



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

División de Estudios de Posgrado

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE Departamento de Angiología y  
Cirugía Vascul ar

**“GENERACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS ARTIFICIALES POR INGENIERÍA DE TEJIDOS  
(VSPIT) CON NANOFIBRAS DE POLICAPROLACTONA Y FIBRINA CON CULTIVO DE  
CÉLULAS DE MÚSCULO LISO Y CÉLULAS ENDOTELIALES TRASPLANTADOS EN RATA  
COMO MODELO DE ESTUDIO”**

**TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL GRADO DE:  
ESPECIALISTA EN ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA VASCULAR**

PRESENTA:

**DR. MIGUEL ALFONSO PERAZA ARJONA**

Asesor de Tesis: Dr. Juan Miguel Rodríguez Trejo  
Profesor Titular del Curso: Ignacio Escotto Sánchez

MEXICO, D.F.

OCTUBRE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



---

**DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ**  
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN CENTRO MÉDICO NACIONAL  
20 DE NOVIEMBRE

---

**DR. JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ TREJO**  
ASESOR DE TESIS Y JEFE DEL SERVICIO DE ANGIOLOGÍA Y CIRUGÍA  
VASCULAR CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE

---

**DR. IGNACIO ESCOTTO SÁNCHEZ**  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO.

---

**DR. MIGUEL ALFONSO PERAZA ARJONA.**  
AUTOR

## INDICE

<i>Introducción</i>	4
<i>Antecedentes</i>	7
<i>Planteamiento del problema</i>	15
<i>Justificación</i>	16
<i>Hipótesis</i>	17
<i>Objetivo general</i>	17
<i>Objetivos específicos</i>	17
<i>Métodos</i>	17
<i>Resultados</i>	31
<i>Discusión</i>	40
<i>Conclusiones</i>	42
<i>Bibliografía</i>	43

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad arterial periférica (EAP) es una entidad caracterizada por la oclusión aterosclerótica de las extremidades inferiores y es uno de los retos más grandes del cirujano vascular, ya que, es un factor de riesgo mayor para la amputación de extremidades inferiores y un marcador potente de afectación aterosclerótica en otros territorios vasculares y de complicaciones tanto cerebrovasculares como coronarias.<sup>1</sup>

Se desconoce su prevalencia mundial<sup>2-3</sup>, pero se calcula que afecta a un 15-20% de los sujetos mayores de 70 años, si bien es probable que su prevalencia sea aún mayor si analizamos a los sujetos asintomáticos. En México no existe un estudio adecuado de la prevalencia e incidencia de esta enfermedad.

Los denominados factores de riesgo mayores son los que han sido determinados a partir de grandes estudios epidemiológicos y son concordantes con los factores de riesgo para enfermedad cerebrovascular y cardiopatía isquémica. Algunos estudios han confirmado que los factores de riesgo mayores (diabetes, hipertensión, tabaquismo e hiperlipemia) están implicados en un 80-90% de las enfermedades cardiovasculares.<sup>2</sup>

Desde el punto de vista fisiopatológico, la isquemia de los miembros inferiores puede clasificarse en funcional y crítica. La isquemia funcional ocurre cuando el flujo sanguíneo es normal en reposo, pero insuficiente durante el ejercicio, manifestándose clínicamente como claudicación intermitente. La isquemia crítica se produce cuando la reducción del flujo sanguíneo ocasiona un déficit de perfusión en reposo y se define por la presencia de dolor en reposo o lesiones tróficas en la extremidad.

Para el manejo de la enfermedad cardiovascular en general y específicamente la EAP en muchas ocasiones se encuentra indicado el realizar reconstrucciones vasculares, siendo el bypass con vena autóloga de elección<sup>4</sup> sin embargo hasta en el 30 % de los pacientes no se encontrará disponibilidad de vena, o será inadecuada por lo que existe una necesidad crucial de alternativas a la vena y arteria para realizar reconstrucciones

vasculares, Así mismo el uso de materiales sintéticos está limitado por la frecuencia de oclusiones de las prótesis de pequeño diámetro. Una alternativa sería un biomaterial diseñado por ingeniería de tejidos que se integrara al organismo y proveyera la capacidad de realizar la reconstrucción vascular.

La ingeniería de tejidos ha sido utilizada con éxito para la producción de tejidos y órganos in Vitro, mediante el cultivo y diferenciación de células en conjunto con el uso de biopolímeros como andamiajes y su aplicación terapéutica en medicina regenerativa, para el tratamiento de distintas enfermedades <sup>5,6</sup>). La idea de reemplazar órganos dañados o emplear constructos generados por ingeniería de tejidos, se basa en la creación de sustitutos 3D cada vez más complejos en los que además de lograr replicar estructuralmente algún órgano o tejido, se busca replicar su funcionalidad, siendo éste el objetivo principal de la ingeniería de tejidos <sup>7,8</sup>. Actualmente ya se han generado distintos modelos de órganos y tejidos in Vitro, como hueso, cartílago, piel, músculo y vasos sanguíneos, empleando como matriz extracelular algunos órganos descelularizados, hidrogeles e impresiones en 3D, los cuales puedan ser repoblados con células, sin embargo, no se ha conseguido el éxito esperado, por distintos factores como de compatibilidad e integridad del andamio<sup>9-12</sup>.

Debido a la creciente prevalencia de enfermedades cardiovasculares como la arteroesclerosis, se ha puesto un especial interés en la generación de sustitutos vasculares, que puedan suplir la función de un vaso sanguíneo <sup>13,14</sup>. Diversos grupos de trabajo se han enfocado en la búsqueda de materiales que puedan suplir la función vascular altamente compatibles que puedan proporcionar soporte y sean flexibles. Se han desarrollado varias técnicas como de autoensamblaje, impresión en platilla, separación de fases, hilado en húmedo, electrohilado y su combinación<sup>15-18</sup>.

Andamios generados por electrohilado, pueden estar conformados por fibras con diámetros que varíen en nanómetros y micrómetros, teniendo la capacidad de generar andamios compuestos por nanofibras que varíen de entre 50-500 nm de diámetro, asemejándose mucho a la matriz extracelular de forma natural <sup>19,20</sup>. Algunos de los polímeros más empleados para la fabricación de andamios por la técnica de electrohilado son Poly ( $\epsilon$ - caprolactona o PCL), poliuretano (PLT), polipropileno (PLP),

entre otros, los cuáles se ha demostrado son biocompatibles, sin embargo, también se han empleado polímeros naturales como seda, gelatina y elastina principalmente<sup>21-23</sup>.

Se ha observado que la mezcla de varios polímeros puede proporcionar mayor resistencia y durabilidad, que, empleando un solo tipo de polímero, siendo algunas de las combinaciones más empleadas a partir de gelatina/policaprolactona, polidioxano/elastina, colágeno/ elastina, entre otros <sup>24-26</sup>. Otros reportes han sugerido y realizado la integración de células al andamio tubulares con la finalidad de darle funcionalidad, dichas células han sido células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVECs del inglés "Human Umbilical Vein Endothelial Cells"), células de aorta bovina (BAEC del inglés "Bovine Aorta Endothelial Cells"), y células endoteliales de cerebro de rata (RCECs del inglés "Rat Cerebral Endothelial Cells") principalmente <sup>27-29</sup>.

Aunque existen reportes recientes de la aplicación clínica en humanos, sólo se ha logrado generar sustitutos vasculares de diámetros mayores a 6 mm, con células de músculo liso, células endoteliales y fibroblastos humanos, integradas, sin embargo, actualmente no existe un reporte exitoso para la generación de vasos sanguíneos de diámetros pequeños, estables y fisiológicamente funcionales <sup>30</sup>.

Los andamios de nanofibras presentan características útiles en la generación de tejidos: propiedades físicas; diámetros nanométricos; alta relación superficie / volumen cercana a la de los tejidos vivos; adhesión y crecimiento de las células vivas. Varios polímeros biocompatibles basados en poli (ácido láctico), poli ( $\epsilon$ -caprolactona), poli (carbonato-uretano) y colágeno se utilizan como andamios para la ingeniería de tejidos debido a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, así como la facilidad de procesamiento.

Generar vasos sanguíneos por ingeniería de tejidos ha sido todo un reto, de acuerdo a la complejidad de este tipo de órganos. El electrohilado resulta técnica muy útil y prometedora para la generación de vasos sanguíneos artificiales de acuerdo a que, nos permite generar fibras de polímeros inorgánicos bicompatibles, como la policaprolactona, y polímeros naturales como el colágeno y la gelatina, generando fibras de diámetros cercanos a los 50-500 nm semejantes a las que conforman de manera natural la matriz extracelular, en los vasos sanguíneos y que además permitan integrar en su superficie células endoteliales y de músculo liso, para proveer de

funcionalidad al andamio. El objetivo de este protocolo es demostrar la factibilidad de producción in Vitro de vasos sanguíneos por ingeniería de tejidos basado en el uso nanofibras de proteínas naturales y biopolímeros. En este protocolo se pretende 1) Estandarizar la generación de sustitutos vasculares de diámetro cercano a 1mm, por electrohilado, empleando policaprolactona y gelatina como polímeros. 2) Integrar células endoteliales y células de músculo liso en la superficie del andamio; 3) Generar un modelo murino en el que se reemplace una porción de arteria abdominal, por el sustituto vascular antes y después de integrar células en su superficie.

A diferencia de otros protocolos reportados en revistas internacionales, éste protocolo resulta ser innovador, puesto que se emplearán polímeros muy accesibles.

## **ANTECEDENTES**

### **Enfermedades Cardiovasculares**

La arterioesclerosis es una de las enfermedades cardiovasculares de mayor prevalencia; la cual se caracteriza por depósitos de lípidos, colesterol, células inflamatorias y elementos del tejido conectivo que se acumulan en la pared interior de una arteria. La estructura mas temprana en la arterioesclerosis, es la acumulación sub-endotelial de macrófagos y linfocitos T que forman una línea de grasa, que en conjunto con los macrófagos y lípidos extracelulares, forman un núcleo que esta rodeado por células del músculo liso y matriz de colágena<sup>31</sup>. Adicionalmente, una extra proliferación de las células del músculo liso da lugar a un incremento en la producción de la matriz extracelular y a la formación de tejido con una cubierta fibrosa que se superpone a un núcleo de lípidos y tejido necrótico, a lo cual se le conoce como placa de ateroma o placa ateromatosa.

