

## PREMIO ALFREDO SÁNCHEZ MARROQUÍN CATEGORÍA MAESTRÍA

### Ingeniería de tejidos vasculares: una mirada hacia el diseño, retos y logros de la vascularización artificial

Daniel Santillán, Paul Mondragón\*

*Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" – ISSSTE, San Lorenzo 503, Col. Del Valle, Benito Juárez, Ciudad de México CP 03100, México.*

*Correo electrónico: [p.mondragonteran@gmail.com](mailto:p.mondragonteran@gmail.com)*

#### RESUMEN

La ingeniería de tejidos vasculares tiene el principal reto de realizar constructos o equivalentes tisulares que sustituyan vasos sanguíneos de manera segura, así como investigar la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes (angiogénesis) y mimetizar *In vitro* el proceso de vasculogénesis llevado a cabo durante el desarrollo embrionario. En la presente revisión, mostramos la importancia de la ingeniería de tejidos vasculares, los recursos de células troncales, biomateriales, retos y alcances que posee la ingeniería de tejidos ante la generación y regeneración vascular *In vitro* e *In vivo* en la búsqueda de nuevas alternativas para cubrir las necesidades clínicas de terapia isquémica.

**Palabras clave:** Ingeniería de Tejidos, Tubulogénesis, Cultivo tridimensional, Célula endotelial, vascularización.

#### ABSTRACT

Vascular Tissue Engineering nowadays has the goal to develop tissue equivalent constructs for the substitution or replace of blood vessel in a safe way. Vascular Tissue Engineering allows the culture of progenitor endothelial cells as an *In vitro* recapitulation of blood vessel formation during embryo development. In this review, we show the importance of vascular tissue engineering, the stem cells resources, biomaterials, challenges and scopes that tissue engineering has in the area of vascular generation and regeneration *in vitro* and *in vivo* in the search for new alternatives for cover the clinical needs of ischemic therapy.

**Keywords:** Tissue Engineering, Tubulogenesis, Tridimensional Culture, Endothelial Cell, Vascularization.

## 1. Ingeniería de Tejidos

El concepto de ingeniería de tejidos (I.T) fue acuñado en la primavera de 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias de Medicina Humana en Estados Unidos de América (Falke & Atala, 2000). La I.T se enriquece y se ha desarrollado con un enfoque multidisciplinario como es la biología celular y molecular en conjunto con otras ramas de las ciencias, entre ellas: la química, física, ingeniería, computación entre otras, han hecho posible una nueva era de la medicina moderna al ofrecer nuevas opciones terapéuticas (Chang & Niklason, 2017). Langer & Vacanti (1993) plantearon que la I.T se encuentra orientada al desarrollo de sustitutos biológicos o equivalentes tisulares que permitan mantener, mejorar o restaurar las funciones normales de tejidos u órganos dañados por enfermedades degenerativas, infecciosas o de alguna otra etiología. La I.T como todas las áreas nuevas del conocimiento tienen numerosas fuentes de oportunidad y futuros prometedores, en el área de la medicina reconstructiva y trasplantes ya que precisamente estas áreas de la medicina registran baja disponibilidad de tejidos obtenidos por donación (Falke, 2001). Para ello la I.T hace uso de 3 factores principales: 1. Células troncales (diferenciadas o indiferenciadas), 2. Factores de señalización (crecimiento y/o diferenciación) y 3. Biomateriales. Existiendo notables reportes en los cultivos de células de piel, hueso, córnea, vasos sanguíneos,

hígado, músculo, y tejido nervioso (Arvelo, 2007). Cabe mencionar que no todos los tejidos son diseñados de la misma manera, existiendo grandes retos de representación artificial en el siguiente orden: tejidos bidimensionales (córnea, piel) tejidos tubulares (uretra, esófago, venas, arterias), órganos viscosos (vagina, vejiga) y órganos complejos (hígado, tejido cardíaco, etc.) (Atala et al., 2012). La ingeniería de tejidos vasculares es un campo de conocimientos en expansión enfocado al desarrollo de la biología vascular, ofreciendo nuevas y amplias opciones de terapia en retinopatía diabética, artritis reumatoide, soriasis y en progresiones malignas como es la diseminación metastásica del cáncer (Deroanne et al., 2001). La vascularización *In vitro* asume una importancia igual que la vascularización *In vivo* brindando condiciones adecuadas a la viabilidad celular durante el crecimiento del tejido, inducir una organización estructural y promover la vascularización tras la implantación (Levenberg, 2005), por otro lado ayudará a determinar genes y rutas metabólicas involucradas para la revascularización de un tejido u órgano dañado.

## 2. Vasos Sanguíneos

Los vasos sanguíneos son conductos que proveen a los tejidos y órganos el suministro de oxígeno y nutrientes, siendo el sistema cardiovascular el primero en formarse durante el desarrollo embrionario en los

vertebrados (Caiado & Días, 2012). Existen dos mecanismos para la formación de vasos sanguíneos: vasculogénesis, la formación de vasos sanguíneos por progenitores endoteliales, y angiogénesis, la ramificación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (Koroleva et al., 2016). Durante la formación de vasos sanguíneos existe una modulación de diferentes factores de crecimiento y diferenciación celular entre los que se encuentran: factor de crecimiento hepático (HGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína 1 quimiotáctica de monocitos MCP1 y esfingosina 1 fosfato (S1P) (Miya et al., 2011; Nguyen et al., 2013). Existen otros factores biofísicos como es la tensión de oxígeno y las propiedades hidrodinámicas que tienen la capacidad de encender otros genes que favorecen el proceso de angiogénesis como es la proteína heterodimérica HIF-1, la cual se ha descrito en la formación y generación de un patrón y maduración vascular (Jain, 2003).

Los vasos sanguíneos son divididos en 3 categorías dependiendo su diámetro: 1. Microvasculatura (<1mm), 2. Pequeñas venas (1-5mm) y 3. Grandes venas (>6mm) ver **Tabla 1** (Chang & Niklason, 2017). Vasos sanguíneos de talla pequeña y grande presentan una histología compuesta de 3 capas, la primera es capa íntima que genera

el lumen tubular y consiste en el revestimiento de células endoteliales en la membrana basal y capa del tejido conectivo subendotelial; la conformación de células endoteliales tiene un papel importante en la regulación de los factores de coagulación, confieren permeabilidad selectiva y participan en el transporte de células del sistema inmune (Hoenig et al., 2005). Seguido se encuentra la capa intermedia, túnica media donde la población de células de músculo liso son las que la integran, rica en colágeno, elastina y proteoglicanos; confiriendo resistencia y actuando como efector del tono vascular. Arterias y vénulas son equivalentes a las arterias y venas; pero de menor calibre, presentan menos células de músculo liso. Mientras que los capilares son vascularizaciones de menor talla, tienen pericitos o células murales (de Rouget) que son contráctiles y que apoyan a la capa de células endoteliales y membrana basal pues se envuelven alrededor de dichas células (Song et al., 2018). Por último, la túnica adventicia, es la capa más externa, donde fibroblastos se encuentran dispuestos longitudinalmente; la matriz de esta capa es rica en colágeno- elastina. La red de capilares está compuesta por células endoteliales dispuestas en la membrana basal distribuidas junto con pericitos (Awad et al., 2018, Song et al., 2018).

**Tabla 1.** Vascularización y sus componentes extracelulares. (modificado de Thottappillil & Nair.,2015).

Categoría por Talla	Tipo de vascularización	Componentes de la Matriz Extracelular
Grande	Arteria elástica (30mm-5mm)	Elastina, fibronectina, fibrilina, colágeno (I, II, III, IV, V, VI) y proteoglicanos
	Arteria muscular (6mm)	Elastina, fibronectina, fibulina, colágeno (I, II, III, IV, V, VI) y proteoglicanos
Pequeñas venas	Vena (1-5mm)	Elastina, fibronectina, colágeno I, II, III, IV, V, VI y proteoglicanos
Microvasculatura	Arteriola (>50µm)	Elastina, colágeno (I, III) y fibrilina
	Vénula (20-100µm)	Laminina, colágeno (IV) y fibronectina
	Capilar (<20µm)	Colágeno IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos de Heparán sulfato

### 3. Ingeniería de Tejidos Vasculares

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad y morbilidad a nivel mundial, anualmente existieron entre el año 2008-2013 ~ 17.3 millones de muertes en estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud, mientras que para el año 2015 se reportaron 17.7 millones de defunciones por esta causa, existiendo estimaciones de ~23.3 millones de muertes para el año 2030 (Wang et al., 2014; Wang et al., 2015; Carrabba & Madeddu, 2018; OMS, 2019).

