



**Universidad**  
Zaragoza



Instituto de Investigación  
Sanitaria Aragón

## Trabajo de Fin de Grado

# REVASCULARIZACIÓN DE ÁRBOLES VASCULARES COMPLEJOS Y RAMIFICADOS EN HÍGADOS DESCELULARIZADOS



Autor:

**Raúl Bertol Pinilla**

Director:

**Pedro Miguel Baptista**

Laboratorio de Bioingeniería de órganos y Medicina Regenerativa – IIS Aragón /

Biotecnología

Curso 2018/2019

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumen del proyecto.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Introducción.....</b>  | <b>1</b>  |
| Demanda hepática y trasplantes  | 1         |
| Alternativas al trasplante hepático                                     | 2         |
| Ingeniería de tejidos   | 3         |
| Proceso de desarrollo vascular  | 4         |
| Desarrollo vascular “in vitro”  | 4         |
| <b>Objetivos y planteamiento.....</b>                                   | <b>7</b>  |
| <b>Materiales y métodos.....</b>  | <b>8</b>  |
| Preparación y obtención de la matriz extracelular hepática.             | 8         |
| Aislamiento de las líneas celulares hMSC y hUVEC                        | 9         |
| Cultivo y expansión de las líneas celulares hMSC y hUVEC                | 9         |
| Sembrado celular del sistema de recelularización                        | 10        |
| Circuito de recelularización de la matriz extracelular                  | 11        |
| Combinación de presiones en el sistema de recelularización              | 12        |
| Desarrollo temporal del sistema de recelularización y medios de cultivo | 13        |
| Tinción histológica de hematoxilina-eosina                              | 14        |
| Análisis por inmunofluorescencia  | 15        |
| <b>Resultados.....</b>  | <b>16</b> |
| Proceso de descelularización hepática                                   | 16        |
| Cultivo de las líneas celulares hMSC y hUVEC                            | 17        |
| Tinción de hematoxilina-eosina e inmunofluorescencia                    | 17        |
| Integración de los datos de inmunofluorescencia                         | 19        |
| Interpretación estadística de los datos de inmunofluorescencia          | 19        |
| <b>Discusión de resultados.....</b>                                     | <b>21</b> |
| <b>Conclusiones.....</b>  | <b>22</b> |
| Futuros objetivos   | 23        |
| <b>Bibliografía consultada.....</b>                                     | <b>24</b> |
| <b>Anexos.....</b>  | <b>25</b> |

## RESUMEN

Durante el desarrollo de este trabajo se ha llevado a cabo la reconstitución in vitro del árbol vascular del lóbulo derecho del hígado de rata. Para ello, se tuvieron en cuenta los múltiples factores descritos como necesarios para la mencionada generación vascular. Estos factores, a grosso modo, consistieron en el uso y cultivo de las líneas celulares adecuadas, la generación de un ambiente bioquímico propicio, la creación de un circuito de sembrado celular u biorreactor, y la utilización de un soporte físico donde recrear adecuadamente la nueva vasculatura. No obstante, el objetivo fundamental, más allá de lograr una efectiva revascularización, fue el de comparar la recelularización llevada a cabo con la utilización de dos medios con estrategias y factores de crecimiento distintos, para finalmente, poder determinar cuál es el medio de cultivo más adecuado para llevar a cabo la revascularización hepática a mayor escala.

During this work, it was recreated the “in vitro” reconstitution of the rat liver right lobule vasculature. In order to achieve that, it was considered multiple factors described as essential in vasculogenesis process. A simplified approach of this factors included the use and culture of appropriate cell lines, an adequate generation of the biochemical environment, creation of a cellular seeding device/bioreactor and use of physical support for recellularization. Nevertheless, the main goal of this study, beyond achieving an effective revascularization, was to compare the overall recellularization carried out with the use of two media with different strategies and growth factors, to finally be able to determine which one was more suitable for carrying out hepatic revascularization on a larger scale.

## INTRODUCCIÓN

### *Demanda hepática y trasplantes*

El hígado es un órgano vital que desempeña un gran número de funciones principalmente relacionadas con la homeostasis y el metabolismo. A grandes rasgos, su adecuado funcionamiento permite la reserva de fuentes de energía tanto a corto como a largo plazo, la síntesis de aminoácidos, proteínas, enzimas y colesterol, la detoxificación de fármacos y xenobióticos y la producción de bilis. Además, presenta una gran capacidad de regeneración pudiendo llegar a solventar pérdidas de más de la mitad de su peso. <sup>1</sup>

No obstante, hay una serie de enfermedades que comprometen su adecuada funcionalidad. Dichas enfermedades representan una importante amenaza sanitaria que por ejemplo cuenta sólo en los Estados Unidos con más de 30 millones de personas afectadas. Las principales enfermedades hepáticas son el hepatocarcinoma, las enfermedades hepáticas alcohólicas, las enfermedades hepáticas ligadas a obesidad, diabetes e hiperlipidemias, la fibrosis hepática, la cirrosis, los diferentes tipos de hepatitis vírica, los fallos congénitos en el metabolismo y los fallos hepáticos agudos. Precisamente, la combinación de cirrosis con daño hepático crónico representa la duodécima causa de muerte más frecuente en los Estados Unidos con estudios que pronostican aún mayores incidencias a corto y medio plazo. <sup>1</sup>

Ante esta desalentadora situación, cuando el daño hepático es considerable e irreversible (enfermedad hepática en fase terminal) se requiere de una intervención clínica que lo remedie.

Hoy día la alternativa más extendida es el trasplante de hígado. La técnica ha sido mejorada en los últimos 40 años hasta el punto de que la tasa de supervivencia existente postrasplante alcanza entre el 80% y 90%, habiéndose trasplantado a lo largo de 2018 más de 8.000 hígados en los EE.UU. Durante el desarrollo de la técnica se han conseguido importantes avances entre los que destaca la inmunosupresión adecuada del receptor.<sup>2</sup> Además, el alcance de la técnica ha aumentado notablemente puesto que no sólo es posible trasplantar el hígado de un donante fallecido a un receptor, sino que también se ha conseguido trasplantar parte del hígado a partir de un donante vivo, así como a partir de un mismo hígado trasplantarlo con éxito a un individuo adulto y a un niño.<sup>3</sup> Sin embargo, actualmente la lista de espera para ser trasplantado ha experimentado un preocupante aumento, más aún si tenemos en cuenta que dicha lista subestima el número real de pacientes afectados. Esta demanda creciente de hígados funcionales se debe principalmente al descenso en el número de potenciales donantes cuya esperanza de vida se ha visto progresivamente aumentada, el número de accidentes de tráfico reducido y las consideraciones sobre los pacientes que han sufrido lesiones cerebrales graves se han visto modificadas.<sup>4</sup> Al mismo tiempo, el aumento en la esperanza de vida del donante, así como la alta prevalencia de la diabetes y la obesidad, han supuesto una menor calidad promedio de los órganos potencialmente útiles.<sup>5</sup> Con estos datos, se estima que en torno a un 10% de los pacientes que se encuentran en lista de espera morirán antes de poder ser trasplantados, llegando casi a los 20% en algunos países actualmente.<sup>6-7</sup> Además, aunque la intervención quirúrgica de trasplante de hígado es segura, conlleva a posteriori ciertos riesgos a tener en cuenta. Estos riesgos, aunque poco probables, incluyen posibles dificultades en la inmunosupresión del receptor, la transmisión de cáncer, la transmisión de enfermedades infecciosas raras o latentes, la transmisión de enfermedades autoinmunes o la transmisión de desórdenes metabólicos.<sup>4</sup>

#### Alternativas al trasplante hepático

De forma alternativa al trasplante convencional, existen otras posibilidades que se encuentran todavía hoy en proceso de desarrollo y optimización. El ejemplo más similar sería el desarrollo de xenotrasplantes donde se haría uso de cerdos modificados genéticamente.<sup>2</sup> No obstante, el abanico de opciones es variado. Por ejemplo, para el tratamiento de las enfermedades hepáticas congénitas cabe destacar la implementación de terapias génicas o terapias celulares<sup>1</sup>, mientras que para la estabilización y control de aquellos pacientes en lista de espera se han desarrollado dispositivos de asistencia hepática. Estos dispositivos actúan de un modo similar a la hemodiálisis a nivel renal permitiendo la depuración de aquellas toxinas que por falta de funcionalidad no puede depurar el hígado.

También existen terapias basadas en la suplementación hepática de factores de crecimiento. Dichos factores buscan principalmente potenciar la capacidad regenerativa del hígado.<sup>1</sup> Por último y como alternativa en la que se va a centrar el trabajo aquí presentado, se encuentra la incipiente irrupción de la ingeniería de tejidos o bioingeniería. Esta disciplina hace uso de la medicina regenerativa cuyo fin es el de potenciar la capacidad de regeneración del tejido a tratar o directamente llevar a cabo su reemplazo por otro tejido perfectamente funcional que haya sido fabricado “ex vivo”.<sup>1</sup> Dicha opción ha despertado un creciente interés científico tal como se ve reflejado en motor de búsqueda PubMed en el que entre el año 2000 y el 2016 se han registrado cerca de 20 veces más de publicaciones relacionadas.<sup>8</sup>

#### Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una disciplina amplia y en desarrollo que promete un alto potencial de acción. Más allá de la síntesis de tejidos concretos, la disciplina se encuentra en avance hacia lograr la recreación de órganos completos. Concretamente, los órganos en los que se tiene un mayor interés de generación son el corazón, pulmón, riñón, páncreas, intestino e hígado. Sin embargo, la producción de estos supone un importante desafío por la complejidad intrínseca que conllevan, puesto que todos aquellos compartimentos que componen la totalidad del órgano han de ser debidamente diseñados y han de actuar de forma sinérgica. <sup>8</sup> Es por ello, por lo que hoy en día la ingeniería de órganos completos aún no es factible para llevar a cabo trasplantes. No obstante, sí es de utilidad en numerosas aplicaciones tales como ensayos a nivel fisiológico, ensayos de metabolismo de fármacos, biología del desarrollo, estudios de células madre y estudios de problemas concretos por la posibilidad de diseño y personalización con fallos específicos. <sup>9</sup>

La bioingeniería no hace referencia a una única forma de proceder, sino que comprende diferentes aproximaciones en experimentación que buscan perseguir un mismo fin último. Un ejemplo de ello lo encontramos en la forma de sembrar las células con las que se quiere generar el nuevo órgano pudiendo utilizar la novedosa impresión en 3D, que dispone las células en localizaciones estratégicas de la matriz <sup>10</sup>, o técnicas más tradicionales e inespecíficas de sembrado, ya sea a través del parénquima o a través de los conductos vasculares que permanecen tras la descelularización de la matriz. <sup>9</sup>

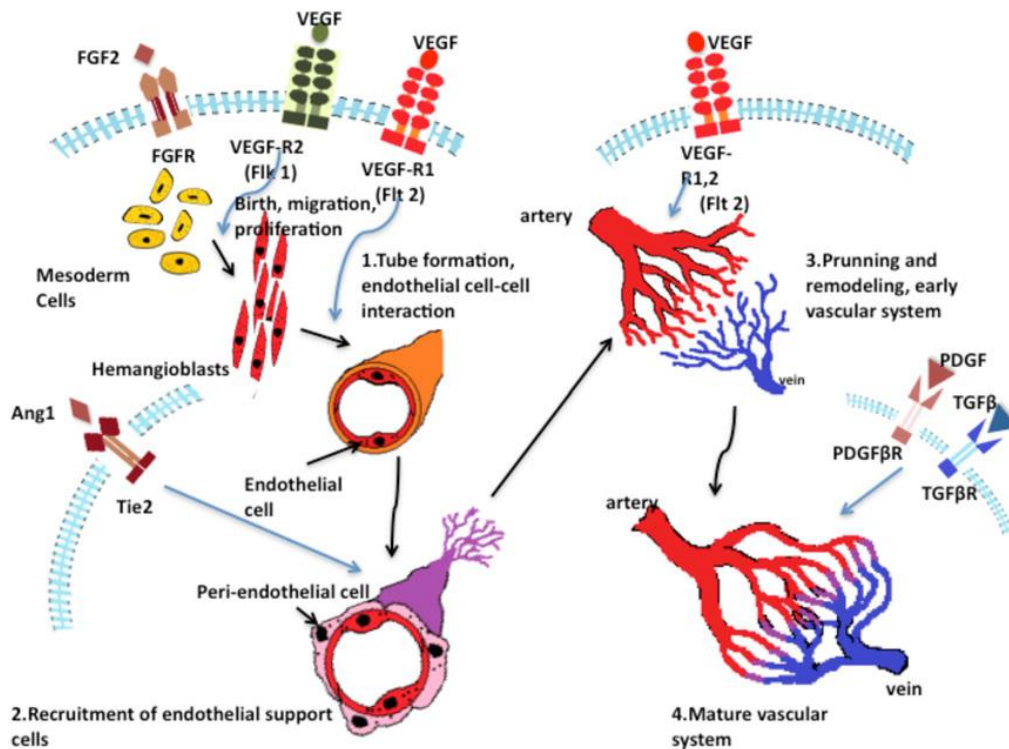
- Ingeniería hepática

De entre toda la ingeniería de órganos mencionada, el campo más investigado es la ingeniería hepática con un tercio de las publicaciones relativas a bioingeniería. <sup>8</sup> Los avances conseguidos actualmente comprenden la descelularización efectiva de la matriz extracelular (ECM) de hígado de cerdo y de rata <sup>1</sup>, así como la recelularización de la matriz con hepatocitos de rata y células fetales hepáticas humanas. <sup>9</sup> No obstante, la completa recelularización y consecución de un hígado funcional aplicable a la clínica todavía no se ha conseguido. <sup>1</sup> Para ello, es necesario solventar una serie de limitaciones existentes:

- La identificación de las especies más adecuadas para la selección de las ECM hepáticas necesarias para la recelularización.
- La selección de óptima de los tipos celulares para la recelularización. Dichas células han de cumplir que estén bien caracterizadas, que tengan una buena capacidad proliferativa y de diferenciación, que presenten un genotipo estable, que se adecúen al fenotipo final requerido y que estén disponibles. <sup>9</sup>
- La optimización del dispositivo de recelularización u biorreactor y su pertinente escalado. <sup>9</sup>
- El logro de una red vascular funcional, completa y estable, que entre otras cosas evite la necrosis del tejido por falta de difusión del oxígeno. <sup>8</sup> Precisamente, será la recreación de una red vascular hepática el objetivo central de nuestro trabajo.

### Proceso de desarrollo vascular

Para poder comprender la vascularización de los tejidos es de importancia conocer de qué manera se produce ésta a nivel fisiológico. Los primeros momentos de desarrollo vascular se producen a nivel embrionario, donde la vascularización surge por sinergia de dos grandes procesos denominados vasculogénesis y angiogénesis. <sup>8</sup> Estos procesos hacen referencia a la formación “de novo” de una red primitiva vascular y al consiguiente crecimiento y desarrollo de este primer entramado (Figura 1). <sup>11</sup>



**Figura 1.** El proceso de vasculogénesis y angiogénesis. Se indican algunas de las proteínas angiogénicas en cada etapa (Roy et al. Nanotechnology 2011).

La vasculogénesis se origina a partir de una serie de células mesodérmicas en estado indiferenciado. Estas células, destacan por su capacidad de diferenciarse a hemangioblastos, los cuales van a ser capaces de formar una serie de agregados que reciben el nombre de islas sanguíneas. Precisamente, la progresiva diferenciación y fusión celular de estos agregados va a suponer que aquellas células que se encuentren en el interior del agregado se diferencien a precursores hematopoyéticos y que las células del exterior lo hagan a células endoteliales, conllevando en definitiva la formación de la ya mencionada red primitiva vascular (Figura 1). Adicionalmente, para la adecuada formación de la red, las células endoteliales van a llevar a cabo el reclutamiento de células murales por liberación y recepción del factor de crecimiento PDGF-BB.<sup>10</sup> De este modo, la red vascular acaba por ser el resultado de la interacción de las células endoteliales que se encuentran dibujando el vaso y las células murales, pericitos y células vasculares de músculo liso, que se encuentran recubriéndolo.<sup>8</sup>

Paralelamente, el proceso de angiogénesis parte de esta red vascular para la formación de una red más compleja y desarrollada. Para ello, es necesaria la creación de una especie de andamio proteico fruto de la liberación de proteínas sanguíneas, ya que este va a permitir la proliferación y migración dirigida de las células endoteliales circundantes. Dicha migración, se encuentra regulada tanto por quimiotaxis como por diversos estímulos mecánicos.<sup>11</sup>

Por último, cabe destacar la regulación a nivel hemodinámico que tiene lugar a nivel vascular. En dicha regulación influyen factores tales como la presión y el flujo sanguíneo que son percibidos por las células endoteliales mediante mecanorreceptores. Estos factores van a influir en definitiva en la maduración y en las diferencias estructurales del entramado vascular.<sup>11</sup>

## Desarrollo vascular "in vitro"

El objetivo consiste en conseguir recrear una red vascular propiamente organizada que permita la irrigación completa y funcional del órgano que se quiere sintetizar. Para ello, resulta fundamental establecer una serie de técnicas que permitan asentar el proceso de desarrollo del endotelio para posteriormente avanzar hacia la creación de la red completa.

Los principales elementos requeridos para el desarrollo de vasos sanguíneos son: una matriz extracelular que actúe como soporte y canal de distribución celular, una fuente de células endoteliales, una fuente de células murales, factores de crecimiento que posibiliten el proceso de angiogénesis y una combinación adecuada de factores hemodinámicos.

- Células endoteliales

Las células endoteliales son a priori las células principales para la formación de vasos sanguíneos. No obstante, su función no se limita únicamente a actuar de barrera física y delimitar los vasos, sino que también interviene en la regulación del transporte de células inflamatorias, en la modulación de la coagulación sanguínea y en la participación como guardianes del metabolismo celular.<sup>8</sup>

En cuanto a su procedencia, al tratarse de células ubicuas este puede ser muy variado. No obstante, a fin de conllevar la mínima invasión posible se opta por la obtención de células endoteliales procedentes de cadáveres o, lo más frecuentemente utilizado, la obtención de células endoteliales a partir de la vena umbilical. Esta última procedencia destaca por su fácil accesibilidad, así como por su alto rendimiento a nivel de cultivo celular<sup>8</sup> y será precisamente la procedencia que se va a utilizar en la parte experimental del trabajo.

- Células murales

Generalmente se entiende por células murales o perivasculares el conjunto de células musculares lisas y de pericitos. La importancia de las células musculares lisas a nivel vascular reside en la capacidad que confieren de vasomotilidad, así como de repuesta mecánica al flujo sanguíneo.<sup>8</sup> No obstante, pese a su relevancia, se ha prescindido de su utilización para la realización de los experimentos de revascularización que van a ser descritos. Esto únicamente atiende a razones de simplificación a la hora de conseguir abordar la recreación vascular.

Por otra parte, los pericitos constituyen los reguladores clave del proceso de angiogénesis. Son capaces de controlar el crecimiento endotelial, la migración y la estabilización de la microvasculatura, así como conferir resistencia capilar a la regresión.<sup>8</sup> No obstante, existe cierta controversia con respecto a su origen y diferenciación, Arnold I. Caplan afirma al respecto que los pericitos son precisamente los precursores de las denominadas células madre mesenquimales (MSC) lo cual confronta con lo anteriormente aceptado de que el origen de las MSC era el tejido conectivo de la médula o del estroma. Concretamente, propone una cierta equivalencia entre ambos tipos celulares debido a su parentesco que denomina pMSC (pericito/MSC).<sup>12</sup> Adicionalmente, Bruno Péault y Johnny Huard proponen también como precursores no sólo a los pericitos sino también a la células endoteliales miogénicas y a la células adventicias.<sup>13</sup> En definitiva, todo ello refuerza la idea de pluripotencialidad de las células MSC, las cuales han sido descritas como capaces de diferenciarse en condiciones adecuadas de cultivo a progenitores adiposos, osteoblastos, condrocitos y células madre de músculo esquelético, así como también poder comportarse como pericitos.<sup>8</sup> Por ello, se ha llevado a cabo la utilización de las células MSC para la revascularización hepática detallada en este trabajo.

En referencia a la procedencia de las MSC utilizadas, la mejor caracterizada es la de médula ósea, no obstante, la línea celular de MSC que se va a utilizar procede de lipoaspirados lipídicos, en los

cuales se consigue la extracción de pericitos existentes en pequeños vasos. Esto se debe a los altos rendimientos que producen al mismo tiempo que la obtención es sustancialmente menos invasiva<sup>14</sup> y, aunque pueden existir diferencias fenotípicas entre ambas líneas celulares, las procedentes de lipoaspirados se comportan in vitro del mismo modo que las de médula ósea.

- Matriz extracelular (ECM)

Uno de los requisitos necesarios para la generación de órganos completos, y por tanto para la recreación de la vasculatura de éstos, es el de disponer de una estructura que haga de soporte y contenga las moléculas adecuadas para la correcta disposición y adhesión celular. Dicha estructura es la ECM, que surge fruto del proceso de descelularización que se lleva a cabo sobre el órgano nativo. Tras dicho proceso la matriz queda únicamente compuesta por componentes, en su mayoría proteicos, como los diferentes tipos de colágeno. De esta forma, la matriz restante imita en buena medida el ambiente bioquímico y anatómico que se encuentra en el órgano.<sup>8</sup> Además, dicha matriz presenta una serie de importantes ventajas:

No produce respuesta inmune en caso de ser trasplantada aún en el caso de trasplante entre diferentes especies, debido a la elevada homología de las proteínas de la ECM entre especies.<sup>8</sup>

Debido a la naturaleza de su estructura retiene la microarquitectura del hígado de forma intacta, así como los conductos por lo que se desarrolla la vasculatura pudiendo de este modo facilitar la disposición celular posterior.<sup>9</sup>

Por último, en cuanto al origen del que se puede obtener la ECM puede ser variado, ya que las moléculas que la constituyen se encuentran altamente conservadas entre especies. Esto permite la utilización de matrices de origen animal. No obstante, por su similitud en tamaño y en microvasculatura, las ECM preferidas son de origen porcino u ovino. Además, en aquellos casos que el hígado de un potencial donante humano no pueda ser trasplantado, se puede hacer también uso de su ECM.<sup>9</sup>

- Factores de crecimiento

Atendiendo a la biografía consultada, cabe destacar el papel fundamental de determinados factores de crecimiento en el proceso de angiogénesis que posteriormente serán tenidos en cuenta para la parte experimental del trabajo.

El factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1) constituye una importante hormona implicada en el crecimiento de una amplia variedad de células. Además, en combinación con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) llevan a cabo una relevante estimulación de la división celular.<sup>1</sup>

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los principales factores que interviene en el inicio del proceso de angiogénesis. Su presencia favorece la permeabilidad y consiguiente liberación de proteínas que intervienen en la generación de un andamio proteico que permita la formación de nuevos vasos a partir de los preexistentes. Además, en combinación con el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) juegan un importante papel en la diferenciación de células pluripotenciales.<sup>11</sup>

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es responsable de la vía principal por la cual se lleva a cabo el reclutamiento de las células murales por parte de las células endoteliales que conforman el vaso.<sup>11</sup>

La angiopoyetina 1 (Ang-1) produce el fortalecimiento de las uniones celulares que se establecen entre las células endoteliales y los pericitos lo que favorece la maduración vascular.<sup>11</sup>

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ 1) induce la síntesis de componentes de la matriz extracelular y de sus receptores, así como interviene en la inhibición de la síntesis de enzimas proteolíticas responsables de degradar la matriz.<sup>15</sup>



La angiopoyetina 2 (Ang-2) por su parte, es considerada una espada de doble filo puesto que dependiendo de la presencia de su receptor Tie-2 puede llevar acciones antagonistas entre sí. Específicamente, durante el proceso de angiogénesis, el receptor Tie-2 es poco abundante y por tanto la Ang-2 no actuará sobre este sino sobre las integrinas, que se encuentran altamente expresadas por las células endoteliales, produciendo en definitiva la activación y migración del proceso de angiogénesis. <sup>16</sup>

- Factores hemodinámicos: presión y flujo sanguíneo

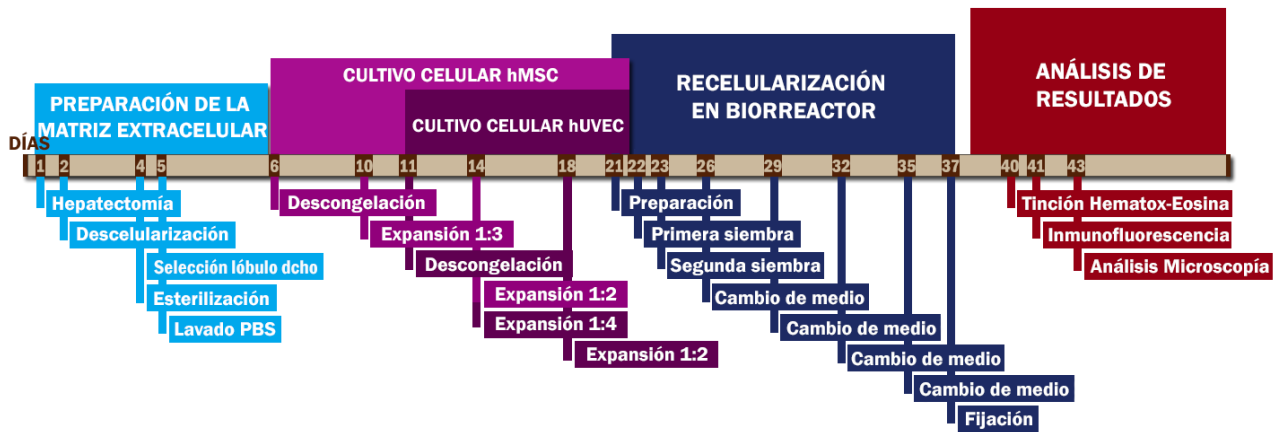
Tal y como se ha comentado previamente en el apartado de desarrollo vascular fisiológico, la regulación hemodinámica interviene en dicho proceso. Precisamente, los estímulos mecánicos producidos por la presión y flujo sanguíneo son responsables de la maduración y de las diferencias estructurales vasculares. <sup>11</sup> Es por ello, que para una adecuada recreación “in vitro” del entramado vascular será necesario tener en cuenta dichos factores. Aquí entra también el juego el desarrollo de un circuito que sea capaz de infligir dicha presión al mismo tiempo que recircular el contenido celular que quiere ser sembrado. Dicho circuito recibe el nombre de biorreactor y será explicado con detalle en los apartados siguientes.

## OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

- Establecer un esquema de trabajo adaptado a la revascularización de matrices extracelulares hepáticas de rata, que englobe de forma coordinada los diferentes procesos y subprocesos necesarios para la consecución del fin (descelularización de la matriz hepática, cultivo celular, sembrado en biorreactor y análisis de resultados).
- Lograr la revascularización efectiva de diferentes matrices hepáticas en unas condiciones de cultivo concretas garantizando la adecuada reproducibilidad entre las mismas.
- Establecer la comparativa entre dos condiciones de cultivo determinadas (medio alternado y medio combinado) que englobe para cada condición individual a las diferentes réplicas realizadas.
- Determinar de entre las dos condiciones de cultivo ensayadas, cuál es la más adecuada para llevar a cabo la revascularización hepática de todos aquellos posibles diámetros de vasos sanguíneos que componen la totalidad del árbol vascular.

- **ESQUEMA DE TRABAJO DEL PROCESO DE RECELULARIZACIÓN HEPÁTICA**

El eje pone en valor el tiempo empleado desde el primer momento en el que se recibe el modelo experimental congelado hasta el momento final de la observación en el microscopio de fluorescencia de las secciones de la matriz extracelular recelularizada. No obstante, algunos intervalos temporales siempre pueden estar sujetos a modificaciones. Suponiendo un desarrollo normal del proceso, el tiempo estimado para cada matriz extracelular recelularizada es de 43 días.



**Figura 2.** Desarrollo temporal del proceso completo de revascularización hepática del lóbulo derecho. Diferenciación entre bloques de trabajo con sus consiguientes subprocesos. Estimación aproximada de tiempo en días.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### • PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA.

Como modelo experimental se partió de ratas (*Rattus norvegicus*) del cruzamiento *Sprague-Dawley* de las cuales se obtuvo la matriz extracelular. Dicho modelo experimental se encontraba en estado congelado, puesto que para la descclularización posterior es favorable el sometimiento del órgano a un proceso de congelación y descongelación. Una vez descongelada, en primer lugar, se llevaron a cabo cirugías de extracción hepática para, posteriormente, proceder a la descclularización y acondicionamiento del órgano.

El proceso de descclularización se realizó mediante la perfusión de volúmenes determinados tanto de solución de descclularización como de solución de lavado impulsados mediante el uso de una bomba peristáltica (MasterFLEX L/S modelo 7519-06).

A nivel general, el esquema de trabajo fue el siguiente:

- Cirugía de extracción hepática. Disección y canulación de la vena porta, disección de vena cava inferior suprahepática e infrahepática.
- Lavado con agua del tejido. Eliminación de la sangre. Flujo constante de 2 ml/min a 4°C.
- 1ª fase de perfusión de la solución de descclularización (Triton 1% + 0.1% de NH<sub>4</sub>OH).  
Aplicación del 5l de solución con un flujo constante de 2 ml/min a 4°C.
- 2ª fase de perfusión de la solución de descclularización (Triton 1% + 0.1% de NH<sub>4</sub>OH).  
(Únicamente necesaria en aquellos casos en los que no se ha observado suficiente descclularización). Mismo volumen y mismas condiciones que en la primera fase.
- Lavado con agua y eliminación del detergente. Aplicación de un volumen total de 10l con flujo constante de 2 ml/min a 4°C.
- Hepatectomía parcial. Selección del lóbulo derecho hepático por su irrigación directa.

- Perfusión de la solución de esterilización (penicilina y estreptomicina a 10%). Trabajo en cabina de flujo laminar a temperatura ambiente.
- Lavado con PBS estéril para la eliminación de la solución de esterilización.
- Almacenamiento a 4°C hasta su utilización en un recipiente hermético y estéril.

- **AISLAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES hMSC y hUVEC**

Para el aislamiento de la línea celular hUVEC, que posteriormente fue empleada en la recelularización de la matriz, se emplearon cordones umbilicales procedentes de donaciones hospitalarias. Sobre estos cordones, se llevó a cabo la inserción de la cánula en la vena umbilical para posteriormente proceder al lavado con PBS y separación celular del interior de la vena con tripsina a 37°C. No obstante, la separación puede tener también otros tipos de células diferentes de hUVEC tales como fibroblastos por lo que se estableció un cultivo de este en un medio adaptado al tipo celular de interés y se procedió a progresivas visualizaciones cada 3-4 días. En caso de que la contaminación fuera notable o persista, se puede hacer *cell sorting* (con CD31) lo que nos permitiría separar los diferentes tipos celulares de las células endoteliales de forma selectiva.

Por su parte, las células hMSC, procedían de lipoaspirados humanos obtenidos en intervenciones hospitalarias. A partir de su recepción se procedió a la centrifugación de la muestra lo que generó 3 fases diferentes, de las cuales se desechó la fase intermedia. Tras ello, se mezclaron el resto de las fases y se volvió a centrifugar la muestra quedándonos en este caso únicamente con el pellet. A partir de este pellet se resuspendió en el medio correspondiente de las células hMSC y se centrifugó. El mismo proceso anterior se repitió de nuevo y finalmente se pasó el contenido por un filtro de 100 µm de tamaño de poro. El establecimiento del cultivo final y el lavado de las células muertas nos dio el cultivo final de las células hMSC con el que trabajamos posteriormente en la expansión.

- **CULTIVO Y EXPANSIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES hMSC y hUVEC**

Para la revascularización hepática se hizo uso de dos líneas celulares diferentes. Estas líneas nos permiten una aproximación simplificada de la vasculogénesis. El cultivo se llevó a cabo sobre placas de cultivo de 150 mm a la que previamente se les había añadido una capa de gelatina porcina para favorecer la adecuada adhesión de las células a la placa.

Durante todo el proceso de cultivo se trabajó de forma separada con ambas líneas celulares puesto que esto nos permitió obtener la expansión más óptima posible para cada una de ellas. De este modo, las células madre mesenquimales (hMSC) se cultivaron en condiciones de hipoxia al 3% de CO<sub>2</sub> y las células endoteliales de vena umbilical (hUVEC) lo hicieron en condiciones de normoxia. Asimismo, los requerimientos de cultivo fueron diferentes.

Las células hMSC se incubaron con Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (Sigma D8062) suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma P0781 1%) y suero fetal bovino (Gibco 10270106 10%). Mientras que las células hUVEC lo hicieron con MCB131 (Gibco/ThermoFisher) suplementado con suero fetal bovino (Gibco 10270106 5%), L-glutamina (Sigma G7513 2mM), penicilina/estreptomicina (Sigma P0781 1%), insulina (Sigma I9278 5 µg/ml), transferrina (Sigma T0665 10 µg/ml), factor de crecimiento endotelial vascular (Preprotech 100-20 50 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (Preprotech AF-100-15 40 ng/ml),

factor de crecimiento fibroblástico 2 (Preprotech 100-18B 40 ng/ml) y factor de crecimiento similar a insulina 1 (Sigma I9278 40 ng/ml).

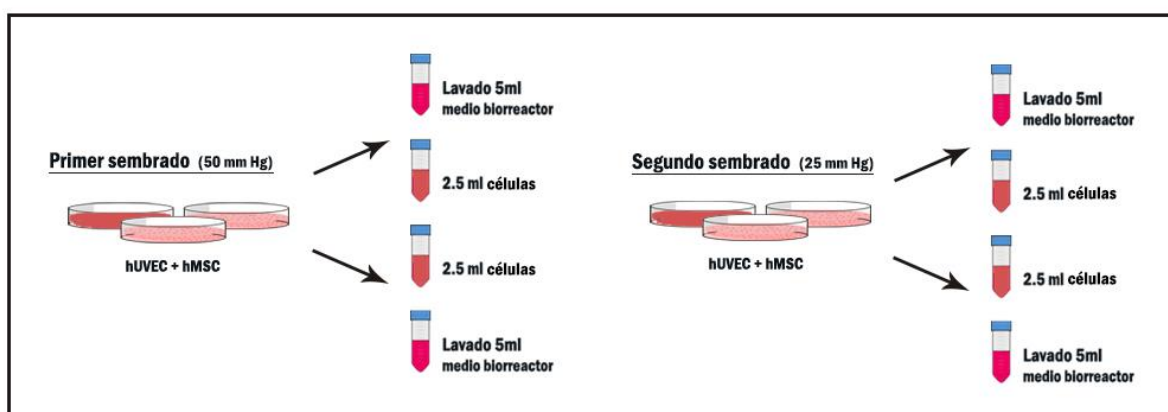
La expansión celular se consideró completa cuando se lograron alcanzar los números suficientes para poder llevar a cabo el sembrado del biorreactor. Esto generalmente sucede cuando tras diferentes expansiones se ha conseguido la confluencia de 13 placas de cultivo en el caso de las células hMSC y de 16 placas de cultivo en el caso de las células hUVEC.

### • SEMBRADO CELULAR DEL SISTEMA DE RECELULARIZACIÓN / BIORREACTOR

La siembra del biorreactor se realizó en dos días consecutivos una vez hubo sido completada la expansión celular. Consistió en la tripsinización del cultivo, contaje celular y concentración de ambas líneas celulares en un volumen adecuado para la siembra.

La siembra conllevó la mezcla de ambas líneas celulares en una proporción adecuada. Esta proporción está sustentada en la proporción fisiológica existente entre las líneas celulares utilizadas que concretamente es de 3 veces más cantidad de células hUVEC que de hMSC. No obstante, no siempre obtenemos la misma calidad en la expansión celular y por tanto existe un pequeño rango de variación en el número de células sembrado. Además, para evitar alteraciones demasiado grandes que afecten a la reproducibilidad entre biorreactores se fijó un límite superior de 145 millones de células totales como máximo a sembrar. No obstante, se reservaron para posterior sembrado dos de las placas de cultivo de hMSC como será explicado más adelante.

El proceso de siembra aparece descrito en la Figura 2, el primer día de siembra se concentró el contenido de la mitad de las placas de cultivo en el medio de cultivo del biorreactor para ser finalmente dividido en dos tandas de 2.5 ml cada una. El segundo día se hizo lo mismo con la otra mitad de placas restantes. El lavado con medio de biorreactor tanto inicial como final tuvo como objetivo eliminar las posibles burbujas que pudieran haberse formado en la vía de entrada y evitar que quede medio con células depositado en la vía de entrada.



**Figura 3.** Esquema de sembrado celular del biorreactor. Separación por alícuotas del primer sembrado, equivalente al sembrado a altas presiones (50 mm Hg), y del segundo sembrado, equivalente a bajas presiones (25 mm Hg). Inyección de las alícuotas vía bomba para jeringuillas (*New Era pump systems.inc modelo NE400*).

Tanto el primer como segundo día de siembra, tras el sembrado de la primera tanda de 2.5 ml se dejó reposar el contenido celular unos 15 min para favorecer la adhesión a la matriz. Tras este tiempo se procedió a la siembra de la segunda de las tandas, la cual se dejó reposar durante 1h. Tras ello, se procedió a la puesta en marcha del circuito a la presión de siembra (en función de si es el primer o segundo día serán 50 o 25 mm de Hg) de tal modo que se hicieron los cálculos pertinentes para asegurar que todo el contenido sembrado recorriera al menos 5 vueltas del circuito a fin de garantizar una adecuada distribución:

$$\frac{\text{Volumen de medio total en el biorreactor (ml)} \times 5 \text{ vueltas}}{\text{Flujo vena porta correspondiente a la presión (ml/min)}} = \text{Tiempo requerido (min)}$$

Tras ello se mantuvo un flujo basal de 1 ml/min durante las siguientes 20h y finalmente el segundo de los días de siembra, una vez había transcurrido ese tiempo, se mantuvo una presión en el sistema de 25 mm de Hg durante el resto de los días.

## • **CIRCUITO DE RECELULARIZACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR**

El conjunto del circuito del biorreactor tiene como fin posibilitar la revascularización del lóbulo derecho de la matriz extracelular hepática. Por lo que, para garantizar el buen entendimiento del sistema, es necesario explicar la función de determinados dispositivos específicos:

- Bomba peristáltica (MasterFLEX L/S modelo 7519-06).  
Aparato diseñado para el establecimiento de un caudal específico en el circuito. Conjunto de tres rodillos que describen un movimiento circular a una velocidad de giro concreta. El caudal se establece mediante la presión que los rodillos ejercen sobre un tubo flexible por el que circula el medio de cultivo de tal modo que, en función de la velocidad de giro, la presión que impulsa el líquido tendrá una determinada frecuencia y con ello, un caudal concreto.
- Regulador de presión (Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus: módulo transductor-amplificador modelo 705/1 + servo-controlador de perfusión modelo 704).  
Este dispositivo permite la regulación del flujo del medio de cultivo gracias a la transducción presión-flujo que lleva a cabo mediante una resistencia denominada puente de Wheatstone. Posteriormente mediante la acción del servo-controlador, es capaz de transmitir dicho valor de flujo a la bomba peristáltica para que perfunda en consecuencia. <sup>17-18</sup>
- Sensor de presión (Harvard Apparatus modelo APT300)  
Sensor electrónico que detecta la presión existente en un determinado punto del circuito. Comunica dicho valor al regulador para que sea interpretado, y si fuera necesario, poder ser corregido.
  - Bomba para jeringuillas (New Era Pump Systems, inc. modelo NE400)  
Dispositivo ideado para la disposición de jeringuillas. Permite inyección del contenido celular al sistema a una presión (un caudal de entrada) determinado. Estos valores se regulan en función de la velocidad de giro de los tornillos que lo conforman, de tal modo que una mayor velocidad de giro supone una mayor presión de inyección.

### Descripción del circuito:

Se trata de un circuito cerrado que establece la comunicación entre dos recipientes de vidrio de mayor volumen denominados *spinner flask*. El primero de los recipientes tiene dos entradas y contiene la matriz extracelular del hígado. La primera de las entradas conecta directamente con la vena porta descelularizada del hígado lo que permite la entrada del medio de cultivo al lóbulo derecho del hígado, mientras que, la segunda entrada actúa realmente de salida y permite la recogida del medio que se ha filtrado volviéndolo a poner en circulación. El segundo recipiente únicamente actúa de lugar de almacenamiento del medio de cultivo circulante, permitiendo el cambio del medio sin alterar el recipiente con la matriz hepática.

La siembra de las células se llevó a cabo mediante una vía adicional. Una llave de tres vías permite la apertura y la siembra a través de la zona de entrada del *spinner flask*.

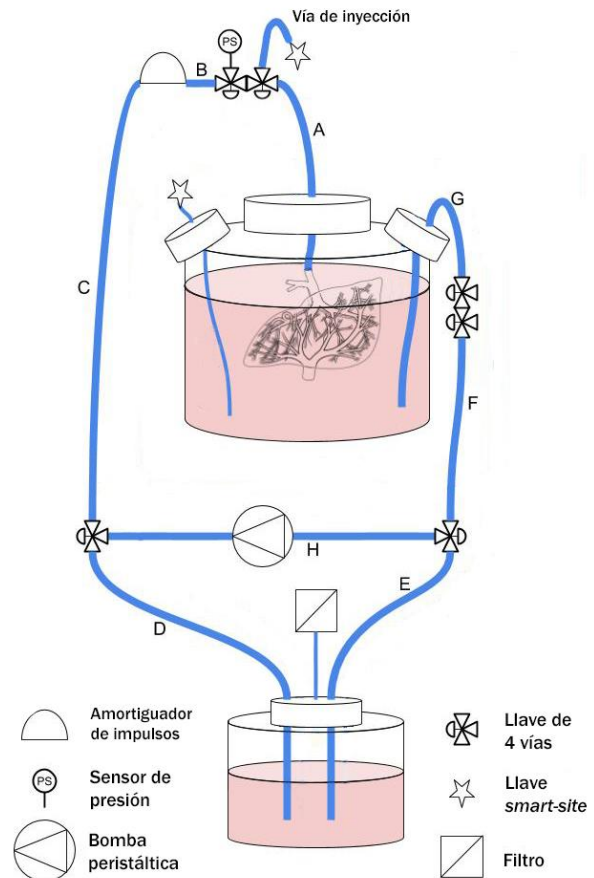


Figura 4. Representación esquemática del circuito del

## • COMBINACIÓN DE PRESIONES EN EL SISTEMA DE RECELULARIZACIÓN

El sistema del biorreactor funciona a una serie de presiones fijas. Estas presiones son diferentes según el momento del proceso en el que nos encontremos. Es por tanto fundamental que exista una regulación efectiva de la presión más aún si tenemos en cuenta que además los factores hemodinámicos como la presión intervienen de forma significativa en el proceso de angiogénesis. Para la regulación de la presión en el sistema, en un primer momento se introdujo la presión deseada en el regulador de presión, el cual la transmite a la bomba peristáltica. La bomba convierte dicho valor en el que será el caudal de entrada a la matriz. Adicionalmente, a la salida de la matriz el sensor de presión detecta la presión circulante e informa al regulador de modo que si no corresponde con la deseada ordena a la bomba peristáltica modificar el caudal para volver a ajustarse a la presión impuesta.

En los momentos de sembrado de células se utilizaron las presiones más altas a fin de garantizar una efectiva propagación de las células por toda la matriz extracelular. A su vez, como el proceso de sembrado se realizó en dos días consecutivos, en el primero de ellos se utilizó una mayor presión y en el segundo una menor.

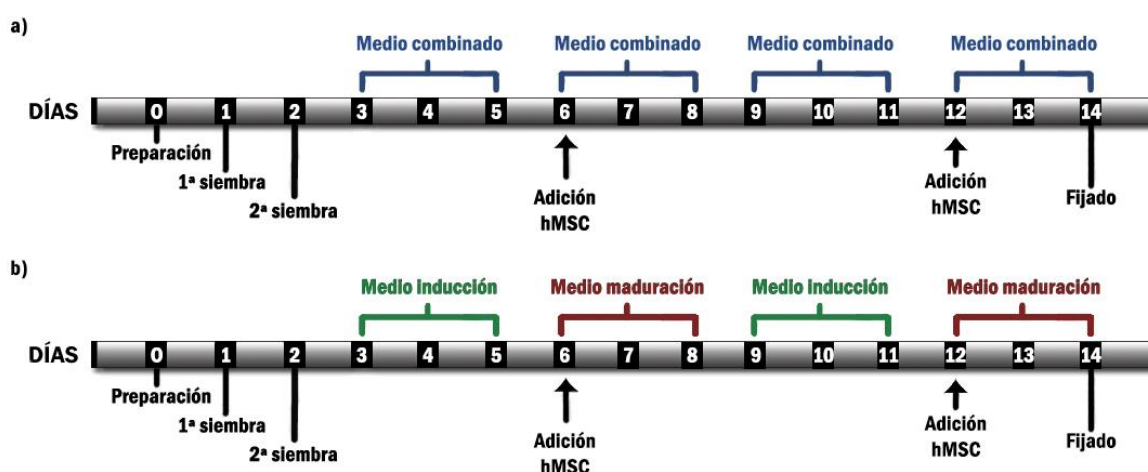
En relación a la combinación de presiones utilizada, en el momento de puesta en marcha del circuito se probaron diferentes combinaciones de presiones de sembrado (14/7 mm Hg, 25/14 mm Hg, 50 /25 mm Hg y 100/50 mm Hg). De este modo, la combinación más adecuada sería aquella

que permita una alta penetración en el tejido, pero sin llegar a dañar a la integridad del mismo. Para ello, se establecieron una serie de técnicas que permitieran medir ambos parámetros:

- La integridad celular se determinó con la realización del test de la lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo del biorreactor después de la siembra. Dicho test lleva a cabo la medición de la actividad de dicha enzima por medio de la detección por absorbancia del producto que cataliza. El interés radica en que la enzima se encuentra en el interior celular y por tanto toda aquella medición de actividad observada en el sobrenadante del biorreactor será indicativa de que ha tenido lugar rotura u stress celular.
- La penetración en el tejido se observó con marcaje fluorescente diferencial de los dos días consecutivos de sembrado. De este modo, se podía distinguir la recelularización y la penetración obtenida cada día. Posteriormente, los resultados se observaron con microscopía de fluorescencia y se diferenció además el tipo de marcaje por diámetro de vaso. Así, atendiendo a la disposición jerárquica vascular, aquel sembrado que hubiera penetrado más habría recelularizado los vasos de menor tamaño.

Finalmente, tras interpretar los datos adjuntados en el anexo como Figura 1. Se determinó que la condición óptima de presión es la de 50 mm Hg para el primer día de sembrado y de 25 mm Hg para el segundo día.

### • DESARROLLO TEMPORAL DEL SISTEMA DE RECELULARIZACIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO



**Figura 5.** Comparativa entre el eje temporal del biorreactor en ambas condiciones de cultivo. a) Biorreactor con medio combinado (medio de inducción + medio de maduración) b) Biorreactor con medio alternado (alternancia entre el medio inducción y el medio maduración cada 3 días).

En primer momento y previo al sembrado celular, se procedió a la preparación del biorreactor. Dicha preparación consistió en la conexión del circuito completo y la adición del primer medio de cultivo celular. Este medio es el llamado medio de biorreactor y permaneció durante los primeros 3 días hasta que se llevó a cabo un cambio de medio. La composición del **medio de biorreactor** fue DMEM/F12 (Sigma D8062), así como de MCBD131 (Gibco 10372019) y se encontraba suplementado con penicilina/estreptomina (Sigma P0781 1%), L-glutamina (Sigma G7513 2 mM), suero fetal bovino (Gibco 10270106 5%), insulina (Sigma I9278 5 µg/ml), transferrina (Sigma T0665 10 µg/ml), factor de crecimiento endotelial vascular A (Prepotech 100-20 50 ng/ml), factor de crecimiento epidérmico (Prepotech AF-100-15 40 ng/ml), factor de

crecimiento fibroblástico 2 (Prepotech 100-18B 40 ng/ml) y factor de crecimiento similar a insulina 1 (Prepotech 100-11R3 40 ng/ml).

El interés principal que persigue este trabajo es el de establecer la comparativa entre el sistema de recelularización que contiene los medios de inducción (de la proliferación de células vasculares) y maduración añadidos de forma alternativa cada 3 días y el sistema que únicamente contiene el medio combinado, el cual surge de la mezcla en cantidades iguales de los medios de inducción y maduración.

El **medio de inducción** estaba formado por volúmenes iguales de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F12 (Sigma D8062), así como de MCBD131 (Gibco 10372019) y se encontraba suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma P0781 1%), L-glutamina (Sigma G7513 1%), suero fetal bovino (Gibco 10270106 1%), insulina (Sigma I9278 5 µg/ml), transferrina (Sigma T0665 10 µg/ml), factor de crecimiento endotelial vascular A (Prepotech 100-20 50 ng/ml), factor de crecimiento fibroblástico 2 (Prepotech 100-18B 40 ng/ml), factor de crecimiento similar a insulina 1 (Prepotech 100-11R3 40 ng/ml) y angiopoyetina 2 (Prepotech 130-07 100 ng/ml). Paralelamente, el **medio de maduración** contenía nuevamente volúmenes iguales de Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (Sigma D8062), así como de MCBD131 (Gibco 10372019) y se encontraba suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma P0781 1%), L-glutamina (Sigma G7513 1%), suero fetal bovino (Gibco 10270106 1%), insulina (Sigma I9278 5 µg/ml), transferrina (Sigma T0665 10 µg/ml), angiopoyetina 1 (Prepotech 130-06 50 ng/ml), factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (Prepotech 100-21 0.1 ng/ml) y factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (Prepotech 100-14B 10 ng/ml).

Cabe destacar el sembrado adicional de una placa de cultivo de células hMSC los días 6 y 12 del proceso. Dicho sembrado fue de especial interés en el caso de la utilización de los medios alternativos. Su finalidad es la de favorecer el proceso de maduración vascular, el cual se produce principalmente por el reclutamiento por parte de las células endoteliales de las células murales o, nuestro caso, mesenquimales. De este modo, es en los días 6 y 12 del proceso cuando se añadió el medio que contiene los requisitos adecuados para la maduración y adicionalmente se reforzó dicha maduración con el sembrado de las células a reclutar. Dicho sembrado también se llevó a cabo con el medio combinado a fin de facilitar la comparativa entre ambas condiciones de cultivo. Por último, se procedió al fijado de la matriz extracelular hepática recelularizada. Para ello se desconectó del circuito del biorreactor, se extrajo la matriz, se conectó a través de la vena porta y se perfundió con formol durante 10 min a un flujo de 1 ml/min. Tras ello ya pudieron ser realizados los pertinentes análisis.

## • **TINCIÓN HISTOLÓGICA DE HEMATOXILINA-EOSINA**

Para la realización de la tinción se partió del lóbulo derecho recelularizado y se embebió en un bloque de parafina. Una vez formado el bloque se procedió al corte del tejido con microtomo (Thermo Scientific Microm HM 355S) en unas 50 secciones de 3-5 µm, de este modo tiñendo los cortes 1, 10, 20, 30, 40 y 50 se estudió la recelularización a lo largo del grosor del tejido.

La tinción con hematoxilina-eosina tuvo como objetivos:

- Caracterizar la viabilidad celular.
- Caracterizar la distribución celular y grado de penetración en la ECM. Porcentaje de recelularización.



- Determinar el estado del tejido recelularizado.

Su interés radica en la diferente capacidad de tinción específica que llevan a cabo ambos colorantes. La hematoxilina consiste en un colorante de naturaleza catiónica o básica que es capaz de llevar a cabo la tinción en tonos púrpuras de los núcleos celulares, mientras que la eosina es un colorante aniónico o básico que lleva a cabo la tinción de los citoplasmas celulares.

El protocolo de tinción comenzó con la aplicación de xilol durante 10 min. El xilol es sustancia alcohólica que permite el lavado de los excesos de parafina en la que se encontraba embebida la muestra. Tras ello se procedió al lavado progresivo de la muestra en concentraciones decrecientes de alcohol etílico 100%, 96% y 70% que tienen como objetivo permitir una cierta rehidratación de la muestra. Posteriormente, se procedió a la tinción con hematoxilina, la cual fue previamente filtrada para evitar la deposición de cristales de colorante que pudieran ensuciar la muestra. Dicho colorante se dejó actuar 5 min para luego, tras el lavado con agua y agua amoniacal, proceder a la tinción con eosina. Esta tinción se dejó reposar durante unos 45 segundos. Por último, se procedió ya a la deshidratación de la muestra, para ello se llevó a cabo el proceso inverso del realizado anteriormente con el alcohol etílico pasando por concentraciones crecientes de 70%, 96% y 100% y concluyendo con el sumergimiento durante 10 min en xilol. Una vez conseguida la completa deshidratación se procedió al montaje del portaobjetos para lo que se aplicó el medio de montaje, se colocó el cubreobjetos y se selló el montaje.

Una vez realizada la tinción se procedió a la observación bajo microscopio del resultado obtenido y a la toma de imágenes. Concretamente a fin de garantizar el correcto visualizado de la sección completa de matriz extracelular recelularizada, se realizó una MIA (Multiple Image Alignment) que consiste en llevar a cabo una serie de sucesivas fotos de alta calidad que recorran la totalidad de la sección teñida, para posteriormente proceder al alineamiento de las fotos individuales y recrear la sección completa teñida.

## • ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA

La realización de la inmunofluorescencia requirió del uso de anticuerpos que reconocieran específicamente las proteínas de las líneas celulares sembradas CD31 y vimentina (las funciones y especificidad se encuentran explicadas en el Anexo), así como de anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos que reconocieran a los primeros y permitieran la detección fluorescente. De este modo el anticuerpo primario anti-CD31 permitió el marcaje de las células hUVEC y fue detectado como fluorescencia verde (Alexa Fluor 488), mientras que el anticuerpo anti-vimentina permitió el marcaje de las células hMSC y se corresponde con la fluorescencia roja (Alexa Fluor 568). Adicionalmente, se utiliza el colorante DAPI que tiñe de color azul los núcleos celulares y permitió la localización de éstos.

Para la realización de la técnica se hace también uso tanto de un control positivo como un control negativo. El control negativo consiste en la adición a la muestra de la solución de bloqueo *Sea block serum free PBS* (ab166955 Abcam) sin adición de anticuerpo primario.

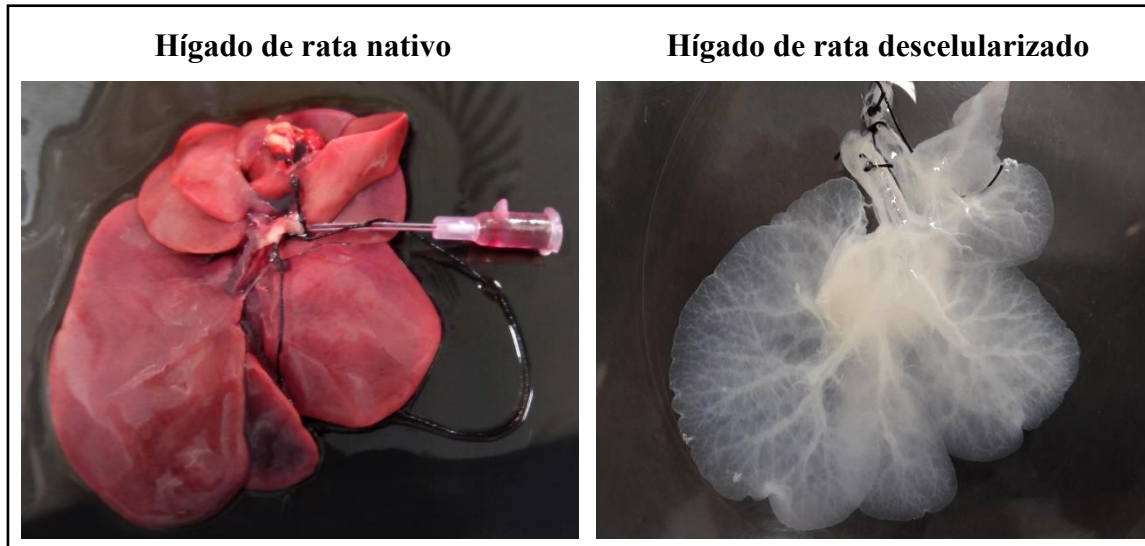
El protocolo de inmunofluorescencia comenzó en primer lugar con la desparafinación de la muestra. La recuperación del antígeno se llevó a cabo mediante la aplicación de la solución de recuperación Dako Target Retrieval Solution 10x (S1699 Dako) a 98°C. Posteriormente, para reducir la autofluorescencia se aplicó borohidruro de sodio diluido en PBS al 1%. La muestra se

bloqueó durante una hora en cámara húmeda con la solución comercial *Sea block serum free PBS* (ab166955 Abcam) con un 10% de saponina. Se añadieron los anticuerpos primarios correspondientes, anticuerpo de ratón anti-CD31 (MAD-002048 Máster Diagnostica) y anticuerpo de conejo anti-vimentina (MAD-000326QD Máster Diagnostica), y se dejaron actuar toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, tras el lavado con tampón Tris salino, se aplicaron los anticuerpos secundarios de origen caprino, anticuerpo anti-IgG de ratón AF488 (Molecular Probes A11029) y anti-IgG de conejo AF568 (Molecular Probes A11036). Finalmente, tras el lavado de la muestra se procedió a la aplicación del medio de montaje junto con el colorante nuclear DAPI y se almacenaron las muestras a -30°C.

El análisis fluorescente se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio de fluorescencia con filtros para diferentes fluoróforos de óptica invertida con lámpara de metal-haluro (Olympus IX81) así como del software Cell^D. Se analizaron de forma independiente cada una de las longitudes de onda de fluorescencia de marcaje para posteriormente, fusionar las diferentes fluorescencias en una sola imagen que se denomina *merge*. El grosor de los vasos observados se determinó con una escala métrica aportada por el software que permite la medición del diámetro de la luz de éstos. Se analizó una sola sección representativa y sobre esta se tomaron 5 fotos de diferentes zonas, registrando después que tipo de células tapizaban (hUVEC, hMSC o ambas) los vasos de distintos diámetros que se agruparon en tres grupos: <40µm, 40-100µm y >100µm.

## RESULTADOS

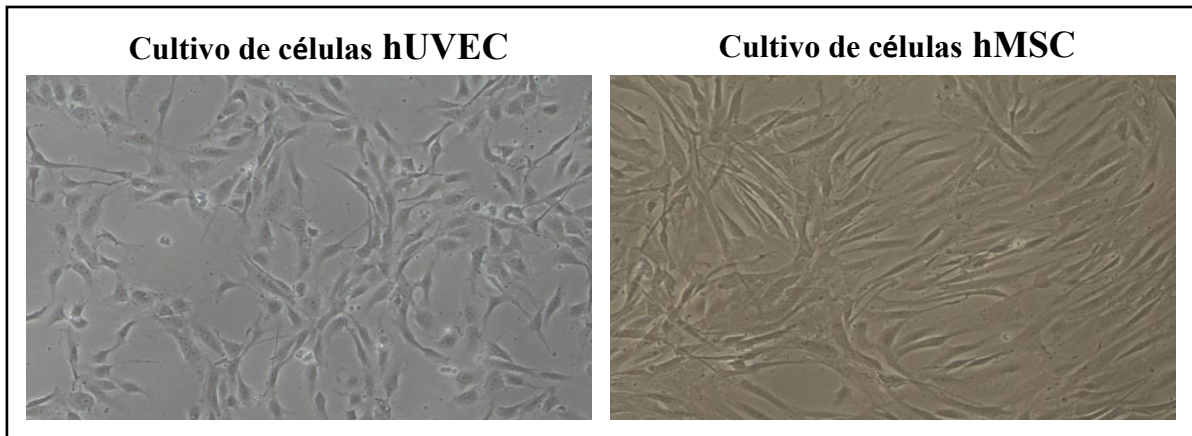
### • PROCESO DE DESCELULARIZACIÓN HEPÁTICA



**Figura 6.** Comparativa entre hígado de *Rattus norvegicus* en estado nativo y el hígado tras haber sufrido el proceso completo de descelularización. Tras la descelularización se puede apreciar sobre la matriz extracelular los conductos que bordean al que era el árbol vascular anterior.

Una vez terminado el proceso de descelularización hepática, se puede observar el mantenimiento de las estructuras vasculares de mayor tamaño en el andamiaje bien como su arquitectura nativa (Figura 6). El aspecto final del hígado acelular es casi transparente. Cuando analizado por histología y tinción de H&E normalmente se observa la ECM sin componentes celulares (datos no presentados).

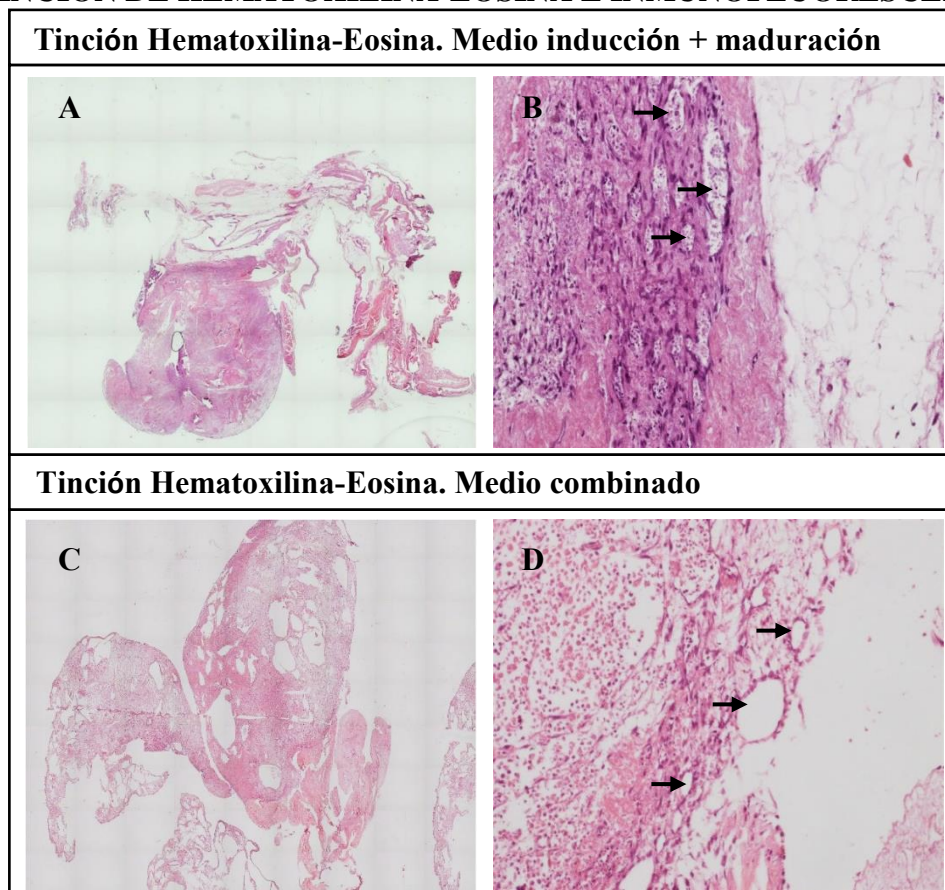
- **CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES hMSC y hUVEC**



**Figura 7.** Comparación del cultivo de las líneas celulares hUVEC y hMSC. Fotos con microscopio óptico invertido a 10 aumentos.

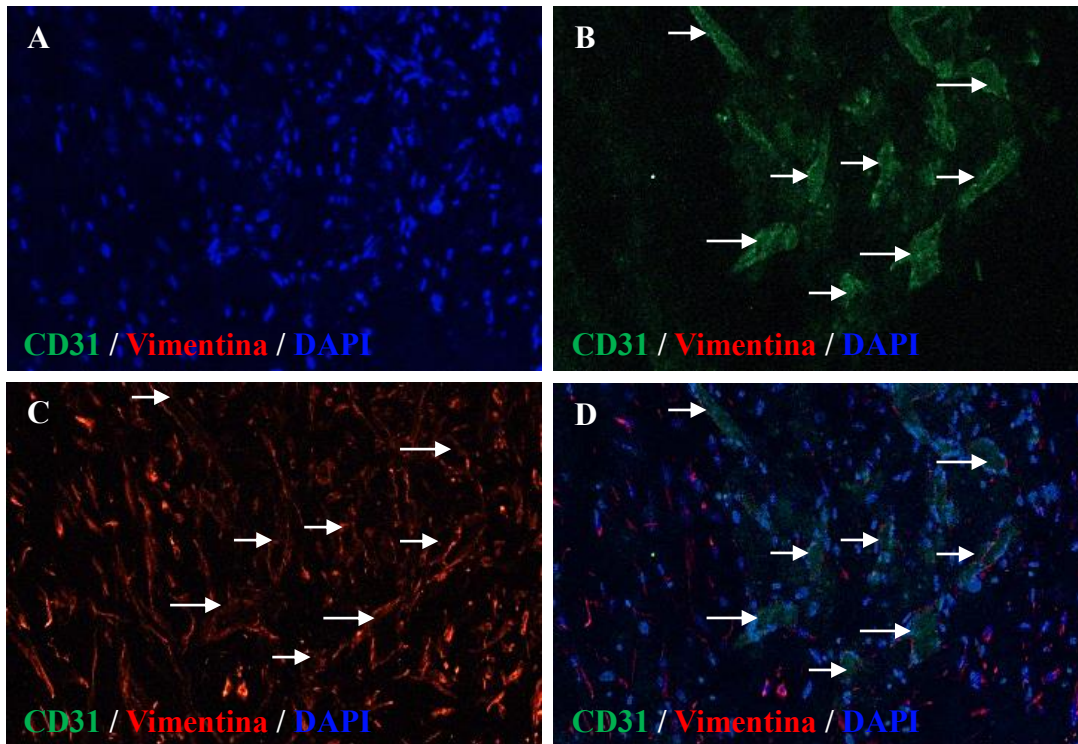
Las líneas celulares expandidas para la siembra del biorreactor (Figura 7), presentaran durante todo su cultivo el fenotipo usual de células endoteliales y mesenquimales, respectivamente. Las hUVEC cuando confluentes presentan capas celulares como un empedrado, en cuanto las hMSC se presentan muchas más alargadas y dispuestas de una forma direccional.

- **TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA E INMUNOFLUORESCENCIA**



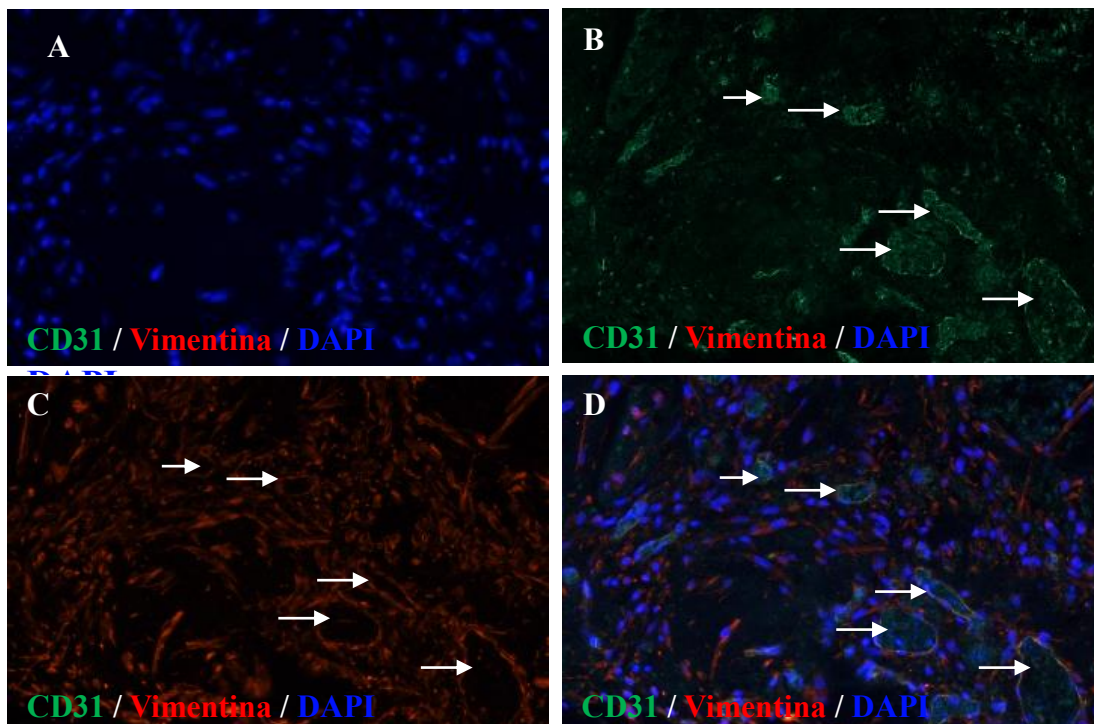
**Figura 8.** Fotos de la tinción histológica de Hematoxilina-Eosina llevada a cabo sobre la ECM recelularizada con condición de medios alternados (fotos A y B) y de la ECM con condición de medio combinado (fotos C y D). Fotos A y C correspondientes a la técnica de fotografía MIA (*Multiple Image Alignment*) compuesta por la suma de 36 fotos alineadas. Fotos B y D correspondientes a la visualización con microscopio óptico a 10 aumentos. Señalización mediante flechas de estructuras que se asemejan a vasos sanguíneos.

### Inmunofluorescencia medio inducción + maduración



**Figura 9.** Fotografías tomadas en microscopio invertido de fluorescencia del inmunomarcaje realizado a la ECM en condición de medio alternado. A: canal de fluorescencia azul, B: canal de fluorescencia verde, C: canal de fluorescencia roja y D: combinación de las fluorescencias individuales. Las flechas señalan la formación de vasos.

### Inmunofluorescencia medio combinado

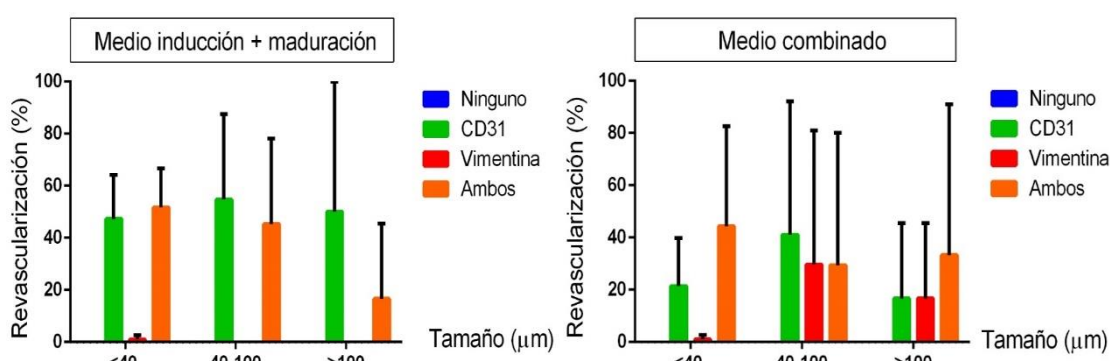


**Figura 10.** Fotografías tomadas en microscopio invertido de fluorescencia del inmunomarcaje realizado a la ECM en condición de medio combinado. A: canal de fluorescencia azul, B: canal de fluorescencia verde, C: canal de fluorescencia roja y D: combinación de las fluorescencias individuales. Las flechas señalan la formación de vasos.

## • INTEGRACIÓN DE LOS DATOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

El objetivo de diferenciar la recelularización en función del diámetro de vaso no fue otro sino el de caracterizar el grado de efectividad y penetración que ha tenido la siembra de ambas líneas celulares. No obstante, al tratarse el árbol vascular de una red jerárquica de vasos de mayor y menor calibre el interés residió en conseguir la revascularización por igual de todos los diferentes diámetros existentes.

Los datos resultantes del análisis por inmunofluorescencia fueron recogidos en tablas. De entre ambas condiciones de cultivo que se querían comparar (medio alternado y medio combinado), se consiguieron hacer 3 réplicas/biorreactores de cada condición por lo que se procedió a hacer la media numérica de los datos para cada condición. Una vez se obtuvieron dichos valores se procedió a la obtención de los porcentajes de recelularización para cada uno de los diámetros registrados distinguiendo entre recelularización con ambas líneas celulares, con sólo hMSC, con sólo hUVEC o con ninguna de ambas líneas. Estos datos aparecen reflejados en la Figura 11.



**Figura 11.** Gráficas representativas de la vascularización hepática observada con inmunofluorescencia. A: valor promedio de las 3 réplicas realizadas con condición de medio alternado. B: valor promedio de las 3 réplicas realizadas con condición de medio combinado. CD31 corresponde con la presencia de células hUVEC, Vimentina corresponde con la presencia de células hMSC. Diferenciación por diámetro de vaso observado: <40 µm vaso pequeño, 40-100 µm vaso intermedio y >100 µm vaso grande.

## • INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS DATOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

La representación gráfica fruto de la integración de los resultados de la inmunofluorescencia permitió la observación de tendencias en la recelularización vista entre ambas condiciones de cultivo. Sin embargo, además de ello fue necesario el análisis a nivel estadístico a fin de obtener conclusiones más consistentes. Para ello, se contó con la ayuda de una bioestadista que analizó las diferencias a nivel estadístico en la recelularización con ambos medios.

Con respecto a la interpretación estadística de los datos, para el nivel de confianza del 99.9% si el  $p\text{-valor} > 0.001$  la hipótesis inicial de que ambos medios actúan por igual será estadísticamente cierta, mientras que si  $p\text{-valor} < 0.001$  la hipótesis será falsa y existirán diferencias entre ambos medios de cultivo en la recelularización.

- En términos de calibre (Tabla 2) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el calibre de las células que cada uno de los medios es capaz de revascularizar ( $p\text{-valor}$

= 0.233). Destaca que el 72.3% de las células que se revascularizan con medio combinado y el 70.2% de las que se revascularizan con medio alternado son de calibre <40 µm.

- En términos de tipo celular (Tabla 3) sí se observaron diferencias estadísticamente significativas (p-valor<0,001) entre los tipos de células que cada medio es capaz de revascularizar. Estando el 66.8% de las células del medio combinado recelularizado con ambas líneas celulares frente al 52.4% del medio alternado.
- En términos de calibre y tipo celular (Tablas 4, 5 y 6). Para calibre <40 µm no se observaron diferencias entre los dos medios en cuanto al tipo de células que revascularizan la matriz (p-valor=0.190). Para el calibre 40-100 µm sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas para cada medio (p-valor<0.001) siendo el porcentaje de recelularización con ambas líneas celulares en el caso del medio combinado del 69.8% y en el caso del medio alternado del 47.2%. Finalmente, para el calibre >100 µm no se apreciaron diferencias entre los dos medios en (p-valor=0.151).

| En términos de calibre |           | MEDIO DE CULTIVO                   |           | Total  |        |
|------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|--------|--------|
|                        |           | COMBINADO                          | ALTERNADO |        |        |
| CALIBRE                | <40 µm    | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 146       | 146    | 292    |
|                        |           |                                    | 72.3%     | 70.2%  | 71.2%  |
|                        | 40-100 µm | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 53        | 53     | 106    |
|                        |           |                                    | 26.2%     | 25.5%  | 25.9%  |
|                        | >100 µm   | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 3         | 9      | 12     |
|                        |           |                                    | 1.5%      | 4.3%   | 2.9%   |
| Total                  |           | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 202       | 208    | 410    |
|                        |           |                                    | 100.0%    | 100.0% | 100.0% |

**Tabla 2.** Comparación entre el diámetro de vaso revascularizado debido al uso del medio combinado y del medio alternado representado en forma de porcentajes producidos por cada medio individual.

| En términos de tipo celular |           | MEDIO DE CULTIVO                   |           | Total  |        |
|-----------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|--------|--------|
|                             |           | COMBINADO                          | ALTERNADO |        |        |
| TIPO                        | CD31      | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 56        | 97     | 153    |
|                             |           |                                    | 27.7%     | 46.6%  | 37.3%  |
|                             | VIMENTINA | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 11        | 2      | 13     |
|                             |           |                                    | 5.4%      | 1.0%   | 3.2%   |
|                             | AMBAS     | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 135       | 109    | 244    |
|                             |           |                                    | 66.8%     | 52.4%  | 59.5%  |
| Total                       |           | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 202       | 208    | 410    |
|                             |           |                                    | 100.0%    | 100.0% | 100.0% |

**Tabla 3.** Comparación entre el tipo celular observado con el medio combinado y el alternado representado en forma de porcentajes producidos por cada medio individual. Los datos marcados en amarillo son los estadísticamente significativos.

| En términos de calibre y tipo celular |           |                                    |           |        |        |  |
|---------------------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|--------|--------|--|
| Calibre <40 µm                        |           | MEDIO DE CULTIVO                   |           | Total  |        |  |
|                                       |           | COMBINADO                          | ALTERNADO |        |        |  |
| TIPO                                  | CD31      | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 47        | 62     | 109    |  |
|                                       |           |                                    | 32.2%     | 42.5%  | 37.3%  |  |
|                                       | VIMENTINA | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 2         | 2      | 4      |  |
|                                       |           |                                    | 1.4%      | 1.4%   | 1.4%   |  |
|                                       | AMBAS     | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 97        | 82     | 179    |  |
|                                       |           |                                    | 66.4%     | 56.2%  | 61.3%  |  |
| Total                                 |           | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 146       | 146    | 292    |  |
|                                       |           |                                    | 100.0%    | 100.0% | 100.0% |  |
| Calibre 40-100 µm                     |           | MEDIO DE CULTIVO                   |           | Total  |        |  |
|                                       |           | COMBINADO                          | ALTERNADO |        |        |  |
| TIPO                                  | CD31      | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 8         | 28     | 36     |  |
|                                       |           |                                    | 15.1%     | 52.8%  | 34.0%  |  |
|                                       | VIMENTINA | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 8         | 0      | 8      |  |
|                                       |           |                                    | 15.1%     | 0.0%   | 7.5%   |  |
|                                       | AMBAS     | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 37        | 25     | 62     |  |
|                                       |           |                                    | 69.8%     | 47.2%  | 58.5%  |  |
| Total                                 |           | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 53        | 53     | 106    |  |
|                                       |           |                                    | 100.0%    | 100.0% | 100.0% |  |

| Calibre >100 µm |           | MEDIO DE CULTIVO                   |           | Total  |        |
|-----------------|-----------|------------------------------------|-----------|--------|--------|
|                 |           | COMBINADO                          | ALTERNADO |        |        |
| TIPO            | CD31      | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 1         | 7      | 8      |
|                 |           |                                    | 33.3%     | 77.8%  | 66.7%  |
|                 | VIMENTINA | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 1         | 0      | 1      |
|                 |           |                                    | 33.3%     | 0.0%   | 8.3%   |
|                 | AMBAS     | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 1         | 2      | 3      |
|                 |           |                                    | 33.3%     | 22.2%  | 25.0%  |
| Total           |           | Recuento % dentro de TIPO DE MEDIO | 3         | 9      | 12     |
|                 |           |                                    | 100.0%    | 100.0% | 100.0% |

**Tablas 4, 5 y 6.** Tablas resultantes de la integración de datos de inmunofluorescencia. Se diferencia el tipo celular que ha producido revascularización por cada diámetro de vaso registrado y por condición de medio de cultivo bajo la cual ha ocurrido la recelularización. Los datos marcados en amarillo son los obtenidos como estadísticamente significativos que serán mencionados en el apartado siguiente.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El desarrollo de técnicas efectivas de revascularización de andamiajes acelulares de hígado es un paso vital para la traslación de hígados de bioingeniería a la clínica. Como tal, este proyecto se ve revestido de particular importancia por su potencial terapéutico futuro.

Así, analizando los resultados obtenidos utilizando dos condiciones distintas de revascularización de andamiajes hepáticos (dos medios distintos) se percibe que los factores de crecimiento utilizados en cada momento, pueden ser críticos en el control del comportamiento celular.

Estas diferencias no son observables con una simple tinción de H&E (Figura 8). Aun así, se puede observar que en ambas condiciones de cultivo observamos una adecuada penetración y distribución celular, así como la formación de algún vaso primigenio.

En relación con los resultados observados en el marcaje de inmunofluorescencia y atendiendo a la comparativa entre la Figura 9 y Figura 10, vimos que la utilización del medio combinado favoreció la presencia de vasos sanguíneos más definidos y en un estado de diferenciación aparentemente mayor que los observados con el medio alternado. Esta afirmación se sustenta en que en la vascularización, tal como se ha explicado en el apartado de la introducción “proceso de desarrollo vascular”, la formación de vasos comienza con un agrupamiento de células endoteliales (hUVEC) y pericitos (hMSC) que posteriormente, conforme avanza la diferenciación del vaso, se convierte en una estructura más definida constituida por el tapizado de células endoteliales y la capa exterior de pericitos. Es precisamente esto lo que se vio corroborado con el uso del medio combinado puesto que se aprecia un perímetro de vaso más perfilado con células endoteliales y un agrupamiento de células menos indefinido (Figura 10).

En referencia a los datos obtenidos de las inmunofluorescencia y la integración de éstos, cabe destacar que el interés reside en lograr no sólo la recelularización de los conductos de la matriz extracelular sino también llevarla a cabo con la presencia de ambas líneas celulares, puesto que es necesaria la presencia de ambas para correcta vascularización. Dicho esto, atendiendo a los resultados obtenidos en las gráficas recogidas en la Figura 11, pueden observarse ciertas tendencias:

- Por un lado, vimos como en el caso del medio combinado la recelularización observada en los vasos de tamaño intermedio y grande pudo ser debida tanto a la presencia de células hUVEC, hMSC o la combinación de ambas. No obstante, ninguna de ellas se encontró en una clara predominancia en el porcentaje de recelularización que representan frente al resto. Mientras que, para el medio alternado la recelularización observada fue principalmente debida a las células hUVEC o a la combinación de ambas, pero no a la presencia individual de células hMSC.
- Por otro lado, atendiendo a la tendencia observada en la recelularización con ambas líneas a lo largo de los diferentes diámetros recogidos, cabe apreciar que en el caso del medio alternado se observó una ligera tendencia decreciente en el porcentaje de recelularización obtenido conforme la luz del vaso aumenta, mientras que para la condición de medio combinado dicha tendencia no existió e independientemente del diámetro de vaso observado el porcentaje de recelularización se mantuvo en torno a unos valores fijos. Esto a priori puede

indicar una mayor reproducibilidad en el tipo de recelularización observada entre los diferentes tamaños de vasos.

- Finalmente, el análisis estadístico ha revelado algunas diferencias significativas entre las dos condiciones. Una de ellas, es que 66.8% de los vasos en los hígados revascularizados con el medio combinado estaban recelularizados con ambas líneas celulares frente al 52.4% del medio alternado ( $p$ -valor $<0,001$ ). Además, para el calibre 40-100  $\mu\text{m}$  se observaron diferencias estadísticamente significativas para cada medio ( $p$ -valor $<0,001$ ) siendo el porcentaje de recelularización con ambas líneas celulares en el caso del medio combinado del 69.8% y en el caso del medio alternado del 47.2%.

## CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados presentados, se puede concluir que a priori el medio combinado, que surge de la unión simultánea de medio de inducción y medio de maduración, es el más favorable a la hora de llevar a cabo la revascularización hepática. Dicha conclusión se sustenta en la mayor diferenciación vascular observada en las fotos de inmunofluorescencia, en la mayor capacidad del medio para recelularizar la matriz extracelular con ambas líneas celulares, tanto independientemente del calibre como específicamente para el calibre entre 40-100  $\mu\text{m}$ , y en el hecho de no presentar la tendencia decreciente observada en la Figura 11 que sugiere menor capacidad de recelularización con ambas líneas conforme aumenta el diámetro del vaso sanguíneo. No obstante, a nivel general cabe destacar que la comparativa establecida habría sido más consistente en caso de tener un mayor número de réplicas de biorreactores para cada una de las condiciones probadas, más aún si tenemos en cuenta que una de las réplicas con medio combinado no fue del todo exitosa. Sin embargo, debido a la complejidad del proceso y al tiempo que conlleva completar la recelularización de cada réplica, no fue posible hacerlo.

Finalmente, creemos que las implicaciones de este estudio son importantes en el avance de las tecnologías disponibles para la revascularización de hígados descellularizados, un paso crítico para hacer el trasplante de hígados de bioingeniería una realidad.

Once the results presented have been analyzed, it can be concluded that a priori the combined medium, which arises from the simultaneous union of induction medium and maturation medium, is the most favorable at the time of carrying out hepatic revascularization. That conclusion is supported by the more vasculature differentiation ability showed by combined medium, by the better results with both cells lines in percent recellularization, regardless of vessel diameter, and by the inexistence of the decreasing tendency observed and mentioned on Figure 11. Nevertheless, it should be noted that for a consistent comparison and conclusion it should have been a greater number of replicas with both tested mediums. However, due to complexity and complete process duration it was impossible to achieve it.

Finally, we believe that the implications of this study are important in advancing the available technologies for the revascularization of decellularized livers, a critical step in making bioengineered liver transplantation a reality.



## FUTUROS OBJETIVOS

Como planes a realizar a corto plazo, se encuentra el test funcional de la vasculatura generada en el andamiaje. Para esto, se usará entre otras cosas la perfusión de bradiquinina a los biorreactores una vez ha concluido la recelularización. Si bien es cierto que esta técnica ya ha sido probada en algunos biorreactores previamente realizados, todavía no ha sido usada de forma global en los biorreactores aquí presentados. El objetivo de esta perfusión consiste en comprobar si a nivel endotelial sucede la liberación de prostaciclina y de óxido nítrico (NO) que tiene lugar con la recepción de la bradiquinina. Estas sustancias son de carácter vasodilatador y anticoagulante y tienen especial importancia en la respuesta al ambiente que ocurre a nivel fisiológico en los vasos sanguíneos, por lo que la medición de la capacidad de respuesta de las células endoteliales sembradas nos permitiría determinar en cierto modo el grado de funcionalidad que presenta la matriz revascularizada que hemos generado.

Asimismo, una vez tenemos optimizado el proceso de recelularización de matriz de rata (descelularización, medio de cultivo, biorreactor y combinación de presiones) el objetivo a largo plazo es el de extrapolar dicha técnica a la matriz extracelular porcina. Dicho paso es de especial interés por la mayor similitud de este órgano con el humano, así como por los retos que supone conseguirlo (mayor tamaño de matriz, expansión celular en muy grandes cantidades...). Precisamente, para poder conseguirlo se está poniendo en marcha una técnica adecuada de cultivo celular en 3 dimensiones para poder abarcar las cantidades celulares que serán requeridas. Por último, el objetivo final es el de, una vez obtenidos las matrices porcinas recelularizadas, poder llevar a cabo trasplantes hepáticos porcinos en los que poder analizar la funcionalidad del árbol vascular generado.

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Dhal A, Vyas D, Moran EC, Deegan DB, Soker S, Baptista PM. Translational Regenerative Medicine-Hepatic Systems [Internet]. Translational Regenerative Medicine. Elsevier Inc.; 2014. 469–484 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00034-7>
2. Ferreira Meirelles Júnior R, Salvalaggio P, De Rezende MB, Evangelista AS, Della Guardia B, Matiello CEL, et al. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. Einstein (Sao Paulo). 2015;13(1):149–52.
3. Farkas S, Hackl C, Schlitt HJ üрге. Overview of the indications and contraindications for liver transplantation. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4(5):1–13.
4. Neuberger J. An update on liver transplantation: A critical review. J Autoimmun [Internet]. 2016; 66:51–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.021>
5. Orman ES, Mayorga ME, Wheeler SB, Townsley RM, Toro-diaz HH, Hayashi PH, et al. Declining Liver Graft Quality Threatens the Future of Liver Transplantation in the United States. 2015;1040–50.
6. Kim WR, Therneau TM, Benson JT, Kremers WK, Rosen CB, Gores GJ, et al. Deaths on the Liver Transplant Waiting List: 2002;345–51.

7. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J Hepatol* [Internet]. 2013;58(3):593–608. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.005>
8. Pellegata AF, Tedeschi AM, De Coppi P. Whole organ tissue vascularization: Engineering the tree to develop the fruits. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6(MAY):1–13.
9. Moran E, Dhal A, Vyas D, Lanas A, Soker S, Baptista PM. Whole-Organ Bioengineering-Current Tales of Modern Alchemy. *Transl Regen Med to Clin* [Internet]. 2015;31–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2014.01.004>
10. Associate SY, Yoo S. Expert Opinion on Therapeutic Patents 3D-printed biological organs: medical potential and patenting opportunity 3D-printed biological organs: medical potential and patenting opportunity. 2015;25(5):507-511.
11. Traore MA, George SC. Tissue Engineering the Vascular Tree. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2017;23(6):505–14.
12. Caplan AI. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *J Orthop Res*. 2017;35(6):1151–9.
13. Chen WCW, Péault B, Huard J. Regenerative Translation of Human Blood-Vessel-Derived MSC Precursors. 2015;2015.
14. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101–9.
15. Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming Growth Factors  $\beta 1$  and  $\alpha$  in chronic liver disease. *The New England Journal of Medicine*. 1991;324(14):933-40.
16. Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest*. 2012;122(6):1991–2005.
17. Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus [Website]. March-Hugstetten (Germany). Servo Controller for Perfusion (SCP) Type 704, 73-2806. Available from: <https://www.hugo-sachs.de/index.php/amplifiers-transducers/amplifiers/plugsys-modular-measuring-control-system/plugsys-modules/perfusion-control/servo-controller-for-perfusion-scp-type-704-73-2806.html>
18. Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus [Website]. March-Hugstetten (Germany). Transducer amplifier Module (TAM-A) 73-0065. Available from: <https://www.hugo-sachs.de/index.php/amplifiers-transducers/amplifiers/plugsys-modular-measuring-control-system/plugsys-modules/pressure-force-amplification/transducer-amplifier-module-tam-a.html>
19. Vanchinathan V, Mizramani N, Kantipudi R, Schwartz EJ, Sundram UN. The vascular marker CD31 also highlights histiocytes and histiocyte-like cells within cutaneous tumors. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(2):177–85.
20. Tomiyama L, Kamino H, Fukamachi H, Urano T. Precise epitope determination of the anti-vimentin monoclonal antibody V9. *Mol Med Rep*. 2017;16(4):3917–21.

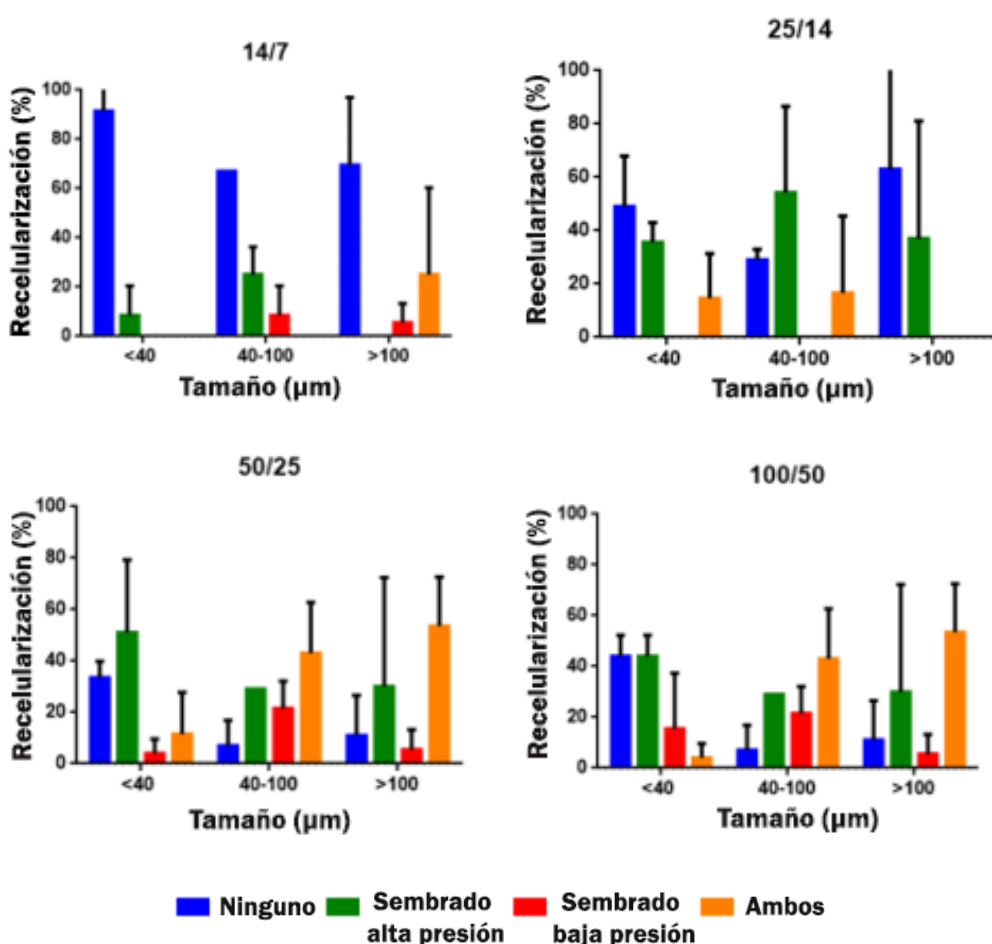
## ANEXOS

### CD31 o PECAM-1

Glicoproteína de adhesión expresada por las células endoteliales que interviene en la angiogénesis y mantenimiento de la integridad vascular [18].

### Vimentina

Filamento intermedio de tipo III presente en la superficie de las células de tipo mesenquimal. Interviene en la señalización, adhesión y migración celular [19].



**Figura 1.** Gráficas comparativas de la efectividad y tipo de recelularización entre las diferentes combinación de presiones probadas. Diferenciación entre células observadas: ningún tipo de célula, células procedentes del primer sembrado a alta presión, células procedentes del segundo sembrado a baja presión y células procedentes de ambos sembrados. Diferenciación por tipo de vaso recelularizado: <40 µm vaso pequeño, 40-100 µm vaso intermedio y >100 µm vaso grande. Cálculo del porcentaje de recelularización con cada tipo de células para cada uno de los diámetros de vaso.