El crecimiento continuo de células de músculo liso en la placa de ateroma puede bloquear el flujo sanguíneo hacia las arterias debido a la disminución gradual del espacio intraluminal. Aunado a ésto, la erosión endotelial puede resultar en la formación de un coagulo sanguíneo (trombo) en el sitio de ruptura de la placa de ateroma (Figura 1a). Algunas partes de la placa ateromatosa llamada émbolo, también

se pueden romper y causar infarto al corazón, infarto cerebral y embolia pulmonar debido a la oclusión total de un vaso sanguíneo.

### Tratamientos actuales para arteriosclerosis

La angioplastia es un método de tratamiento de invasión mínima para liberar a los vasos sanguíneos estenóticos u ocluidos. Este tratamiento se basa en el uso de un balón y posteriormente la posible colocación de “stent” expandible (autoexpandible o expandible por balón) que es un dispositivo de acero inoxidable de diferente diseño el cual es introducido en las arterias enfermas con la ayuda de un catéter. Un vez colocado el “stent” y el catéter en la arteria ateromatosa, el stent es expandido (despliegue o expansión por balón) y la placa ateromatosa empujada contra la pared de la arteria. El catéter es removido y el balón en caso de expansión por balón, dejando al “stent” permanentemente en el sitio actuando como un andamiaje estabilizador de la arteria (Figura 1b).



Figura 1 a) Arteria con placa ateromatosa b) Tratamiento con stent

Sin embargo, la expansión del “stent” es un proceso agresivo y puede causar daño en el tejido alrededor de la región del implante. El trauma de este tejido ha sido asociado con trombosis, inflamación, proliferación de la neoíntima y deposición de matriz extracelular e incluso ruptura del vaso enfermo<sup>32</sup>. Se ha comprobado que la respuesta al trauma es la causa de la reestenosis intra-stent (reducción del diámetro intra-stent) en un lapso de 3 a 6 meses en el 30% de pacientes sometidos a este tratamiento<sup>33,34</sup>. El principal mecanismo de la reestenosis intra-stent es la trombosis debido a daño de

tejido y a la presencia de superficies trombogénicas como el acero inoxidable. El segundo mecanismo de importancia en reestenosis intra-stent es la proliferación de la neoíntima dentro del stent, debido a la migración y proliferación de células del tejido de músculo liso aunado a la aumentada producción de matriz extracelular<sup>35</sup>.

Por otro lado, uno de los tratamientos quirúrgicos en el caso de arterias que presentan arterioesclerosis, sean coronarias o periféricas es la cirugía de bypass. En este caso normalmente se utiliza la vena safena del mismo paciente como sustituto de la arteria enferma (Figura 2). Este trasplante vascular autólogo, se realiza para desviar el flujo sanguíneo alrededor de la obstrucción por arterioesclerosis; sin embargo, en 30% de los pacientes, sobre todo de edad avanzada, con problemas renales y de diabetes entre otros, es difícil obtener las venas con suficiente diámetro o longitud para realizar el bypass e incluso obtener venas sin cambios patológicos. En estos casos, así como en casos de arteriosclerosis progresiva en los que el uso de un stent no es factible y la arteria tiene un daño mayor o incluso aneurisma, se ha propuesto el uso de injertos vasculares artificiales para reemplazar a las arterias. Sin embargo, se ha demostrado que la aplicación de materiales artificiales con pobre compatibilidad, induce una alta ocurrencia de re-estenosis y trombosis.



Figura 2. Bypass femoro-popliteo con injerto de vena safena reversa.

(Foto adquirida de caso clínico tratado en el servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Centro Médico Nacional 20 de Nov. )

## **Generación de vasos sanguíneos artificiales**

Ha existido un progreso considerable en el área de ingeniería de tejido vascular, desde que Weinberg y Bell reportaron en 1986 la construcción de un vaso sanguíneo a partir de colágena con cultivo de células endoteliales (CE) de la aorta de bovino, células de músculo liso (CML) y fibroblastos<sup>36</sup>. A pesar de lo novedoso de esta metodología, su aplicación in vivo no ha sido exitosa debido a que las características físicas - mecánicas (i.e. resistencia a presión normal de flujo sanguíneo) del vaso sanguíneo artificial fueron encontradas hasta 5 veces por debajo de las requeridas en una rata usada como modelo para trasplante de estos injertos vasculares producidos in vitro. La ingeniería de tejidos enfocada en el desarrollo de vasos sanguíneos humanos ha avanzado sustancialmente durante la década pasada, sin embargo aun es necesario perfeccionar diferentes aspectos como cuál es el biopolímero óptimo y cuales son las mejores células a utilizar para el exitoso implante de arterias producidas in vitro. Existen también otras limitantes que hacen aun más complejo el desarrollo de vasos sanguíneos por ingeniería de tejidos (VSpIT) como la diferencia en la vida promedio que presenta las células de donadores adultos mayores comparada con las células de donadores jóvenes.

La ingeniería de tejidos es un área de investigación científica que se ha desarrollado rápidamente y requiere la combinación de conocimientos en ciencias biológicas, ingeniería y medicina. Esta nueva área de investigación, ha sido utilizada con éxito para la producción de tejidos y órganos in vitro con aplicación terapéutica en medicina regenerativa<sup>6</sup>. El cultivo y diferenciación de células en conjunto con el uso de biopolímeros como andamiajes que dan soporte al crecimiento del tejido son partes fundamentales de la ingeniería de tejidos; y la aplicación clínica de estos órganos o tejidos producidos in vitro es conocida como medicina regenerativa<sup>5</sup>. Los polímeros seleccionados como soporte son generalmente biodegradables, frecuentemente utilizan compuestos que han sido aprobados para trasplantes humanos. Estos materiales pueden ser modificados químicamente para mejorar sus propiedades específicas de adhesión celular lo cual hace mas eficiente el crecimiento y desarrollo del tejido in vitro.

La aplicación de ingeniería de tejido tiene un alto potencial para el desarrollo de conductos vasculares trasplantables autólogos o alogénicos. De acuerdo al registro en USA, se realizan anualmente aproximadamente 1.4 millones de procedimientos quirúrgicos en los que se requieren injertos protésicos arteriales. La mayoría de las prótesis requeridas son de diámetros menores a 6 mm, para los cuales los materiales sintéticos no son generalmente útiles. Se ha propuesto el uso de arterias y venas autólogas, sin embargo no todos los pacientes poseen disponibilidad de las mismas para derivaciones arteriales y re-vascularización por cirugía. Por otro lado, se ha demostrado que el uso de la mayoría de los materiales sintéticos no ha sido exitoso en la formación e injerto de arterias de diámetros pequeños, por lo que la creación de un vaso sanguíneo sustituto es un objetivo importante a obtener en ingeniería de tejidos<sup>37</sup>. La generación de un vaso sanguíneo que sea biológica y funcionalmente comparable con los vasos sanguíneos originales es un enorme reto; aunado a esto, se debe considerar la edad y la diferencia de especies entre donador y receptor en el caso de trasplantes alogénicos. En la clínica, los pacientes con necesidades de trasplantes de vasos sanguíneos son generalmente adultos mayores que presentan cuadros de enfermedad cardiovascular, esto podría limitar la viabilidad y funcionalidad de las células de su sistema vascular<sup>12,38</sup>.

### **Materiales sintéticos como sustitutos de vasos sanguíneos**

Diversos grupos científicos alrededor del mundo, se han enfocado en la búsqueda de materiales para injerto vascular altamente compatibles que puedan proporcionar soporte y sean flexibles. Hasta ahora, la mayoría de los materiales propuestos están hechos de polímeros como: politetrafluoroetileno expandido (ePTFE), polietileno tereftalato o poliéster (PET, Dacron®) y poliuretano (PU)<sup>39</sup>. A pesar de que estos materiales tienen excelentes propiedades mecánicas y físicas, fueron originalmente diseñados para aplicaciones industriales y después fueron utilizadas en aplicaciones biomédicas<sup>40</sup>. Todos esos materiales se caracterizan por mayor o menor hemo-incompatibilidad, sin embargo, si estos materiales ya implantados entran en contacto con la sangre humana, el cuerpo produce una respuesta mayor de la activación de los mecanismos de defensa humoral y celular contra el material identificado como un

invasor disparando de este modo diferentes cascadas del sistema hemostático<sup>41</sup>. Se ha demostrado que injertos vasculares artificiales con un diámetro mayor a los 6 mm como los usados en posición aortica o iliaca pueden permanecer sin endotelio<sup>42</sup> y mantener permeabilidad por al menos 10 años debido al suficiente volumen de flujo sanguíneo<sup>43-47</sup>. Sin embargo existe una reacción hidrolítica en medio acuoso de los polímeros mencionados (i.e. poliéster) que degrada lentamente al injerto resultando en ruptura del vaso artificial como se muestra en el ejemplo de la Figura 3<sup>48</sup>.

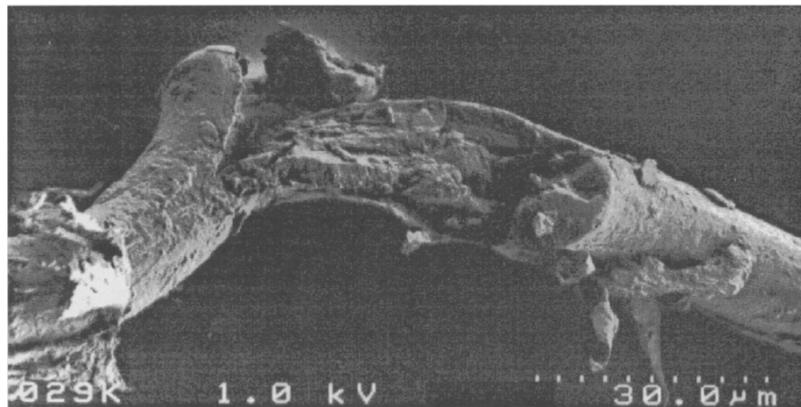


Figura 3. Injerto vascular de 13 años mostrando fractura en el centro de una vena iliaca artificial de poliéster (tomada de Riepe et al., 1997).

A pesar de los alentadores resultados en estudios clínicos a largo plazo utilizando materiales sintéticos como sustitutos de venas de diámetro relativamente mayor, la situación es completamente distinta cuando se analiza regiones más pequeñas del sistema vascular como las coronarias o las arterias periféricas (i.e. arterias tibiales) en donde el diámetro interno necesita ser menor de 5 mm. En este caso, principalmente la insuficiente hemo-compatibilidad de las superficies del injerto están asociadas con altas frecuencias de oclusión, rechazo y trombosis<sup>42</sup>.

### **Uso de electrospinning para generación de matrices tridimensionales**

Una de los principales objetivos de la ingeniería de tejidos, es el desarrollo de andamiajes o matrices tridimensionales para soportar la proliferación y el crecimiento celular dentro del mismo andamiaje. La meta es generar neo-tejidos in vitro que se puedan transplantar en humanos y lleven acabo las mismas funciones fisiológicas que

su contraparte original; para lograr lo anterior, la generación de andamiajes debe ser específica y mimética biológicamente en cuanto a estructura tridimensional. El andamiaje ideal debe satisfacer un número de requerimientos como: a) Niveles y tamaños apropiados de porosidad que permita la migración celular, b) suficiente área superficial y variedad de superficies químicas que aumenten la adhesión, el crecimiento, la migración y la diferenciación celular y c) que el andamiaje tenga una velocidad de biodegradación similar a la velocidad de regeneración del tejido natural deseado<sup>49</sup>.

Se han desarrollado un amplio número de matrices como soporte en ingeniería de tejidos, algunas de esas matrices sintéticas han demostrado potencial clínico, recientemente se ha retomado la producción de fibras microscópicas de diferentes biopolímeros generadas por la metodología de “electrospinning”<sup>50</sup>. El uso de estas fibras como andamiaje, ha demostrado poseer características físicas como permeabilidad muy similares a las matrices celulares naturales. La complejidad de las matrices producidas por el método de electrospinning les confiere ventajas muy significativas sobre otras técnicas, sin embargo aún es necesario realizar modificaciones a esta metodología antes de que estas matrices sean aplicadas in vivo, primero en animales modelo (ratas y cerdos) y posteriormente para pruebas clínicas en humanos. Las matrices producidas por la metodología de electrospinning pueden tener fibras con diámetros de micras o nanómetros dependiendo de los requerimientos. La mezcla de materiales sintéticos y naturales puede ser utilizada para eliminar complicaciones de respuesta inmune - rechazo o de transmisión de enfermedades por donador.

La técnica de electrospinning esta basada en la aplicación de una fuerza electrostática para generar la formación de nanofibras, estas fibras pueden ser colectadas en una superficie plana o de alguna otra geometría deseada<sup>51</sup> para formar un andamiaje específico (Figura 4). Esta metodología permite modular la superficie topográfica de las fibras individuales y/o la superficie topográfica total del andamiaje.

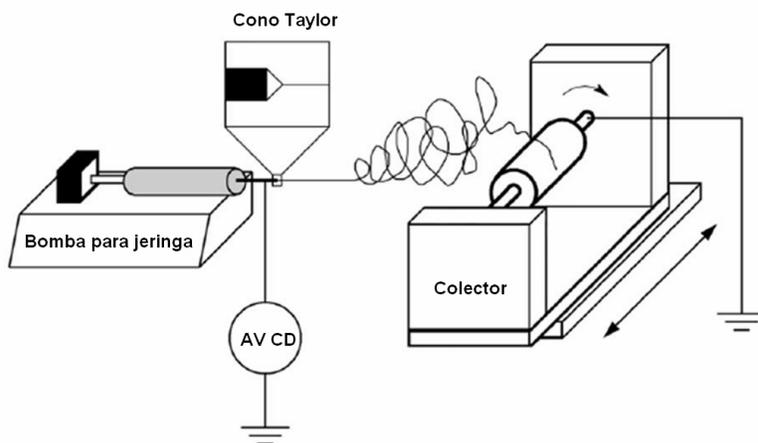


Figura 4. Representación gráfica de electrospinning. La suspensión del polímero o mezcla de polímero - proteína es liberada a una velocidad constante proporcionada por una bomba de jeringa. El aparato de alto voltaje (corriente directa) proporciona dirección y forma a las nanofibras. (Adaptado de Sill y Recum 2008).

Uno de los polímeros más utilizados para aplicaciones clínicas es la policaprolactona (PCL), ya que es un poliéster biodegradable por hidrólisis de sus uniones éster en condiciones fisiológicas. La PCL puede ser preparada utilizando catalizadores aniónicos o catiónicos para abrir el anillo  $\epsilon$ -caprolactona y formar el polímero (Figura 5).

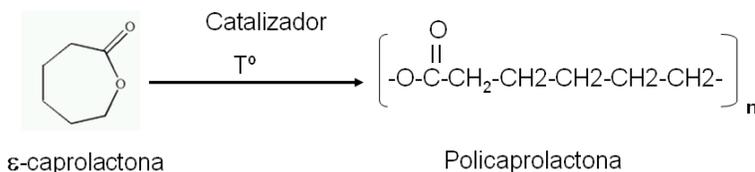


Figura 5. Polimerización de  $\epsilon$ -caprolactona a policaprolactona

La alta solubilidad de PCL, su bajo punto de fusión (alrededor de 60°C) y sus características de compatibilidad así como sus propiedades mecánicas, su facilidad de producción, de moldeamiento para formación de diferentes configuraciones geométricas, su fácil biodegradación e incluso la modulación de tamaño de poro que permite el crecimiento de tejido, han estimulado el uso de este polímero en investigaciones biomédicas incluyendo nano-esferas, nanofibras, fibras textiles cruzadas, y diversas geometrías moduladas con pulsos láser<sup>53-56</sup>. Adicionalmente, se pueden agregar diversos grupos funcionales a PCL con el fin de aumentar sus

características de adhesión, hidrofílicas o biocompatibles. La fibrina es una proteína fibrilar que se encuentra en la sangre en forma inactiva y tiene la capacidad de formar redes tridimensionales y agregados formando un coagulo blando. Esta proteína ha sido utilizada como matriz extracelular para aumentar la adhesión de las células en cultivo y como soporte en algunos intentos de producir vasos sanguíneos in vitro con resultados alentadores en la adhesión y proliferación celular pero con resultados negativos en características mecánicas y de difusión cuando se ha utilizado como único soporte<sup>57</sup>. En similar forma al colágeno, con la fibrina se pueden obtener altos índices de eficiencia de cultivo y de distribución homogénea de las células en cultivo; la fibrina también estimula a la síntesis de colágeno y elastina y ha mejorado las propiedades mecánicas de matrices tridimensionales utilizados en aplicaciones cardiovasculares <sup>58-60</sup>. La fibrina se puede obtener de fibrinógeno autólogo o alogénico y su biodegradación puede ser controlada por la adición de inhibidores fibrinolíticos como el ácido amino caproíco<sup>61</sup>.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La aterosclerosis es una de las enfermedades cardiovasculares de mayor prevalencia; la cual se caracteriza por depósitos de lípidos, colesterol, células inflamatorias y elementos del tejido conectivo que se acumulan en la pared interior de una arteria provocando una oclusión total o parcial de la misma. Uno de los tratamientos para la estenosis y/u oclusión de las arterias del organismo, es el bypass utilizando venas autólogas (por ejemplo la vena safena), sin embargo no todos los pacientes poseen disponibilidad de las mismas para re-vascularización por cirugía, mientras que el uso de venas alogénicas es muy limitado debido al reducido numero de donadores. De acuerdo a registros, tan solo en los Estados Unidos de Norteamérica, se realizan anualmente 1.4 millones de procedimientos quirúrgicos en los que se requieren prótesis arteriales, por lo que es importante contar con vasos sanguíneos artificiales disponibles que presenten características mecánicas y fisiológicas similares a los vasos sanguíneos naturales.

## JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son las primeras causas de muerte a nivel mundial e incluyen desordenes como infarto al miocardio y enfermedad arterial periférica que afectan al corazón y al sistema arterial, respectivamente. En el 2005, se estimó que 17 millones de personas murieron por enfermedades cardiovasculares, de las cuales 7.6 millones fueron secundarios a infartos del corazón y 5.7 millones a infarto cerebral ([www.who.int](http://www.who.int)). Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de incapacidad y su impacto económico es altísimo. Tan solo en Estados Unidos de Norte América (USA) se ha estimado que el costo anual es de \$449 mil millones de dólares<sup>62</sup>. Existe una evidente necesidad clínica de injertos vasculares de diámetros pequeños para su uso en medicina regenerativa a nivel mundial. Actualmente existen injertos vasculares sintéticos para vasos sanguíneos de diámetro relativamente mayores, sin embargo aún presentan dificultades como un limitado tiempo de vida así como también inmuno respuesta y rechazo en caso de entrar en contacto con el torrente sanguíneo. Recientemente se describió el resultado de una prueba clínica en humanos utilizando un vaso sanguíneo artificial de diámetro mayor a 6 mm formado de células de músculo liso, células endoteliales y fibroblastos humanos<sup>30</sup>. Sin embargo, a la fecha no hay un reporte exitoso para la generación de vasos sanguíneos de diámetros pequeños, estables y fisiológicamente funcionales, de tal manera que es una necesidad abordar lo anterior; por lo que proponemos este protocolo para la producción *in vitro* de vasos sanguíneos de 2 mm de diámetro con propiedades fisiológicas, físicas y mecánicas similares a vasos sanguíneos nativos de una rata usada como modelo de estudio. Se utilizará la rata ya que es el modelo universal de estudios *in vivo*. La generación *in vitro* de estos vasos sanguíneos esta basada en el uso de una matriz compuesta de nanofibras de un biopolímero biodegradable (policaprolactona) y de una proteína natural (fibrina) coadyuvante en la proliferación celular y la generación de matriz extracelular (principalmente colágeno), garantizando que los vasos sanguíneos generados en este protocolo serán potencialmente aplicable en trasplantes autólogos.

## **HIPÓTESIS**

Un vaso sanguíneo artificial, producido mediante el uso de una matriz compuesta de nanofibras de policaprolactona y fibrina, será estructural y funcionalmente similar a un vaso sanguíneo natural en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar la factibilidad de producción *in vitro* de vasos sanguíneos por ingeniería de tejidos basado en el uso nanofibras de proteínas naturales y biopolímeros.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Diseñar y producir una estructura tubular estable de fibrina y policaprolactona para ser utilizada como andamiaje en la generación de vasos sanguíneos *in vitro*.
2. Modular el diámetro de las fibras nanométricas de cada uno de los componentes del andamiaje y determinar su influencia en las características físicas y mecánicas finales del andamiaje.
3. Implantar el vaso sanguíneo artificial en un grupo de ratas Wistar como modelo de estudio. Realizar evaluación a las 4, 6 y 8 semanas.
4. Evaluar la biocompatibilidad y degradación del andamio vascular, implantado en las ratas, a las 4, 6 y 8 semanas.
5. Evaluar la permeabilidad del andamio vascular, implantado en las ratas, a las 4, 6 y 8 semanas.

## **METODOLOGÍA**

### **Criterios de inclusión.**

Ratas Wistar de variedad, peso y sexo indicado con certificado de salud

### **Criterios de exclusión.**

Ratas que presenten hematomas o infecciones.

### **Criterios de eliminación.**

Ratas que mueran ante de la fecha establecida para la finalización del estudio post trasplante.

### **Tamaño de muestra para análisis de vasos sanguíneos artificiales**

Se utilizaron tres vasos sanguíneos artificiales producidos *in Vitro* por electrohilado los vasos sanguíneos fueron realizados mediante un método estandarizado en el laboratorio de medicina regenerativa, para la generación de nanofibras estables.

### **Tamaño de muestra para evaluación de bio-funcionalidad in Vivo de lo vasos sanguíneos artificiales**

Se llevó a cabo un estudio transversal, prospectivo y comparativo, utilizando 3 ratas Wistar machos de peso estimado entre 250 – 300 g, manejadas siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-Z00-1999, la cual refiere a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se alojaron en la Unidad de Transito de Biológicos del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, con una temperatura de 21°C, humedad relativa entre 40 -60% y 12:12 horas luz–oscuridad. Para su anestesia se usó dietiléter y durante el post operatorio, se les administró Metamizol Sódico como analgésico y Ampicilina como antibiótico. Al final del proyecto se sacrificaron por medio de sobredosis de pentobarbital (60 mg/kg) vía intraperitoneal.

A éste grupo de 3 ratas se les colocó el andamiaje tubular de nanofibras sustituyendo a un segmento de 8 mm aproximadamente de aorta infrarrenal abdominal, en distintos tiempos. La primer rata permaneció por 2 meses, hasta su eutanasia, así mismo la segunda por 1 mes y la última por 1 mes ½.

### **Para optimización de derivación de producción de vasos sanguíneos artificiales:**

Se empleó un equipamiento que permitió por electrohilado generar nanofibras modulando la dispersión de la mezcla de polímero – proteína, controlando el tiempo de

electrohilado y el voltaje principalmente, para lograr producir un sustituto vascular de 1 mm de diámetro aproximadamente.

**Para el implante en ratas como modelo de estudio:**

Se emplearon ratas de la cepa Wistar, para evaluar la biocompatibilidad, resistencia, biodegradación y funcionalidad del sustituto vascular, antes de cultivar las células endoteliales y de músculo liso en su superficie, para este fin se realizó una anastomosis de la aorta abdominal.

**Universo de trabajo:**

Sustitutos vasculares de Fibrina/ Policaprolactona, generados por electrohilado y ratas de la cepa Wistar en las que se integró e injertó el andamio.

**Tiempo de ejecución:**

24 meses divididos en 2 etapas de 12 meses cada una:

ETAPA 1: Se Identificó las condiciones adecuadas para la generación del sustituto vascular por electrohilado.

ETAPA 2: Evaluación de la biocompatibilidad, resistencia, biodegradación y funcionalidad del sustituto vascular realizando una anastomosis de la aorta abdominal en ratas Wistar.

**Definición del grupo control:**

Grupo Control Negativo: A un grupo de 3 ratas se les colocó el andamiaje tubular de nanofibras sustituyendo a un segmento de 8 mm aproximadamente de aorta infrarrenal abdominal.

**Técnica.**

**Fabricación del andamiaje tubular para vasos sanguíneos artificiales**

Los andamiajes vasculares fueron fabricados por el método de electrospinning utilizando una proporción 1:1 (peso/peso) del polímero policaprolactona (Lactel Absorbable polymers, Pelham AL, USA) y fibrina (F5386-1G, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) disueltos en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolol (99%) (HFP, Sigma-Aldrich,

St Louis, MO, USA). El equipo de electrospinning incluyó una bomba de jeringa, un equipo suministrador de alto voltaje y una base colectora-rotatoria para coleccionar las fibras (Equipo de NaBond, Honk Kong). La solución de PCL/fibrina fue liberada con una jeringa por medio del uso de una bomba de jeringa a un flujo constante de entre 1 y 2 mL/h. La base colectora fue de acero inoxidable de 2 mm de diámetro, 10 cm de longitud y fue colocada en una base rotatoria. La velocidad de rotación de la base colectora fue investigada entre 700 – 1000 rpm. La distancia entre la jeringa y la base rotatoria fue de 10 cm y el voltaje fue modulado alrededor de 20 kV para poder coleccionar las nanofibras en la base rotatoria hasta lograr un andamiaje tubular de 2 mm de espesor. Los valores de velocidad de flujo de la bomba de jeringa y la velocidad rotatoria del colector se propusieron de acuerdo a valores utilizados en protocolos de investigación similares reportados en la literatura<sup>63,64</sup>. Se seleccionaron las velocidades que resultaron en una conformación óptima y homogénea en el alineamiento de las nanofibras de fibrina y policaprolactona. Una vez que los andamiajes estuvieron terminados, estos fueron expuestos al vapor de una solución de 2.5% de glutaraldeido durante 6 horas para garantizar mayor adherencia de las nanofibras, así como aumentar la estabilidad y dureza del andamiaje. Dos andamios se esterilizaron manera química en PBS + antibiótico al 4% + mertiolate® blanco y un andamio además se esterilizó en gas con óxido de etileno.

### **Trasplante de Vasos sanguíneos artificiales en rata para evaluar bio-funcionalidad *in Vivo***

Los vasos sanguíneos artificiales basados en el uso de un andamiaje de nanofibras de policaprolactona y fibrina revestidos de célula de músculo liso y de células endoteliales se trasplantaron en ratas como modelo de estudio de funcionalidad *in Vivo*. Los vasos artificiales se trasplantaron en ratas Wistar macho de entre 250 y 300 g de peso bajo anestesia general, siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-Z00-1999, la cual refiere a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Utilizando técnicas de microcirugía estándar, se realizó una laparotomía media localizando y disecando la aorta infrarenal abdominal, de donde un segmento de 8 mm fue seccionado. Con el propósito de evaluar la bio-

funcionalidad de los vasos sanguíneos artificiales, fue necesario trabajar con varios grupos de rata diseñados de la siguiente forma: a) en un grupo de 3 ratas se colocó el andamiaje tubular de nanofibras sustituyendo al segmento de 8 mm de aorta infrarenal abdominal (control negativo), en otro grupo de 3 ratas se colocó un vaso sanguíneo artificial (grupo experimental), en otro grupo de 3 ratas se diseccionó la aorta infrarenal abdominal y se colocó en forma invertida (grupo control), se utilizó un grupo de 3 ratas sin microcirugía ni injerto como grupo control positivo. Se evaluó la medición en tiempo real de flujo sanguíneo por la técnica arteriografía a las 4 semanas en cada una de las ratas. En la cuarta semana, las ratas del grupo en el que se injertaron los vasos sanguíneos artificiales fueron sacrificadas para realizar análisis inmunocitoquímico de los injertos artificiales con la finalidad de evaluar cambios morfológicos y en el fenotipo celular.

#### **Técnica de Laparotomía exploratoria, anastomosis vascular e implantación del andamio vascular en aorta abdominal en modelo murino:**

Se realizó una modificación a la técnica previamente descrita por Padilla - Sanchez y cols en 1987<sup>65</sup>, la cual consistía en una anastomosis termino-terminal en aorta nativa de la rata, siendo en esta ocasión una anastomosis aorta-andamio-aorta término terminal.

- Bajo sedoanalgesia con dietiléter, asepsia y antisepsia con jabón quirúrgico. Tricotomía abdominal, colocación de campos estériles.
- Se colocó andamio vascular en solución fisiológica más Mertiolate® blanco (50/50 v/v).
- Se realizó laparotomía exploratoria a la rata, iniciando con una incisión xifopública en línea media, posteriormente se disecciona por planos.
- Se evisceró e hidrató retroperitoneo con solución fisiológica.
- Se procedió a realizar disección de la aorta abdominal en su porción infrarrenal, separación de la vena cava y colocación de referencias vasculares con seda libre 4-0 proximal y distal a nivel infrarrenal y bifurcación aórtica respectivamente.

- Se colocó microclamp aortico, se realizó sección de 8 mm de la aorta y se procedió a preparar andamio vascular, retirando la solución previa e irrigando con solución heparinizada (4 mls de solución fisiológica con 1 ml de heparina cálcica de 1000 UI por ml).
- Se realizó anastomosis proximal de cara anterior de la aorta nativa al injerto vascular con Prolene® vascular 10-0, iniciando por los bordes y posteriormente el centro, se continuó con anastomosis distal del injerto vascular a la cara anterior de la aorta distal con Prolene® vascular 10-0 iniciando con los postes y finalmente la parte central.
- Se giró la aorta en bloque junto con el microclamp vascular, se aproximaron los bordes y se realizó anastomosis proximal en cara posterior de la aorta nativa al injerto vascular con Prolene® vascular 10-0, iniciando por los bordes y posteriormente el centro, se continuó con anastomosis distal del injerto vascular a la cara posterior de la aorta distal con Prolene® vascular 10-0 en el mismo sentido.
- Se corroboró hemostasia durante 7 minutos con compresión a través de un hisopo.
- Finalmente se colocaron visceras en su lugar y se procedió al cierre por planos. Se aplicó analgésico (Metamizol Sódico) y antibiótico ( Ampicilina).

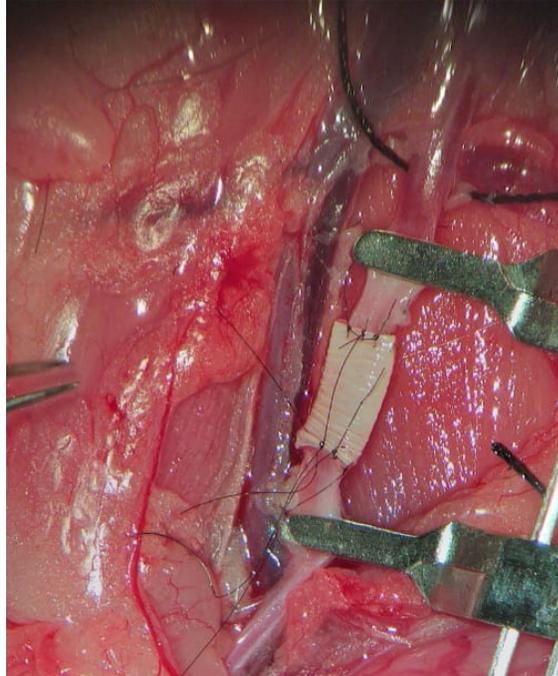


Figura 6: Realización de anastomosis aorta nativa – andamio - aorta nativa en Rata 1.

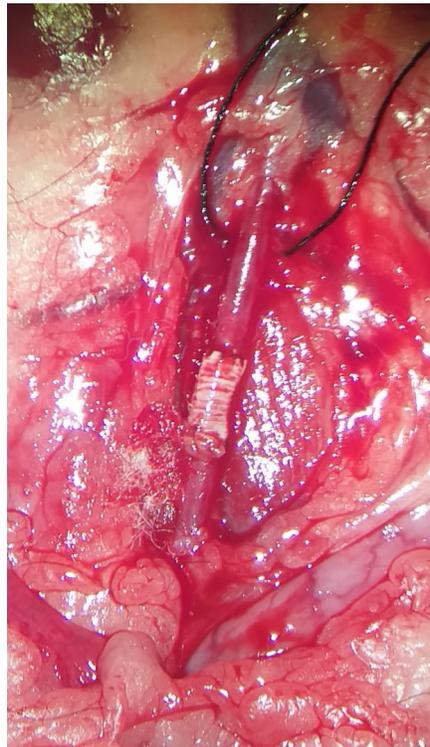


Figura 7: Anastomosis aorta – andamio - aorta en Rata 1.

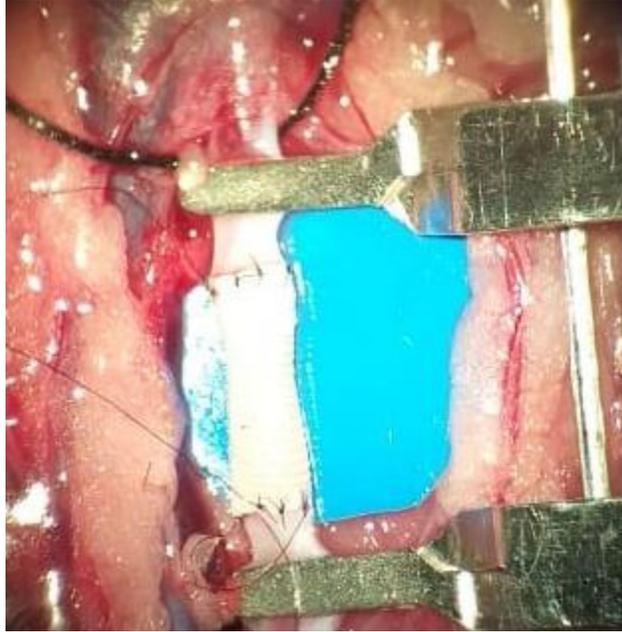


Figura 8: Realización de anastomosis aorta nativa – andamio - aorta nativa en Rata 2.

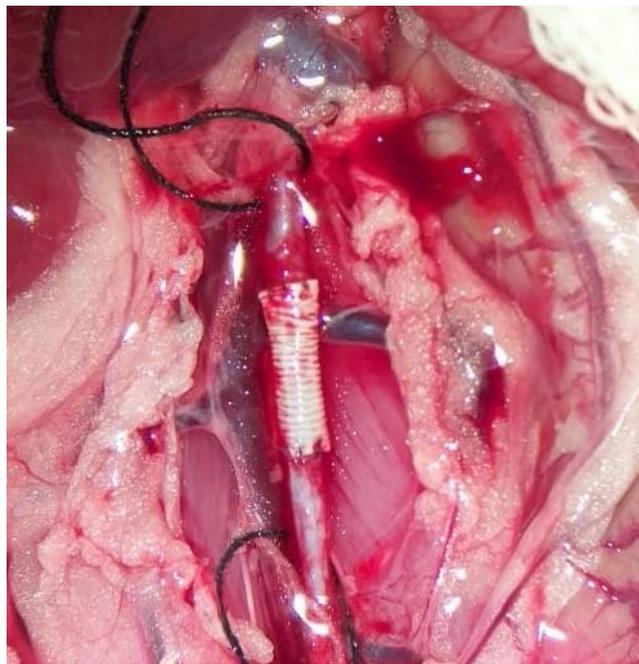


Figura 9: anastomosis aorta – andamio - aorta en Rata 2.

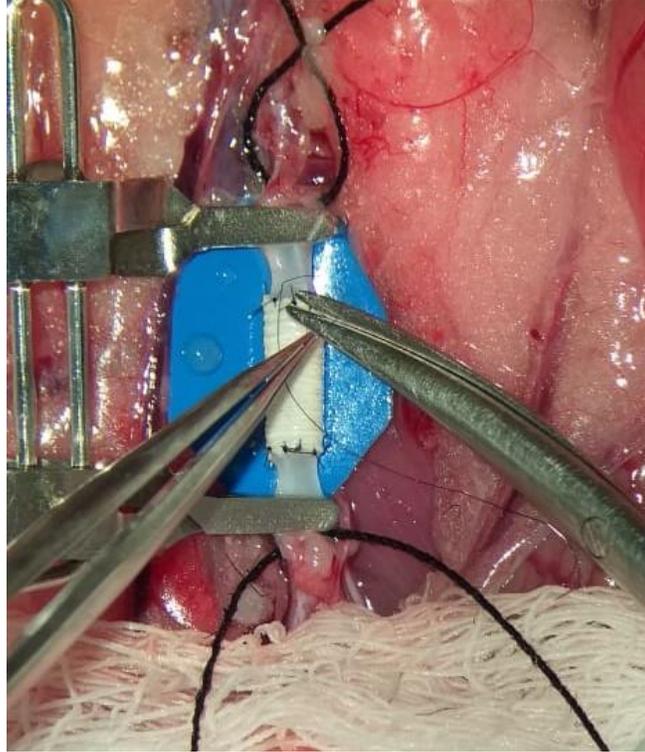


Figura 10: Realización de anastomosis aorta nativa – andamio - aorta nativa en Rata 3.

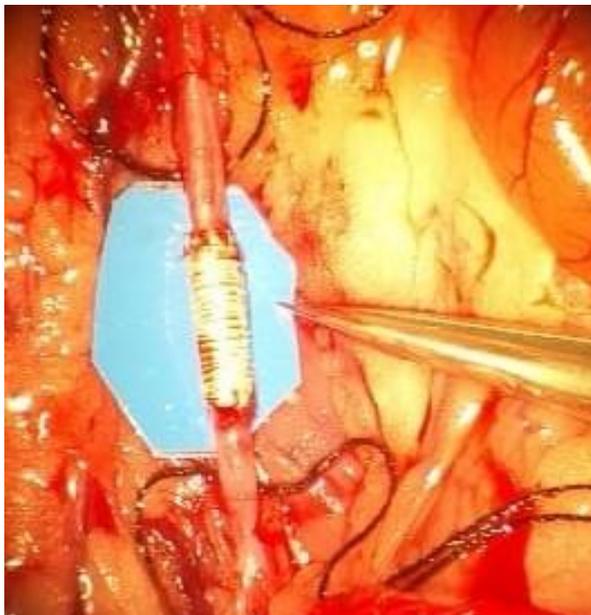


Figura 11: Anastomosis aorta – andamio - aorta en Rata 3.

**Técnica de arteriografía, sacrificio y toma de muestras:**

Se realizó una modificación a la técnica previamente descrita por Padilla - Sanchez y cols en 2014<sup>66</sup>, la cual consistía en una técnica para evaluar neovascularización o angiogénesis experimental en la extremidad de la rata.

- Se realizó laparotomía en línea media abdominal con extensión hacia tórax, se disecó la aorta torácica y la aorta abdominal y se colocaron 2 riendas a nivel de aorta torácica.
- Se anudó la rienda superior y se realizó arteriotomía.
- Por medio de una jeringa con aguja 21G se heparinizó la rata de forma sistémica con 20 mL de solución salina y 0.2 mL de heparina 1:100.
- Se introdujo un catéter de polietileno calibre 0.060 previamente adelgazado con calor desde aorta torácica hacia aorta abdominal y se anudó la rienda inferior para evitar que el catéter se mueva o salga. Asimismo, se unieron las ligaduras superior e inferior.
- Se llevó a la rata a sala de fluoroscopia y se procedió a realizar inyección de 10 mls de medio de contraste através de cateter de polietileno. Se realizó arteriografía.
- Posteriormente se sacrificó la rata con sobredosis de pentobarbital intraabdominal.
- Finalmente se procedió a toma de muestras tanto del andamio vascular, como aorta toracica, aorta suprarrenal e iliaca izquierda.

#### **Técnica de procesamiento de muestras:**

Posterior a la obtención de las muestras, se procede a su transporte.

- Una vez colocado cada una de las muestras en PBS antibiótico-antimicótico 1% se transporta en una hielera en frío y se lleva al laboratorio de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.
- Se lava dos veces en PBS y se almacena en PBS antibiótico-antimicótico al 1% a - 20 °C hasta procesar las muestras.

Posterior al lavado, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se procedió a la inclusión de las muestras en parafina.

- Lo primero que se realizó fue la deshidratación del tejido para lo cual se necesitó hacer los cortes transversal y longitudinal de acuerdo a la muestra.
- Se depositó el cassette en 3ml de SAFEFIX por 10 min.
- Posterior a esto se procedió a colocar cada tejido en un cassette de inclusión y depositarlo en un frasco de etanol al 50% toda la noche .
- El tejido fue cambiado a alcohol al 70%, 80%, 90% y 100% en agitación por 30 min.
- Después el tejido se colocó en una solución Xileno-Alcohol 1:1 por 30 min en agitación.
- El tejido fue cambiado a una solución Xileno-Parafina 1:1 por 30 min a 60°C
- Posteriormente se cambió a una solución Xileno 100% por 10 min a 60°C
- El tejido fue cambiado nuevamente a solución Xileno-Parafina 1:1 por 30 min a 60°C
- Finalmente se pasó a una solución de parafina al 100% por 2 horas a 60°C

Posterior a la inclusión en parafina, se procedió a realizar los cortes de los tejidos en microtomo, para proceder a las pruebas inmunohistoquímicas.



Figura 12: Deshidratación del Tejido en las muestras tomadas de R1.



Figura 13: Inclusión de los tejidos de las muestras de R2 en parafina.



Figura 14: Corte de los tejidos de las muestras tomadas de R1 ya incluidos en parafina.

#### **Técnica de inmunohistoquímica:**

Para la tinción por Hematoxilina y eosina, se siguió el siguiente procedimiento:

- Xilol por 3 minutos para desparafinar.
- Hidratación en baños decreciente de alcohol:
- Alcohol absoluto 100% por 3 minutos
- Alcohol absoluto 100% por 3 minutos
- Alcohol al 95% por 3 minutos
- Alcohol al 95% por 3 minutos
- Alcohol al 70 % por 3 minutos
- Agua corriente por 5 minutos
- Agua destilada (2 baños) por 1 minuto (cada uno)

- Sumergir en hematoxilina a lumínica de Harris por 5 minutos
- Dos lavados de 1 minuto con agua destilada
- Diferenciar usando alcohol ácido y lavar con agua corriente por 2 minutos
- Virar empleando bicarbonato de sodio al 2%, lavando en agua corriente por 5 minutos y dos baños de agua destilada por 1 minuto cada uno.
- Sumergir en éste punto eosina durante 5 minutos.
- Deshidratar en baños decrecientes de:
  - Alcohol al 70% por 1 minutos
  - Alcohol al 95% por 1 minutos
  - Alcohol al 95 % por 1 minutos
  - Alcohol absoluto 100% por 1 minutos
  - Alcohol absoluto 100% por 2 minutos
- La aclaración se realizó empleando xilol por 1 minuto y después por 2 minutos
- El montaje se realizó empleando una resina sintética, para sellar el tejido teñido con el cubreobjetos.

#### **Análisis de inmunohistoquímica**

El análisis del tejido se realizó empleando un microscopio óptico, para identificar la presencia o ausencia de células, como prueba de la biocompatibilidad del tejido.

#### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

No fue necesario realizar un análisis estadístico, debido a que los resultados obtenidos son netamente cualitativos.

#### **ASPECTOS ÉTICOS**

Este protocolo de investigación estuvo diseñado para animales de laboratorio, por lo que no involucra riesgos ni peligros para el paciente. Las ratas Wistar machos de peso estimado entre 250 – 300 gramos fueron manejadas siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-Z00-1999, la cual se refiere a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

## **CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD**

Se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones de bioseguridad:

1. Lavado de manos antes y después de cada procedimiento.
2. Ventilación e iluminación adecuada de ambientes.
3. Uso de guantes, mascarillas, batas y lentes protectores.
4. Desinfección y esterilización de instrumental.
5. Manejo apropiado de material punzo cortante.
6. Limpieza y descontaminación de ambientes, muebles e implementos utilizados.
7. Manejo y eliminación segura de los desechos químicos y biológicos.
8. Prevención y atención de accidentes ocupacionales.

El presente trabajo se realizó con animales de experimentación y todos los procedimientos se realizaron bajo las disposiciones contenidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y La Ley General de Salud.

La investigación se consideró de riesgo mínimo. En la fase experimental los animales fueron manipulados por personal con experiencia en el área, manteniendo medidas de seguridad respecto al manejo de animales y uso de sustancias para la anestesia. El investigador principal pudo suspender y modificar el curso la investigación al advertir algún riesgo o daño adicional en los animales de experimentación.

Para la protección del personal durante el trabajo con animales de laboratorio, fue necesario utilizar equipo de protección para la salud personal.

Por las características propias del quirófano, esta debió ser un área en donde la presencia de contaminación fuera mínima, se tomaron medidas de bioseguridad dentro y fuera del quirófano, así como en las áreas de mantenimiento de los biológicos, para protección de los investigadores según las Normas Oficiales. Los procedimientos experimentales descritos en este protocolo involucraron el manejo de muestras biológicas; por lo que las medidas de bioseguridad generales incluyeron el uso de barreras físicas tales como bata de laboratorio, guantes de nitrilo, uso de gabinetes de seguridad biológica durante el manejo y disposición de muestras biológicas. Los materiales plásticos que tuvieron contacto con las muestras biológicas, así como

objetos punzo cortantes y residuos biológicos fueron manejados hasta su disposición final de acuerdo a lo que indica la NOM-087-ECOL-SSA1-2002; que refiere a la norma para clasificación y especificaciones de manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos. El animal sacrificado fue recogido por personal de la compañía que realiza la venta del mismo, para su posterior incineración en sus instalaciones.

## RESULTADOS

Se realizaron 3 andamios vasculares de policaprolactona con fibrina, todos con dos capas. Para la realización del polímero se procedió primero a tomar 14 mls de HFP y 6 mls de ácido acético, posteriormente se prepararon 2 concentraciones de policaprolactona / fibrina al 5% y 10%, colocando en un tubo falcon 500 mgs de policaprolactona con 500 mgs de fibrina y en otro tubo falcon 250 mgs de policaprolactona con 250 mg de fibrina, finalmente cada tubo se llevó a 10 mls con la solución preparada de HFP + ácido acético, se protegieron ambos tubos con aluminio y se dejaron durante la noche en agitador.



Figura 15: Agitador con ambos tubos falcon protegidos por aluminio.

Una vez obtenido el polímero se realizó el andamio en la máquina de electrohilado. La primera capa se realizó con los siguientes parámetros: polímero 5%, revoluciones

2,500 rpm, voltaje 25 kV, distancia de 10 cms, flujo de 0.1 ml/hr, durante un tiempo de 20 minutos.

La segunda capa se realizó con parámetros de polímero 10%, revoluciones 1,500 rpm, voltaje 21 kV, distancia de 8 cms, flujo de 0.2 ml/hr, durante un tiempo de 30 minutos.



Figura 16: Equipamiento de Electrohilado.

Dos andamios se esterilizaron únicamente de manera química en PBS + antibiótico al 4% + mertiolate® blanco y un andamio (R3) además se esterilizó a través de una pipeta de pasteur en gas con óxido de etileno.

Se procedió a realizar la laparotomía exploratoria, anastomosis e implantación del andamio vascular en la aorta abdominal de 3 ratas (R1,R2 y R3) de acuerdo a la técnica descrita previamente en metodología. El tiempo quirúrgico promedio fue de 45 minutos (60 minutos para R1, 45 minutos para R2 y 30 minutos para R3). Se observó que la medida del andamio en promedio fue de 2.3 mms de diámetro por 7 mms de largo ( R1: 3x6mm, R2: 2x7mm y R3: 2x8mm) .

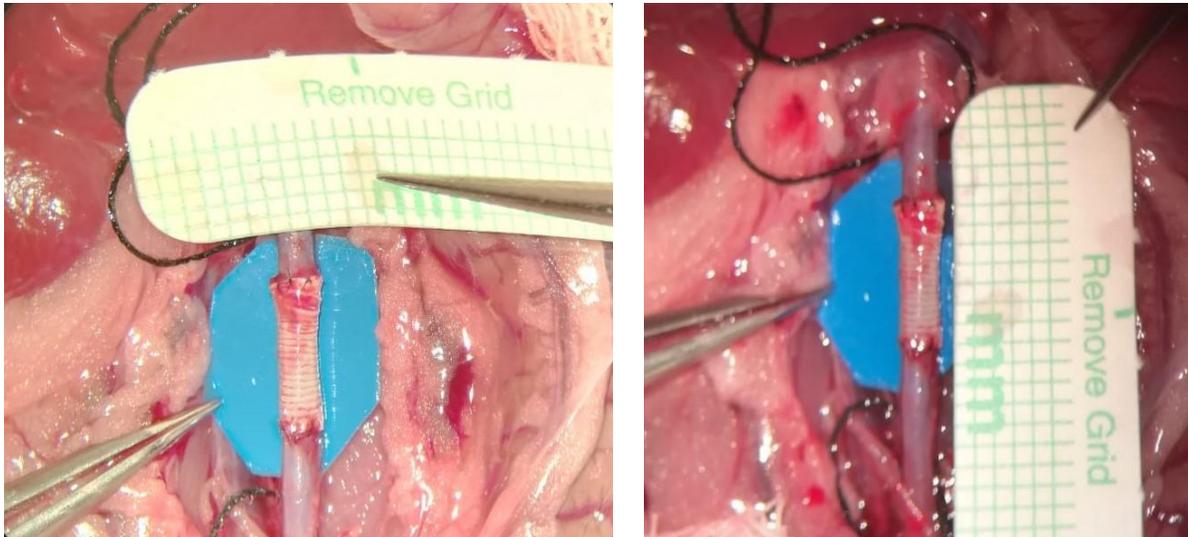


Figura 17: Medidas del andamio anastomosado en R2.

Se observó tranquirúrgicamente que el andamio esterilizado en gas con óxido de etileno (R3) tenía mejor consistencia, con mejor compliancia y distensibilidad. Fue más fácil su manejo transoperatorio comparado con los otros dos andamios esterilizados únicamente de manera química.

Se realizó vigilancia durante 2 meses a R1 y durante 1 mes a R2 y R3. Los primeros 3 días se les aplicó analgesia posquirúrgica a todos a base de Metamizol Sódico y antibioticoterapia a base de Ampicilina.

Concluido el tiempo de vigilancia, se procedió a realizar la arteriografía de control más sacrificio de los modelos y toma de muestras para inmunocitoquímico de acuerdo a la técnica descrita en metodología.

Al momento de realizar la laparotomía exploratoria abdominal con extensión a tórax en R1, habiendo pasado 2 meses desde el momento del implante, se observó degeneración aneurismática del andamio vascular, con ausencia de flujo arterial distal a la anastomosis andamio-aorta nativa, por lo que se procedió a la arteriografía de acuerdo a la técnica descrita previamente corroborando la presencia del aneurisma infrarrenal y ausencia de paso de medio de contraste hacia arterias iliacas. Posterior al procedimiento endovascular, se sacrificó el modelo y se transportaron las muestras tanto del andamio vascular como de la aorta suprarrenal, tórax e iliaca izquierda al laboratorio de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos para su procesamiento,

deshidratación, inclusión en parafina y cortes inmunohistoquímicos de acuerdo a lo descrito previamente en metodología.

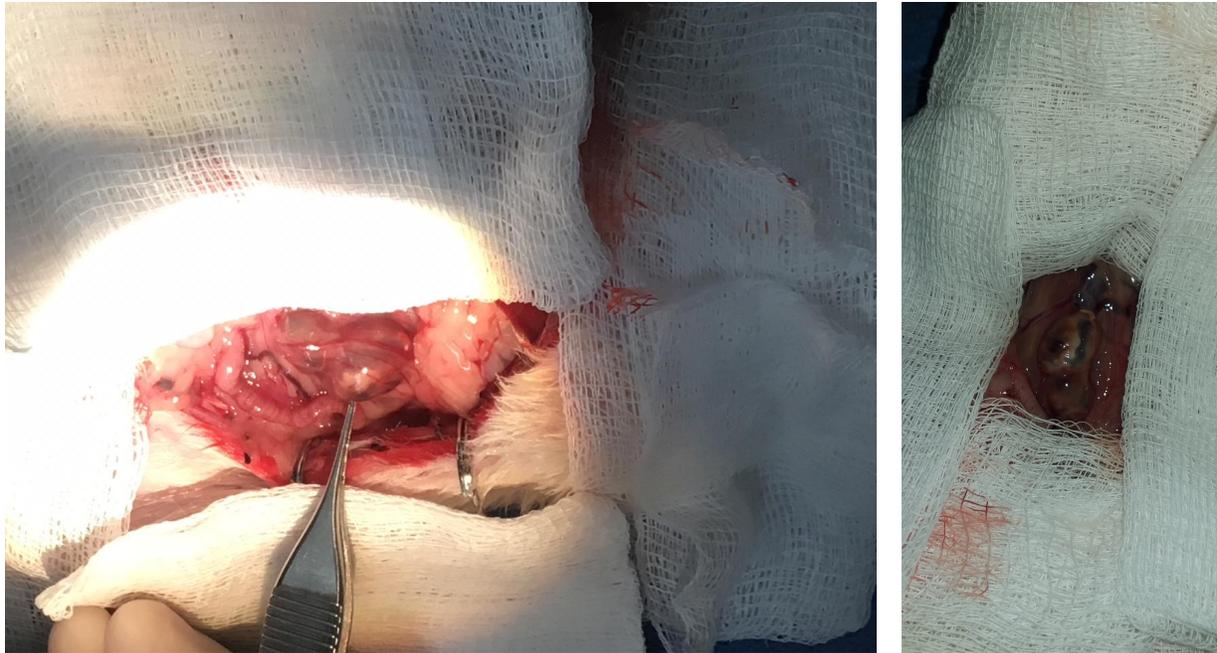


Figura 18: Degeneración aneurismática del andamio en modelo R1 observada durante la laparotomía exploratoria con extensión a tórax.



Figura 19: Arteriografía del modelo R1, donde se observa degeneración aneurismática y ausencia del paso de medio de contraste hacia arterias ilíacas.



Figura 20: Toma de muestra del andamio aneurismático, previo a su envío al laboratorio de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos para su procesamiento inmunohistoquímico.

Se realizó laparotomía exploratoria abdominal con extensión a tórax en los modelos R2 y R3 al mes de seguimiento posquirúrgico de acuerdo a la técnica descrita previamente, observando en ambos modelos integridad del andamio, sin degeneración aneurismática y con flujo presente posterior a la anastomosis distal andamio - aorta nativa.



Figura 21: Andamio en modelo R2 integro y permeable observado durante la laparotomía exploratoria abdominal con extensión a tórax.

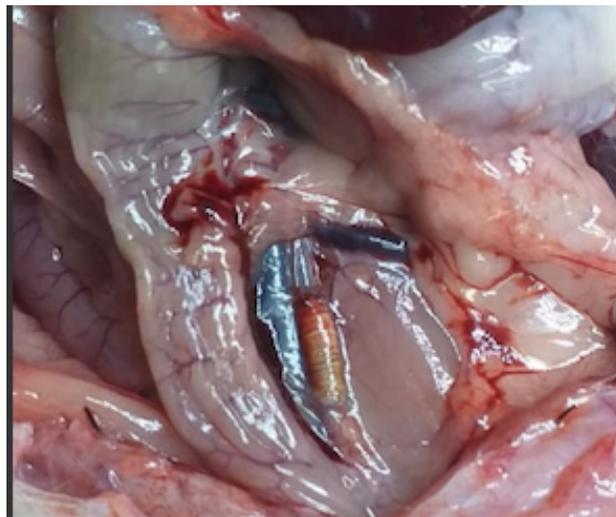


Figura 22: Andamio en modelo R3 integro y permeable observado durante la laparotomía exploratoria abdominal con extensión a tórax

Posterior a la laparotomía exploratoria, se realizó arteriografía de control en ambos modelos murinos de acuerdo a la técnica en metodología, pero, con una modificación transquirúrgica que consistió en punción directa con aguja de insulina e infusión del

medio de contraste en aorta abdominal corroborando adecuado paso de medio de contraste a través del andamio vascular y hacia distal, sin datos de fuga, sin pseudoaneurisma ni degeneración aneurismática.

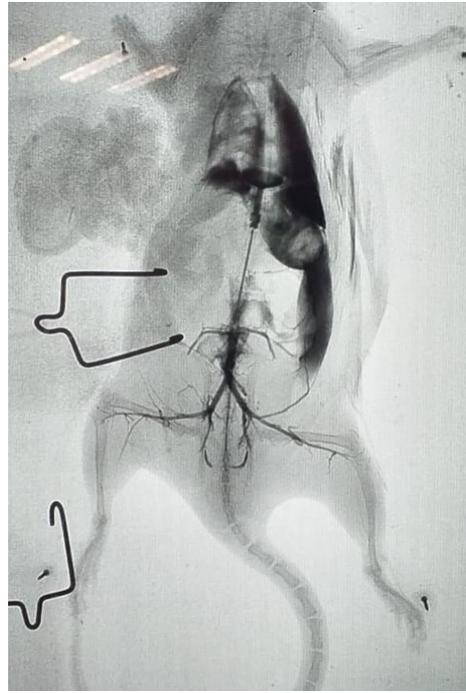


Figura 23: Arteriografía de R2 con permeabilidad del andamio vascular, paso de medio de contraste hacia arterias iliacas.

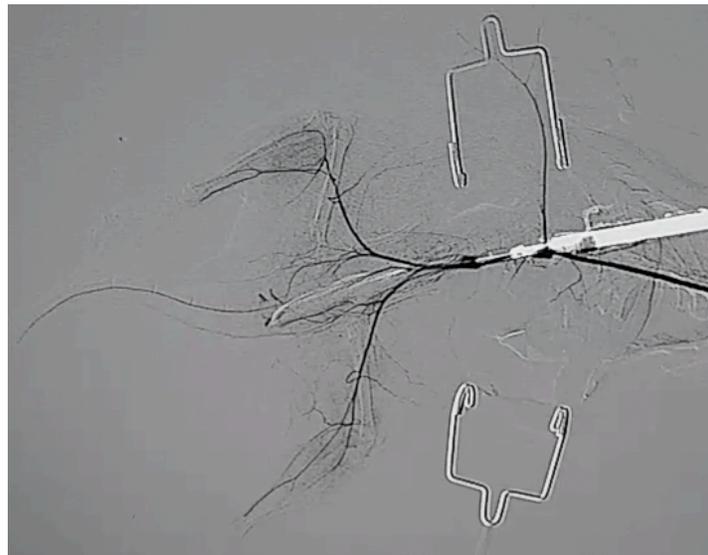


Figura 24: Arteriografía de R3 con permeabilidad del andamio vascular, paso de medio de contraste hacia arterias iliacas.

Posterior a ambos procedimientos endovasculares, se sacrificó a los modelos R2 y R3 y se tomaron las muestras tanto de los andamios vasculares como de aorta suprarrenal, tórax e iliaca izquierda para su transportación al laboratorio de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos para su procesamiento, deshidratación, inclusión en parafina y cortes inmunohistoquímicos de acuerdo a lo descrito en metodología.



Figura 25: Toma de muestra del andamio integro del modelo R2, previo a su envío al laboratorio de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos para su procesamiento inmunohistoquímico.

Posterior al procesamiento de las muestras, se procedió a realizar la técnica y análisis de inmunohistoquímica descrita previamente en metodología, encontrando células con núcleo teñido recubriendo la pared interna de los 3 andamios.



Figura 26: Cortes para la realización de análisis inmunohistoquímico de muestras de R1

Se encontró que hubo invasión de células en los andamios colocados en los tres modelos, lo cual nos habla de la biocompatibilidad de los mismos y su biointegración. En la Figura 27 se distinguen las células teñidas recubriendo el andamio R2, resaltando los núcleos celulares, por hematoxilina - eosina.

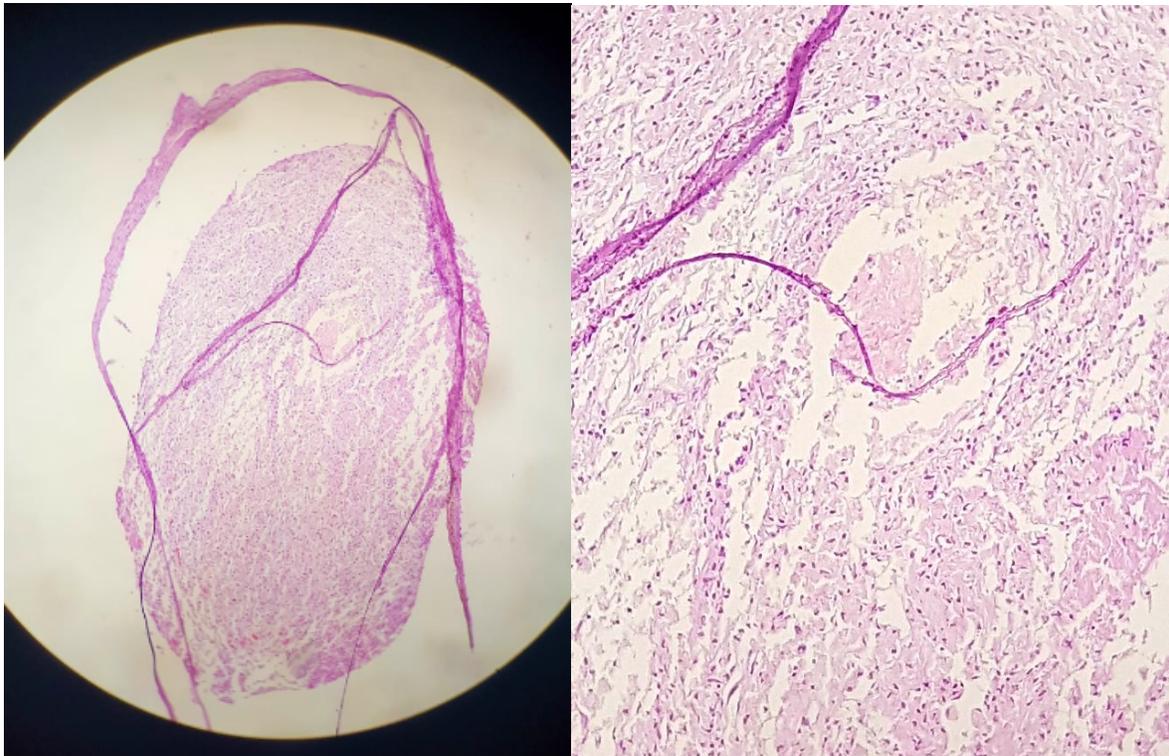


Figura 27: Células teñidas recubriendo la pared interna del andamio R2 resaltando el núcleo con hematoxilina-eosina

Tabla 1 Comparación de parámetros de los andamios, comparado al resultado de la anastomosis.

RATA	Éxito en anastomosis	Sobrevida hasta la toma de muestras	Diámetro andamio	Longitud andamio	Integridad	Permeabilidad	Vigilancia pos-quirúrgica
R1	Si	SI	3 mm	6 mm	NO	NO	2 meses
R2	Si	SI	2 mm	7 mm	SI	SI	1 mes
R3	SI	SI	2 mm	8 mm	SI	SI	1 ½ meses

## DISCUSIÓN

Se ha descrito previamente que la aparición de un falso aneurisma o pseudoaneurisma se origina por ruptura o daño a la pared aortica, que es contenida por el resto de las capas de la pared o por las estructuras adyacentes<sup>67,68</sup>, en este sentido la causa del aneurisma en el modelo R1 pudo estar dado por un defecto en la pared del andamio ya sea durante su construcción o durante el proceso de anastomosis, incluso se ha descrito años después de una aortoplastia originada en la zona de sutura<sup>68,69</sup>, por lo que el aneurisma encontrado en R1 también podría estar originado en un sitio de fuga de alguna de las anastomosis.

Cabe también la posibilidad de que la causa de la degeneración aneurismática sea el tiempo de vigilancia posquirúrgica ya que está descrito que pese a que el tiempo de vida media de la policaprolactona es larga, una desventaja de su uso es que pierde gran parte de su resistencia mecánica mucho antes de que se produzca la reabsorción total del material<sup>70</sup>, de aproximadamente 2 meses, e incluso bastante antes de que se haya producido una buena regeneración del tejido en el punto de aplicación, pudo haberse iniciado dicho proceso de pérdida de resistencia mecánica antes de realizar la laparotomía exploratoria con extensión a tórax y ser el motivo de la formación del aneurisma.

En cuanto a la ausencia de flujo distal hacia arterias iliacas en el primer modelo, puede deberse a la degeneración aneurismática ya comentada que lleva por si misma a trombosis intraluminal y pérdida de la permeabilidad del andamio vascular<sup>71</sup>.

Importante comentar que existe la posibilidad de que la ausencia de paso de medio de contraste observada en la arteriografía del modelo R1 pueda ser debido a la técnica quirúrgica realizada, ya que se realizó la arteriografía desde el catéter de polietileno introducido en aorta torácica y avanzado hacia aorta abdominal previo al andamio, sin intentarse punción directa en aorta abdominal. En los modelos R2 y R3 al no observarse tampoco paso de medio de contraste con esta técnica, pero ante la discrepancia por presencia de flujo distal clínicamente observado durante la laparotomía exploratoria, se decidió puncionar directo en aorta abdominal, talvez de haber puncionado de la misma manera directamente la aorta abdominal en R1 se hubiese corroborado si el andamio estaba trombosado dentro del aneurisma o si había

red arterial colateral motivo por el cual el modelo continuó vivo y con movilidad en las piernas durante los 2 meses de vigilancia.

No estaría de más realizar nuevamente el experimento a dos meses con mayor cuidado en la colocación del andamio para evitar lesiones en la pared que llevarían a degeneración aneurismática y con realización de punción directa en aorta abdominal durante la realización de la arteriografía.

Queda pendiente realizar estudios de microscopia electrónica de barrido para observar las características y porosidad de las nanofibras ya que está descrito que las prótesis de alta porosidad exhiben un mayor sangrado en el momento de su implantación; sin embargo permiten una buena incorporación de la prótesis al organismo, por el contrario, las prótesis de baja porosidad no producen mayor sangrado durante su implante pero tienen el inconveniente de ser difícilmente incorporadas por el organismo, produciéndose un engrosamiento importante de la neoíntima formada en su interior, con menor capacidad de sujeción y mayores posibilidades de fragmentación, con embolización hacia distal u oclusión aguda de la prótesis, hasta este momento se plantea que los andamios colocados tuvieron una alta porosidad ya que presentaron sangrado durante su implantación que requirió 7 minutos de compresión y hemostasia como se describió en la técnica quirúrgica (metodología) y presentaron buena integración y biocompatibilidad con aparición de células con núcleo teñido en su recubrimiento interno.

El andamio en R1 tuvo mayor diámetro y menor longitud respecto a los andamios en R2 y R3 y se hubiese esperado que los andamios del modelo R2 y R3 se trombosaran al ser menores y más largos, pues, se encuentra descrito que precisamente a mayor diámetro y menor longitud la tasa y porcentaje de trombosis debería ser menor, lo que no sucedió en esta ocasión.

## **CONCLUSIONES**

Este trabajo muestra hasta el momento una técnica innovadora para creación de vasos sanguíneos artificiales, siendo viable su replicación, sin embargo, falta aún agregar los hallazgos y resultados de un grupo experimental con el andamio recubierto con células de músculo liso y células endoteliales cultivadas y los hallazgos y resultados de un grupo control con el andamio colocado de manera invertida.

Así mismo será necesario confirmar su eficacia y efectividad y evaluar la durabilidad en tiempo, beneficio e impacto sobre la tasa de salvamento de extremidad y supervivencia, antes de tener las bases suficientes para poder ser experimentada en seres humanos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cronenwett, Jack L., and K. Wayne Johnston. Rutherford's Vascular Surgery E-Book. Elsevier Health Sciences, 2014.
2. Norgren L, Hiatt W, Dormandy J, Nehler M, Harris K, Fowkes F. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Journal of Vascular Surgery*. 2007;45(1):S5-S67.
3. Moore, Wesley S. *Vascular and Endovascular Surgery: A Comprehensive Review*. Elsevier Health Sciences, 2012.
4. L'Heureux N, Dusserre N, Konig G, Victor B, Keire P, Wight TN, Et al. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nature Medicine*. 2006; 12 (3):361-365.
5. Mason C and Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine* 3(1): 1-5, 2008.
6. Athala A. Cell therapy and tissue engineering strategies in regenerative medicine, in: *Stem Cell Technologies, basics and applications*. Chapter 26: 617-644.
7. Griffith L G & Swartz M. Capturing complex 3D tissue physiology in Vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 211–224 2006.
8. van Duinen V, Trietsch S. J, Joore J, Vulto P & Hankemeier T. Microfluidic 3D cell culture: From tools to tissue models. *Current Opinion in Biotechnology* 35, 118–126 2015.
9. Langer R & Vacanti J P. Tissue engineering. *Science* 260, 920–926 1993.
10. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O & Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889–895 1994.
11. Kirsner R S, Falanga V & Eaglstein W. The development of bioengineered skin. *Trends Biotechnol.* 16, 246–249 1998.

12. Shin'oka, T. Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery, *N. Engl. J. Med.* 344 (7): 532–533, 2001.
13. Gong Z, Niklason L. Blood vessels engineered from human cells. *Trends Cardiovasc. Med.*, 16, 153–156 2006
14. Stegemann J P, Kaszuba S. Rowe, S.L. Advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Eng.*, 13, 2601–2613 2007.
15. Zhang Y, Lim C, Ramakrishna S & Huang Z. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 16, 933–946 2005.
16. Huang Z, Zhang Y, Kotaki M, & Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.*, 63, 2223–2253, 2003.
17. Chen R, Morsi Y, Patel S, Ke Q, & Mo X. A novel approach via combination of electrospinning and FDM for tri-leaflet heart valve scaffold fabrication. *Front. Mater. Sci. China*, 3, 359–366, 2009.
18. Owida A, Chen R, Patel S, Morsi Y, & Mo X. Artery vessel fabrication using the combined fused deposition modeling and electrospinning techniques. *Rapid Prototyp. J.*, 17, 37–44, 2011.
19. Klinkert P, Post P, Breslau P, & Van Bockel J. Saphenous vein versus PTFE for above-knee femoropopliteal bypass. A review of the literature. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.*, 27, 357–362, 2004.
20. Barnes C, Sell S, Boland E, Simpson D, & Bowlin G. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 1413–1433, 2007.
21. De Valence S, Tille J, Mugnai D, Mrowczynski W, Gurny R, Möller M, & Walpoth B. Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model. *Biomaterials*, 33, 38–47, 2012.
22. He W, Hu Z, Xu A, Liu R, Yin H, Wang J, & Wang S. The preparation and performance of a new polyurethane vascular prosthesis. *Cell Biochem. Biophys.*, 66, 855–866, 2013.

23. Mazalevska O, Struszczyk M & Krucinska I. Design of vascular prostheses by melt electrospinning— Structural characterizations. *J. Appl. Polym. Sci.*, 129, 779–792, 2013.
24. Wang S, Zhang Y, Yin G, Wang H, & Dong Z. Electrospun polylactide/silk fibroin–gelatin composite tubular scaffolds for small-diameter tissue engineering blood vessels. *J. Appl. Polym. Sci.*, 113, 2675–2682, 2009.
25. McClure M, Sell S, Simpson D, Walpoth B, & Bowlin G. A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: A preliminary study. *Acta Biomater.* 2010, 6, 2422–2433, 2010.
26. Wang Z, Cui Y, Wang J, Yang X, Wu Y, Wang K, