesis de poliuretanos, es necesario conocer las propiedades de reacción de cada uno de sus reactantes que conformarán su estructura <sup>57</sup>.

Actualmente nuevos estudios preclínicos de dispositivos médicos a base de fibroína de seda y poliuretano (Pellethano<sup>R</sup>) en mezcla 1:1 están siendo evaluados como sustitutos de vasos sanguíneos y han presentado algunas ventajas como mayor facilidad al implantar, infiltración de células y colágeno en la primer semana y sin generar calcificación hasta tres meses del implante, todo esto comparado con el politetrafluoroetileno expandido (ePTFE) el cual comienza con acumulaciones de calcio a las cuatro semanas y no acumula colágeno hasta los 4 meses del implante, además, de ser no bioabsorbible<sup>58</sup>.

Por otra parte, algunos trabajos de investigación realizados con anterioridad en nuestro grupo de trabajo han demostrado la capacidad de adherencia y citotoxicidad causada por diversos materiales sintéticos, destacando el uso de una membrana compuesta de poliuretano y el correcto crecimiento y proliferación de células endoteliales cultivadas sobre una membrana bidimensional compuesta por poliuretanos. Dicho trabajo fue realizado por Perales en el 2013 <sup>59</sup>, seguido de trabajos posteriores en los

que se evaluaron el crecimiento y proliferación de queratinocitos, demostrando una baja toxicidad y una correcta adherencia por parte de estas células<sup>60</sup>. Por otra parte también se sabe que el uso de estas membranas en cultivos celulares puede generar estrés oxidativo, esto debido al tipo de materiales que son utilizados para construir dichas estructuras, de este modo es importante mencionar que también ya se han estandarizado protocolos para evaluar el efecto de estrés oxidativo de moléculas bioactivas en células endoteliales<sup>61</sup>, por lo que este protocolo puede ser orientado a la evaluación del estrés oxidativo generado por las membranas de poliuretano.

Uno de los materiales que se han empleado para el desarrollo de estructuras vasculares es el Tecoflex, por lo que se decidió realizar una membrana con dicho material. Las películas formadas con el polímero Tecoflex presentaron características muy elásticas, mayores que las presentadas por las elaboradas de poliuretano-cys.

Dentro del uso clínico de los poliuretanos se puede mencionar su aplicación como dispositivos de remplazo dérmico, para su uso en lesiones graves generadas por quemaduras, en dicho estudio se eligieron 10 pacientes a quienes se les aplicó espuma de poliuretano (Novosorb) obteniendo una asimilación total del polímero en 367 días<sup>31</sup>.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento y prevalencia de patologías metabólicas como diabetes y obesidad en México, representa un problema de salud pública, debido a que estas patologías son consideradas como enfermedades que condicionan la aparición de complicaciones que pueden ser la causa de muerte de muchas personas, estos padecimientos son: hipertensión, estenosis, arteriosclerosis, aterosclerosis y en última instancia sus consecuencias como la generación de tejidos isquémicos o el padecimiento de infartos cardíacos o cerebrales. Por tal motivo es necesario comprender detalladamente los mecanismos fisiopatológicos de estos padecimientos con la intención de identificar puntos clave en el proceso de su desarrollo, y con ello establecer posibles blancos específicos para la generación de nuevas moléculas o productos para revertir los daños ocasionados por las diferentes condiciones a las que son sometidos los vasos sanguíneos.

De esta manera el desarrollar estructuras arteriales *in vitro* es importante en primera instancia para realizar la evaluación de daños bioquímicos y metabólicos generados por trastornos bioquímicos como es el estrés oxidativo, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad, lo que brindará la oportunidad de llevar a cabo la evaluación de nuevas sustancias químicas o fármacos que puedan ser utilizados como moduladores del tono vascular sanguíneo o que posean la capacidad de revertir los cambios bioquímicos que inducen daño vascular. Por otra parte, el desarrollo de estas estructuras tridimensionales arteriales permitirá la generación de nuevos dispositivos médicos que podrían ser empleados en trasplantes para pacientes que requieran procedimientos de derivaciones vasculares. De esto surge la siguiente pregunta: ¿Los andamiajes tridimensionales pueden ser un soporte bio-compatible para co-cultivos de células endoteliales y musculares lisas, sin generar estrés oxidativo o citotoxicidad?

#### **4. HIPÓTESIS**

- Los poliuretanos reabsorbibles no inducirán citotoxicidad ni estrés oxidativo, por lo que permitirán el cultivo de células endoteliales y musculares lisas vasculares sobre dichas estructuras.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general.**

- Establecer condiciones adecuadas de cultivo para evaluar la citotoxicidad y estrés oxidativo en células endoteliales y musculares lisas sobre membranas de poliuretanos.

##### **5.2. Objetivos específicos.**

- Obtener cultivos homogéneos de células endoteliales y musculares lisas.
- Establecer las condiciones óptimas de propagación de las células musculares lisas vasculares.
- Evaluar el efecto citotóxico de membranas de poliuretanos en cultivos de células endoteliales y musculares lisas vasculares en cultivos bidimensionales.
- Evaluar la generación de estrés oxidativo causado por las membranas de poliuretano en cultivos de células endoteliales y musculares lisas vasculares.
- Generar co-cultivos de células endoteliales y musculares lisas.
- Evaluar el estrés oxidativo del co-cultivo de células endoteliales y musculares lisas sobre membranas de poliuretanos.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Esquema general del proyecto

La estrategia experimental realizada en este proyecto se ilustra en la Figura 4.

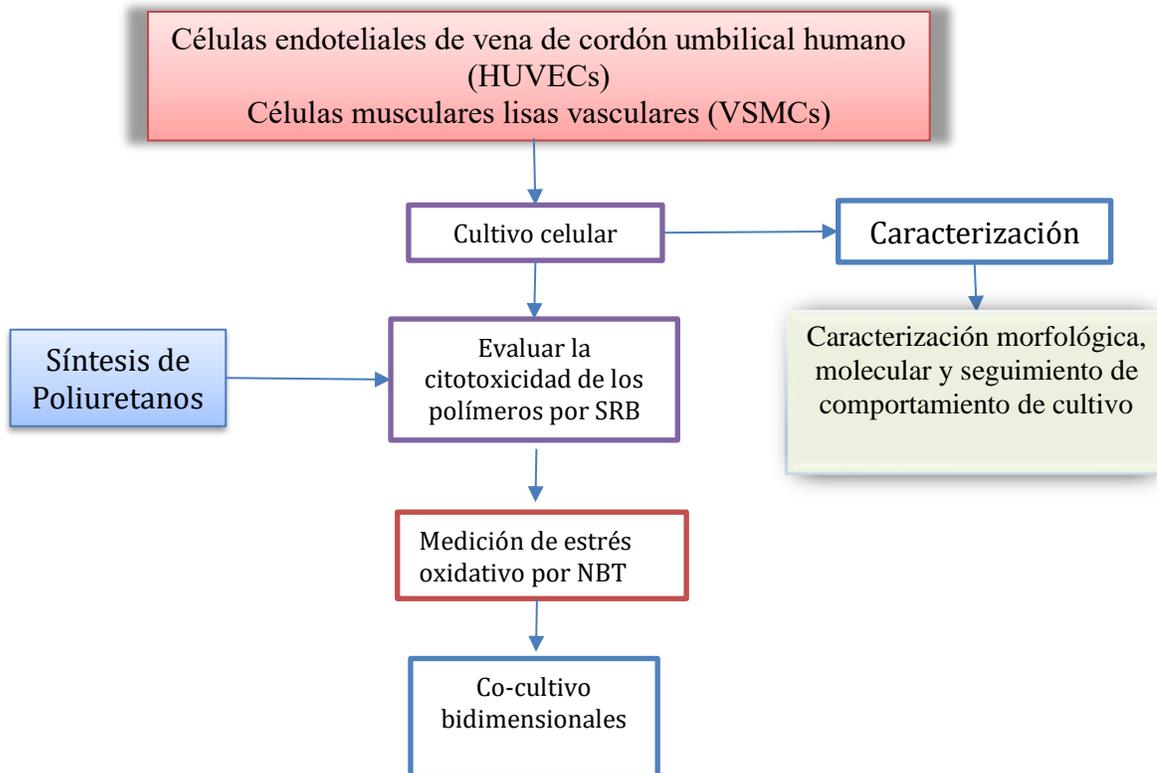


Figura 4. Esquema general del proyecto de investigación. Esquema que muestra de manera resumida los procedimientos realizados en este proyecto.

### 6.2. Síntesis y caracterización de poliuretanos

#### 6.2.1. Síntesis de poliuretanos

La síntesis de poliuretanos se realizó en colaboración con el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y para ello se pesaron 7.384g de policaprolactona la cual fue secada a 60°C por 24 horas en estufa de presión negativa con el objetivo de eliminar el exceso de agua para evitar su reacción durante el proceso de síntesis. La reacción de síntesis fue realizada en cámara de guantes con atmosfera de Nitrógeno, durante la primera etapa conocida como pre-polimerización se adicionó la policaprolactona seca, 20 ml de N-N- dimetilformamida, 1.91 gr de diisocianato y 18 µl del catalizador octoato de estaño, dejando reaccionar durante 4 horas a 70 °C con agitación constante a 120 rpm. Para la segunda etapa

conocida como extensión de cadena de adicionaron 0.58g del aminoácido y se continuó la reacción a 70°C a 120 rpm por 2 horas. El producto de reacción se precipitó en agua destilada a 25°C y se dejó en agitación por 72 horas aproximadamente. Posteriormente se eliminó el agua por filtración utilizando un equipo de vacío y una vez terminado el lavado, el polímero se secó por 24 horas en estufa de presión negativa.

### 6.2.2. Elaboración de membranas de polímeros

Para la elaboración de películas (o membranas) de los diferentes polímeros se pesaron 2 g y se disolvieron en 40 ml de Tetrahidrofurano (THF) por 5 horas, a continuación, el producto de la disolución se vertió en un molde de teflón (Figura 5) y se dejó secar toda la noche.

También se llevó a cabo la elaboración de otras membranas con el polímero Tecoflex<sup>R</sup> donados por el CICY, polímero empleado comercialmente para la elaboración de dispositivos vasculares, por otro lado, con el objeto de poder combinar las propiedades de los dos polímeros utilizados se realizó la mezcla de poliuretano-Tecoflex en proporciones 1:1 con el polímero M2 utilizando las mismas condiciones y concentraciones mencionadas anteriormente.

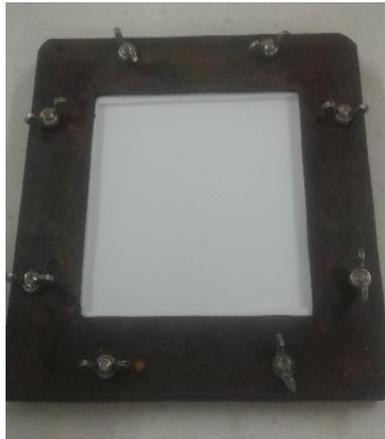


Figura 5. Película de poliuretano en molde de teflón. Imagen que muestra la elaboración de una película o membrana de poliuretano, previamente vertido y secado por evaporación.

Una vez realizadas las membranas de los diferentes polímeros, se realizó la construcción de las estructuras cilíndricas por el método de enrollado, proceso donde el proceso de elaboración de las membranas es interrumpido antes de terminar completamente su secado y éstas son enrolladas sobre un cilindro de teflón de 6 mm de diámetro que es retirado al término del enrollado, generando de esta manera una estructura tubular.

### **6.2.3. Microscopia electrónica de barrido**

Con el objeto de observar detalladamente la superficie de cada una de las membranas de poliuretanos se realizó un análisis por microscopia electrónica de barrido, este análisis se realizó con apoyo del Laboratorio de Microscopia del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) empleando el microscopio electrónico de la marca Carl Zeiss modelo EVO-LS10 life science, usando una presión de vapor de agua de 10 pascales (Pa), equipo capaz de operar sin tratamiento o recubrimiento de las muestras para su visualización.

### **6.2.4. Esterilizado de membranas de poliuretanos**

Para la evaluación biológica de los distintos poliuretanos fue necesario contar con los polímeros estériles por lo que el primer paso fue realizar cortes circulares con 5 mm de diámetro empleando un punch para biopsias, área suficiente para realizar los bioensayos en placas multipozos de 96. Una vez obtenidos todos los cortes, estos fueron lavados 3 veces con agua milli-Q estéril, se incubaron con etanol 70% por 1 hora, se lavaron nuevamente 3 veces con agua milli-Q estéril y se incubaron con PBS 1X por 24 horas. Una vez terminado el tiempo de incubado, los polímeros se retiraron del PBS y se secaron. Por último, cada uno de los cortes realizados se esterilizó con luz ultravioleta (UV) 30 min por cada lado, los cortes de poliuretanos se almacenaron en tubos cónicos para centrifuga de 50 ml, se aislaron de la humedad y se cubrieron con papel metalizado hasta su uso.

## **6.3. Propagación y caracterización de los cultivos celulares**

### **6.3.1. Obtención de los tipos celulares.**

Las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano HUVECs (por sus siglas del inglés Human Umbilical Vein Endotelial Cells, ATCC® PCS-100-010™ Normal, Human) y las células musculares lisas vasculares (VSMCs, del inglés Vascular Smooth Muscle Cells, PCS-100-021 Primary Coronary Artery Smooth Muscle Cells; Normal, Human (HCASMC)) se adquirieron de la compañía ATCC. Para el caso de las HUVECs fueron propagadas utilizando el método ya estandarizado en nuestro laboratorio por Acosta en el 2012<sup>62</sup>, para el cual se empleó el medio denominado como UDMM-ENDO el cual contiene los reactivos glutamax, Suero fetal bobino (FBS), ácido ascórbico, heparina e hidrocortisona, así como los factores de crecimiento necesarios para realizar su propagación (FGF, EGF, IGF y VEGF). El total de células contenidas de los tubos de criopreservación se descongelaron, contaron y se sembraron en cajas Petri de 100 mm para cultivo celular a una densidad de 9,090 cel/cm<sup>2</sup> (células

por centímetro cuadrado) y sus pases o subcultivos fueron realizados cuando los cultivos presentaron una confluencia del 80%, para el desprendimiento y disgregado de este tipo celular se utilizó el reactivo Triple Express. Las células fueron incubadas a una temperatura de 37 °C y CO<sub>2</sub> 5%.

El cultivo de VSMC se realizó siguiendo las especificaciones recomendadas por ATCC, para lo cual fue empleado el medio comercial vascular (ATCC® PCS-100-030) adicionado con el kit de crecimiento VEGF (ATCC® PCS-110-042), las células se descongelaron, contaron y sembraron a una densidad de 5000 cel/cm<sup>2</sup> y se incubaron a 37 °C en un ambiente con CO<sub>2</sub> 5%. Los pases fueron realizados cuando las células presentaron un 80% de confluencia empleando tripsina al 0.25 % para realizar su disgregado.

Una vez realizado el disgregado de los tipos celulares se realizó su conteo en cámara de Neubauer. Para la identificación de las células muertas se empleó el colorante azul de tripano, ya que posee la capacidad de unirse a las células muertas permitiendo de esta manera hacer la distinción entre las células vivas. El conteo se realizó promediando 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer multiplicado por el factor de dilución y por el volumen total de mezcla, la formula se indica a continuación.

$$\text{Fórmula 1, Total de células vivas. } C_v = [((c_1 + c_2 + c_3 + c_4 + c_5) / 5) * 20000] * \text{ml}$$

Donde c<sub>1</sub>= cuadrante 1, c<sub>2</sub>= cuadrante 2, etc. 20000= es el factor de dilución y ml= el volumen total de medio en el que se encuentran resuspendidas el total de células disgregadas.

### 6.3.2. Parámetros estadísticos

Durante el cultivo de los dos tipos celulares, se realizó la evaluación de parámetros como la densidad de sembrado, tiempo de cultivo, rendimiento, porcentaje de viabilidad, doblaje poblacional y tiempo de doblaje. Las fórmulas utilizadas para realizar estos cálculos se enlistan a continuación.

$$\text{Fórmula 2, densidad de sembrado. } D = \frac{\text{No. de células inoculadas}}{\text{Área de cultivo}}$$

$$\text{Fórmula 3, tiempo de cultivo. } T_c = \text{No. de días u horas entre cada subcultivo}$$

$$\text{Fórmula 4, rendimiento. } R = \frac{\text{No. total de células vivas}}{\text{Área de cultivo}}$$

Fórmula 5, porcentaje de viabilidad.  $Vb = \frac{\text{No. células vivas} * 100}{(\text{No. cel vivas} + \text{No. cel muertas})}$

Fórmula 6, doblaje poblacional.  $DP = \log 2(\text{cel vivas al tiempo 1} / \text{cel vivas al tiempo 0})$

Fórmula 7, tiempo de doblaje.  $TD = \text{Horas de cultivo} / DP$

De esta manera los datos obtenidos del cultivo de HUVECs y VSMCs fueron graficados y son presentados en la sección de resultados.

#### **6.4. Generación de un medio de cultivo para el cultivo de VSMCs**

Durante la propagación de VSMCs se encontró con la necesidad de desarrollar un medio de cultivo de mayor accesibilidad y un menor costo, de esta manera se inició con la búsqueda de una fórmula que permitiera propagar y mantener el fenotipo de este tipo celular en nuestro laboratorio. Para lograr este objetivo se formularon y evaluaron distintos medios de cultivo basados en artículos previamente reportados, así como el conocimiento generado dentro de nuestro laboratorio. Para el cultivo de VSMCs se empleó el medio de cultivo DMEM F-12 así como distintas combinaciones de factores de crecimiento y aditivos como antibiótico, Glutamax, suero fetal bobino, ácido ascórbico y etc.

Para la evaluación del cultivo de VSMC se realizaron dos experimentos siendo el primero el ensayo colorimétrico de SRB para evaluar el porcentaje de células en cultivo y el segundo por propagación en cajas Petri de 100 mm de diámetro con adherencia para evaluar su comportamiento. El ensayo colorimétrico se realizó en placas de 24 pozos con una densidad de cultivo de 5000 células por  $\text{cm}^2$  para los tres primeros medios de cultivo y fue modificada a 9090  $\text{cel}/\text{cm}^2$  para los últimos medios y con replicas cuádruples la cuales fueron incubadas a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$ , las placas de cultivo de VSMC fueron fijadas con ácido tricloroacético al 10% a las 24, 72 y 168 horas de cultivo (Días de cultivo 1, 3 y 7 respectivamente).

De manera inicial, se generaron dos medios de cultivo y se compararon con el medio comercializado distribuido por ATCC. Para la generación del primer medio de cultivo se emplearon los aditivos mencionados por ATCC en los que se encuentran factores de crecimiento como FGF-básico (5 ng/ml), EGF (5 ng/ml) y los reactivos Glutamax 10%, insulina (5 ug/ml), ácido ascórbico (50ug/ml) y SFB 5% y utilizando como medio base DMEM-F12 suplementado con HEPES, el cual se empleó para la generación de los diferentes medios de cultivo. De esta manera el primer medio de cultivo se designó como Formula-ATCC y se designado como medio MD 1. El segundo medio se elaboró con la formula reportada para el cultivo de estas células el cual incluye medio base DMEM-F12 con HEPES adicionando

10% de SFB y fue designado como medio MD 2.

De los resultados obtenidos fue claro que no teníamos las condiciones máximas de propagación, por lo tanto con el objetivo de mejorar la eficiencia del medio de cultivo, se realizó la mezcla de los medios evaluados con anterioridad y el medio elaborado fue designado como MD 3 y la formulación fue la siguiente: FGF-b (5 ng/ml), EGF (5 ng/ml) y los reactivos Glutamax 5%, insulina (5 ug/ml), ácido ascórbico (50ug/ml) y SFB 10%.

Debido a que los resultados de cultivo y propagación celular no mostraron una mejoría en el cultivo de VSMC fue necesario formular nuevos medios de cultivo, en este caso se adicionó el Factor de derivado de plaquetas (PDGF) y se designó como MD 4 ya que se sabe que éste activa la proliferación de las VSMC<sup>63</sup>, de esta manera la formulación quedó compuesta por con los siguientes aditivos: PDGF (15ng/ml), FGF-b (5 ng/ml), EGF (5 ng/ml) y los reactivos Glutamax 5%, insulina (5 ug/ml), ácido ascórbico (50ug/ml) y SFB 10%, así mismo con el objetivo de evidenciar si otros medios de cultivo o alguno de sus componentes con los que se cuentan en el laboratorio favorecerían la proliferación de este tipo celular, las VSMC se crecieron en los medios de cultivo UDMM-EPI y UDMM-ENDO, Una vez realizada la evaluación los resultados obtenidos mostraron un incremento en la propagación de las VSMCs cuando se cultivaron en el medio UDMM-EPI, sin embargo fue necesaria una nueva formulación de medios, ya que, aunque con el cultivo con el medio UDMM-EPI favoreció la propagación de VSMCs, estas células perdieron su completamente su morfología.