A mediados del siglo XX, la vena safena se utilizó como injerto vascular de aplicación clínica, inicialmente, fue realizado por Kunlin (1951) y en la actualidad representa una de las técnicas más comunes de reemplazar tejido vascular; encontrando la limitante en la disponibilidad del propio tejido (Ravi & Chaikof, 2010). A finales de los años

70's biomateriales no degradables como es el polietileno-tereftalato (Dacrón) y politetrafluoroetileno (Teflón, PTFE) fueron introducidos para cirugías de bypass aórtico y extremidades inferiores. En la misma fecha los primeros sustitutos vasculares generados por ingeniería de tejidos fueron tejidos acelulares bovinos y humanos como son: Artegraft (North Brunswick, NJ), Procol (Hancock Jaffe Laboratories Inc., Irvine, CA) y Cryovein (CryoLife, Kennesaw,GA)(Carrabba & Madeddu, 2018).

La ingeniería de tejidos vasculares en las últimas 3 décadas se ha desarrollado ante la necesidad de remplazar obstrucciones vasculares y estudiar los procesos de angiogénesis y vasculogénesis para la regeneración vascular (Li et al., 2017). Nuevos enfoques en la formación de vasos artificiales podrían afectar de manera positiva la terapia de lesión isquémica, tratamiento de

enfermedades cardiovasculares y el campo de conocimiento de la ingeniería de tejidos (Salingova et al., 2014). Actualmente se ha buscado controlar la micro y macroarquitectura de andamios tridimensionales, el éxito de ello dependerá de la composición y la estructura modificará e influenciará la funcionalidad del sustituto vascular. Estos acercamientos corresponden a técnicas como electrohilado, células dispuestas en multicapas, moldes e impresión 3D. Convirtiéndose en un objetivo primario el desarrollar un sustituto completamente biológico, que cuente con buenas condiciones mecánicas, diámetro, resistencia de diferentes presiones de flujo, resistencia a trombosis, regulación del flujo sanguíneo y que no genere una respuesta inmunológica exacerbada por parte del paciente al sustituto biológico (Chang & Niklason, 2017; Thottappillil & Nair, 2015). Para ello, son importantes las investigaciones enfocadas en el desarrollo y regeneración vascular (proceso esencial en la construcción de cualquier órgano funcional); los abordajes que se han tenido incluyen descelularización de matrices, láminas de células y andamios biodegradables (Figura 1) (Wang et al., 2014); propiedades de las redes vasculares como es la geometría, maduración, estabilidad, suplementación con factores de crecimiento y/o diferenciación biológica en biomateriales se han tratado de optimizar *In vitro* (Rosenfeld et al., 2016). Por ejemplo, para generar microvasculatura, se han encapsulado angioblastos y células mesenquimales en

matrices biológicas tridimensionales (3D), mismas que tienden a organizarse como una red microvascular; permitiendo la formación de láminas capilares.

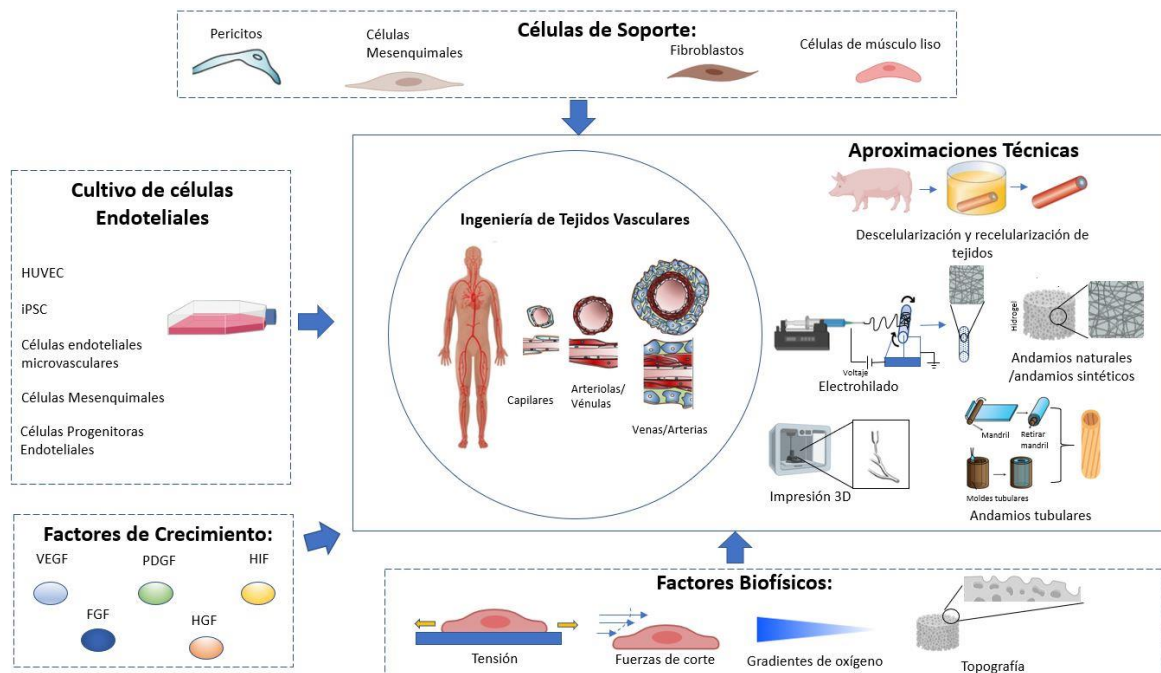
### 3.1 Recursos de Células Troncales

Las células troncales han sido descritas por presentar una división mitótica asimétrica, lo cual implica el generar una célula destinada a una diferenciación especializada, al mismo tiempo es capaz de autorrenovarse y permanecer en un estado latente o quiescente. Por su “**potencialidad**” son divididas en: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, biopotenciales y unipotenciales (Hong et al., 2018). Por su “origen” son clasificadas en células troncales embrionarias y en células troncales adultas. En el campo de la IT vasculares se han estudiado los procesos de vascularización utilizando células mesenquimales, células progenitoras endoteliales y células troncales pluripotentes inducidas del acrónimo en inglés *iPSC*, entre otras; evaluando la presencia de varias proteínas de reconocimiento como biomarcadores para evidenciar las células a linaje endotelial; entre estos marcadores se encuentran prominina-1 (CD133+), CD34+, c-kit+/Sca1+, CD146+, Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria (PECAM,CD31+), CD105+, Factor Von Willebrand (VWF+), tirosin cinasa parecido a inmunoglobulina (del inglés immunoglobulin-like), caderina vascular endotelial +, receptor

del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2+) (Caiado & Dias, 2012).

Un adecuado y prometedor recurso celular es el derivar células autólogas del paciente, esto es un paso crítico para facilitar la compatibilidad en terapia celular (Geenen et al., 2015); minimizando el rechazo

inmunológico. Sin embargo, el aislar y expandir cultivos primarios de pacientes con una avanzada enfermedad arterial puede ser deficiente ya que las células presentan una reducción en su crecimiento y también una disminución en su potencial de regeneración (Wang et al., 2014).



**Figura 1.** Ingeniería de Tejidos Vasculares. Factores que influyen en la realización de constructos vasculares artificiales.

### 3.1.1 Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana

Las células endoteliales de la vena umbilical (del acrónimo en inglés HUVECs) proveen un modelo óptimo de estudio de regulación de células endoteliales a respuestas de diferentes estímulos. El cultivo de estas células puede obtenerse por perfusión de tripsina o colagenasa en venas umbilicales de donadores (Jaffe et al., 1973). Se ha reportado que cultivos de HUVECS en

suspensión en matrices de colágeno tipo I, tienden a entrar en procesos apoptóticos, pero sobreviven cuando son transducidas con la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (D34A caspasa-resistente en la expresión del vector pSG5); esto se demostró al implantar subcutáneamente en ratones inmunodeficientes hidrogeles de colágeno y fibronectina que contenían células HUVECS soportadas con células murales (Schechner et al., 2000). La infección de HUVECS se logró

mediante cuatro infecciones en serie durante 2 semanas sin selección por fármacos; en resumen, la infección se realizó de manera estándar en presencia de *polybrene* (5 µg/ml) realizado durante 6 h con una densidad celular de  $1 \times 10^5$  HUVECs en el pasaje uno. Las células fueron mantenidas toda la noche en medio de crecimiento celular, y la infección fue repetida el siguiente día. Las células fueron mantenidas una semana y nuevamente se repitió el proceso de infección a una densidad de  $1 \times 10^5$  células. Obteniendo al finalizar del proceso una expresión de genes transducidos >95% (Zheng et al., 2000; Schechner et al., 2000).

### 3.1.2 Células Troncales Mesenquimales

Las células troncales mesenquimales son células adultas que tienen la capacidad de formar una variedad de células del tejido conectivo, incluyendo células vasculares. Pueden ser aisladas de médula ósea, sangre periférica, músculo esquelético y tejido adiposo. Algunos métodos propuestos por Iwasaki et al. (2008) se enfocan en co-cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECS) y células troncales mesenquimales, visualizando que de manera espontánea presentan una red vascular.

### 3.1.3 Células Progenitoras Endoteliales

Las células progenitoras endoteliales (CPE) son células troncales, las cuales podemos encontrar principalmente en médula ósea representando el 1% de la misma. Sin embargo, también se logran encontrar en un

bajo porcentaje circulando en sangre periférica, encontrando entre 0.1%-0.001% de las células mononucleares dependiente del donador. Las CPE participan en procesos de angiogénesis postnatal o reparación vascular (Geenen et al., 2015; Hanjaya-Putra et al., 2011) originalmente estas células fueron descritas por Asahara (1997) como células mononucleares circulantes localizadas en sangre periférica identificadas por ser CD34+, FLK1+, mismas que son capaces de diferenciarse en células endoteliales. Existen factores que influyen la densidad de células progenitoras endoteliales, como es fumar, obesidad, edad, diabetes que actúan negativamente disminuyendo la cantidad de los progenitores, mientras que el ejercicio estimula un aumento de estas (Saligovia et al., 2014). Por otro lado, se ha reportado que el porcentaje de CPE en sangre periférica se ve incrementado como respuesta a un trauma o isquemia, de manera que la matriz extracelular es modulada para reclutar células progenitoras que ayuden a regenerar el tejido (Anderson et al., 2015).

Las CPE se han clasificado en 2 tipos, las CPE tempranas y las CPE tardías (Figura 2), por sus características en condiciones de cultivo *In vitro*. Las CPE tempranas son células en forma de huso, que proliferan ampliamente en la segunda o tercera semana después del aislamiento; sin embargo, solo pueden ser mantenidas en cultivo por un lapso no mayor a 4 semanas. Las CPE tardías tienen morfología adoquinada, la cual es característica de las células endoteliales. En

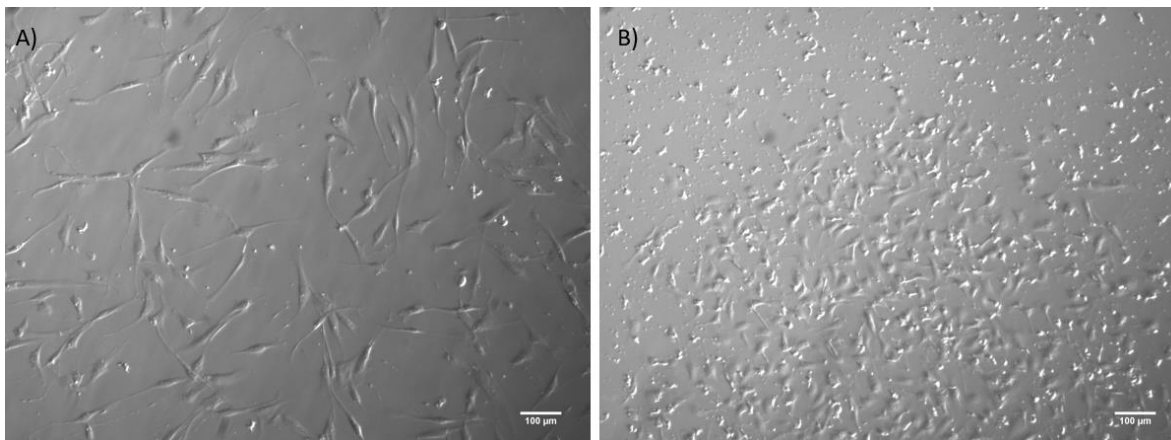
cultivo, aparecen aproximadamente entre la semana 2-3 después del aislamiento, proliferan más rápido entre la cuarta y la octava semana y sobreviven *In vitro* alrededor de 12 semanas (Grochot et al., 2013).

### 3.1.4 Células Troncales Pluripotentes Inducidas

El innovador trabajo de Takahashi & Yamanaka (2006), demostró la posibilidad de que células somáticas humanas adultas (por ejemplo, fibroblastos especializados) re-expresaran genes de pluripotencia celular (Sox2, Klf4; c-Myc y Oct3/4) de manera artificial, generando así a las Células Troncales Pluripotentes Inducidas (IPSC por sus siglas en inglés). En el año 2007, se reportó la generación de las primeras células pluripotentes humanas inducidas (*human induced Pluripotent Stem Cells, hiPSCs*) (Takahashi et al., 2007). Como ventaja estas células ofrecen la posibilidad de tener grandes bancos celulares de trabajo al ser guiadas a cualquier estirpe celular, mismas que podrían ser utilizadas en terapia celular (Figura 3) (Wang et al., 2014; Gu et al., 2017). En ese sentido se ha reportado que al utilizar medio suplementado con PDGF-BB, ácido retinoico (RA) y TGF- $\beta$  promueven la diferenciación de IPSC hacia células de músculo liso mientras que para el linaje endotelial se ha implementado principalmente el VEGF y FGF

(Greiner & Wendorff, 2007; Song et al., 2018). Como desventaja se sabe que las iPSCs presentan variaciones clon a clon, en las cuales predominan mutaciones puntuales y aneuploidías; existiendo aneuploidías parciales o completas recurrentemente reportadas en el cromosoma: 8,12,17 o 20 así como trisomía X (Lin & Xiao, 2017); aunado a ello, el proceso de reprogramación tiene una baja eficiencia, por lo que hace falta estandarizar el protocolo de generación, diferenciación y purificación que asegure una inocuidad en la inoculación de dichas células; ya que en experimentos con modelos animales de ratón el implementar células no diferenciadas implica la generación de teratomas (Abad et al., 2013). Adams et al. (2013) demostraron que la plasticidad fenotípica de las iPSCs derivadas de células endoteliales tienen respuestas a estímulos biomecánicos, farmacológicos y humorales similares a las que se presentan en células endoteliales. Mientras que Wang et al. (2014) establecieron un cultivo hiPSCs derivados de fibroblastos aórticos humanos, los cuales fueron rediferenciados a células de músculo liso y dispuestos en una matriz macroporosa de ácido poli-L-láctico biodegradable; demostrando la factibilidad y funcionalidad como una fuente de recurso celular en ingeniería de tejidos vasculares.





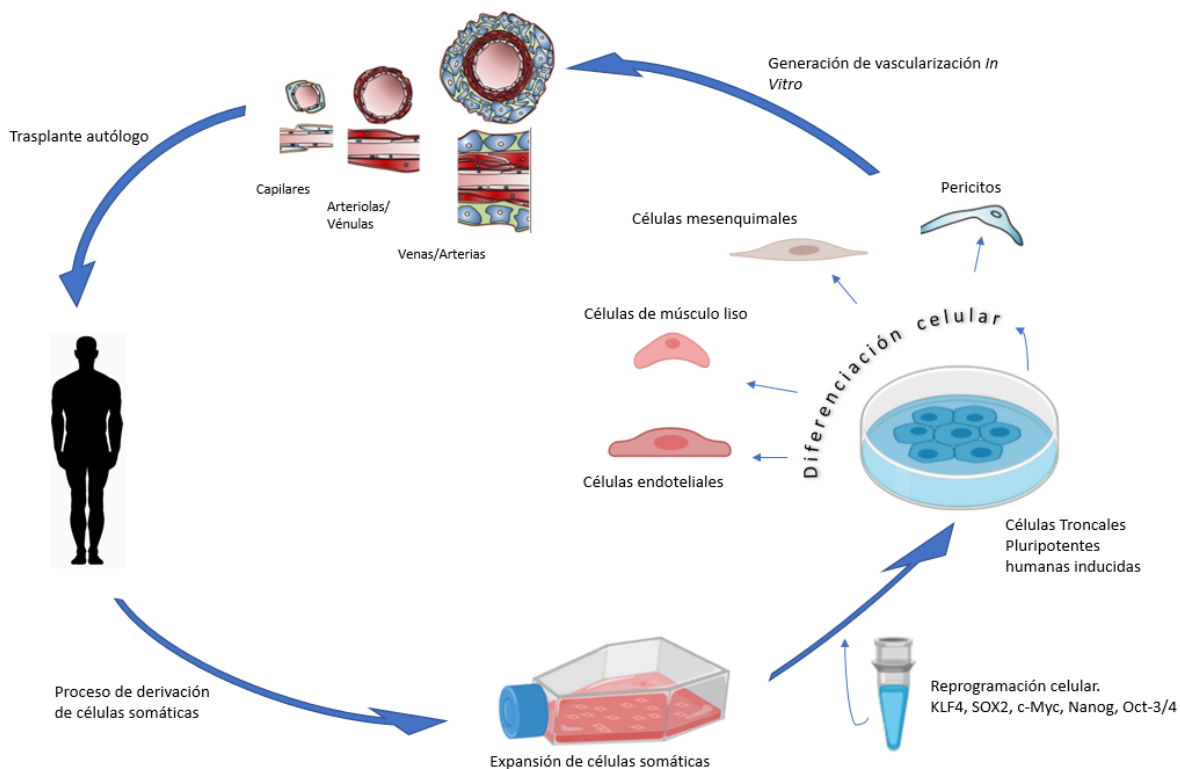
**Figura 2.** Cultivo de células progenitoras endoteliales (CPEs). A) CPEs tempranas, presentan morfología ahusada y proliferación dispersa, B) CPEs tardías, presentan morfología “adoquinada” y proliferación por colonias (Fotografías tomadas con microscopio invertido de luz Olympus IX71, en el laboratorio de Medicina Regenerativa e ingeniería de tejidos del CMN 20 de Noviembre ISSSTE).

### 3.2 Biomateriales

Los biomateriales tienen la función de actuar como una matriz de soporte extracelular artificial. Por definición los biomateriales son aquellos materiales sólidos, líquidos o geles que, por sus características físicas, químicas y mecánicas pueden entrar en contacto con células y tejidos vivos ofreciendo una estructura tridimensional (andamio 3D) para el mantenimiento, crecimiento y diferenciación celular (Falke & Atala, 2000; Atala, 2012); idealmente no deben alterar o modificar negativamente las funciones de las células y tejidos con las que interactúan, contrario a ello las células no solo deben sintetizar nueva matriz extra celular en el andamio sino que también tienen que

promover un proceso de reparación o regeneración del tejido (Fabres, 2010; Ye et al., 2000).

Los biomateriales son clasificados en 3 tipos, naturales (biológicos), artificiales/sintéticos e híbridos. Inicialmente las prótesis vasculares fueron hechas de polímeros no degradables como el PTFE, Dacrón y Gore-Tex sin embargo la regeneración vascular era nula y faltaba permeabilidad limitando el uso de estos materiales; observándose que son materiales eficaces para reemplazar grandes vasos, sin embargo, cuando se utilizan en injertos vasculares de pequeño diámetro estos sustitutos son fácilmente trombóticos (Deutsch et al., 2009; Carrabba & Madeddu, 2018; Hoenig et al., 2005).



**Figura 3.** Inducción de células Pluripotentes Humanas (hiPSCs) aplicado a Ingeniería de Tejidos Vasculares.

### 3.2.1 Polímeros naturales

Los polímeros naturales tienen un mayor acercamiento a los componentes de la matriz extracelular, entre las que se incluyen principalmente colágeno tipo I, fibronectina, fibrina, laminina y membranas basales reconstruidas (ejemplo: matrigel) (Koroleva et al., 2016; Deroanne et al., 2001). Por ello son considerados un material adecuado para la generación de andamios y generalmente no presentan riesgo de inflamación crónica o toxicidad al paciente (Boccafroschi et al., 2007). Cabe mencionar que los polímeros naturales presentan desventajas en cuanto a las propiedades de carga mecánica, y el perfil de biodegradación; colágeno y elastina, llegan

a ser los principales componentes de una arteria, estos componentes son los responsables de las características mecánicas; por lo que están en procesos constantes de investigación (Ravi & Chaikof, 2010). Con lo que respecta a Matrigel®, contiene factores de crecimiento no bien definidos y potencialmente tumorigénicos aunado a ello las variaciones de producción (Koroleva et al., 2016).

El colágeno es un ejemplo de aplicaciones muy diversas, ya que en forma de membrana o películas se ha propuesto como sustituto de córnea en modelos animales, en membranas para hemodiálisis, piel artificial y en reparación de hernias, en

formas de esponja es utilizado en tratamientos de lesiones de piel, en la sustitución de hueso y cartílago, válvulas cardiacas y como agente hemostático, entre otras aplicaciones. Dreesmann et al. (2007), generaron una matriz de esponja de gelatina porcina entrecruzada con metanal (formaldehído), al cultivar células L929 (fibroblastos de ratón) en la esponja se demostró que no genera citotoxicidad alguna, permitiendo así su proliferación. En pruebas *In vivo* tanto en un huevo como en un injerto subcutáneo en un ratón; observaron que es posible la proliferación y la adquisición de estructuras tubulogénicas dentro de la matriz de esponja. Raghava et al. (2010) reportaron la generación de microvasculatura, con moldes de PDMS y colágeno tipo 1, utilizando células endoteliales de cordón umbilical y BAMECs (células endoteliales de la microvasculatura adrenal bovina) con el propósito de que las microvasculaturas estén generando mejores procesos de difusión de oxígeno y nutrientes, que, hasta entonces en el contexto temporal, era algo que no se había abordado del todo. En moldes de PDMS se generaron microcanales entre 50-100 $\mu$ m de altura, y un centímetro de largo, a los cuales se les relleno de matriz de colágeno tipo 1 mezclado con células, mismas que al interactuar con el medio de cultivo y los factores de diferenciación como VEGF y FGF, se indujo la generación de microvasculatura. Algunos otros estudios han demostrado que la presencia de fibroblastos en los andamios corresponde a un incremento de

vascularización, debido a que los fibroblastos secretan proteínas de la matriz extracelular como es laminina, colágeno tipo I y colágeno tipo IV; necesarios para una maduración vascular (Greiner & Wendorff, 2007; Song et al., 2018) de igual manera se ha demostrado que el ácido hialurónico juega un rol importante en la regulación de angiogénesis al estimular la secreción de citocinas y la proliferación de células troncales por interacciones de  $\alpha3/\alpha5$   $\beta1$  integrinas, obteniendo mejores resultados que en hidrogeles que no contienen ácido hialurónico (Li et al., 2017).

### 3.2.2 Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos han tenido relevancia al presentar mayor resistencia mecánica que los polímeros naturales, sin embargo, la desventaja que presentan es que no proveen los suficientes receptores celulares, necesarios para la adhesión celular. Polímeros sintéticos como lo son el ácido poliglicólico, policaprolactona, poli L-láctico y mezclas de ellos, han sido investigados por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y ninguna inmunogenicidad (Pham et al., 2006, Song et al., 2018). Un estudio reciente elaborado por Gui et al. (2016) utilizó estructuras tubulares de ácido poliglicólico, en donde se inocularon células de músculo liso obtenidas de iPSCs; los autores demostraron que las células provocaban la generación de depósitos de colágeno, incrementando la resistencia de presiones de flujo de 500 mmHg después de

8 semanas de cultivo.

### 3.2.3 Biomateriales Híbridos

Son materiales que presentan poca adherencia celular generalmente son recubiertos con secuencias de Arginina-Glicina-Acido aspártico (RGD) e incluso factores de crecimiento como es FGF y/o VEGF.

El primer reporte clínico exitoso como aplicación de ingeniería de tejidos vasculares en pacientes fue realizado por Shin'oka et al. (2001) quienes implantaron un constructo biodegradable como un conducto pulmonar en un niño con atresia pulmonar y anatomía de ventrículo único. El constructo fue realizado por la mezcla de L-láctico y e-caprolactona, reforzado con Ácido poliglicólico. Las células implementadas fueron células autólogas mesenquimales derivadas de médula ósea; los resultados mostraron una sobrevida de 7 meses postimplante (Song et al., 2018).

### 4. Estado de las Investigaciones en Ingeniería de Tejidos Vasculares

El primer sustituto de venas generado por ingeniería de tejidos fue realizado por Weinberg y Bell (1986), generando cultivos de células endoteliales bovinas, células de músculo liso y fibroblastos en capas de colágeno soportados por una malla de Dacrón por 3-6 semanas; dispuestas en capas que mimetizaban la arquitectura celular de un vaso sanguíneo (Ravi & Chaikof, 2010; Chang & Niklason, 2017); la estructura tubular presentó una resistencia de ~300 mmHg (Hoenig et al.,

2005), lo cual es muy bajo para un implante arterial, la resistencia natural aproximada se encuentra entre 2000mmHg y 3000 mmHg en la vena safena humana y en la arteria mamaria interna respectivamente (Song et al., 2018). L'Heureux et al. (1998) generaron una estructura vascular de tres capas completamente biodegradable, los autores emplearon células de músculo liso de vena umbilical, fibroblastos de piel y células endoteliales en el lumen por 7 días de cultivo; mostrando una resistencia de presión de 2600 mmHg, pero con permeabilidad en 3 de 6 constructos (Song et al., 2018).

### 4.1 Descelularización de Tejidos

Los Injertos xenogénicos (otra especie) y alogénicos (misma especie) pueden ser un recurso de tejido para ser descelularizado por procesos de abrasión mecánica, digestión enzimática y/o surfactantes químicos (Thottappillil & Nair, 2015). La ventaja que ofrece la descelularización es que se conserva la arquitectura nativa de la matriz extracelular, de esta manera proporciona un punto de partida para la remodelación al colocarle las células de interés y en un lapso mínimo de una semana un implante avascular puede ser revascularizado por el hospedero (paciente) (Greiner & Wendorff, 2007). Huynh et al. (1999), utilizaron pequeños segmentos de submucosa intestinal porcina descelularizada impregnada con colágeno I bovino (cerca de 4mm) mostrando que tiene el potencial de integrarse en un tejido huésped (arteria de

conejo), proporcionando un andamio adecuado al presentar una buena homeostasia y permeabilidad. El injerto se remodeló en un periodo de 90 días presentando actividad fisiológica; se infiltraron células de músculo liso y células endoteliales mostrando respuesta a agentes vasoactivos. Estudios realizados por Gui et al. (2009) descelularizaron arterias umbilicales humanas por ciclos con detergentes (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate y dodecíl de sodio sulfatado e incubado en medio de crecimiento endotelial (EGM-2), manteniendo la integridad de la matriz de colágeno y una reducción parcial de fibras de elastina.

Mientras que Assmann et al. (2013), descelularizaron aortas de ratas mediante la implementación de dodecíl sulfato sódico (SDS) y deoxicolato, al finalizar el proceso de descelularización, decidieron colocar en la matriz un recubrimiento adicional de fibronectina (50µ/ml) por 24 h a 37°C; Demostrando que la fibronectina acelera el proceso de endotelización sin formar trombos, sin embargo, existen evidencias de que la fibronectina induce una hiperplasia en miofibroblastos.

La idea de utilizar tejido xenólogo se ha propuesto debido a la falta de donaciones y disponibilidad de tejidos humanos; sin embargo, las reacciones inmunológicas como respuesta a células y matrices no propias pueden llegar a ser severas y en ocasiones fatales, como es la presencia de galactosa-alfa-1,3-galactosa (alfa-gal) epítipo

expresado en todas las superficies celulares de los mamíferos, a excepción de los humanos y primates (Dhulekar & Simionescu, 2018), siendo ello una limitante del avance como uso convencional; llevando a procesos de investigación en las técnicas de descelularización, así como la meta de eliminar completamente biomoléculas inmunogénicas. Un ejemplo de ello que ha sido descrito es inactivar la alfa-galactosa con glutaraldehído, mismo que tiende a reticular el tejido reduciendo así la inmunogenicidad, cabe mencionar que, la utilización del glutaraldehído compromete a citotoxicidad, predisponerlo a ser trombogénico y ser susceptible a calcificarse (Song et al., 2018).

## 4.2 Hidrogeles

La fabricación de constructos tridimensionales (3D) con hidrogeles para homologar procesos de vasculogénesis y angiogénesis, se ha ido diversificando (McCoy et al., 2016). Los hidrogeles son biomateriales con un alto contenido de agua, buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, proveen un adecuado microambiente y son considerados como un material ideal para tejidos suaves. Hidrogeles sintéticos y semisintéticos han tenido gran popularidad en el campo de la Ingeniería de tejidos vasculares al contener a las células, modulando factores solubles como pueden ser las citocinas o bien la disponibilidad de oxígeno y nutrientes (McCoy et al., 2016; Liu et al., 2015; Koroleva et al., 2016). Hidrogeles sintéticos como es el polietilenglicol (PEG);

ofrece estabilidad mecánica, estructura tridimensional, además de que fácilmente puede ser conjugado con péptidos, enzimas, proteínas y otros biomateriales (Koroleva et al., 2016). Avances en la ingeniería para elaborar constructos de tejido más complejos *In vitro* ha generado la necesidad paralela del desarrollo y diseño 3D de redes vasculares. (Liu et al., 2015)

Syedain et al. (2011) utilizaron fibroblastos cultivados en hidrogeles de fibrina para generar vascularización de pequeños diámetros, para estos métodos el hidrogel fue polimerizado en un tubo que en el centro contenía un mandril de vidrio tubular. Los fibroblastos generaron su propia matriz extracelular, principalmente colágeno; esto en un periodo de 7-9 semanas de cultivo en biorreactor con control de flujo para inducir la alineación circunferencial de las células y la matriz. Posteriormente los investigadores descelularizaron el constructo anteriormente desarrollado con 1% de dodecilo sulfato de sodio y lo implantaron como injerto en arterias femorales de ovejas, al cabo de 24 semanas el injerto se repobló completamente por células endoteliales mostrando evidencia de depósitos de elastina (Syedain et al., 2014).

#### 4.3 Fibrina

Como una alternativa a andamios de colágeno, investigadores se han enfocado en el uso de células inmersas en geles de fibrina para generar injertos celulares (Peck et al., 2012); la fibrina es el producto final de la cascada de coagulación del fibrinógeno en la

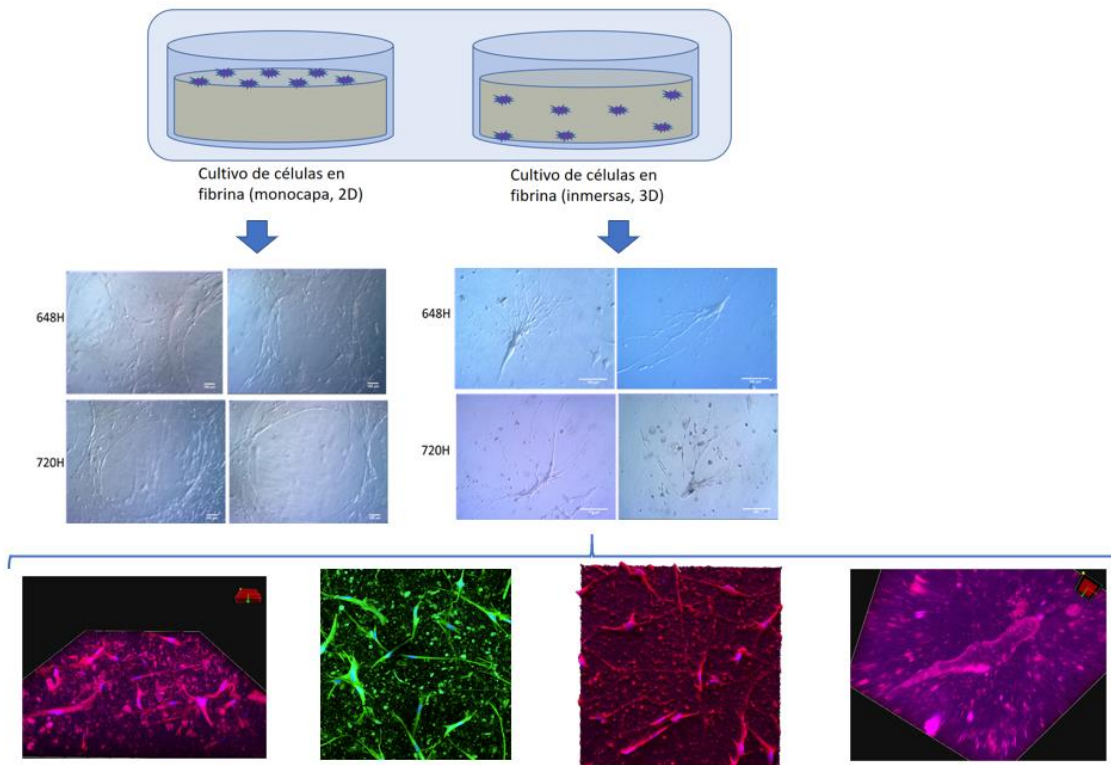
presencia de trombina y calcio; el fibrinógeno es una glicoproteína que se encuentra solubilizada en el plasma sanguíneo en una concentración normal de 1.4-3.5g/l (Jockenhoevel & Flanagan, 2011), proporciona un andamio estructural para la adhesión, proliferación y migración de células importantes en la curación de heridas; y al final de este proceso el coágulo de fibrina es reabsorbido por el cuerpo. El hidrogel de fibrina es propuesto como un modelo de estudio para vasos sanguíneos asociados a tumores o para vasos sanguíneos en sitios de lesiones vasculares (Lafleur et al., 2002). Los geles de fibrina son un biomaterial prometedor, pueden ser obtenidos autólogamente, disminuyendo los riesgos potenciales de los aloinjertos como es el rechazo inmunológico y la adquisición de enfermedades por virus (Ye et al., 2000; Zhao et al., 2007; Koroleva et al., 2016) de una manera mínimamente invasiva, y que al variar las concentraciones proteicas, aumento de la concentración de calcio, sodio y el entrecruzamiento a través de enzimas o luz ultravioleta se puede generar un implante con características deseadas (gelificación, compresión, velocidad de degradación, etc.) (Murphy & Leach., 2012; Koroleva et al., 2016). El hidrogel de fibrina tiene una virtud entre los factores biofísicos, debido a que es un gel que contiene mayoritariamente los ligandos de  $\beta 3$  integrinas, permitiendo así la migración celular. Trombina, fibrinógenos, monómeros de fibrina y fibrinopéptidos B, todos incrementan la síntesis de ADN en

células de músculo liso y consecuentemente su proliferación (Pakala et al., 2001). Como ejemplo de ello mostramos en la **Figura 4** dos abordajes de cultivo de CPEs en hidrogeles de fibrina, en la que células progenitoras endoteliales tempranas se inocularon a una densidad de  $1 \times 10^3$  células $\cdot$ cm $^{-2}$  para ser cultivadas en monocapa. Desde el día 2 (48 h) se logran apreciar estructuras circulares, y que han sido reportadas como procesos incipientes de vascularización endotelial; mismos que a través de un mayor tiempo de cultivo (648-720 h) logran ser estructuras mayormente definidas. En contraste con una densidad de  $1 \times 10^3$  células $\cdot$ cm $^{-3}$  inmersas, en la que únicamente las células presentan un crecimiento 3D, aumentando proyecciones celulares las cuales han sido reportadas como “sprouting” endoteliales, las cuales tienden a secretar factores de crecimiento como es el VEGF y FGF (Herbert & Stainier, 2011).

La degradación *In vivo* puede ser controlada con la proteinasa inhibidora de aprotinina y agentes entrecruzantes (Ravi & Chaikof, 2010). Como una aplicación clínica Ryu et al. (2005) implantaron células mononucleares de médula ósea usando una matriz de fibrina inyectable, incrementando así la vascularización del miocardio infartado.

Cummings et al. (2004), se dispusieron a generar 2 tipos de hidrogeles (fibrina y colágeno tipo1) con el propósito de

comparar las propiedades físicas de los mismos; concluyendo que el gel de fibrina es un polímero muy flexible (28 y 19 Kpa), mientras que el de colágeno es más rígido (191-242 kpa), no tan flexible. Al realizar una mezcla 1:1 ( $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de fibrina con colágeno, las propiedades físicas de los geles, es el promedio de los geles por separado, por lo que se obtiene un biomaterial (gel) no tan duro, ni tan flexible (153-116 Kpa); permitiendo así una adecuada manipulación y que a su vez genera un buen mantenimiento y proliferación de células de músculo liso de aorta de rata. Chung et al., en 2015 compararon el efecto que provocaban tres tipos de geles (fibrina, colágeno tipo 1, y P-fibrina) en las células de tejido adiposo. P-fibrina es la mezcla de polietilenglicol con la fibrina, concluyendo que, las células de tejido adiposo logran crecer y proliferar en mayor cantidad con los geles de naturaleza de fibrina, sin embargo como copolímero (P-fibrina) al igual que en el estudio llevado a cabo por Cummings et al. (2004), los copolímeros otorgan mayores propiedades físicas y químicas que pueden ser benéficas para las células a estudiar, en este sentido, en los andamios de P-fibrina, se lograron apreciar que las células crecían de una manera más elongada y formaron mayores estructuras de conformación tubular.



**Figura 4.** Cultivo de CPEs en hidrogeles de fibrina. Presentando dos abordajes a 648 y 720 h de cultivo estándar 1) cultivo en monocapa (lado izquierdo; densidad de  $1 \times 10^3$  CPEs $\cdot$ cm $^{-2}$ ), observándose disposiciones de células en estructuras circulares; proceso incipiente de vascularización. y 2) cultivo de células inmersas (3D; densidad de  $1 \times 10^3$  CPEs $\cdot$ cm $^{-3}$ ), Observándose un crecimiento 3D de las células en el hidrogel con un mayor número de proyecciones de filopodios conocidas como “sprouting” endoteliales. Anexando a esta secuencia de imágenes una reconstrucción Z stack de las células observadas en microscopía multifotónica.

#### 4.4 Electrohilado

Una parte del conocimiento de ingeniería de tejidos vasculares se ha abordado por la técnica de electrohilado, el cual, es un proceso que utiliza la fuerza electrostática para obtener fibras de polímero natural o sintético en escala nanométrica, de tal manera que se puede mimetizar la matriz extracelular, proporcionando un microambiente óptimo para la proliferación, migración y/o diferenciación celular. Podría presentar una ventaja al poder modular la porosidad del

andamio y si fuese necesario la alineación de las propias fibras (Agarwal et al., 2008).

Andamios de nanofibras tubulares han sido producidos como injertos vasculares con mezclas de colágeno, elastina y otros polímeros reabsorbibles (PCL, LC, PLGA y PLLA); un ejemplo de estas combinaciones es 45% colágeno, 15% elastina y 40% polímeros reabsorbibles (Ercolani et al., 2015). Un enfoque de estos estudios corresponde al realizado por Filipe et al. (2018) que demostraron *In vitro* e *In vivo* que al



electrohilar un andamio de seda de Bombyx Mori se obtienen características reológicas (elasticidad, elongación y punto de ruptura) similares a una aorta de rata, llegando a ser mejor que un modelo comercial de politetrafluoroetileno.

#### 4.5 Bioimpresión

Se ha reportado el proceso de impresión de constructos 3D implementando células y biomateriales. La “biofabricación” funcional de tejidos y órganos se realiza mecánicamente adicionando biotinta (células suspendidas en biomateriales) dispuestas capa por capa para homologar el tejido u órgano en función a su histología y anatomía. Controlando la micro y macro arquitectura del diseño se proporcionará lo esencial del espacio de crecimiento celular y las propiedades mecanoquímicas adecuadas (Liu et al., 2015; Song et al., 2018; Kolesky et al., 2016)

Recientes estrategias se han enfocado en el desarrollo acelular de estructuras de “sacrificio”, las cuales son biotintas que pueden ser impresas con una fina resolución para generar estructuras que después serán removidas por disolución; generando microcanales donde las células endoteliales puedan proliferar.

El uso de materiales de “sacrificio” fue primeramente demostrado por Miller et al. (2012), quienes implementaron una tinta soluble de azúcar. Primero fue bioimpresa la estructura tubular vascular con diámetros uniformes de 150  $\mu\text{m}$ , esta estructura tubular

fue embebida con un hidrogel; seguido de un proceso para disolver la estructura tubular con agua. Esto permitió que en el hidrogel se generaran estructuras tubulares que actuaron como guía de proliferación celular de las células endoteliales.

#### 4.6 Microfluídos

El cultivo en sistema de microfluídos o sistema en “chips” se considera una prometedora forma de cultivo celular, el cual es definido como un cultivo que permite modular flujos de medio de cultivo hacia células contenidas en cámaras con microcanales; este tipo de cultivo puede aportar estímulos similares a los fisiológicos, bioquímicos y mecánicos. En el tema del cáncer, puede contribuir al estudio de la formación, progresión y respuesta a terapia (Meng et al., 2019). La relevancia fisiológica es alta y tiene potenciales usos para predecir el desarrollo o progresión de las enfermedades; para tales fines, actualmente se han modelado de manera exitosa sistemas de cultivos en chips de alveolos pulmonares, corazón, túbulos del riñón, barrera hematoencefálica, hígado entre otros. Entre las enfermedades o alteraciones fisiológicas que se han mimetizado se encuentran: Edema pulmonar, trombosis, asma y obstrucción pulmonar crónica (Sontheimer et al., 2019; Schöneberg et al., 2018).

Los sistemas en microfluídos se han convertido en herramientas invaluable para desarrollar e investigar las propiedades del nicho perivascular *In vitro*, de este modo

Winkelman y Dai 2015 desarrollaron un sistema de red microvascular formada por células HUVECs ( $1 \times 10^6$  células $\cdot$ mL $^{-1}$ ) y fibroblastos humanos pulmonares ( $2 \times 10^6$  células $\cdot$ mL $^{-1}$ ). Las células fueron suspendidas en hidrogeles de fibrina 3D dentro de un sistema de microfluidos con el objetivo de recrear un nicho neurovascular de manera artificial y poder entender la dinámica que se está teniendo entre las células endoteliales y las células neurales (Winkelman & Dai, 2015).

## Conclusiones

El desarrollo *In vitro* de procesos vasculogénicos o angiogénicos es de vital importancia debido a que la mayoría de los órganos y tejidos funcionalmente hablando deben estar vascularizados. Pese a que existen fortalezas en cada una de las técnicas anteriormente mencionadas para la obtención de procesos vasculares, también existen retos que deben ser abordados para la correcta integración, forma y función de los vasos sanguíneos generados. Clínicamente, el tiempo de espera (en algunos casos son meses) para generar un sustituto de tejido u órgano autólogo de manera artificial es un impedimento, que posiblemente el paciente no pueda tener, ya que dependerá de su estado de salud, condición física y edad. Por lo que es importante realizar mayores investigaciones en los procesos de obtención celular, generación de matrices y su mantenimiento artificial. Por ejemplo, saltando la importancia de generar procesos de vascularización e incentivando la curiosidad

científica se ha observado que el estado de maduración celular responderá de diferente manera al generar sustitutos vasculares. En ese sentido se ha descrito que la adición de ácido ascórbico y ácido retinoico en el medio de cultivo celular endotelial potencializa la producción de colágeno, y a su vez esto incrementa las propiedades mecánicas del constructo vascular (Hoenig et al., 2005).

En un futuro las aplicaciones de la Ingeniería de tejidos vasculares podrán permitir plantear trasplantes sin riesgos de rechazo y efectivos funcionalmente, ya sea por xenotrasplantes, alotrasplantes o autotrasplantes. En teoría, potencialmente podrían generarse cualquier tipo de órgano y tejido a un paciente específico; incluso con sus propias células haciendo uso de hiPSCs.

## Referencias

- Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Canamero M, Rayon T, Ors I, Graña O, Megías D, Domínguez O, Martínez D, Manzanares M, Ortega S & Serrano M (2013) Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. 502(7471): 340-345.
- Adams WJ, Zhang Y, Cloutier J, Kuchimanchi P, Newton G, Sehrawat S, Sehrawat S, Aird W, Mayadas TN, Luscinskas FW & García G (2013) Functional vascular endothelium derived from human induced pluripotent stem cells. *Stem cell rep.* 1(2):105-113.
- Agarwal S, Wendorff JH, Greiner A (2008) Use of electrospinning technique for

- biomedical applications. *Polymer*. 49(26): 5603-5621.
- Anderson-Enrin M, Kwee BJ, Lewin SA, Raimondo T, Mehta M, & Mooney DJ (2015) Local delivery of VEGF and SDF enhances endothelial progenitor cell recruitment and resultant recovery from ischemia. *Tissue Eng Part A Rev*. 21(7):1217-1227.
- Arvelo F (2007) Ingeniería de tejidos y producción de piel humana in vitro. *Invest Clin*. 48(3):367-375.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G & Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275:964–967.
- Assmann A, Delfs C, Munakata H, Schiffer F, Horstkötter K, Huynh K, Barth M, Stoldt VR, Kamiya H, Boeken U, Lichtenberg A & Akhyari P (2013) Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials*. 34(25):6015-6026.
- Atala A, Kasper FK & Mikos AG (2012) Engineering complex tissues. *Sci Transl Med*. 4(160):160.
- Awad N, Niu H, Ali U, Morsi Y & Lin T (2018) Electrospun fibrous scaffolds for small-diameter blood vessels: a review. *Membranes*. 8(1): 15.
- Boccafoschi F, Rajan N, Habermehl J, Mantovani D (2007) Preparation and characterization of a scaffold for vascular tissue engineering by direct-assembling of collagen and cells in a cylindrical geometry. *Macromol Biosci*. 7(5):719–726.
- Caiado F & Dias S (2012) Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs. *Fibrogenesis tissue repair*. 5(1):1.
- Carrabba M & Madeddu P (2018) Current strategies for the manufacture of small size tissue engineering vascular grafts. *Front Bioeng Biotechnol*. 6:41.
- Chang WG & Niklason LE (2017) A short discourse on vascular tissue engineering. *NPJ Reg med*. 2(1):7.
- Chung E, Rytlewski JA, Merchant AG, Dhada KS, Lewis EW & Suggs LJ (2015) Fibrin-based 3D matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells. *Acta Biomater*. 17: 78-88.
- Cummings CL, Gawlitta D, Nerem RM & Stegemann JP (2004) Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen–fibrin mixtures. *Biomaterials*. 25(17):3699–3706.
- Deroanne CF, Lapiere CM & Nusgens BV (2001) In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton. *Cardiovasc Res*. 49(3):647-658.
- Deutsch M, Meinhart J, Zilla P (2009) Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg*. 49(2):352–362.

- Dhulekar J & Simionescu A (2018) Challenges in vascular tissue engineering for diabetic patients. *Acta Biomater.* 70:25-34.
- Dreesmann L, Ahlers M & Schlosshauer B (2007) The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials.* 28(36):5536-5543.
- Ercolani E, Del Gaudio C & Bianco A (2015) Vascular tissue engineering of small-diameter blood vessels: reviewing the electrospinning approach. *J Tissue Eng Regen Med.* 9(8):861-888.
- Fabres VC (2010) Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva, Unidad de Medicina Reproductiva. Departamento de Ginecología y Obstetricia. *Med Clin Condes.* 21(3) 488 – 493.
- Falke GF & Atala Anthony (2000) Reconstrucción de órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argen Pediatr.* 98(2):103-105.
- Falke G (2001) Introducción a la Ingeniería Tisular, Parte I. *Rev.De Cir infantil* 11(2).
- Filipe EC, Santos M, Hung J, Lee BS, Yang N, Chan AH, Ng MK, Kovacina JR & Wise SG (2018) Rapid Endothelialization of Off-the-Shelf Small Diameter Silk Vascular Grafts. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science.* 3(1):38-53.
- Geenen ILA, Molin DGM, van den Akker NMS, Jeukens F, Spronk HM, Schurink GWH & Post MJ (2015) Endothelial cells (ECs) for vascular tissue engineering: venous ECs are less thrombogenic than arterial ECs. *J Tissue Eng Regen Med.* 9(5):564-576.
- Greiner A & Wendorff JH (2007) Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46(30):5670-5703.
- Grochot-Przęczek A, Kozakowska M, Dulak J & Józkowicz A (2013) Endothelial cell origin, differentiation, heterogeneity and function. In: *Angiogenesis and Vascularisation. Cellular and Molecular Mechanisms in Health and Diseases.* Springer -Verlag Wien.
- Gu Q, Tomaskovic-Crook E, Wallace GG & Crook JM (2017) 3D bioprinting human induced pluripotent stem cell constructs for in situ cell proliferation and successive multilineage differentiation. *Adv Healthc Mater.* 6(17):1700175.
- Gui L, Dash BC, Luo J, Qin L, Zhao L, Yamamoto K, Hashimoto T, Wu H, Dardik A, Telides G, Niklason, L. E & Qyang Y (2016) Implantable tissue-engineered blood vessels from human induced pluripotent stem cells. *Biomaterials.* 102, 120-129
- Gui L, Muto A, Chan SA, Breuer CK & Niklason LE (2009) Development of decellularized human umbilical arteries as small-diameter vascular grafts. *Tissue Engin Part A.* 15(9): 2665-2676.
- Hanjaya-Putra D, Bose V, Shen YI, Yee J, Khetan, S, Fox-Talbot K, Steenbergen C, Burdick JA & Gerecht S (2011) Controlled activation of morphogenesis to generate a functional human microvasculature in a synthetic matrix. *Blood.* 118(3):804-815.

- Herbert SP & Stainier DY (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(9): 551.
- Hoenig MR, Campbell GR, Rolfe BE & Campbell JH (2005) Tissue-engineered blood vessels: alternative to autologous grafts? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(6): 1128-1134.
- Hong J, Rodgers CE & Fehlings MG (2018) Stem Cell Applications in Spinal Cord Injury: A Primer. Springer In Stem Cell Genetics for Biomedical Research (pp. 43-72).
- Huynh T, Abraham G, Murray J, Brockbank K, Hagen PO & Sullivan S (1999) Remodeling of an acellular collagen graft into a physiologically responsive neovessel. *Nat Biotechnol.* 17(11):1083.
- Iwasaki K, Kojima K, Kodama S, Paz AC, Chambers M, Umezumi M & Vacanti CA (2008) Bioengineered three-layered robust and elastic artery using hemodynamically-equivalent pulsatile bioreactor. *Circulation.* 118:S52-S57.
- Jaffe E A, Nachman R L, Becker CG & Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52(11):2745-2756.
- Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 9(6):685-693.
- Jockenhoevel S & Flanagan TC (2011) Cardiovascular tissue engineering based on fibrin-gel-scaffolds. In: Tissue engineering for tissue and organ regeneration. IntechOpen.
- Kolesky DB, Homan KA, Skylar-Scott MA & Lewis JA (2016) Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 113(12): 3179-3184.
- Koroleva A, Deiwick A, Nguyen A, Narayan R, Shpichka A, Kufelt O & Chichkov B (2016) Hydrogel-based microfluidics for vascular tissue engineering. *BioNanoMaterials.* 17(1-2):19-32.
- Kunlin J (1951) Long vein transplantation in treatment of ischemia caused by arteritis. *Rev Chir.* 70:206-235.
- L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R, Germain L and Auger FA (1998) A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J.* 12: 47-56.
- Lafleur MA, Handsley MM, Knäuper V, Murphy G & Edwards DR (2002) Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci.* 115(17): 3427-3438.
- Langer R & Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science.* 260: 920-926.
- Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, Marini R, Blitterswijk, Mulligan RC, D'Amore PA & Langer R (2005) Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol.* 23:879-884.
- Li S, Nih LR, Bachman H, Fei P, Li Y, Nam E, Dimatteo R, Carmichael ST, Barker TH & Segura, T (2017) Hydrogels with precisely

- controlled integrin activation dictate vascular patterning and permeability. *Nat Mater.* 16(9):953-961.
- Lin K & Xiao AZ (2017) Quality control towards the application of induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 46:164-169.
- Liu J, Zheng H, Poh P, Machens HG & Schilling A (2015) Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks. *Int J Mol Sci.* 16(7):15997-16016.
- McCoy MG, Seo BR, Choi S & Fischbach C (2016) Collagen I hydrogel microstructure and composition conjointly regulate vascular network formation. *Acta Biomater.* 44:200-208.
- Meng F, Meyer CM, Joung D, Vallera DA, McAlpine MC & Panoskaltsis-Mortari A (2019) 3D Bioprinted In Vitro Metastatic Models via Reconstruction of Tumor Microenvironments. *Adv Mater.* 31(10):1806899.
- Miller JS, Stevens KR, Yang MT, Baker BM, Nguyen DHT, Cohen DM, Toro E, Chen AA, Galie PA, Yu X, Chaturvedi, R, Bhatia SN & Chen CS (2012) Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat Mater.* 11(9):768-774.
- Miya M, Maeshima A, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiromura K, Yokoo H & Nojima Y (2011) Enhancement of in vitro human tubulogenesis by endothelial cell-derived factors: implications for in vivo tubular regeneration after injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 301(2):F387-F395.
- Murphy KC & Leach JK (2012) A reproducible, high throughput method for fabricating fibrin gels. *BMC Res Notes.* 5(1): 1.
- Nguyen DHT, Stapleton SC, Yang MT, Cha SS, Choi CK, Galie PA & Chen CS (2013) Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 110(17): 6712-6717.
- Organización Mundial de la Salud (octubre, 2019) ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares? (2019). Disponible en: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/)
- Pakala R, Liang CT, Benedict CR (2001) A peptide analogue of thrombin receptor-activating peptide inhibits thrombin and thrombin-receptor-activating peptide-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 37:619-629.
- Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN & L'heureux N (2012) The evolution of vascular tissue engineering and current state of the art. *Cells Tissues Organs.* 195(1-2):144-158.
- Pham QP, Sharma U & Mikos AG (2006) Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng.* 12(5):1197-1211.
- Raghavan S, Nelson CM, Baranski J, Lim E & Chen CS (2010) Geometrically controlled endothelial tubulogenesis in micropatterned gels. *Tissue Eng Part A.* 16(7):2255-2263.

- Ravi S & Chaikof EL (2010) Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med.* 5(1): 107-120.
- Rosenfeld D, Landau S, Shandalov Y, Raindel N, Freiman A, Shor E, Yaron & Levenberg, S. (2016) Morphogenesis of 3D vascular networks is regulated by tensile forces. *Proc Natl Acad.* 113(12):3215-3220.
- Ryu JH, Kim IK, Cho SW, Cho MC, Hwang KK, Piao H, Lim SH, Hong YS, Choi CY, Yoo KJ & Kim BS (2005) Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium. *Biomaterials.* 26(3):319-326.
- Salingova B, Madarasova M, Stejskal S, Tesarova L, Simara P & Koutna I (2014) From Endothelial Progenitor Cells to Tissue Engineering: How Far have we Come? *J Stem Cell Res Ther.* 4: 185..
- Schechner JS, Nath AK, Zheng L, Kluger MS, Hughes CC, Sierra-Honigmann MR, Lorber MI, Tellides G, Kashgarian M, Bothwell ALM & Pober JS (2000) In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Nat Acad.* 97(16): 9191-9196.
- Schöneberg J, De Lorenzi F, Theek B, Blaeser A, Rommel D, Kuehne AJ, Kiebling F & Fischer H (2018) Engineering biofunctional in vitro vessel models using a multilayer bioprinting technique. *Sci Rep.* 8(1):10430.
- Shin'oka, T, Imai Y & Ikada Y (2001) Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med.* 344, 532–533.
- Song HHG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER & Chen CS (2018) Vascular tissue engineering: progress, challenges, and clinical promise. *Cell stem cell,* 22(3):340-354.
- Sontheimer-Phelps A, Hassell BA & Ingber DE (2019) Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer.* 65-81.
- Syedain ZH, Meier LA, Bjork JW, Lee A, Tranquillo RT (2011) Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flow-stretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials.* 32: 714–722.
- Syedain ZH, Meier LA, Lahti MT, Johnson SL, and Tranquillo RT (2014) Implantation of completely biological engineered grafts following decellularization into the sheep femoral artery. *Tissue Eng.* 20:1726–1734.
- Takahashi K & Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126(4), 663-676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K & Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131(5): 861-872.

- Thottappillil N & Nair PD (2015) Scaffolds in vascular regeneration: current status. *Vasc Health Risk Manag.* 11, 79.
- Wang Y, Hu J, Jiao J, Liu Z, Zhou Z, Zhao C, Chang LJ, Chen YE, Ma PX & Yang, B (2014) Engineering vascular tissue with functional smooth muscle cells derived from human iPS cells and nanofibrous scaffolds. *Biomaterials.* 35(32):8960-969.
- Wang Z, Du Z, Chan JKY, Teoh SH, Thian ES & Hong M (2015) Direct laser microperforation of bioresponsive surface-patterned films with through-hole arrays for vascular tissue-engineering application. *ACS Biomater Sci Eng.* 1(12): 1239-1249.
- Weinberg CB & Bell (1986) A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science.* 231: 397-400.
- Winkelman MA & Dai G (2015) Engineer a functional, 3-D vascular niche to support neural stem cell regeneration. *In 2015 41st NEBEC, 1-2.*
- Ye Q, Zünd G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, Hubbell JA & Turina, M (2000) Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 17(5):587-591.
- Zhao H, Ma L, Zhou J, Mao Z, Gao C & Shen J (2007) Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomed Mater.* 3(1): 015001.
- Zheng L, Dengler TJ, Kluger MS, Madge LA, Schechner JS, Maher SE, & Bothwell AL (2000) Cytoprotection of human umbilical vein endothelial cells against apoptosis and CTL-mediated lysis provided by caspase-resistant Bcl-2 without alterations in growth or activation responses. *J Immunol.* 164(9): 4665-4671.