De esta manera, los resultados generados hasta ese momento indicaron un bajo índice de proliferación o bien un cambio morfológico, por lo que se realizaron nuevas formulaciones de medios las cuales contuvieran el factor de crecimiento TGF $\beta$ -1 el cual se conoce que promueve la proliferación de VSMCs, además con el previo conocimiento de que el medio UDMM-EPI ayuda en la propagación de VSMC, se emplearon algunos componentes para generar nuevos medios de cultivo. A continuación se formularon 3 medios de cultivo con los factores y aditivos que contiene el medio MD 3 y fueron suplementados y designados como se menciona a continuación, el primer medio fue suplementado con TGF- $\beta$ 1 para obtener una concentración final de 5 ug/ml y fue designado como MD 3.1, el segundo medio fue suplementado TGF- $\beta$ 1 e IGF para una concentración final de 5 ug/ml y 15 ug/ml respectivamente por lo que fue designado como MD 3.2 y por último, en base a los resultados obtenidos del cultivo de VSMC en medio UDMM-EPI se tomó la decisión de utilizar algunos de sus componentes que no contenían los medios formulados hasta ese momento, por lo que de esta manera se eligieron los reactivos adenina e hidrocortisona y el medio fue designado como MD 3.3.

## 6.5. Caracterización por inmunocitofluorescencia

Así mismo, durante su propagación fue importante realizar su seguimiento morfológico y molecular con el objetivo de verificar que su fenotipo no sufra cambios debido a su propagación *in vitro* con el transcurso del tiempo de cultivo, por lo que se llevó a cabo su monitoreo mediante inmunocitofluorescencia para la detección de moléculas características de ambos tipos celulares.

Para ambos casos las células fueron sembradas en cubreobjetos de cristal redondos con un diámetro de 18 mm y un área de 2.54 cm<sup>2</sup>, los cuales previamente fueron tratados con poli-D-lisina 0.25% para permitir la adherencia celular. A cada cristal se le adicionaron 40,000 células obteniendo una densidad de 15,748 cel/cm<sup>2</sup> y fueron crecidas en su respectivo medio de cultivo por 24 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Los cultivos fueron fijados con paraformaldehído al 4% por una hora a 4°C y posteriormente fueron lavadas con 2 veces con PBS 1X, por último, los cultivos fueron almacenados con PBS 1X máximo por una semana hasta realizar su evaluación.

Los cultivos fijados fueron permeabilizados con Triton 100X diluido a 0.25% por 20 min a temperatura ambiente, a continuación, fueron incubados con la solución de bloqueo por 30 min, posteriormente se incubaron por una hora con los anticuerpos primarios correspondientes para cada tipo celular como se indica a continuación.

Para el caso de las HUVECs se emplearon anticuerpos primarios específicos para la detección del factor de Von Willenbrand (VWF) de la marca ABCAM catalogo ab9378 a una dilución 1:100 y el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-R o Flk-1) de la marca Thermo Fisher catalogo RB-1526-P a una dilución 1:100.

Para el caso de VSMC se utilizaron los anticuerpos primarios específicos para la detección de actina de musculo liso de la marca Thermo Fisher catálogo MS-113-P1 a una dilución 1:800, el anticuerpo primario para la detección de miosina de musculo liso de la marca Bio SB catálogo BSB 5927 a una dilución 1:500.

Al término de la incubación se realizaron 5 lavados con la solución de lavados y se adicionó el anticuerpo secundario, para el caso de las HUVECs se empleó el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo fluoresceinado marca Invitrogen catalogo A-11034 a una dilución de 1:1000 y para el caso de las VSMC se empleó el anticuerpo secundario fluoresceinado anti-raton de la marca Thermo Fisher catalogo A-11002 a una dilución 1:1000, una vez concluido el tiempo de incubación las muestras se lavaron 5 veces con TBS. Por último las muestras se tiñeron con el fluorocromo DAPI de la marca Invitrogen

Biotechnologies con el número de catálogo F203/F204 (0.5 ug/ml) a una dilución 1:25.

La captura de las imágenes se realizó en el área de patología del Hospital del niño y el Adolescente Morelense, empleando un microscopio de epifluorescencia de la marca Olympus BX61 con cámara Evolution VF Cooled color.

## **6.6. Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivos celulares**

Uno de los requerimientos para llevar a cabo la evaluación de citotoxicidad celular es la evaluación del comportamiento celular en condiciones normales de cultivo, por ellos se realizó el seguimiento del cultivo celular empleando una curva de densidad celular por lo cual las HUVECs fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos sembrando 312.5, 625, 1250, 2500, 5000, 10000, 20000, 40000 y 80000 cel/cm<sup>2</sup> (o bien 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800, 25600 células por pozo respectivamente) cada una de las placas fue fijada cada 24 horas por 8 días con ácido tricloroacético (TCA) al 10% y fue evaluada mediante el método colorimétrico de Sulfurodamina B indicado en el siguiente apartado.

La evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivos de HUVECs y VSMC se realizó mediante el método colorimétrico de Sulfurodamina-B (SRB), para ello, los dos tipos celulares fueron propagados con sus respectivos medios de cultivo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en cajas múltipozos de 96 con 3200 células/pozo. Una vez transcurridas 72 horas de cultivo, cuando los cultivos alcanzaron el 60% de confluencia, se realizó un cambio de medio al 50%, seguido de la adición de los diferentes poliuretanos estériles. Tras 24 horas de cultivo los poliuretanos fueron retirados uno a uno con apoyo de pinzas de disección y una vez terminado este proceso los cultivos celulares fueron fijados con ácido tricloroacético al 10% por 1 hora, seguidos de lavados 5 con aguas destilada a 4°C y secados a temperatura ambiente por 12 horas. A continuación, los cultivos ya fijados se tiñeron con la SRB por 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron cinco veces con ácido acético 1% y se secaron por 30 min en campana de flujo laminar, el colorante SRB se solubilizó con Tris base al 1% y la absorbancia se midió en un lector de placas SINERGY 2 a una longitud de onda de 570nm. Los resultados de la absorbancia para cada condición fueron comparados con el cultivo de los tipos celulares sin poliuretanos y su análisis se realizó mediante estadístico para determinar si las membranas de poliuretanos (PU) causan un efecto toxico en los cultivos. De esta manera se evaluó un total de seis diferentes poliuretanos los cuales fueron designados como: PL 1, PL 2, PL 3, PL 4 (Tecoflex), PL 5 (mezcla) y PL 6.

## **6.7. Evaluación del estrés oxidativo en cultivos celulares**

La evaluación de la generación de estrés oxidativo por parte de los poliuretanos en cultivos de HUVECs y VSMCs se realizó mediante la detección del formazan generado por la reducción de nitro azul tetrasodio (Nitro blue tetrasolium, NTB) por las especies reactivas de oxígeno presentes en los cultivos. Las HUVECs y VSMCs se cultivaron en placas de 96 pozos inoculando 3200 células por pozo, a las 72 horas de cultivo y una vez que éstas alcanzaron el 60% de confluencia se adicionó cada uno de los diferentes poliuretanos estériles a los cultivos celulares y se dejaron incubar por 24 horas. A la par de la adición de los poliuretanos y con el objetivo de contar con un control positivo de estrés oxidativo 6 pozos de cultivo con su respectivo tipo celular, fueron adicionados con piocianina a una concentración final de 5  $\mu$ M. Una vez culminado el tiempo de incubación los poliuretanos se retiraron uno a uno con ayuda de pinzas de disección. El medio de cultivo se retiró y se realizó un lavado a todos los pozos en cultivo realizado con buffer de fosfatos formula Dulbecco 1 % (PBS-D) y por último se adicionaron 50  $\mu$ L de PBS-D 1%, para continuar con la evaluación se agregaron 50  $\mu$ L de la mezcla del reactivo NBT 2X (solubilizado en PBS-D) con lo que logró una concentración final de 1mg/ml. La placa de cultivo se incubó a 37°C por 30 min y al término de la incubación la mezcla de reacción se retiró y las células fueron lisadas con SDS 10%, de esta manera una vez solubilizado el formazan en las placas de cultivo se prosiguió a la lectura de la absorbancia en un lector de placas SINERGY 2 a una longitud de onda de 564nm. Por último, los resultados obtenidos se compararon con los cultivos controles en ausencia de poliuretanos.

## **6.8. Co-cultivo Celular**

El co-cultivo de HUVECs y VSMCs partió con la identificación de un medio de cultivo que permitiera la sobrevivencia de los dos tipos celulares y para ello ambos tipos celulares se crecieron en medios opuestos y en mezclas de medio de cultivo conteniendo 50% de medio UDMM-ENDO y 50% de medio UDMM-VSMC, el comportamiento de los cultivos celulares fue comparado con las condición de cultivo normal para cada tipo celular (HUVECs crecidas en medio UDMM-ENDO y VSMCs crecidas en medio UDMM-VSMC). Ambos tipos celulares fueron sembrados individualmente en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 9090 cel/cm<sup>2</sup>, por otro lado, para los co-cultivos celulares se sembraron dos densidades celulares esto con el previo conocimiento de que la densidad celular modula el comportamiento en el cultivo celular, de esta manera la primer densidad de cultivo fue la empleada hasta el momento con 9,090cel/cm<sup>2</sup> (4,545 cel/cm<sup>2</sup> por cada tipo celular) y la segunda densidad de 18,180 cel/cm<sup>2</sup> (9,090 cel/cm<sup>2</sup> por cada tipo celular).

Para la cuantificación del porcentaje de crecimiento celular se realizó por el método colorimétrico de SRB por lo que para esta evaluación se sembraron 3 placas de 24 pozos, las placas se fijaron con TCA al 10% siendo la primera fijada a las 24 horas de cultivo, la segunda las 72 horas y la tercera a las 168 horas.

### 6.9. Cultivo sobre membrana de poliuretano

Para la evaluación de la adherencia de HUVECs y VSMCs a los poliuretanos, se realizó el cultivo de estas poblaciones celulares sobre 1 cm<sup>2</sup> de cada uno de los poliuretanos.

Para ello se utilizarán tres condiciones de cultivo, la condición control que serán los co-cultivos sin la membrana de PU, la segunda condición empleando las membranas de PU.

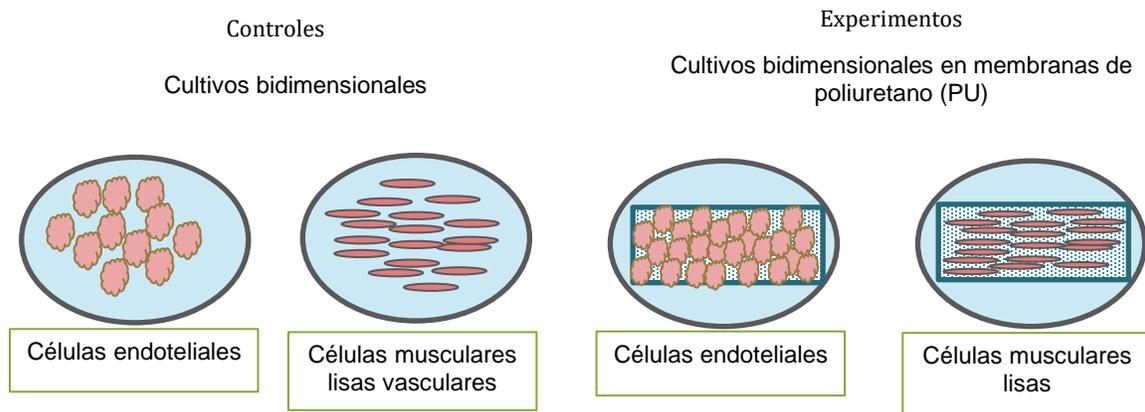


Figura 6. Cultivo sobre membranas de Poliuretano. Imagen representativa de cultivos celulares en adherencia y sobre poliuretanos.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Síntesis y caracterización de poliuretanos**

#### **7.1.1. Síntesis y elaboración de membranas**

Del producto de reacción de síntesis del poliuretano cisteína se obtuvo un polímero con características elásticas, semitransparente, del cual se generaron dos películas o membranas para su evaluación. En general los polímeros donados por el CICY mostraron una buena elasticidad, por lo que se pudo realizar la elaboración de películas o membranas de cada uno de ellos, esto con el objetivo de contar con una superficie de cultivo para los dos tipos celulares. Las imágenes de las membranas de poliuretanos se muestran en la Figura 7, en A) se muestra el polímero PL 1, en B el polímero PL 2, en C el polímero PL 3, en D el polímero PL 4, en E el polímero PL 5 Mezcla 1:1 de poliuretano y en F el polímero PL6.

Para el caso de las membranas PL1 Figura 7A se observó semitransparente y con buena flexibilidad, la película de PL2 Figura 7B presentó menor transparencia, así como una buena elasticidad, la película PL3 mostrada en la Figura 7C presentó menor transparencia y mostró características semirrígidas, la película PL4 Figura 7D presentó una alta elasticidad y transparencia, la película PL5 elaborada con la Mezcla 1:1 de poliuretano Figura 7E presentó características intermedias entre los polímeros que lo componen y por último la película PL6 Figura 8F presentó una coloración marrón y una mayor rigidez comparada como los polímeros anteriores. Todas las membranas elaboradas fueron cubiertas con aluminio y almacenadas en bolsas de sellado hermético hasta su uso.

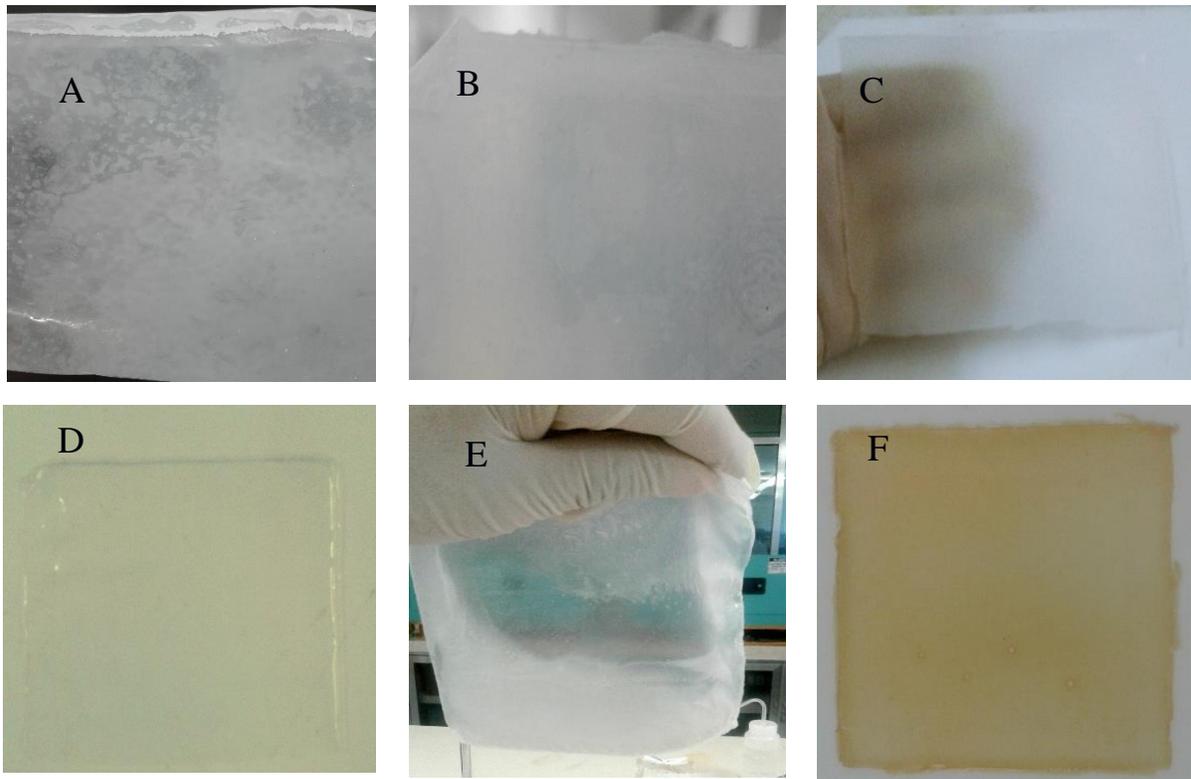


Figura 7. Películas de poliuretanos. Poliuretanos elaborados en la Unidad de Materiales del CICY, utilizando los métodos de síntesis por etapas y moldeado por deposición- evaporación. A) poliuretano PL1, B) Poliuretano PL2, C) poliuretano PL3, D) poliuretano PL 4 Tecoflex, E) poliuretano PL 5 mezcla (1:1) y F) Poliuretano PL 6. Las películas elaboradas son de 12x12 cm y un grosor de 1mm.

### 7.1.2. Microscopia electrónica de barrido

Las membranas de poliuretanos formadas fueron evaluadas por microscopia electrónica de barrido utilizando un microscopio de la marca ZEISS modelo EVO-LS10 life science, empleando una presión de vapor de agua de 10 pascales (Ps), esto con el objetivo de evidenciar si su estructura superficial posee características físicas que pudieran favorecer el anclaje o adherencia celular, las imágenes obtenidas se muestran a continuación en la Figura 8 donde se pueden apreciar las diferentes características presentes en la superficie del polímero, de igual manera se realizó un corte transversal con la intención de observar la estructura interna de estos polímeros. Presentando una superficie principalmente lisa para los poliuretanos de PL 1 y PL 4, mientras que los polímeros PL 2, PL 3, PL 4 y PL 5 presentan una superficie porosa. Por otro lado, al visualizar el corte transversal, los polímeros PL3 y PL5 fueron los únicos que presentaron estructuras cristalinas dentro de sí mismos, mientras que los demás polímeros se observaron de manera homogénea en su porción interna.

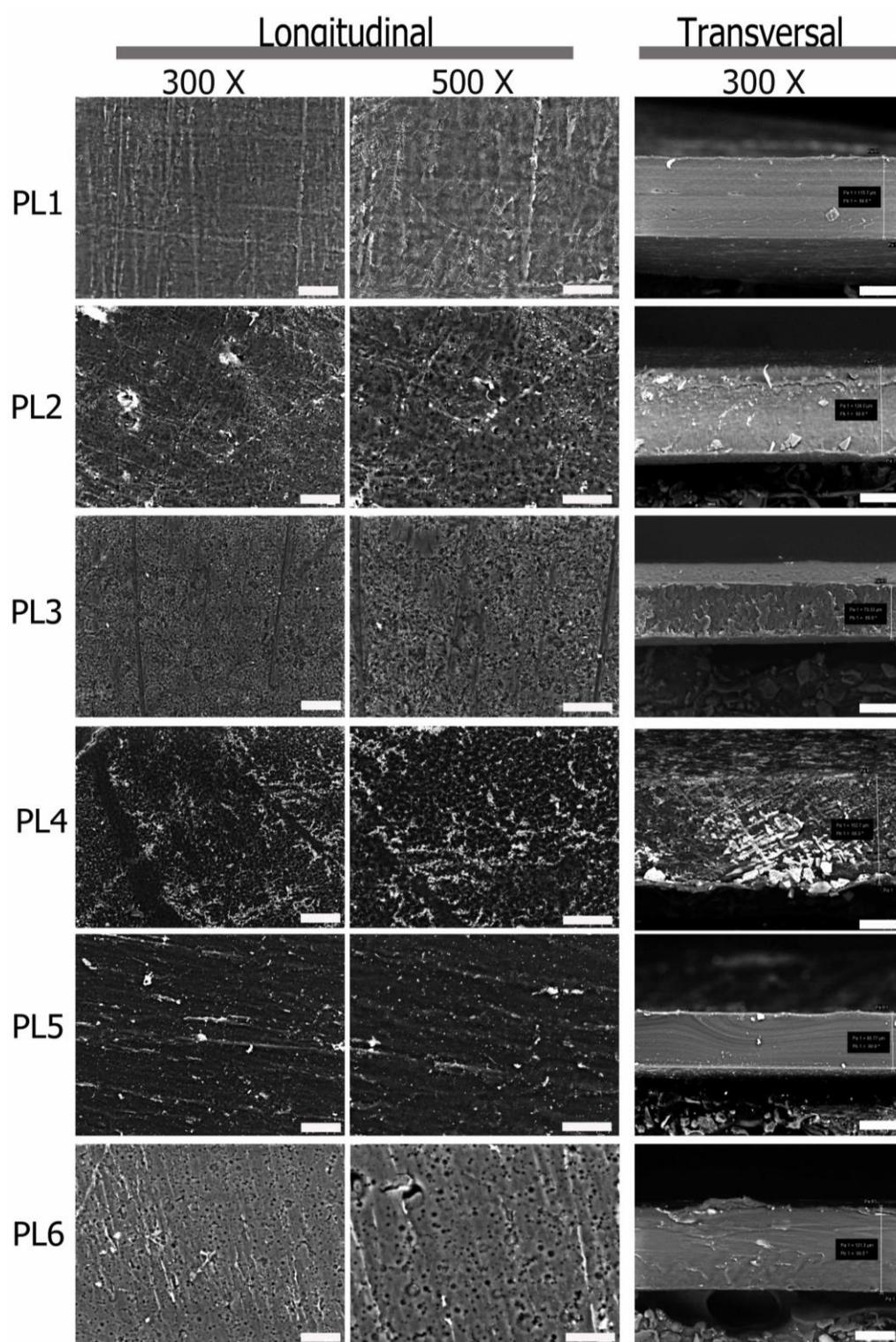


Figura 8. Caracterización de la superficie de los poliuretanos. Imágenes de la superficies y cortes transversales de poliuretanos segmentados obtenida por microscopia electrónica de barrido. Imágenes obtenidas en la Unidad de Microscopia, CEPROBI. Barras indicadoras 50  $\mu\text{m}$ .

### 7.1.3. Construcción de estructuras cilíndricas

La construcción de las estructuras cilíndricas de los poliuretanos fue realizada por la técnica de enrollado la cual se basa en realizar una película de polímero en el molde de secado, donde dos horas antes de concluir el tiempo de secado, esta película es enrollada sobre un cilindro de teflón, obteniendo un tubo con 6mm de diámetro. Los tubos elaborados conservaron las mismas características propias del polímero con el que se elaboraron. El tubo construido con el polímero comercial PL 4-Tecoflex presentó alta elasticidad Figura 9A. Los tubos construidos del PL 5 Mezcla 50:50, presentaron una elasticidad intermedia comparada con los dos tubos anteriores Figura 9 B y C.

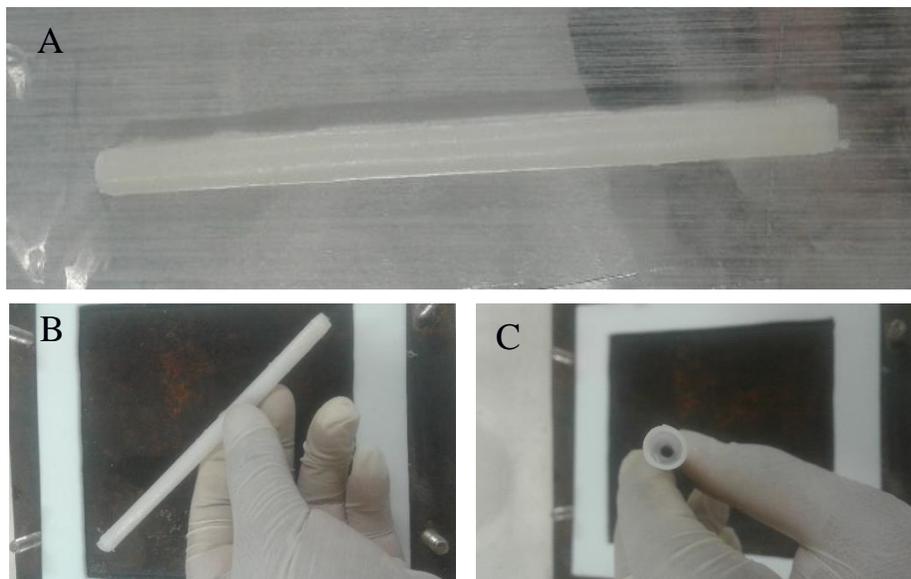


Figura 9. Estructuras cilíndricas de poliuretanos. Estructuras formadas por enrollado de películas de poliuretanos sobre un cilindro de teflón realizados antes de culminar su tiempo de secado. A) Estructura elaborada del poliuretano PL4 Tecoflex. B y C, estructura elaborada con el polímero PL5 mezcla de los poliuretanos.

## 7.2. Propagación y caracterización de cultivos celulares

### 7.2.1. Evaluación morfológica del cultivo de HUVECs

Durante el proceso de propagación de los cultivos celulares se llevó a cabo su monitoreo mediante su registro fotográfico y el conjunto de estas imágenes se muestra en las próximas figuras.

El seguimiento del cultivo de células endoteliales se muestra en la Figura 10, en la cual se observa un correcto crecimiento en los pases 5 y 6 (A y B) presentando una morfología compacta y redondeada, siendo esta similar a la reportada en los cultivos de las empresas ScienCell Company (G), Axol (H) y ATCC (I), proveedoras de líneas celulares. La morfología de las HUVECs cultivadas se ve alterada a partir del pase 7 al 10 (C al F) donde su morfología comienza a alargarse siendo esta morfología alargada predominante en los últimos pases.

De esta manera podemos asumir que morfológicamente se cuenta con células similares a las cultivadas por casas comerciales. El cultivo de HUVECs fue detenido en el pase 10 ya que se conoce que las poblaciones de los cultivos celulares primarios pueden comprometerse en pases avanzados.

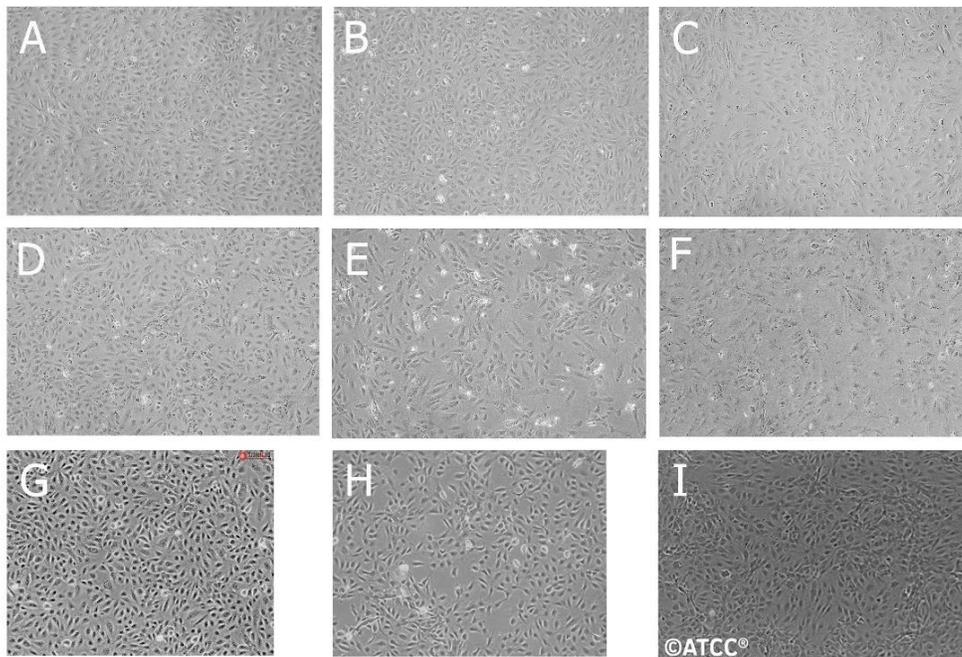


Figura 10. Caracterización morfológica de HUVECs ATCC. En las imágenes obtenidas del cultivo de HUVECs en condiciones de adherencia. De A a F se presenta el seguimiento morfológico del cultivo de células endoteliales a partir del descongelado del pase 5 y cultivadas hasta el pase número 10 comparado con los cultivos G) HUVECs de la empresa ScienceCell, H) HUVECs de la empresa Axol e I) HUVECs cultivadas por la ATCC.

### 7.2.2. Parámetros estadísticos del cultivo de HUVECs

La propagación de HUVECs se realizó sembrando una densidad de 9090 cel/cm<sup>2</sup>, con excepción de los cultivos procedentes de viales congelados en nitrógeno, en cuya condición se cultivó una mayor densidad ya que la viabilidad celular suele ser comprometida debido a las condiciones de criopreservación. Por otra parte, los resultados obtenidos de los parámetros estadísticos de los cultivos de HUVECs se muestran en la Figura 11, cultivo que inició a partir del descongelado en el pase número 5 y se mantuvo hasta el pase número 10 con el objetivo de no comprometer los cultivos celulares.

Se muestran los resultados del rendimiento celular obtenidos para el cultivo de HUVECs, los resultados se muestran en cel/cm<sup>2</sup>, se observa que el rendimiento (células obtenidas al final del cultivo) va disminuyendo conforme se avanza en los pases de cultivo. Este comportamiento se ha reportado por diversos grupos, lo que se ha considerado como un reflejo de la senescencia replicativa. Dentro de los niveles obtenidos del rendimiento celular encontramos valores máximos de 46,181 cel/cm<sup>2</sup> en el pase 5 y valores mínimos de 11,006 cel/cm<sup>2</sup> en el pase 10.

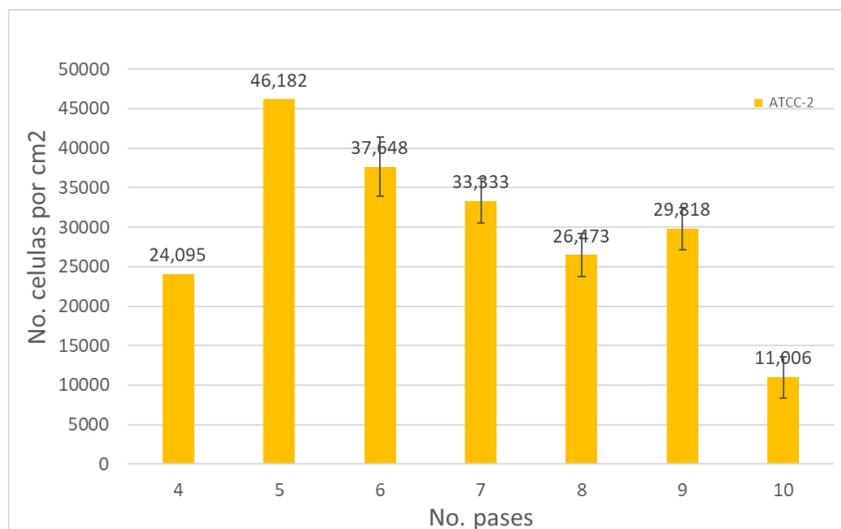


Figura 11. Rendimiento celular del cultivo de HUVECs ATCC. Se presenta el número de células obtenidos del cultivo de HUVECs propagados desde el pase 4 al pase número 10 empleando el medio UDMM-ENDO y reportado en células/cm<sup>2</sup>. Ensayo realizado por triplicado.

Por otra parte, el tiempo de cultivo necesario para alcanzar la confluencia fue diferente ya que se realizó desde los dos días en el pase 4 hasta los nueve días en el pase 10, manteniendo un promedio de 8 días de cultivo (Figura 12). Lo que puede relacionarse también con la disminución de su capacidad proliferativa, siendo este un rasgo más del proceso de senescencia.

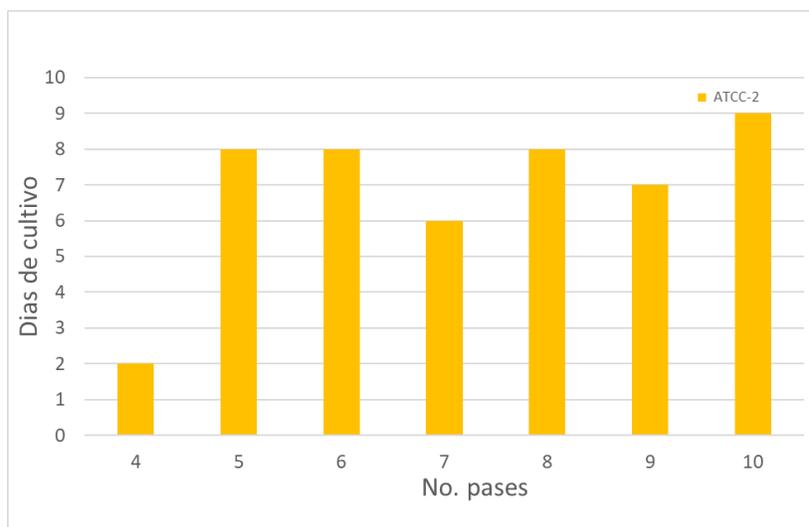


Figura 12. Tiempo en días del subcultivo de HUVECs ATCC. En esta gráfica se muestra el tiempo de subcultivo de HUVECs cultivadas desde el pase 4 hasta el pase 10 crecidas en medio UDMM-ENDO. Ensayo realizado por triplicado.

Así mismo, se evaluó la viabilidad del cultivo celular de cada pase, manteniéndose en su mayoría por arriba del 80 Figura 13, lo que descarta que la manipulación fuera un factor que afectara los resultados obtenidos.

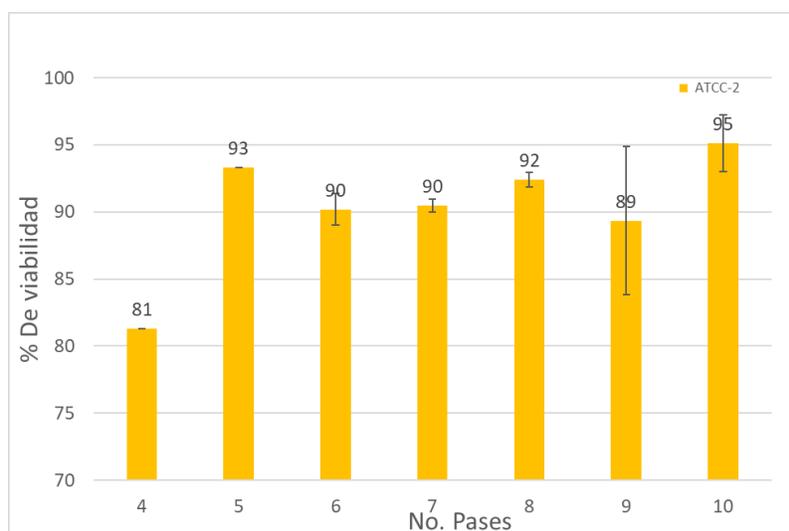


Figura 13. Porcentaje de viabilidad del cultivo de HUVECs ATCC. Esta grafica muestra los valores obtenidos del porcentaje de la viabilidad al realizar el subcultivo de HUVECs en cada pase al alcanzar la semiconfluencia, se grafica del pase 4 hasta el pase 10 crecidas en medio UDMM-ENDO. Ensayo realizado por triplicado.

Por último, con los valores obtenidos del rendimiento celular y los días de cultivo fue posible determinar el número de doblaje poblacional (DP) que indica el número de veces en el cual se duplico la población celular inicial y el tiempo de doblaje poblacional (TDP) que se presentan en la Figura 14 y 15,

respectivamente. Como se puede observar existe una disminución en ambos parámetros llegando a obtenerse un máximo de 2.3 en el pase 2, mientras que se llega a un valor de 0.28 doblajes celulares en el pase 10 (Figura 14). En lo que respecta a las horas empleadas para la duplicación celular, cuando se obtienen valores muy bajos de duplicación y el tiempo de cultivo es amplio, se obtiene como resultado un incremento en el tiempo de doblaje, este comportamiento puede identificarse en el pase número 10 al obtener un tiempo de 0.28 veces, generando un valor de 783 horas como las necesarias para obtener el DP (Figura 15), estos valores están de acuerdo a lo esperado en función de la disminución del rendimiento, y acorde al comportamiento de una población senescente. Así mismo, establecen que el pasé máximo en donde se puede observar aún una actividad proliferativa es en el pase 8.

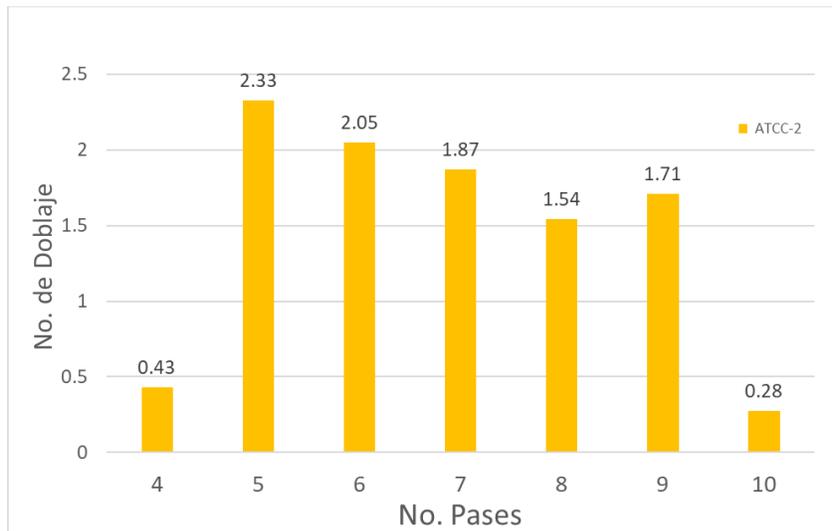


Figura 14. Doblaje poblacional del cultivo de HUVECs ATCC. Ensayo realizado por triplicado.

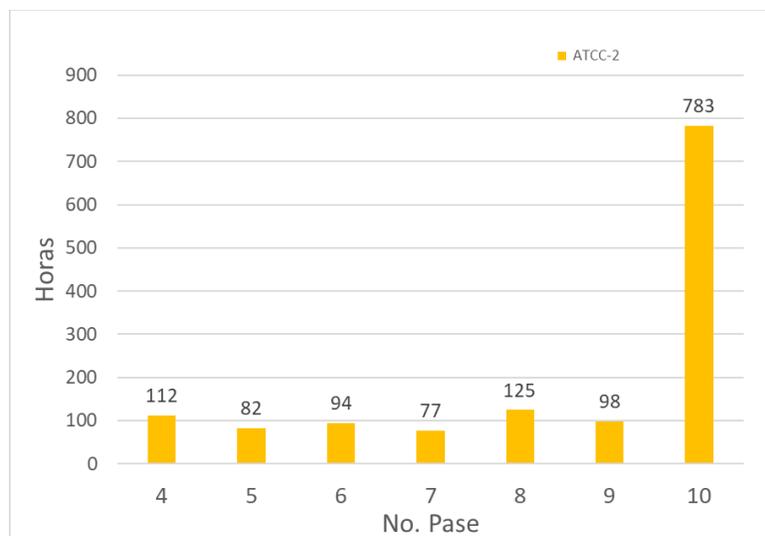


Figura 15. Tiempo de replicación del cultivo de HUVECs ATCC. Ensayo realizado por triplicado.

De esta manera y basados en los registros obtenidos para el cultivo de HUVECs es posible demostrar que las condiciones de cultivo aún pueden ser mejorados para obtener un comportamiento celular homogéneo a lo largo de los pases mayores de 7, por ello, apoyados en la experiencia de nuestro grupo de trabajo decidimos evaluar la densidad celular, que es uno de los factores determinantes en mantener constante una velocidad de proliferación, para lo cual se planteó la evaluación de una curva de densidad celular para identificar el número de células adecuado para mejorar las condiciones de cultivo de HUVECs.

### **7.2.3. Curva de densidad celular del cultivo de HUVECs**

Los resultados de cultivo obtenidos de la curva de densidades de HUVECs se realizó por el método colorimétrico de SRB, además de realizarlo por sextuplicado para cada una de las densidades, los promedios de este ensayo se muestran en la Figura 16. Los resultados obtenidos muestran el efecto de la densidad celular en la propagación de HUVECs (células/cm<sup>2</sup>), ya que los valores por debajo de 2500 cel/cm<sup>2</sup> no poseen capacidad de propagar la población de HUVECs, mientras que los valores a partir de 2500 cel/cm<sup>2</sup> favorecen la propagación del cultivo de este tipo celular. Por otro lado, dentro de las densidades que presentan un mejor desempeño en cuanto al mantenimiento de la población de HUVECs se encuentra la densidad correspondiente a 10,000 cel/cm<sup>2</sup> siendo ésta la condición que posee un comportamiento lineal con respecto a las densidades mayores de 2500 cel/cm<sup>2</sup>, así mismo posee una pendiente de 0.1597 y una R<sup>2</sup> del 0.9814 por lo que se consideró a esta densidad como la adecuada para la propagación de HUVECs y la utilizada para realizar los ensayos de citotoxicidad y estrés oxidativo en nuestros ensayos posteriores.

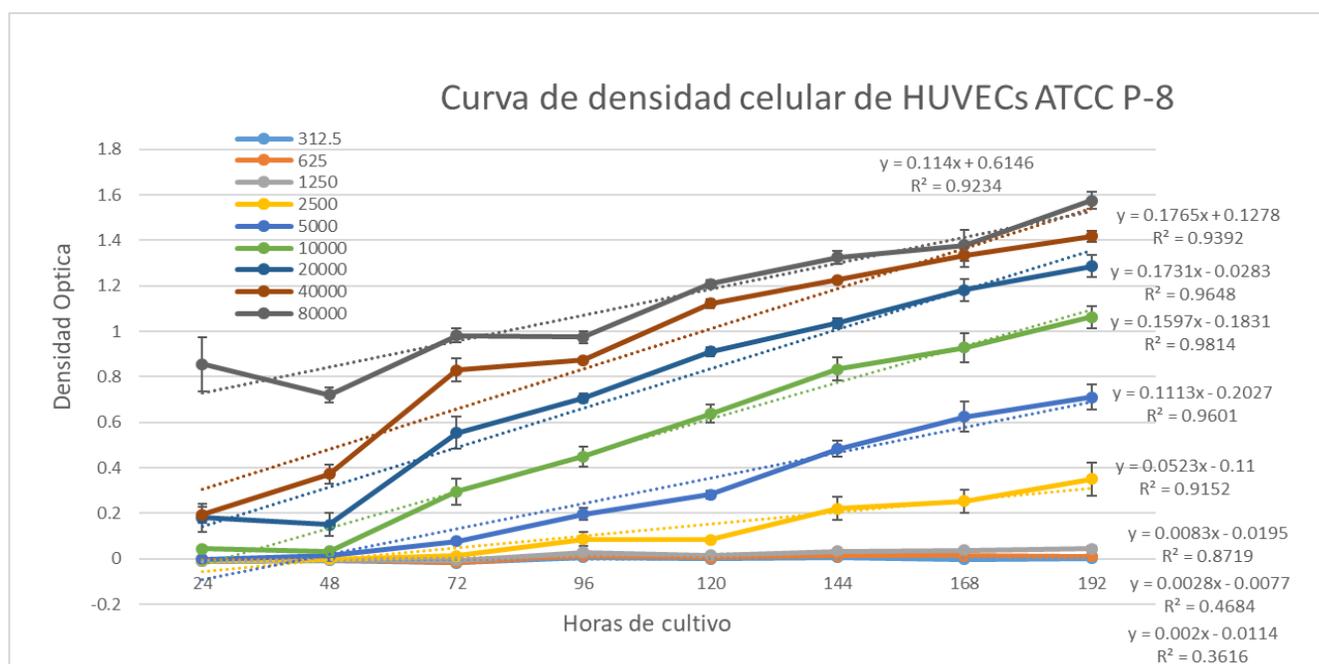


Figura 16. Curva de densidad para la propagación de HUVEC. Cada una de las diferentes densidades de cultivo se presenta con un color diferente y como se indica. Las curvas de cultivo obtenidas fueron linealizadas y los valores obtenidos de la ecuación de la recta se muestran para las diferentes densidades evaluadas. Ensayo realizado por cuadruplicado.

#### 7.2.4. Inmunoconfuorescencia.

Para confirmar la identidad celular de las HUVECs que se tenían en cultivo, las poblaciones celulares fueron evaluadas por inmunoconfuorescencia empleando los anticuerpos específicos para el factor de Von Willenbrand y el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR o Flk-1) (17 C y D). Por otra parte, para evidenciar la proliferación celular se empleó el anticuerpo específico para Ki67. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 17.

Para identificar el Factor de Von Willenbrand (17, A y B) y Flk-1 (17 C y D) las HUVECs ATCC del pase 8 fueron cultivadas a una densidad confluyente de 22,222 cel/cm<sup>2</sup> en cristales de 1.8 cm<sup>2</sup> impregnados con poli-D-lisina, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% a las 24 horas de cultivo. Para evidenciar la proliferación celular se utilizó el anticuerpo específico anti Ki67 (Figura 17 E y 17 F), los cristales fueron sembrados a una densidad de 11,111 cel/cm<sup>2</sup> y fijadas a las 96 horas de cultivo cuando el cultivo presentaba una confluencia de 50 %, ya que este marcador solo puede ser observado en cultivos en estado de división celular. Por último, todos los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI.

De esta manera se muestra la positividad para el factor Von Willenbrand y Flk-1 en los cultivos de células endoteliales, por lo que se demuestra que la población propagada es la correspondiente a

HUVECs, mostrando una completa homogeneidad de la población. Por otra parte, también se logró demostrar la proliferación celular de HUVECs en el pase No. 8. Con lo que se puede concluir que se cuentan con condiciones que permiten la propagación celular de las HUVECs, aunque no de manera estable.

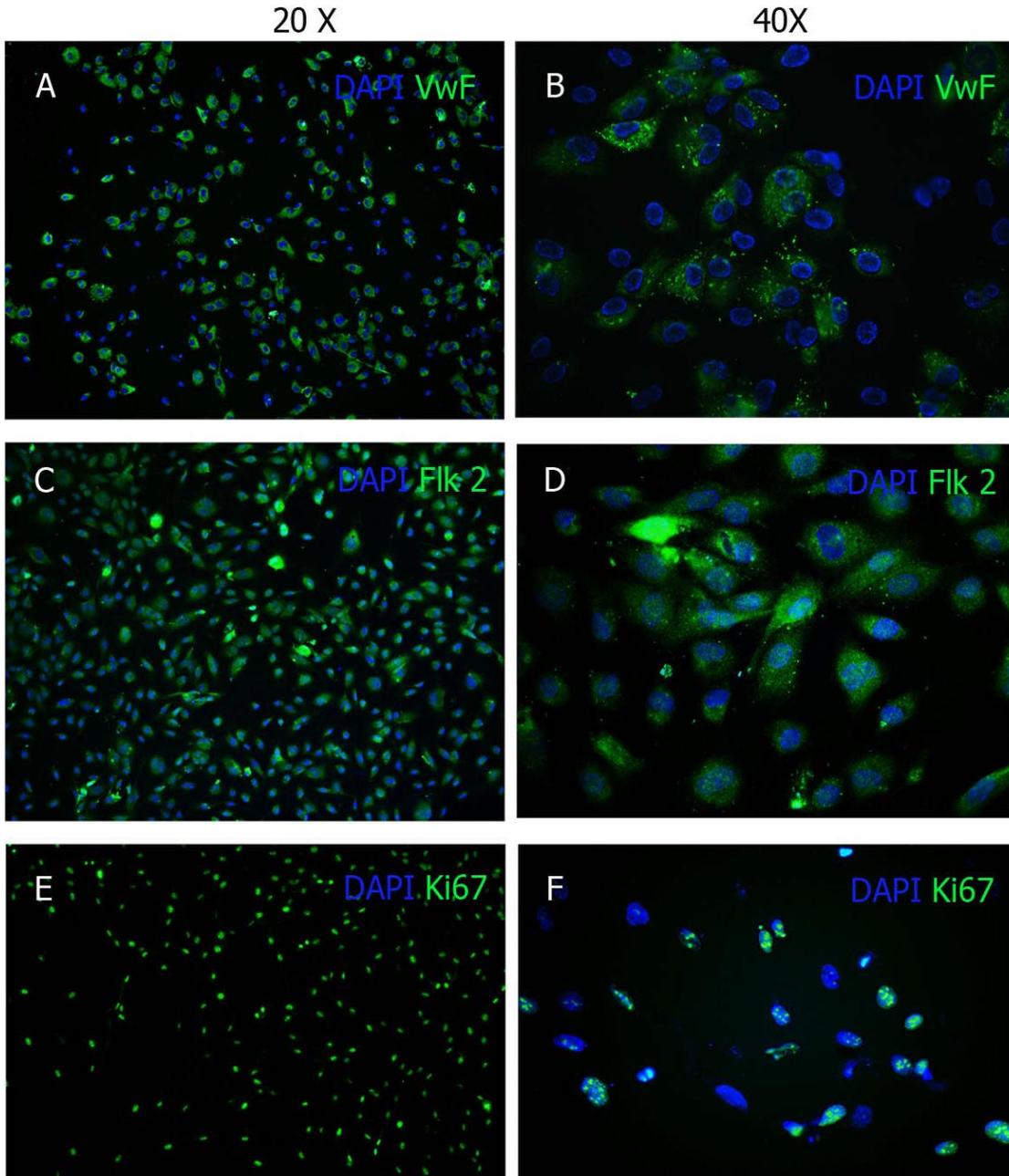


Figura 17. Caracterización por inmunocitofluorescencia del cultivo de HUVECs ATCC. Para este proceso se utilizaron los anticuerpos específicos, para el Factor Von Willenbrand mostradas en las figuras A y B, los anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial VEGFR, figura C y D. Además, se empleó el marcador de proliferación Ki-67 mostrados en las imágenes E y F. Por último, en azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI.

### 7.2.5. Evaluación morfológica del cultivo de VSMCs.

Por otra parte, se realizó la caracterización morfológica de VSMC en cultivo empleando el medio comercial ATCC. Las VSMC fueron descongeladas en pase 2 ya que son aisladas y propagadas por ATCC hasta el pase número 2 cuando son criopreservadas y comercializadas. Las imágenes del cultivo celular se presentan en la Figura 18, figura donde se muestra el seguimiento morfológico del cultivo del pase 2 al 8 de VSMCs. En esta figura se puede apreciar la morfología fusiforme característica de células musculares lisas de los pases 3 al 7, durante este periodo de cultivo no se observó un cambio morfológico, sin embargo, esta morfología fue fuertemente modificada en el pase número 8 al presentarse de forma alargada y ensanchada, observándose largas prolongaciones de la membrana celular, la cual fue acompañada por la pérdida de división celular reportada en los parámetros estadísticos.

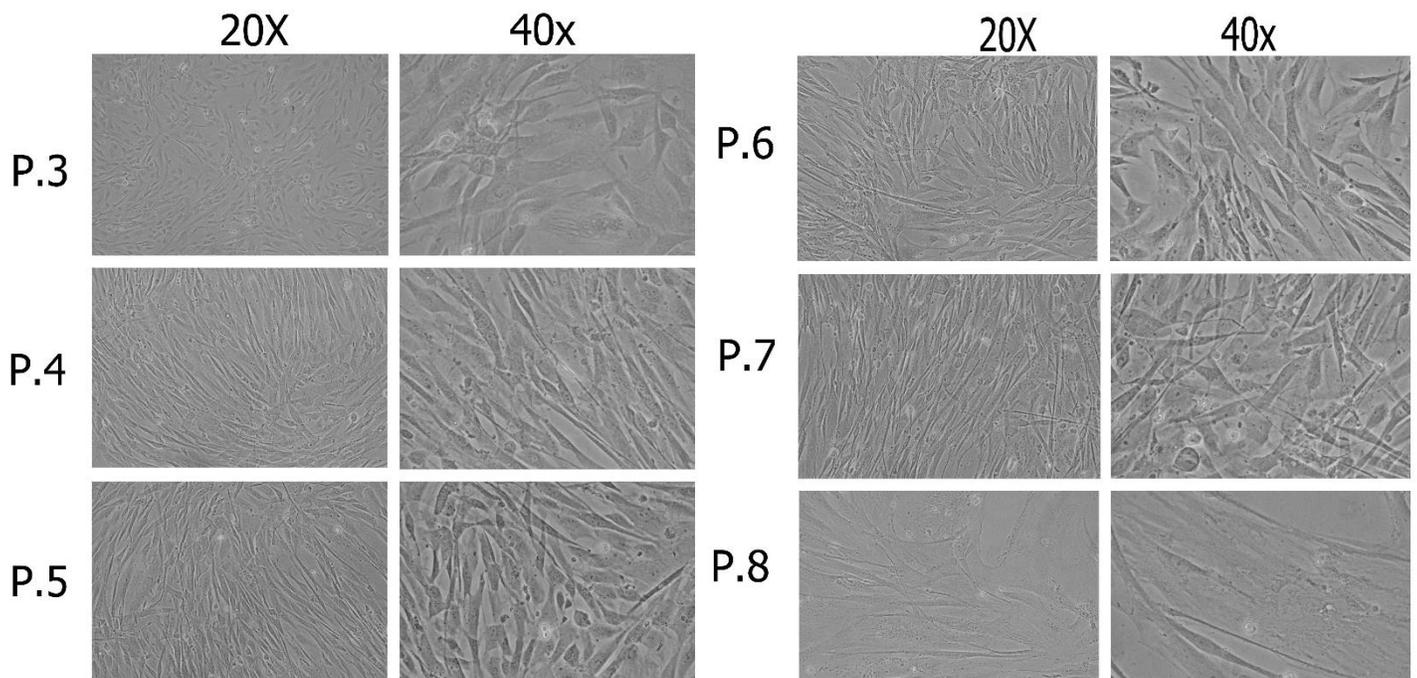


Figura 18. Caracterización morfológica de VSMC. Imágenes del cultivo de células musculares lisas vasculares cultivadas desde el pase número 3 hasta el pase número 8 propagadas con el medio y aditivos vasculares adquiridos de ATCC. Imágenes representativas de cultivos realizados por triplicado.

### 7.2.6. Parámetros estadísticos del cultivo de VSMCs

Para la propagación de VSMCs-ATCC se empleó una densidad de cultivo de 5 000 cel/cm<sup>2</sup> como lo indica el manual de propagación de ATCC para este tipo celular, en la mayoría de los casos con excepción del cultivo que provenía del descongelado del vial en cual se utilizó el doble de la densidad celular, esto debido a que se conoce que el proceso de criopreservación suele comprometer la viabilidad celular.

El subcultivo de VSMCs se llevó a cabo cuando estos alcanzaron una confluencia de 80 al 90%, los valores de los rendimientos obtenidos se muestran en la Figura 19, donde se puede apreciar que los valores mayores van desde 37,000 cel/cm<sup>2</sup> hasta 58,000 cel/cm<sup>2</sup> se presentan en los primeros pases, mientras que los menores se presentan al finalizar el cultivo.

Por otro lado, el análisis del seguimiento del tiempo de subcultivo muestra incremento de los días de cultivo para alcanzar la semi confluencia a partir de los pases 7 y 8 donde se presenta un incremento del 50 % para conseguir dicho valor, en el cual el tiempo de cultivo llega a alcanzar los 12 y 13 días de cultivo para los pases 7 y 8 respectivamente, considerados como los pases finales del cultivo, por lo tanto, con el análisis de estos datos podemos mencionar que la capacidad proliferativa de esta población celular se ve deteriorada conforme el cultivo avanza, incluso llegando a perder esta capacidad en el pase número 8, de esta manera podemos determinar que los cultivos de VSMCs deben ser realizados dentro de los primeros pase como el pase 3 hasta pases intermedios como el pase 6, esto con el objetivo de evitar variaciones en los ensayos posteriores atribuidos al comportamiento normal de pases avanzados como el pase 8 del cultivo de VSMCs.

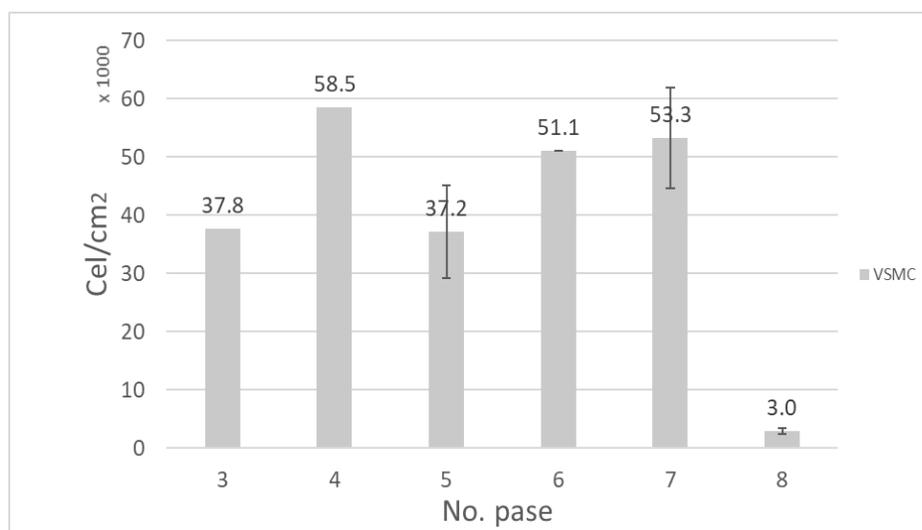


Figura 19. Rendimiento celular obtenido de la propagación de las células VSMCs. Las células fueron propagadas del pase 3 al pase número 8 empleado el medio formulado por ATCC. Ensayo realizado por triplicado

Los resultados obtenidos del tiempo de cultivo de VSMCs se presentan en la Figura 20 donde claramente se observa una tendencia ascendente en el número de días necesarios para llegar al estado de semiconfluencia en el cultivo de VSMCs, presentando un menor número de días los pases tempranos como el número 3, hasta los pases 5 y 6 donde solo fueron necesarios hasta 8 días para alcanzar la semiconfluencia, mientras que los pases avanzados como 7 y 8 fue necesarios de 12 a 13 días para poder alcanzar el estado de semiconfluencia.

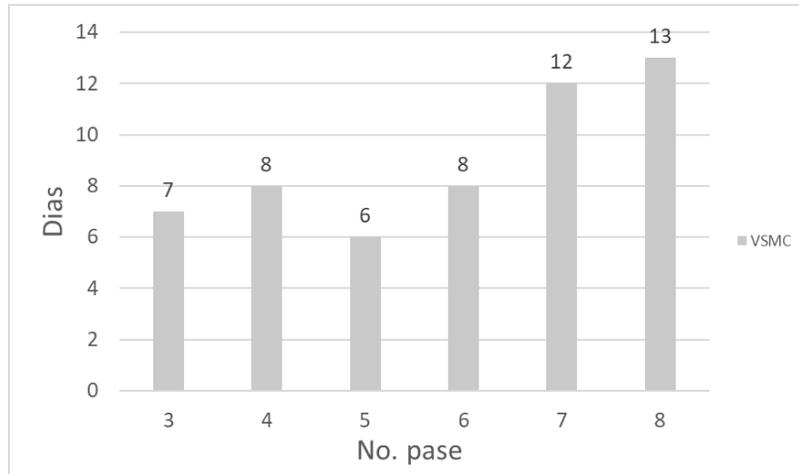


Figura 20. Tiempo de subcultivo de VSMCs. En esta grafica se muestran el tiempo de cultivo en el cual se realizó cada pase del cultivo de las VSMCs ATCC, propagadas con el medio Vascular ATCC. Ensayo realizado por triplicado.

Los resultados del cálculo de la viabilidad de cultivo se presentan en la Figura 21 podemos observar que durante la propagación de VSMCs-ATCC los primeros pases presentan una viabilidad por arriba del 93% el cual es considerado un valor adecuado para cultivos celulares, por otra parte es importante mencionar que este valor fue disminuyendo a partir del pase número 6 donde se presenta una disminución mayor en los pases 7 y 8, datos que pueden estar relacionados con la pérdida de la capacidad proliferativa de este tipo celular.

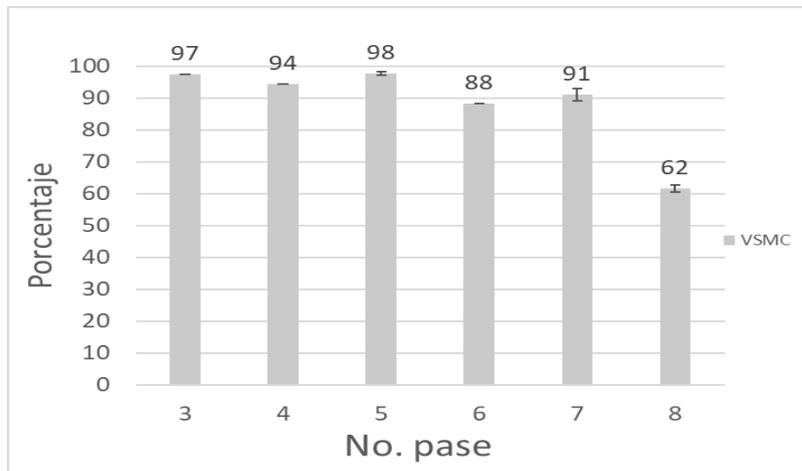


Figura 21. Porcentaje de viabilidad de VSMCs. Valores obtenidos del cultivo de VSMCs ATCC propagadas con el medio comercial ATCC. Ensayo realizado por triplicado.

El cálculo del doblaje poblacional del cultivo de VSMCs se muestra en la Figura 22 donde se muestra que la población mostró valores mínimos de 0.6 veces en el pase 3, así como valores máximos de 3.5 en el pase número 4. En general la población propagada mostró valores cercanos a 3 doblajes poblacionales de los pases 3 al 7 logrando mantener el cultivo de esta población, sin embargo, durante la propagación en el pase 8 no se logró duplicar la población cultivada por lo que se obtuvo un valor negativo para el doblaje poblacional. De esta manera podemos evidenciar que en el pase número 8 con el medio vascular ATCC el cultivo de VSMCs perdió la capacidad de duplicación de la población, por lo que en este pase no es el idóneo para realizar ningún tipo de ensayo.

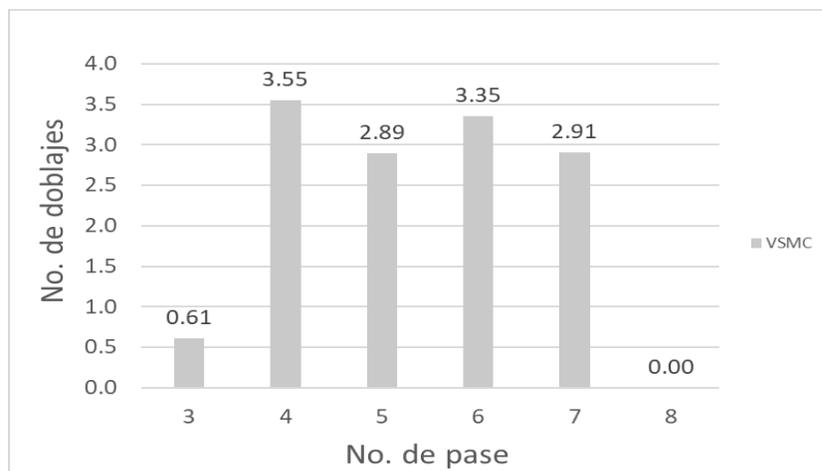


Figura 22. Doblar poblacional de VSMCs. Datos obtenidos del cultivo de VSMCs propagadas con el medio de cultivo ATCC. Datos presentados del pase 3 al pase 8. Ensayo realizado por triplicado.

En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos a partir de la evaluación del tiempo de replicación en el cual se observa que el pase 3 posee el mayor tiempo de replicación esto debido a que el pase número

3 proviene del descongelado y atraviesa por un periodo de adaptación al cultivo celular. De manera posterior, los pases intermedios del 4 al 7 se observa un tiempo de cultivo que oscila entre 49 y 57 horas, mientras que en el pase 7 que es un pase tardío se observa un incremento del tiempo de replicación para la población propagada en este pase. Por último, en el pase número 8 el tiempo de replicación no fue posible ser calculado ya que la población celular propagada no alcanzo a duplicar su población, presentando pérdida del número de células.

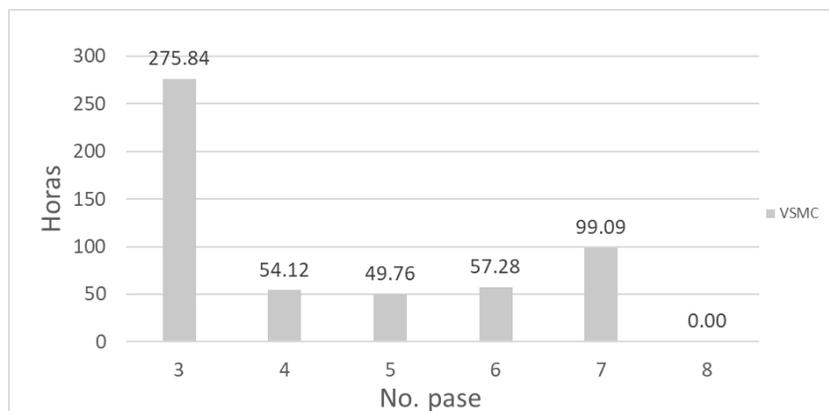


Figura 23. Horas de replicación de VSMC. Datos obtenidos del cultivo de VSMCs propagas con medio vascular ATCC del pase 3 al pase 8. Ensayo realizado por triplicado.

### 7.2.7. Caracterización de VSMC por inmunocitofluorescencia

Por otra parte, los resultados obtenidos de la inmunocitofluorescencia en VSMC mostraron una positividad del 100% para la presencia de actina de musculo liso, los resultados se muestran en la Figura 24, donde se observa la positividad de este marcador para la población celular propagada con el medio UDMM-VSMC. El porcentaje de la positividad fue calculado a partir de la cuantificación de 10 campos obtenidos de manera aleatoria cuyos valores fueron promediados.

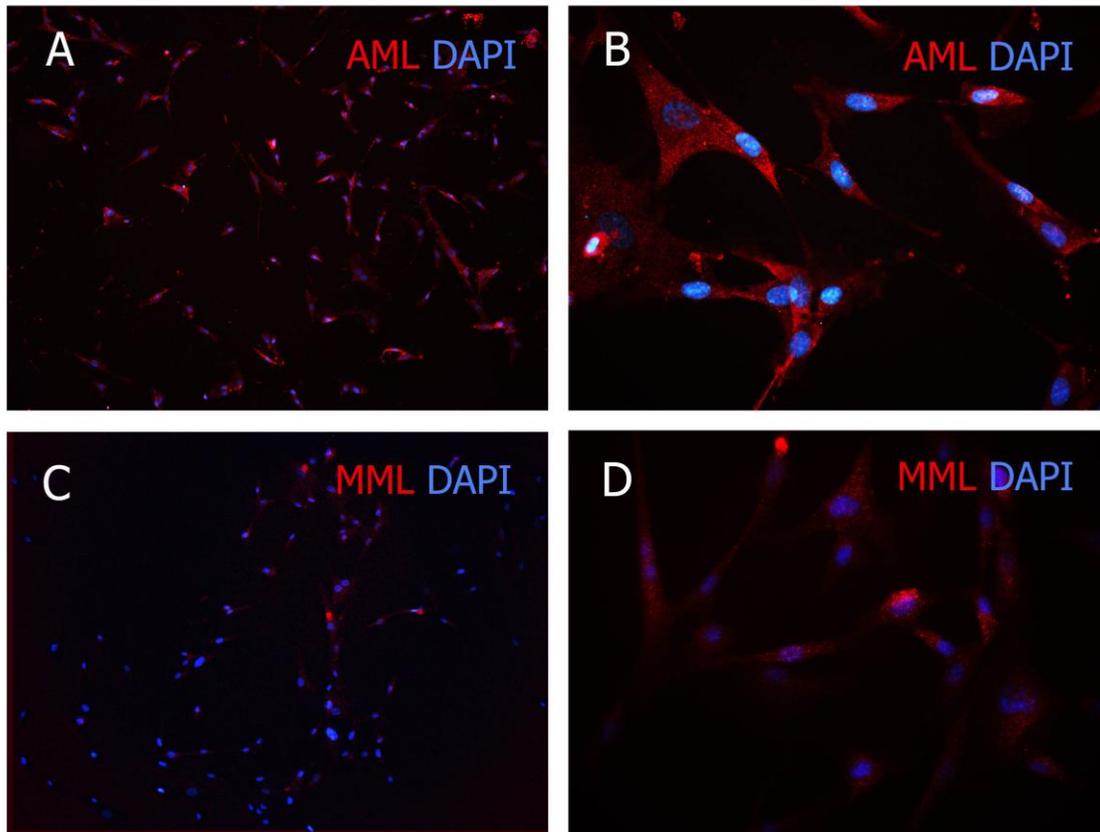


Figura 24. Caracterización molecular de VSMCs mediante inmunocitofluorescencia. A y B VSMC marcadas con el anticuerpo específico anti- actina de musculo liso (AML). C y D, VSMCs marcadas con el anticuerpo específico anti- miosina de musculo liso. A y C tomadas con el objetivo 20X, B y D, imágenes tomadas con el objetivo 40X.

### 7.3. Generación de un medio de cultivo para VSMCs

#### 7.3.1. Primera evaluación

Los resultados obtenidos de la evaluación de medios de cultivo MD 1 y MD 2 se muestran en la Figura 25. Como se puede observar durante los primeros tres días de cultivo no se aprecia ningún cambio en la propagación de las células, al día 3 se observa un incremento en porcentaje de crecimiento, y al día 7 el incremento en la población es preferente con el cuándo las células son cultivadas en medio de la ATCC, mientras que el medio MD 1 solo alcanza aproximadamente el 50 % de la eficiencia comparado con el comercial. Sin embargo, el medio MD 2 que fue complementado con SFB alcanza el 85 % del valor obtenido del cultivo de VSMCs en el medio comercial de la ATCC.

Por otra parte, el seguimiento morfológico indica que el cultivo de VSMC en los medios MD 1 genera cambios ligeramente diferentes a los obtenidos por el medio ATCC, mientras que el cultivo de VSMCs con el medio MD 2 generó cambios morfológicos importantes observados en la Figura 25. De esta manera, basados en los resultados obtenidos no fue suficiente obtener condiciones óptimas de propagación por lo que se prosiguió con la formulación de nuevos medios de cultivo.

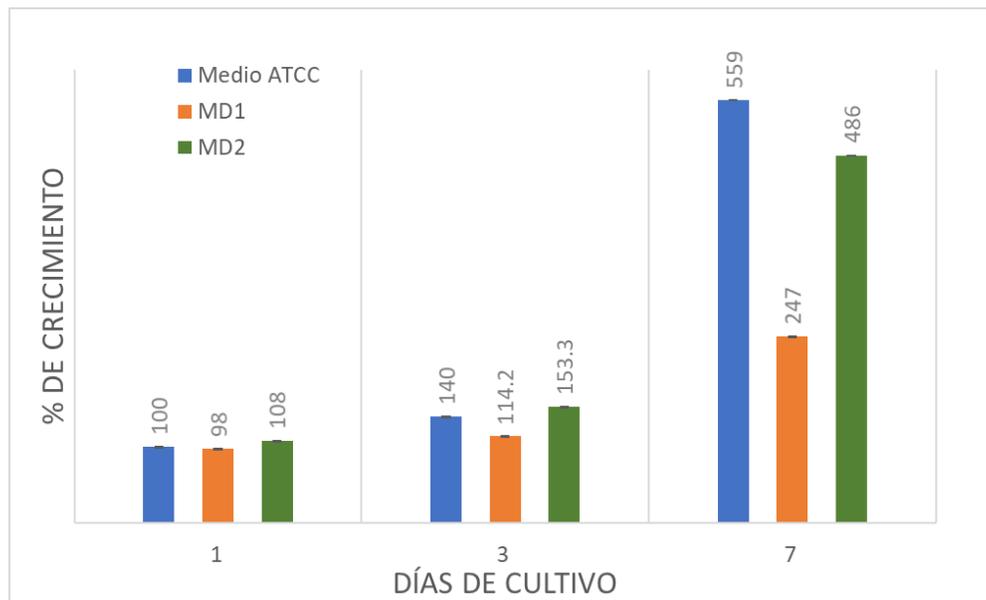


Figura 25. Evaluación de medios de cultivo para VSMCs. Resultados obtenidos de la evaluación de los medios de cultivo designados como medio MD 1, MD 2, fueron comparados con el medio comercial de la compañía ATCC. Ensayo realizado por el método colorimétrico de SRB. Ensayo realizado por triplicado.

### 7.3.2. Segunda evaluación

Por otro lado, los resultados obtenidos de la segunda evaluación colorimétrica por SRB de los medios de cultivo para VSMCs se muestran en la Figura 26. Como se puede observar a los 4 días de cultivo el medio MD 3 presenta el 92 % del alcanzado por el medio ATCC, sin embargo, a los 7 días solo se alcanzó el 72 %, siendo menor al alcanzado por el medio solo complementado con suero fetal bovino, además, basados en el reporte morfológico presentado en la Figura 27 observamos que existe un pequeño cambio morfológico, por lo que proponemos que existe la ausencia de un aditivo que está generando un deterioro en la propagación, por lo anterior se continuó con la formulación de nuevos medios de cultivo.

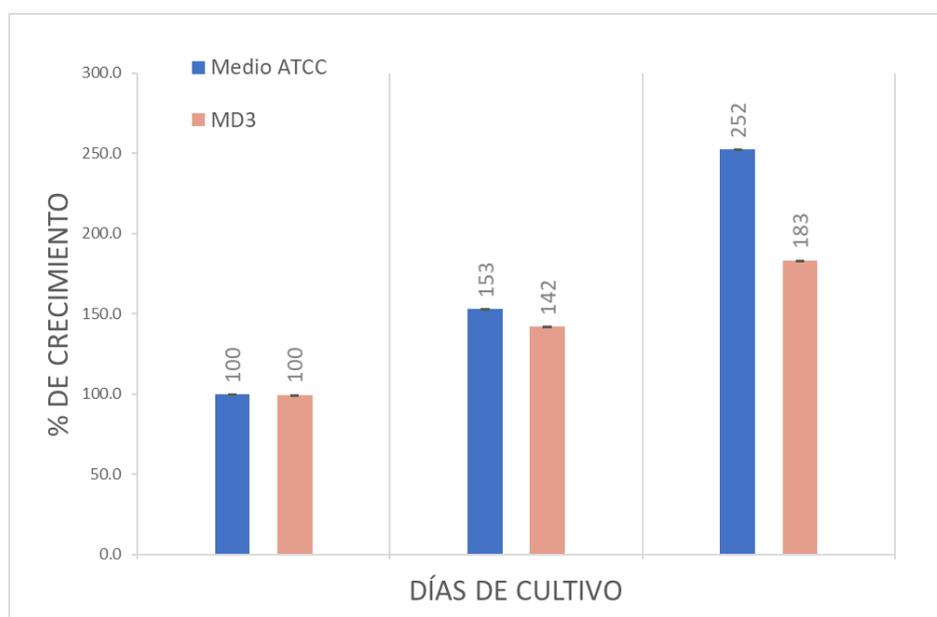


Figura 26. Segunda evaluación de medios para el cultivo de VSMCs. Evaluación del medio designado como MD 3 mostrado en color rosa comparado con el medio comercial de ATCC mostrado en color azul. Evaluación realizada por el método de SRB. Ensayo realizado por triplicado.

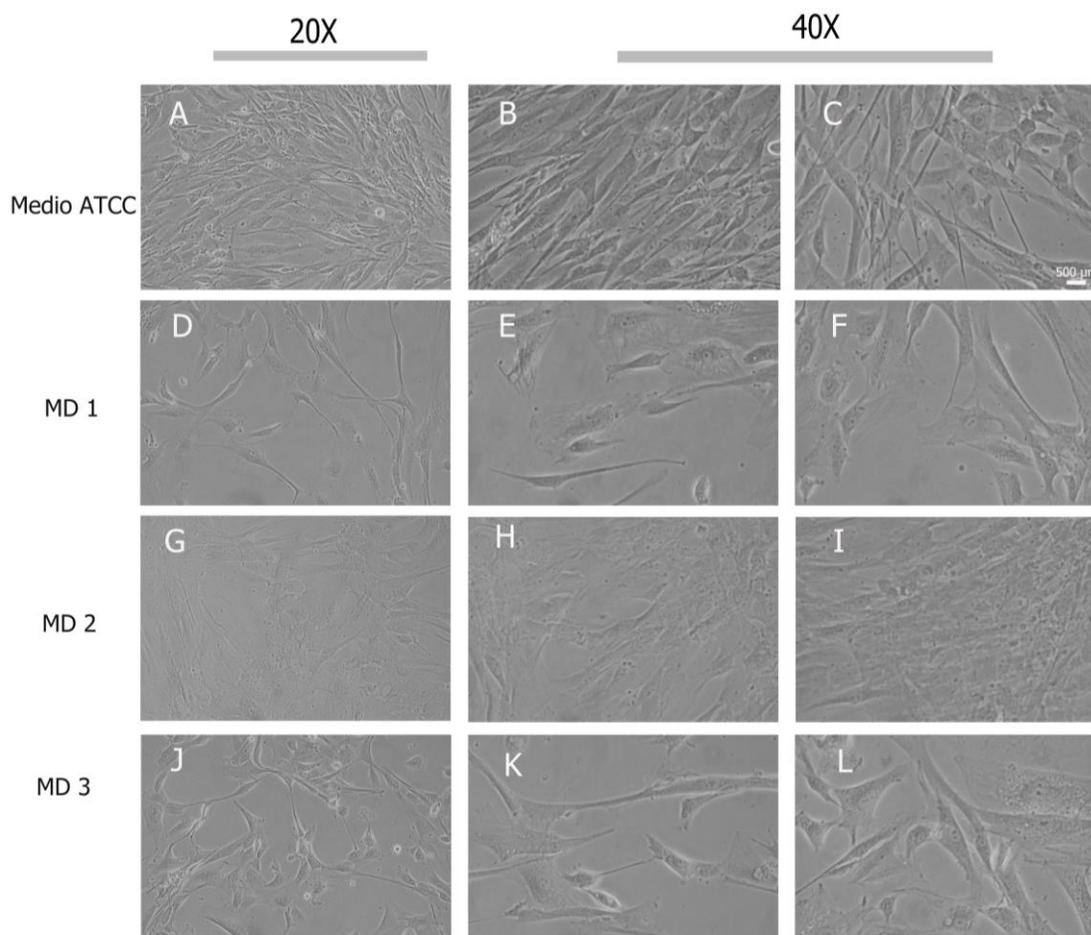


Figura 27. Morfología de VSMC obtenida de la evaluación de medios. Imágenes obtenidas de la primera y segunda evaluación de medio de cultivo para VSMC tomadas a los 7 días de cultivo. A, B y C, VSMC cultivadas en el medio comercial de ATCC. D, E y F, VSMCs cultivadas con el medio MD 1 (Formula ATCC empleado como control de crecimiento). G, H e I, VSMCs crecidas en medio DMEM adicionado como MD 2. J, K y L, VSMCs crecidas en el medio designado como MD 3. Imágenes representativas de cultivos realizados por triplicado, tomadas por microscopia de contraste de fases.

### 7.3.3. Tercera evaluación

Los resultados de la evaluación de los medios de cultivo designados como MD 4, UDMM-EPI y UDMMENDO fueron comparados con el medio MD 3 previamente evaluado (en este caso el medio de cultivo MD 3 fue utilizado como medio de cultivo control sustituyendo al medio provisto por ATCC, esto debido a la carencia del medio de cultivo ATCC). La cuantificación celular por el método colorimétrico de SRB se muestra en la Figura 28, mientras que el reporte morfológico se indica en la Figura 29. Los resultados obtenidos para las condiciones de cultivo de VSMC con el medio de cultivo MD 4 (Figura 29 D, E y F) no mostraron diferencias marcadas en comparación con el medio control MD

3 Figura 29 en A, B y C, por lo que fue descartado para ser empleado en el cultivo de este tipo celular. De manera sorprendente los resultados de la cuantificación celular muestran que el medio UDMM-EPI utilizado para el crecimiento de queratinocitos en nuestro laboratorio, mostró la capacidad de incrementar la propagación de las VSMCs en un 64% (Figura 28) en comparación con el medio control MD 3 al día siete de cultivo. Sin embargo, basados en el reporte morfológico para esta condición de cultivo, es claramente visible que la morfología de las VSMCs es severamente afectada (Figura 29 G, H e I) por lo que si bien el medio UDMM-EPI mejora la proliferación de este tipo celular, este medio no puede ser utilizado para el cultivo de VSMCs, sin embargo, existe la posibilidad de que algunos de sus componentes sean los responsables de este comportamiento, por lo que algunos de sus componentes fueron evaluados en los siguientes experimentos.

Por otra parte, los resultados observados del cultivo de VSMCs en el medio de cultivo UDMM-ENDO solo alcanzaron un ligero incremento del 16% en la cantidad de VSMCs cuantificadas con respecto al medio control MD 3, también es importante resaltar que este medio de cultivo alteró su comportamiento morfológico Figura 29 en J, K y L.

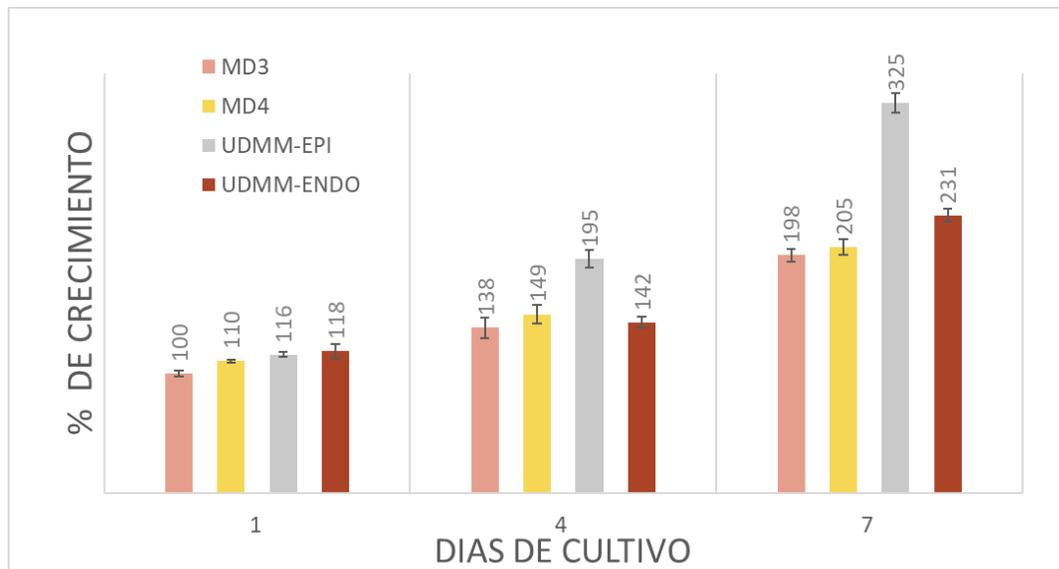


Figura 28. Tercera evaluación de medios de cultivo para VSMCs. Datos obtenidos de la evaluación de tres medios de cultivo formulados con diferentes aditivos y cuantificados por el ensayo colorímetro RSB a los días 1, 4 y 7 de propagación. Rosa VSMCs crecidas en medio MD 3, en amarillo VSMC crecidas con el medio MD 4, en Gris VSMCs crecidas en medio UDMM-EPI y en marrón VSMCs crecidas en medio UDMM-ENDO. Ensayo realizado por triplicado.

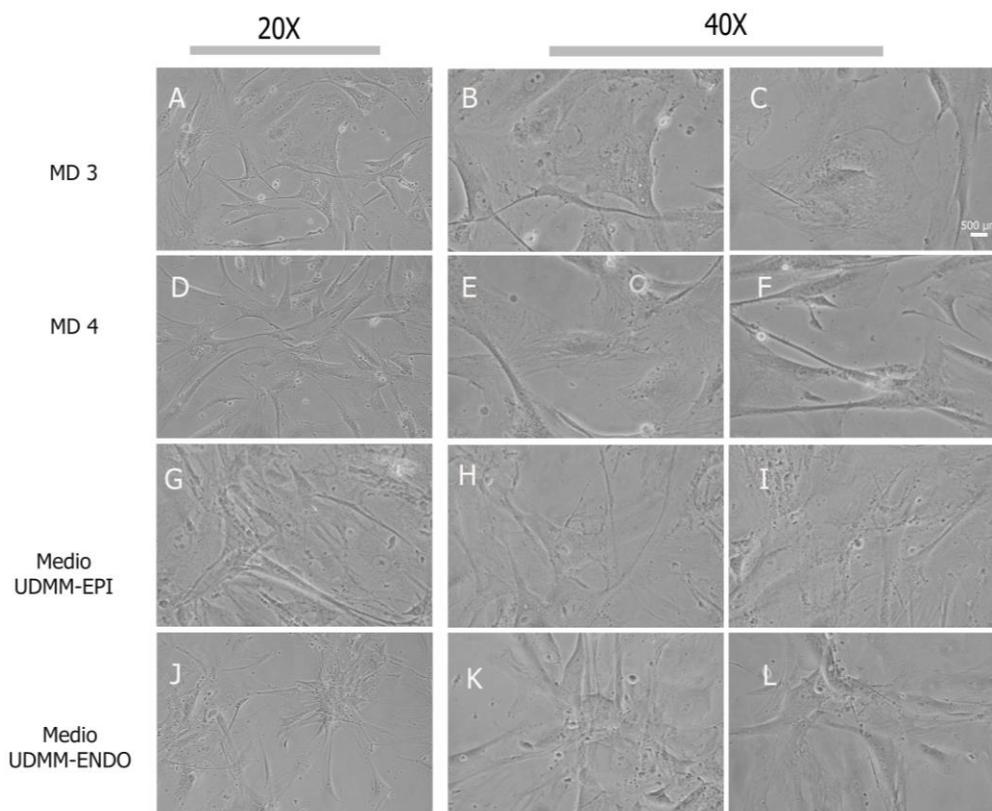


Figura 29. Reporte morfológico de la tercera evaluación de medios para el cultivo de VSMC. A, B y C, VSMC cultivadas en el medio formulado MD 3 (medio control). D, E y F, VSMCs cultivadas con el medio MD 4. G, H e I, VSMCs crecidas en medio UDMM-EPI. J, K y L, VSMCs crecidas en el medio UDMM-ENDO. Imágenes representativas de cultivos realizados por triplicado, tomadas por microscopia de contraste de fases.

### 7.3.4. Cuarta Evaluación

Por otro lado, la cuarta evaluación de medios de cultivo se realizó empleando la formula del medio MD3 (medio generado en nuestro laboratorio) adicionado con diferentes aditivos el ensayo fue cuantificado por el método colorimétrico de SRB y los resultado fueron comparados con el medio control MD 3, de esta manera las VSMCs fueron cultivadas en los medios designados como MD3.1, MD3.2 y MD3.3 y los resultados de la evaluación colorimétrica se muestran en la Figura número 30, mientras que el reporte morfológico de esta misma evaluación se muestra en la Figura 31. De esta manera y basados en los resultados obtenidos de los cultivos de VSMCs en los diferentes medios MD3.1, MD3.2 y MD3.3, se observó un notable incremento en el número celular de los tres diferentes medios esto con respecto con medio control MD 3 (Figura 30). Los porcentajes de la evaluación muestran al día 8 (192 horas) de cultivo se presenta un incremento de 258%, 241% y 466% en el número total de células obtenidas de los cultivos de VSMCs por parte de los medios MD 3.1, MD 3.2 y MD 3.3 respetivamente, siendo el de

mayor incremento el último mencionado y presentándose como el mejor candidato para la propagación celular. Por otra parte, el reporte morfológico presente en la figura 31 muestra una morfología similar cuando con los medios de cultivo MD 3.1 (Figura 31 D, E y F) y MD 3.3 (figura 31 J, K y L), por lo que se asume que los componentes de dichos medios no afectan el cultivo de este tipo celular. Mientras que el cultivo de VSMCs con el medio MD 3.2 presenta una morfología ligeramente diferente (Figura 31 G, H e I), pero conservando la morfología fusiforme característica de las VSMCs. De esta manera y basados en la evaluación colorimétrica y morfológica VSMCs, el medio MD 3.3 fue elegido para llevar a cabo el cultivo de VSMC al poseer 466% mayor en la propagación de VSMC y por mantener la morfología fusiforme de este tipo celular, esto comparado con el cultivo de VSMCs propagadas con el medio control MD 3 durante ocho días. A continuación, el medio MD 3.3 fue renombrado como UDMM-VSMC, por lo que en adelante solo se maneja dicha nomenclatura.

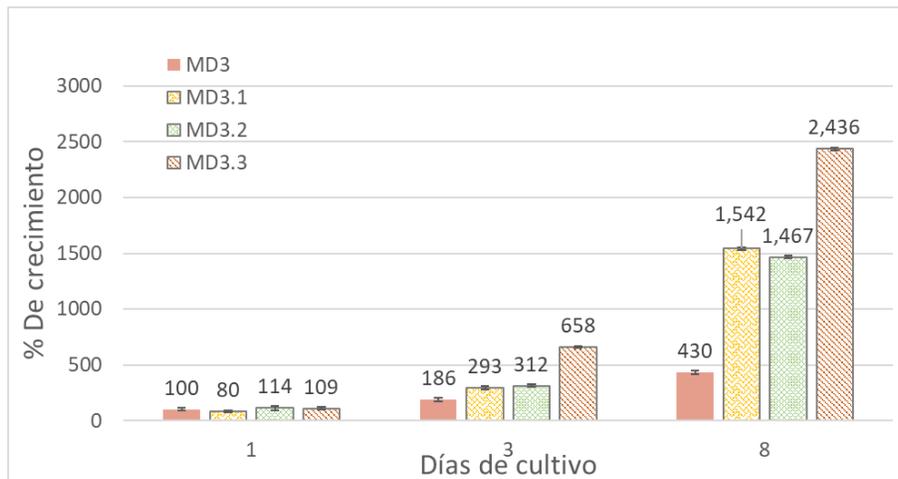


Figura 30. Cuarta evaluación de medios para el cultivo de VSMC. Datos obtenidos por el método colorimétrico SRB realizado al día 1, 3 y 8 de cultivo. Evaluación de los medios de cultivo MD 3 adicionados con el Factor de Crecimiento Tumoral B1 (TGFb1). En rosa el medio control sin el factor MD 3, en amarillo el medio MD 3.1, en verde el medio MD 3.2 y en café el medio MD 3.3. Ensayo realizado por triplicado.

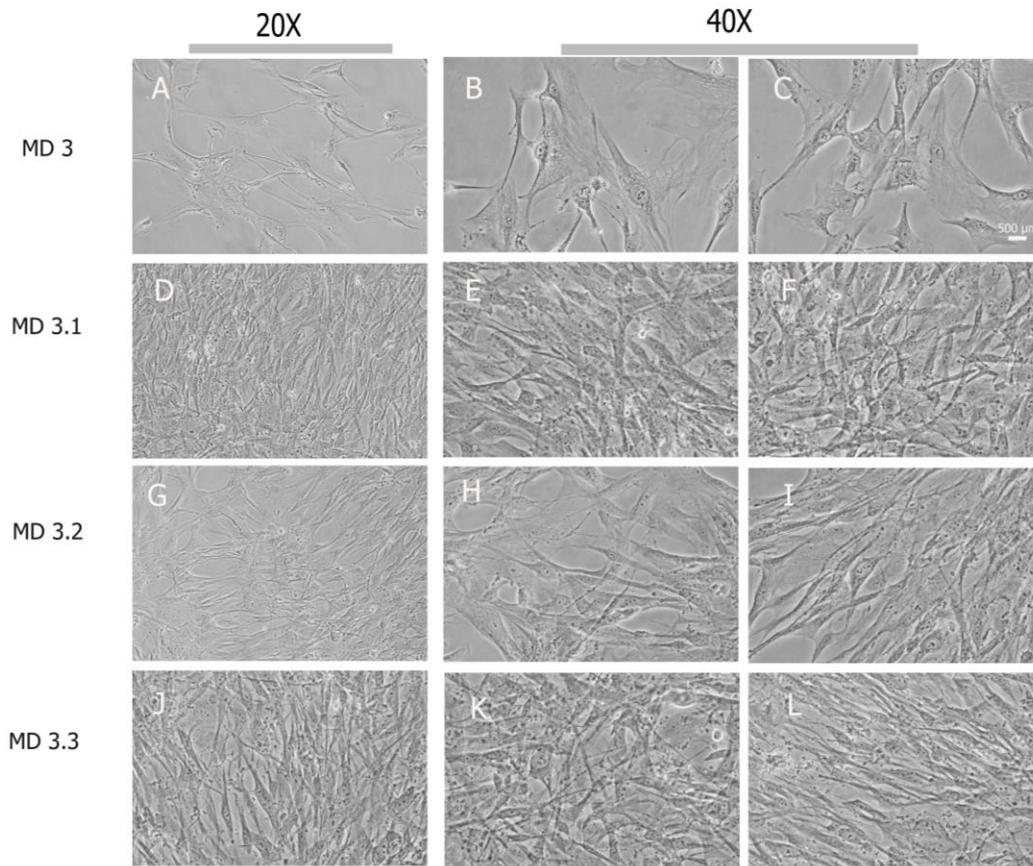


Figura 31. Reporte morfológico de la cuarta evaluación de medios para el cultivo de VSMC. A, B y C, VSMC cultivadas en el medio formulado MD 3 (medio control). D, E y F, VSMCs cultivadas con el medio MD 3.1. G, H e I, VSMCs crecidas en medio MD 3.2. J, K y L, VSMCs crecidas en el medio MD 3.3. Imágenes representativas de cultivos realizados por triplicado, tomadas por microscopia de contraste de fases.

## 7.4. Evaluación de citotóxica de poliuretanos.

### 7.4.1. Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivo de HUVECs

Una vez determinada la densidad óptima de cultivo de HUVECs se realizó la evaluación de citotoxicidad de los polímeros sintetizados, los ensayos citotóxicos se realizaron en placas de 96 pozos por cuadruplicado, además de realizarse en dos ocasiones más, por lo que los promedios de los ensayos triplicados se presentan en la Figura 32, basados en los resultados obtenidos y comparados con los cultivos controles (cultivos celulares sin poliuretano) se puede asumir que no existe citotoxicidad por parte de los poliuretanos evaluados ya que los resultados obtenidos no muestran disminución en el porcentaje del número celular comparado con el cultivo control. Si bien hay un valor por arriba del 100 %, este no es significativo.

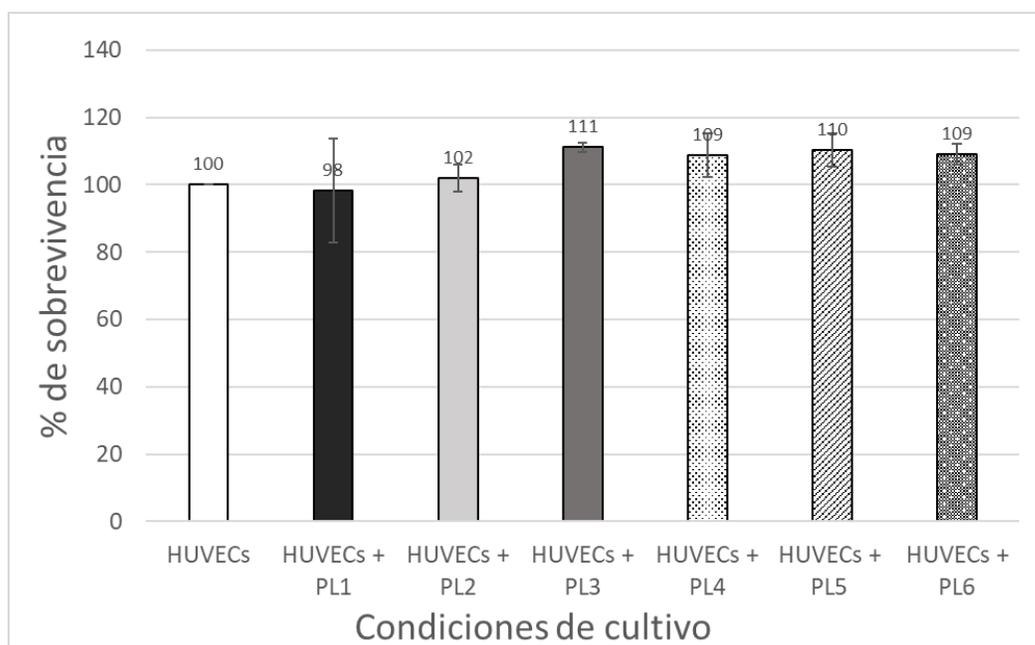


Figura 32. Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivo de HUVECs. Los diferentes poliuretanos indicados en la gráfica fueron adicionados en cultivos de HUVECs y el nivel de toxicidad se evaluó por el método colorimétrico de SRB. Los datos presentados son procedentes de la evaluación citotóxica realizada en tres experimentos realizados de manera independiente por cuadruplicado.

### 7.4.2. Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivos de VSMCs

La evaluación de citotoxicidad de poliuretanos en VSMC también se realizó por cuadruplicado y en tres experimentos independientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33 se indican que no existe un evento citotóxico al cultivar las células en presencia de los poliuretanos, esto basado en los resultados donde se aprecia que no existe una disminución en el porcentaje del número celular en los

cultivos de VSMC. Nuevamente aun que se observa un aumento en el número de células, no hay significancia por la desviación presente en las condiciones analizadas.

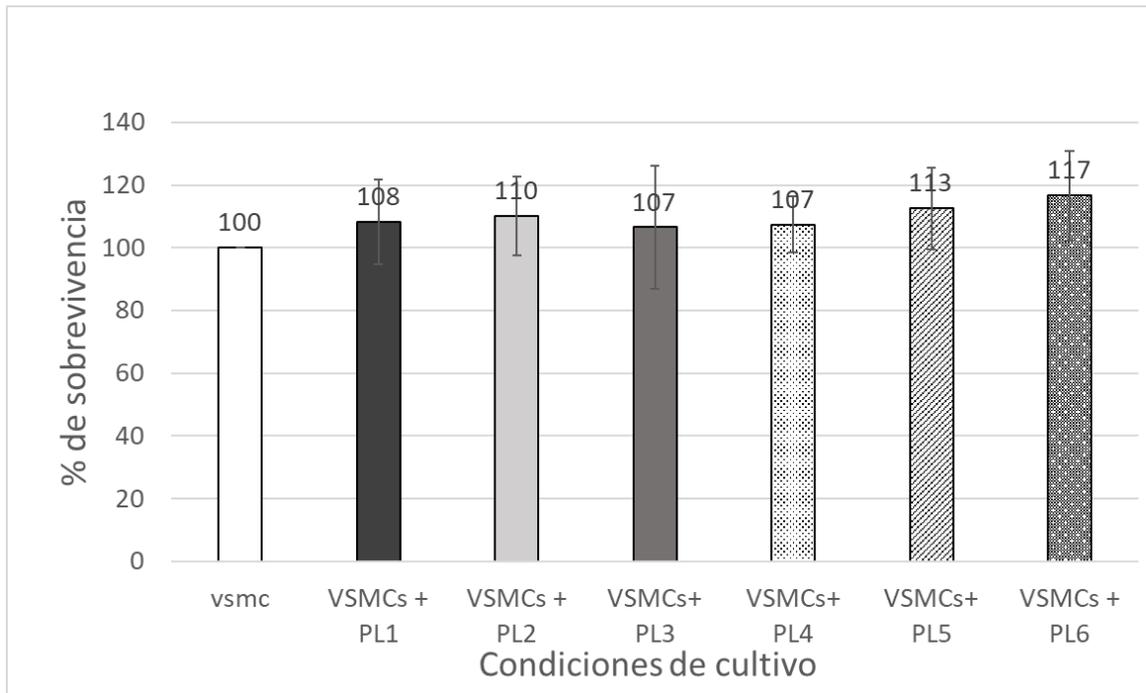


Figura 33. Evaluación citotóxica de poliuretanos en cultivo de VSMC. Las VSMCs fueron cultivadas de manera individual en presencia de los cinco diferentes poliuretanos, los cuales fueron retirados una vez terminado el periodo de incubación, y así llevar a cabo la evaluación por el método SRB. Los resultados obtenidos proceden de ensayos realizados por triplicado.

## 7.5. Evaluación del estrés oxidativo en cultivos celulares

Para el caso de la evaluación del estrés oxidativo en cultivo de HUVECs solo se cuenta con una evaluación la cual se presenta en la Figura 34. De esta manera, podemos observar que existe una disminución en la cantidad de especies reactivas cuando los cultivos de HUVECs son incubados con los poliuretanos A, D, E y F, mientras se observa un incremento de especies reactivas de oxígeno cuando se incuban con el poliuretano C.

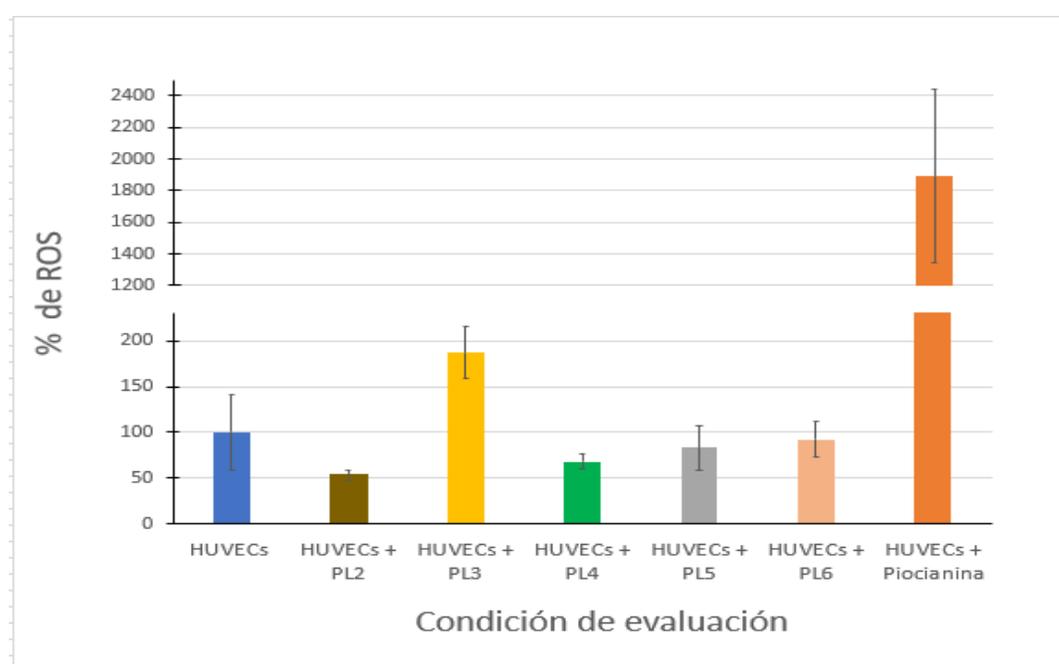


Figura 34. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno en cultivos de HUVECs. En esta grafica se muestra la cuantificación de especies reactivas de oxígeno presentes en cultivos de HUVECs cuando éstas fueron crecidas con los cinco diferentes poliuretanos. Además, se empleó la molécula de píocianina como control positivo para la generación del estrés oxidativo. Ensayo realizado por triplicado.

## **7.6. Co-cultivos celulares.**

### **7.6.1. Evaluación de medios para el co-cultivo celular**

Los resultados obtenidos para la evaluación de medios para el co-cultivo celular se muestran en la Figura 35. La cuantificación del porcentaje celular del seguimiento a los 7 días de cultivo de las HUVECs con la mezcla 50/50 de medios frescos UDMM-ENDO y UDMM-VSMC muestra un incremento gradual en el porcentaje celular obteniendo un 50% en porcentaje final cuando las HUVECs son crecidas con la combinación de medios, esto comparado con las condiciones normales de cultivo con el medio UDMM-ENDO, este resultado sugiere algún componente de la fórmula del medio de cultivo UDMM-VSMC que posee la capacidad para mejorar la proliferación de las HUVECs.

La siguiente evaluación realizada con la mezcla 50/50 de medio UDMM-ENDO fresco y el medio UDMM-VSMC cosechado, generó un evento negativo para el crecimiento de HUVECs observándose una disminución del 94% en el porcentaje celular al día 7 de cultivo, esto demuestra claramente un evento de mortalidad celular generado por la disminución de factores de crecimiento o aditivos al disminuir en un 50% el medio de cultivo fresco con medio cosechado, siendo estos los necesarios para el mantenimiento de esta población celular o a la presencia de moléculas que generen un evento negativo para su mantenimiento y proliferación.

Por otro lado, la evaluación de los medios de cultivo para las VSMCs con el medio combinado 50/50 de medios frescos UDMM-ENDO y UDMM-VSMC mostró una disminución en el porcentaje de crecimiento del 20.9 % comparado con el cultivo control (UDMM-VSMC), evidenciando que algunas moléculas contenidas en el medio UDMM-ENDO impactan negativamente en el cultivo de las VSMC. Así mismo se observa una disminución del 41.7% cuando las VSMC son cultivadas con la combinación 50/50 de los medios UDMM-VSMC fresco y el UDMM-ENDO cosechado, por lo que podemos asumir que algunos metabolitos solubles producidas durante el cultivo de HUVECs generan un impacto negativo en la propagación de VSMCs.

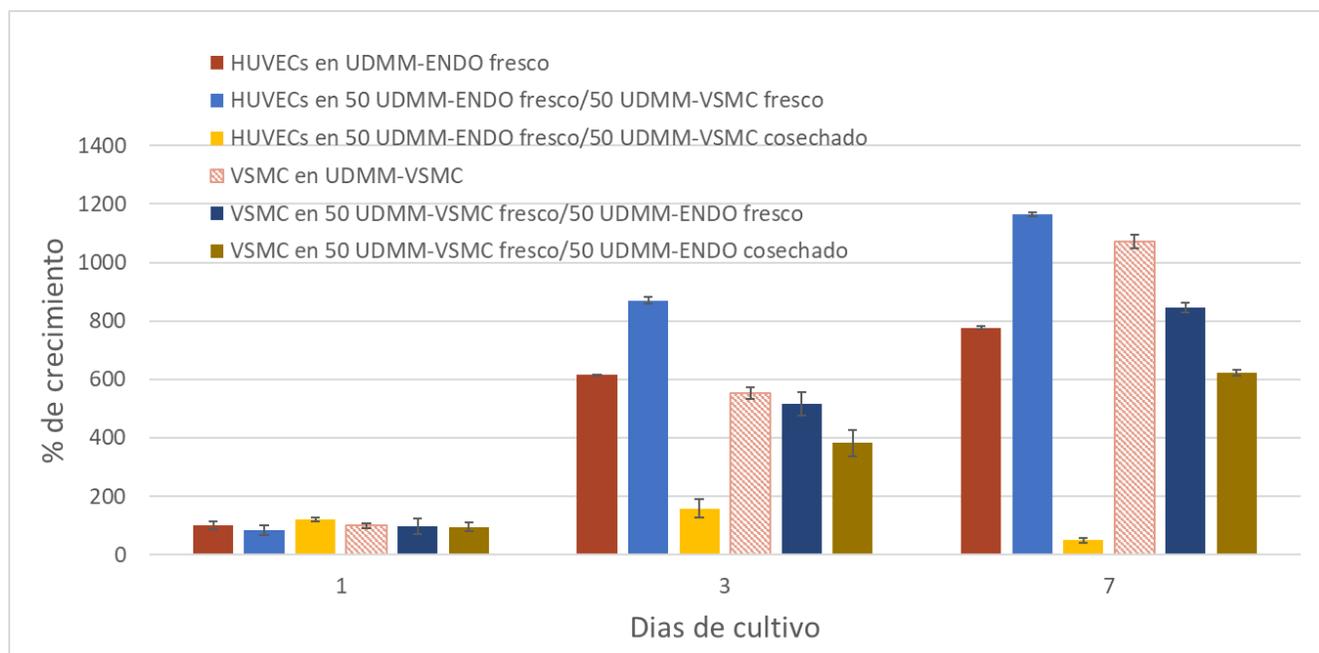


Figura 35. Evaluación de medios para el co-cultivo de HUVECs y VSMCs. Esta grafica muestra los resultados obtenidos del cultivo de HUVECs y VSMCs crecidas individualmente en su respectivo medio de cultivo y en combinaciones de 50:50 V/V de los medios específicos UDMM-ENDO y UDMM-VSMC, así como con la mezcla 50:50 V/V de estos medios específicos y la mezcla de los específicos y medios condicionados. Evaluación realizada por el método colorimétrico de SRB. Ensayo realizado por triplicado.

### 7.6.2. Co-cultivo de HUVECs y VSMCs

Los resultados obtenidos a partir del co-cultivo fueron comparados con las condiciones normales de crecimiento celular (cada tipo celular propagado en su medio de cultivo), los co-cultivos se crecieron con una mezcla 50/50 de los medios UDMM- ENDO y UDMM-VSMC. Los resultados obtenidos por la evaluación de SRB se muestran en la Figura 36 donde podemos observar que la población de VSMCs y HUVECs se comportan normalmente, donde para el cultivo de VSMC presenta un incremento en el porcentaje de crecimiento 5.6 veces más que al inicio del cultivo, mientras que el cultivo de HUVECs y los co-cultivos celulares a la misma densidad de su propagación es similar la cual va de 1.7 a 2 veces más que el inoculado al inicio del cultivo. Es importante mencionar que durante los co-cultivos celulares, en las poblaciones se observa un mayor incremento en el número celular cuando se emplea el doble de la densidad que fue de  $18,180 \text{ cel/cm}^2$  (Figura 36).

Por otra parte, y basados en el comportamiento morfológico presente en la Figura 37 se puede apreciar la formación de colonias o agregados celulares cuando se realizan los co-cultivo de VSMC y HUVECs donde se puede apreciar la formación de agregados celulares los cuales se presentan desde el inicio del cultivo hasta el día 7 donde se realizó el reporte morfológico. De esta manera y basados en los

resultados obtenidos podemos concluir que existe una fuerte interacción entre ambos tipos celulares, por lo que se puede asumir que se presenta algún tipo de regulación mediada por contacto celular entre estos tipos celulares o por condicionamiento del medio.

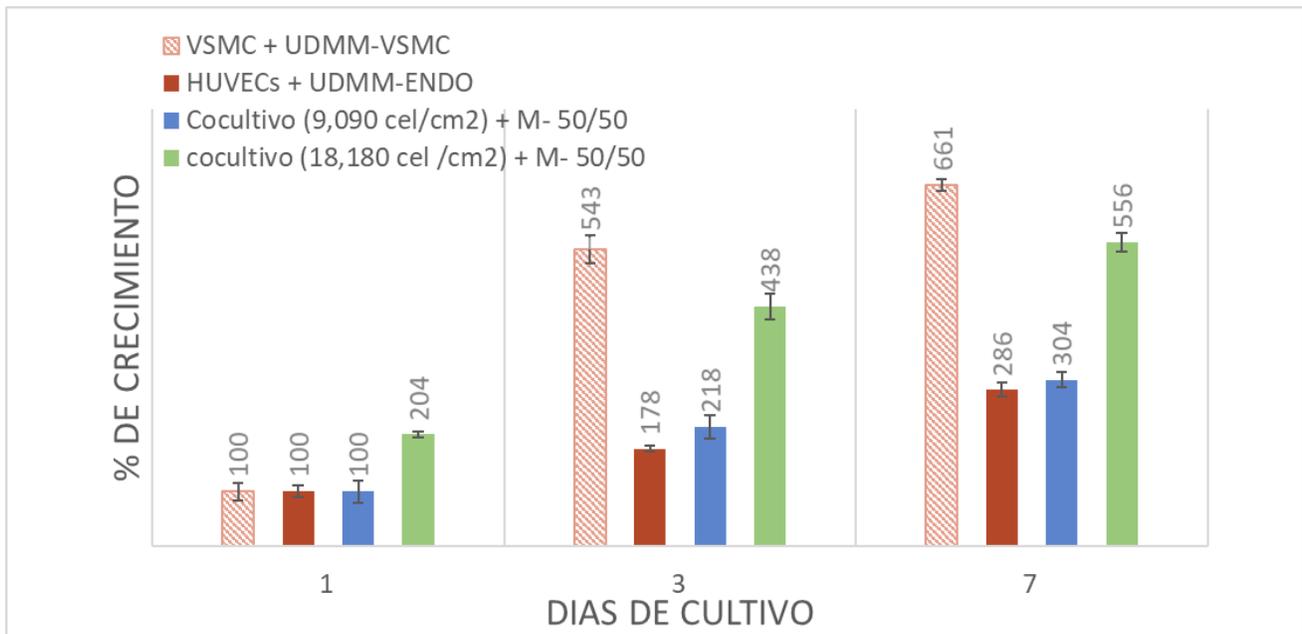


Figura 36. Evaluación del porcentaje de crecimiento de co-cultivos de VSMCs y HUVECs. En esta grafica se presentan los datos obtenidos del co-cultivo de las HUVECs y VSMCs los cuales fueron comparados con su cultivo de manera individual. La evaluación del crecimiento fue realizada por la técnica de SRB. Ensayo realizado por triplicado.

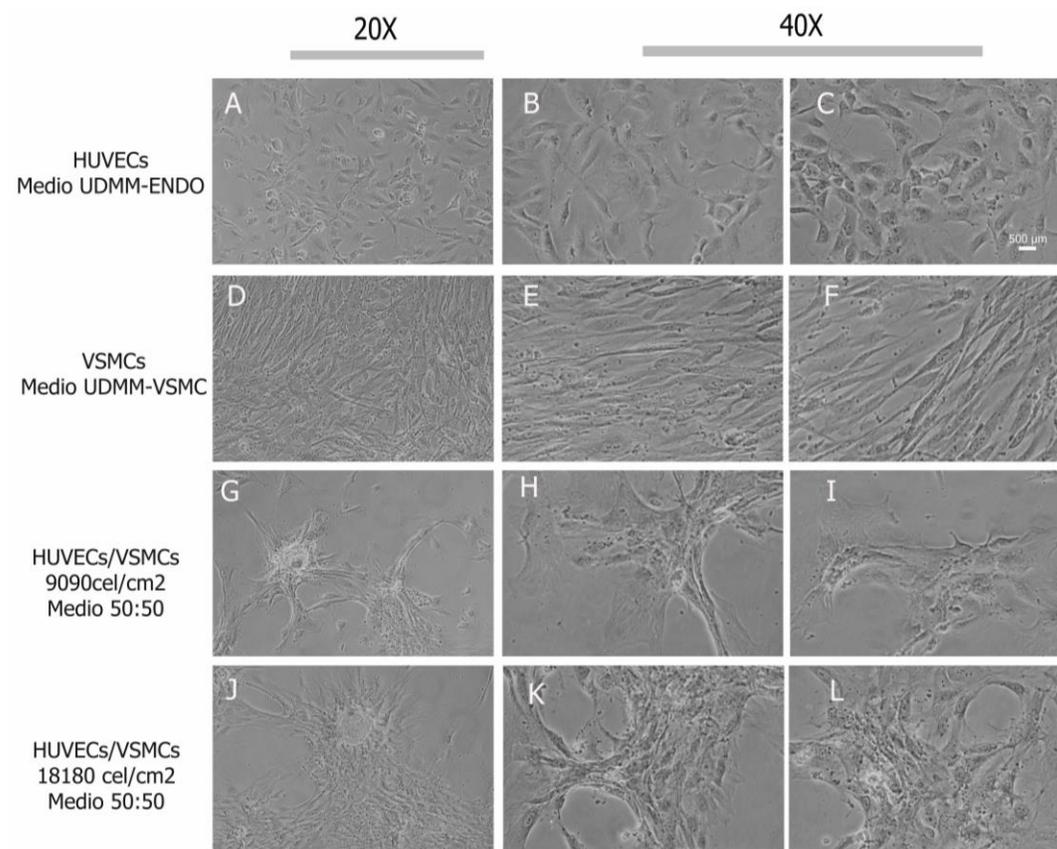


Figura 37. Reporte morfológico de co-cultivos de HUVECs y VSMCs con 7 días de cultivo. A, B y C, comportamiento morfológico que presentaron los cultivos de HUVECs crecidas en el medio UDMM-ENDO. D, E y F, VSMC crecidas en medio UDMM-VSMC. G, H e I, Co-cultivo de células HUVECs y VSMCs crecidas en una mezcla de medios UDMM- ENDO y UDMM-VSMC en una relación 50:50. Imágenes representativas obtenidas a partir del cultivo por triplicado, tomadas por microscopia de contraste de fases.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Propagación de HUVECs.

Los cultivos de células humanas han tomado gran relevancia debido a su uso como modelo experimental para el desarrollo de conocimiento en el área de la fisiología y fisiopatología de diversos padecimientos, además de profundizar en la identificación de los componentes moleculares que participan para llevarse a cabo. Recientemente, el avance en el establecimiento de procedimientos de cultivo de células humanas se presenta como una fuente celular para generar estirpes celulares requeridas para reemplazo en diferentes enfermedades empleando eventos de plasticidad, así como desarrollar aplicaciones y dispositivos médicos dentro de la medicina regenerativa. Durante el presente trabajo se llevó a cabo el cultivo de dos tipos celulares que componen los vasos sanguíneos, en primer lugar, se cultivaron las HUVECs, un tipo celular que resulta de fácil obtención al extraerse de tejido considerado como desecho después del parto, lo que facilita el abastecimiento de este tipo celular.

Estudios anteriores han evidenciado que las células endoteliales pueden entrar en estado de senescencia debido al envejecimiento celular, sin embargo estas células se mantienen viables y metabólicamente activas aunque sus funciones normales se vean alteradas<sup>64</sup>. Un estudio realizado por Silva G. y colaboradores en 2017<sup>65</sup> sobre senescencia celular en cultivos de EC aórticas porcinas (AEC del inglés Aortic Endothelial Cells) describió la propagación de esta población solo hasta el pase número 4, rango donde observaron un incrementado en el proceso conocido como senescencia replicativa (senescencia celular que aparece con el avance de los pases) la cual se identificó por el incremento hasta de tres veces más de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos de EC del pase (P) 1 al P3 cuando se empleó medio MCDB 131 (suplementado solamente con L-Glutamina y 15% de SFB)<sup>65</sup>. Si bien en nuestro proyecto de investigación la senescencia celular no fue evaluada, el cultivo de EC pudo realizarse hasta el pase número 8 datos que concuerdan con el reportado en nuestro grupo de trabajo por Acosta en 2012<sup>66</sup>. Una diferencia importante en las condiciones que hemos establecido es que empleamos una concentración menor de suero fetal bovino, lo cual será útil para disminuir la presencia de componentes de origen animal, lo que permitirá cumplir con los requerimientos regulatorios para el uso de células en humanos.

Otros trabajos realizados en estudios de angiogénesis, donde emplearon el mismo tipo celular que en este proyecto, la propagación de HUVECs (ATCC) fue realizada solo hasta el pase número 6 empleando el medio EGM-2 suplementado con 2% de SFB, sin embargo no se menciona el motivo por el cual no se continuo con su propagación<sup>18</sup>.

Como se mencionó con anterioridad en este proyecto las HUVECs se propagaron empleando el medio UDMM- ENDO el cual difiere bastante en el medio MCDB 131 utilizado para el cultivo de células endoteliales aorticas (AEC)<sup>65</sup> y el medio EGM-2 (endothelial grown medium) suplementado con 2% de SFB<sup>18</sup>, los cuales carecen de Factores de crecimiento para el mantenimiento de la población de EC. Queda pendiente la evaluación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en nuestros cultivos, lo que nos permitiría monitorear el comportamiento del envejecimiento celular de HUVECs en nuestros cultivos.

## 8.2. Propagación de VSMCs.

Las VSMC usualmente son obtenidas a partir del disgregado enzimático de aortas murinas y su cultivo se reporta en gran variedad de medios comerciales. Recientemente se ha realizado la evaluación de VSMC comerciales ATCC procedentes de aorta humana (HASMC) (Primary Aortic Smooth Muscle Cells) por parte de Timraz S. y colaboradores en 2016<sup>67</sup> con el objetivo de evaluar su potencial en la generación de dispositivos vasculares. El medio empleado en el estudio fue medio DMEM-F12 suplementado con 50 mg/ml ácido ascorbico, 5% FBS, 10mM L-glutamina, suplemento de crecimiento endotelial y extracto de cerebro bovino, permitiendo propagar este tipo celular hasta el pase número 10, reportando un cambio morfológico acompañado de una disminución en la expresión de  $\alpha$ -SMA del 34.4% del pase 5 al 7 manteniendo una disminución hasta llegar a 41.2% en p10, además se observó una disminución en la expresión de smotelina de 36.9% y MHC 9.5% cuando se compararon los pase 5 y 10. Por el contrario fue observado un incremento de la deposición de colágeno tipo I y III pasando de 68.8 % a 135.1% entre los pase 5 y 10. Por ultimo reportaron una disminución de la duplicación celular que osciló del P8 que presentó 6 duplicaciones poblacionales (DP), mientras que el P10 solo llegó a 3 DP. Lo cual corresponde a un proceso de senescencia celular demostrado por un incremento gradual de la actividad  $\beta$ -galactosidasa alcanzando hasta el 75% de positividad en la población cuando se evaluó en el P10.

Por nuestra parte el cultivo de VSMCs en el medio comercial adquirido de ATCC, permitió propagar este tipo celular hasta el pase número 8, donde la población perdió totalmente capacidad de propagación. Nuestros valores DP fueron de 3.5 en el pase P4, mientras que al pase P7 presentaron 2.9 DP. Por otro lado, el TDP mostro valores de 2.2, 2, 2.3 y 4 días obtenidos de P4 al P7 respectivamente. Así nuestros datos se encuentran cercanos a los reportados por Timraz S.

Por otra parte, el uso del medio vascular comercializado por ATCC presentó un elevado costo de adquisición, obligándonos a establecer una formulación de medio de cultivo. Se evaluaron medios con formulaciones reportadas por Salazar G. y colaboradores en 2017 donde emplearon el medio DMEM

suplementado con glucosa 1g/L, glutamina 2mM y 10% de SFB<sup>68</sup> cultivando las VSMC hasta el pase número 12. En nuestro caso utilizando una fórmula similar no nos fue posible propagar las VSMC, ya que el porcentaje de crecimiento celular no igualaba a los valores obtenidos cuando propagábamos las VSMCs en medio propietario de ATCC, de esta manera nuevas formulaciones que incluían TGF- $\beta$ 1 se llevaron a cabo, donde la adición de TGF- $\beta$ 1 mejoró el cultivo de VSMC 258%, así mismo la adición de adenina e hidrocortisona (medio UDMM-VSMC) favoreció que el porcentaje de crecimiento alcanzando un 466% mayor comparado con medio F-ATCC-10% SFB el cual poseía solo un 72% del rendimiento presentado por el medio Vascular ATCC. Sin embargo, la comparación directa entre el medio Vascular ATCC y el medio UDMM-VSMC aún permanece sin realizar, así como su evaluación exhaustiva para la propagación de las VSMCs.

### 8.3. Generación y comportamiento de co-cultivos celulares.

Si bien los factores de crecimiento solubles en medios de cultivo pueden modular la proliferación de diversos tipos celulares como las HUVECs y las VSMCs, es bien sabido que las interacciones célula-célula son importantes reguladores en procesos de señalización como lo reporta Seongwoo Bak y colaboradores en su estudio de co-cultivos de VSMC y HUVECs sobre geles termosensibles en la generación de dispositivos que permitan la angiogénesis, al día 5 de cultivo se determinaron los niveles de expresión de VEGF-A (ARN mensajero), encontrando altamente expresado en cultivos de VSMCs con 37 veces comparada con cultivos de HUVECs, por otro lado este mismo factor disminuyó su expresión cuando las VSMCs son co-cultivadas con HUVECs (32.9 veces) por lo que los autores manifestaron que esta modulación de la expresión puede deberse al contacto celular. Así mismo el VEGF-A soluble se cuantificó principalmente en cultivos de VSMCs con  $1050.5 \pm 179.9$  pg/mL y se observó una disminución del mismo cuando se realizó el co-cultivo de ambos tipos celulares, obteniendo valores de  $256.1 \pm 26.6$  pg/mL, lo que representa una disminución del 75% en la producción de este factor de crecimiento comparado con el cultivo de VSMC, evidenciando que la presencia de este factor se ve alterado debido al co-cultivo celular, por otro lado el cultivo de HUVECs no permitieron su cuantificación debido a su baja concentración<sup>43</sup>.

Por nuestra parte, durante la evaluación de medios para los co-cultivos celulares se observó un mejor crecimiento de las HUVECs cuando éstas son crecidas con la mezcla 1:1 de los medios nuevos, indicando que existe algún aditivo presente en el medio UDMM-VSMC que puede estar ayudando al cultivo de HUVECs por lo que las condiciones de cultivo de estas células aún pueden ser mejoradas, mediante la adición de nuevos aditivos al medio UDMM-ENDO, ya que se sabe que actualmente existen diferentes

tipos de medios de cultivo los cuales facilitan el crecimiento de este tipo celular y son distribuidos por compañías como ATCC (4 medios de cultivo), Lubrizol, Axol, etc. los cuales poseen diferencias en sus aditivos.

Durante la evaluación de co-cultivos celulares el comportamiento celular puede estar influenciado no solo por los factores solubles en los medios de cultivo, sino también por las señalizaciones por contacto celular, modificando de esta manera la proliferación de algún tipo celular, por lo que su evaluación debe ser realizada.

#### **8.4. Uso de poliuretanos como dispositivos médicos**

Una de las estrategias empleadas en terapia celular angiogénica ha sido la microinyección de diversos tipos celulares con la intención de mejorar tal proceso<sup>69</sup>, sin embargo, este método cuenta con ciertas desventajas como la pérdida de la viabilidad celular debido al daño causado por el desprendimiento por métodos enzimáticos, así como una baja retención y viabilidad celular posterior a la microinyección.

Hecho contrario es el uso de andamiajes como los poliuretanos evaluados por Grenier S y colaboradores en 2006 como el Policarbonato uterano (PCU, Bionato<sup>®</sup> 55D) y polieter uretano (PEU, Elastano<sup>™</sup> 75D), los cuales son polímeros ya utilizados en el área clínica con el objetivo de generar modelos tridimensionales capaces de ser cultivados con células musculares lisas de arteria coronaria humana (HCASMCs) y células humanas endoteliales de arteria coronaria (HCAECs), durante los cultivos bidimensionales el PCU y PEU fueron evaluados sin y con recubrimiento de Matrigel<sup>™</sup> (mezcla de componentes de matriz extracelular comercializada), reportando que este último incrementa la proliferación de VSMC en 360% aproximadamente con el PEU recubierto y 283% con PCU recubierto comparados con su respectivo control sin recubrir. Así mismo los cultivos de HCAECs en PCU recubierto con Matrigel ayuda en la adhesión y supervivencia de HCAECs a los siete días de cultivo y concluyendo la importancia de la ME en el uso de los dispositivos celulares.

Nuevos estudios han mejorado la propagación de células vasculares, mediante el uso de geles que permiten crecer y transferir cultivos celulares a modelos murinos mostrando una mejor eficiencia en el proceso de angiogénesis evaluada en procesos isquémicos de modelos murinos (ligadura y escisión de arteria femoral distal), ejemplo de ello es el uso de hidrogeles (andamiajes) realizado por Seongwoo Bak y colaboradores donde los co-cultivos de HUVECs y VSMCs indican una mayor eficiencia en la retención de la extremidad al permitir mejorar la capacidad angiogénica (7.2 – 1.1 arteriolas/mm<sup>2</sup>), esto comparado con los cultivos individuales de HUVECs (4.3 – 1.1 arteriolas/mm<sup>2</sup>) y VSMCs (5.7–1.4 arteriolas/mm<sup>2</sup>) en el mismo hidrogel y con la extremidad control (sin tratamiento) (3.2 – 0.7

arteriolas/mm<sup>2</sup>)<sup>43</sup>.

Por otra parte, dentro de los materiales evaluados en modelos murinos se encuentran los poliuretanos, dichos polímeros han demostrado un comportamiento similar a una matriz extracelular permitiendo la migración de células endoteliales y musculares<sup>70,71</sup>, así como la acumulación de colágeno tipo IV componente nativo de la matriz extracelular de los vasos sanguíneos.

A la fecha se reconoce la importancia que tiene el uso de poliuretanos biodegradables en aplicaciones cardiovasculares como lo indica Cahuich-Rodríguez, esto debido a sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, así como a su buena biocompatibilidad y por lo que empleándose como dispositivos permanentes y más recientemente como dispositivos biodegradables<sup>72</sup>.

Algunos poliuretanos biodegradables han sido evaluados clínicamente por Marcus J.D y colaboradores en 2015, demostrando su capacidad bio-absorbible a nivel epitelial en tiempos menores de un año, donde se ha observado una integración del 100% en 6 pacientes y entre un 90 y 60% en seis meses<sup>31</sup>, hecho que resalta su eficacia en la terapia reconstructiva, así como lo realizado por Tamim M y colaboradores donde muestran el uso de stents biodegradables en los procesos de intervención coronaria percutánea<sup>73</sup>.

Por nuestra parte los estudios preclínicos de las membranas de poliuretanos inicio por evaluar si estos generan un evento de toxicidad en cultivos de HUVECs y VSMC, determinando que ninguno de ellos posee un efecto citotóxico ya que en todos los casos se observó una sobrevivencia celular por arriba del 90%, además este resultado nos indica que la evaluación de los poliuretanos puede avanzar y realizar la biocompatibilidad en modelos murinos como lo indican las especificaciones para la generación de nuevos dispositivos médicos.

## 9. CONCLUSIONES.

Durante la propagación celular de HUVECs, se observó una disminución en el rendimiento celular, lo que puede estar relacionado con senescencia celular.

Las condiciones empleadas mantienen una población homogénea al 100 % con respecto a marcadores de linaje para HUVEC y VSMCs.

El medio de cultivo UDMM-VSMC permitió la propagación de VSMC en pases mayores al de la compañía ATCC.

Se realizó la evaluación de la densidad celular en los cultivos de HUVEC, con lo que se determinó la densidad de 10 000 cel/cm<sup>2</sup> como la mejor densidad de propagación celular.

Los poliuretanos evaluados no inducen citotoxicidad y permiten la propagación celular de HUVECs y VSMCs.

No hay cambios significativos del estrés oxidativo en los cultivos de las HUVECs sobre los Poliuretanos.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. México. perfiles los países para la diabetes 2016 (2016).
2. Flores Hernández, S. Diabetes en adultos : urgente mejorar la atención y el control. (2012).
3. Barquera, S., Nonato, I. C., Barrera, L. H. & Juan Rivera Dommarco. Evidencia para la política pública en salud. Obesidad en adultos : los retos de la cuesta abajo. ENSANUT Encuesta Nac. Salud y Nutr. 2012 2–5 (2012).
4. Press, D. Scaffolds in vascular regeneration : current status. 79–91 (2015).
5. Mantilla, M. E. T. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. Rev Cuba. Angiol y Cir Vasc **2**, 131–141 (1996).
6. Yu, T., Zheng, Y., Wang, Y., Xiong, W. & Lin, L. Advanced glycation end products interfere with gastric smooth muscle contractile marker expression via the AGE / RAGE / NF-  $\kappa$  B pathway. Exp. Mol. Pathol. **102**, 7–14 (2017).
7. Potukuchi, A., Addepally, U., Sindhu, K. & Manchala, R. Increased total DNA damage and oxidative stress in brain are associated with decreased longevity in high sucrose diet fed WNIN/Gr-Ob obese rats. Nutr. Neurosci. **0**, 1–9 (2017).
8. Zerneck, A. CD98 promotes vascular smooth muscle cell accumulation in atherosclerosis to confer plaque stability. Atherosclerosis **256**, 128–130 (2017).
9. Association, A. He. What Is Coronary Bypass Surgery ? (2015).
10. Mangones, T., Manhas, A., Visintainer, P., Hunter-Grant, C. & Brumberg, H. L. Prevalence of congenital cardiovascular malformations varies by race and ethnicity. Int. J. Cardiol. **143**, 317–322 (2010).
11. Hernández, E. N., Serrano, S. C., Pablo, A. E. R., Sierra, C. & Hernández, J. V. Prevalencia de malformaciones congénitas registradas en el certificado. **70**, 499–505 (2013).
12. Mendieta-Alcántara, G. G. et al. Incidencia de las cardiopatías congénitas y los factores asociados a la letalidad en niños nacidos en dos hospitales del estado de México. Gac. Med. Mex. **149**, 617–623 (2013).
13. Cleaver, O. & Melton, D. a. Endothelial signaling during development. Nat. Med. **9**, 661–668 (2003).
14. Loscalzo, J. Harrison's Cardio Vascular Medicine. (2017).
15. Nikolova, G., Strilic, B. & Lammert, E. The vascular niche and its basement membrane. **17**, (2006).

16. Herbert, S. P. & Stainier, D. Y. R. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 551–564 (2011).
17. Florey, Lord. The Endothelial Cell. *Br. Med. J.* **2**, 487–490 (1966).
18. Park, J. Y. et al. CCL11 promotes angiogenic activity by activating the PI3K / Akt pathway in HUVECs. *J. Recept. Signal Transduct.* **0**, 000 (2017).
19. Rzczidlo, E. M., Martin, K. A. & Powell, R. J. Chapter 4 Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. 25–32 (2007). doi:10.1016/j.jvs.2007.03.001
20. Miano, J. M., Cserjesi, P., Ligon, K. L., Periasamy, M. & Olson, E. N. Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circ. Res.* **75**, 803–812 (1994).
21. Bajpai, V. K., Mistriotis, P., Loh, Y.-H., Daley, G. Q. & Andreadis, S. T. Functional vascular smooth muscle cells derived from human induced pluripotent stem cells via mesenchymal stem cell intermediates. *Cardiovasc. Res.* **96**, 391–400 (2012).
22. Tykocki, N. R., Boerman, E. M. & Jackson, W. F. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. **7**, 485–581 (2017).
23. Díaz-Flores, M. et al. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Med. Mex.* **140**, 437–447 (2004).
24. secretaria de salud, C. Evidencias y Recomendaciones. catálogo maestro CENETEC **1**, (2016).
25. Salud, S. de. Diagnóstico, Estratificación y Tratamiento de pacientes con síndrome coronario agudos sin elevacion del ST. (2010).
26. Dahl, S. L. M., Koh, J., Prabhakar, V. & Niklason, L. E. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant.* **12**, 659–666 (2003).
27. Institutes, N. & October, H. U. Regenerative Medicine. 1–2 (2010).
28. Rizk, M., Aziz, J., Shorr, R. & Allan, D. S. Cell-Based Therapy Using Umbilical Cord Blood for Novel Indications in Regenerative Therapy and Immune Modulation: An Updated Systematic Scoping Review of the Literature. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 1607–1613 (2017).
29. Nikolajeva, O. et al. Umbilical Cord Blood Cytomegalovirus Serostatus Does Not Have an Impact on Outcomes of Umbilical Cord Blood Transplantation for Acute Leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **23**, 1729–1735 (2017).
30. Shenoy, S. et al. TRANSPLANTATION A trial of unrelated donor marrow transplantation for children with severe sickle cell disease. **128**, 2561–2568 (2017).
31. Wagstaff, M. J. D., Plast, F. & Bradley, J. A Biodegradable Polyurethane Dermal Matrix in Reconstruction of Free Flap Donor Sites : A Pilot. 102–118 (2015).

32. Esquiliano-rendon, D. R. et al. Creación exitosa de Neoesófago mediante Ingeniería de Tejidos en un Modelo Animal. **15**, 61–69
33. Esquiliano-rendón, D., Raya-rivera, A. M., Ordorica-flores, R. M. & Valencia-mayoral, P. Reconstrucción de agenesia e hipoplasia total de uretra mediante ingeniería de tejidos . Primer reporte mundial.
34. Song, Y. et al. TLR4/NF- $\kappa$ B/Ceramide signaling contributes to Ox-LDL-induced calcification of human vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* **794**, 45–51 (2017).
35. Cao, C. et al. Osteopontin regulates the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in response to gingipains treatment. *Mol. Cell. Probes* 1–6 (2017). doi:10.1016/j.mcp.2017.03.003
36. Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A. & D'Amore, P. A. PDGF, TGF-B and heterotypic cell-cell interactions mediate the recruitment and differentiation of 10T1/2 cells to a smooth muscle cell fate. *J Cell Biol* **141**, 805–814 (1998).
37. Brown, D. J. et al. Endothelial cell activation of the smooth muscle cell phosphoinositide 3-kinase / Akt pathway promotes differentiation. 509–516 doi:10.1016/j.jvs.2004.12.024
38. Bennett, M. R., Sinha, S. & Owens, G. K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**, 692–702 (2016).
39. Misra, A. et al. Integrin  $\beta$  3 inhibition is a therapeutic strategy for supra-aortic stenosis. 451–463 (2016). doi:10.1084/jem.20150688
40. Khodarev, N. N. Tumour-endothelium interactions in co-culture: coordinated changes of gene expression profiles and phenotypic properties of endothelial cells. *J. Cell Sci.* **116**, 1013–1022 (2003).
41. Talavera-Adame, D. et al. Endothelial Cells in Co-culture Enhance Embryonic Stem Cell Differentiation to Pancreatic Progenitors and Insulin-Producing Cells through BMP Signaling. *Stem Cell Rev. Reports* **7**, 532–543 (2011).
42. Kao, D. I. et al. Endothelial cells control pancreatic cell fate at defined stages through EGF17 signaling. *Stem Cell Reports* **4**, 181–189 (2015).
43. Bak, S. et al. Delivery of a Cell Patch of Cocultured Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells Using Thermoresponsive Hydrogels for Enhanced Angiogenesis. *Tissue Eng. Part A* **22**, 182–193 (2016).
44. Li, J. et al. Co-culture of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by hyaluronic acid micro-pattern on titanium surface. *Appl. Surf. Sci.* **273**, 24–31 (2013).
45. Wu, H. et al. Coculture of endothelial and smooth muscle cells on a collagen membrane in the development of a small-diameter vascular graft. **28**, 1385–1392 (2007).

46. Bak, S. et al. Delivery of a Cell Patch of Cocultured Endothelial Cells and Smooth Muscle Cells Using Thermoresponsive Hydrogels for Enhanced Angiogenesis. *Tissue Eng. Part A* **22**, 182–193 (2016).
47. Kannan, R. Y., Salacinski, H. J., Butler, P. E., Hamilton, G. & Seifalian, A. M. Current status of prosthetic bypass grafts: A review. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **74**, 570–581 (2005).
48. Manuscript, A. Polymeric Materials for Tissue Engineering of Arterial Substitutes. **17**, 1–15 (2009).
49. Katari, R. et al. Renal Bioengineering with Scaffolds Generated from Human Kidneys. 119–124 (2014). doi:10.1159/000360684
50. COFEPRIS. Normativa para realizar el registro de dispositivos medicos. D. Of. la Fed. (2010).
51. Vichai, V. & Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112–1116 (2006).
52. Skehan, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107–1112 (1990).
53. Lin, Z. X., Hoult, J. R. S. & Raman, A. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. *J. Ethnopharmacol.* **66**, 141–150 (1999).
54. A. Barrante and C Montero. La Prueba de Reducción del N.B.T. **19**, 85–91 (1976).
55. Alexander, J. J. Oxygen Radicals Alter LDL Permeability and Uptake by an Endothelial-Smooth Muscle Cell Bilayer. **367**, 361–367 (1991).
56. Michael Szycher, P. D. Szycher's handbook of polyurethanes. (2013).
57. Perales-Alcacio, J. L. a et al. HUVEC biocompatibility and platelet activation of segmented polyurethanes prepared with either glutathione or its amino acids as chain extenders. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **24**, 1601–17 (2013).
58. Shimada, K., Higuchi, A., Kubo, R. & Murakami, T. The Effect of a Silk Fibroin / Polyurethane Blend Patch on Rat Vessels. **6278**, (2017).
59. Perales, A. Síntesis y caracterización de poliuretanos segmentados a base de L-glutión y los aminoácidos que lo forman como extensores de cadena: Evaluación de hemocompatibilidad y biocompatibilidad con células endoteliales. (2013).
60. Ramos, J. Desarrollo de un aposito celular con queratinocitos. (2017).
61. Nolasco, N. Estudio en células endoteliales humanas de la actividad antioxidante de hidrolizados proteicos. (2016).

62. Acosta, E. Aislamiento y propagación células endoteliales humanas y su participación en la propagación de precursores neurales. (2012).
63. Zeng, Q. et al. Shh mediates PDGF-induced contractile-to-synthetic phenotypic modulation in vascular smooth muscle cells through regulation of KLF4. *Exp. Cell Res.* **345**, 82–92 (2016).
64. Minamino, T. & Komuro, I. Vascular cell senescence: Contribution to atherosclerosis. *Circ. Res.* **100**, 15–26 (2007).
65. Silva, G. C. et al. Replicative senescence promotes prothrombotic responses in endothelial cells: Role of NADPH oxidase- and cyclooxygenase-derived oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **93**, 7–15 (2017).
66. Velázquez, K. “ Aislamiento y propagación de células endoteliales humanas y su participación en la propagación de precursores neurales ”. 1–82 (2012).
67. Timraz, S. B. H., Farhat, I. A. H., Alhussein, G., Christoforou, N. & Teo, J. C. M. In-depth evaluation of commercially available human vascular smooth muscle cells phenotype : Implications for vascular tissue engineering. *Exp. Cell Res.* **343**, 168–176 (2016).
68. Salazar, G., Huang, J., Feresin, R. G., Zhao, Y. & Griendling, K. K. Zinc regulates Nox1 expression through a NF- $\kappa$ B and mitochondrial ROS dependent mechanism to induce senescence of vascular smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* **108**, 225–235 (2017).
69. Powell, R. J. et al. Interim analysis results from the RESTORE-CLI, a randomized, double-blind multicenter phase II trial comparing expanded autologous bone marrow-derived tissue repair cells and placebo in patients with critical limb ischemia. *J. Vasc. Surg.* **54**, 1032–1041 (2011).
70. Bergmeister, H. et al. Healing characteristics of electrospun polyurethane grafts with various porosities. *Acta Biomater.* **9**, 6032–6040 (2013).
71. Bergmeister, H. et al. Biodegradable , thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements. *Acta Biomater.* **11**, 104–113 (2015).
72. Cauich-rodríguez, J. V, Chan-chan, L. H., Hernandez-sánchez, F. & Cervantes-uc, J. M. Degradation of Polyurethanes for Cardiovascular Applications. (2012).
73. Turner, M. E. et al. Percutaneous Coronary Intervention With Bioresorbable Scaffolds in a Young Child. **10032**, 1–5 (2016).

<http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioDispositivosMedicos.aspx>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 14 de noviembre de 2018.

**Dr. David Martínez Duncker Ramírez**  
Director  
Facultad de Medicina  
P r e s e n t e:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Desarrollo de bioensayos para evaluar citotoxicidad y estrés oxidativo: participación de co-cultivos de células endoteliales y musculares lisas vasculares**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Abraham Noé Anzures Jiménez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**Dra. Vera Lucia Petricevich**

Calle Leñeros esquina Iztaccihuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 14 de noviembre de 2018.

**Dr. David Martínez Duncker Ramírez**

Director

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Desarrollo de bioensayos para evaluar citotoxicidad y estrés oxidativo: participación de co-cultivos de células endoteliales y musculares lisas vasculares**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Abraham Noé Anzures Jiménez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**

**M. en C. José Santos Ángeles Chimal**

Calle Leñeros esquina Iztaccihuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**FACULTAD DE MEDICINA**

Secretaría de Docencia

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 14 de noviembre de 2018.

**Dr. David Martínez Duncker Ramírez**

Director

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Desarrollo de bioensayos para evaluar citotoxicidad y estrés oxidativo: participación de co-cultivos de células endoteliales y musculares lisas vasculares**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Abraham Noé Anzures Jiménez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

**Atentamente**



**Dr. Juan José Acévedo Fernández**

Calle Leñeros esquina Iztaccihuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.  
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura\_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA  
EM**

RECTORÍA  
2017-2023

*Una universidad de excelencia*

Cuernavaca, Mor., 14 de noviembre de 2018.

**Dr. David Martínez Duncker Ramírez**  
Director  
Facultad de Medicina  
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Desarrollo de bioensayos para evaluar citotoxicidad y estrés oxidativo: participación de co-cultivos de células endoteliales y musculares lisas vasculares**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Abraham Noé Anzures Jiménez. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente



Dr. Jesús Santa Olalla Tapia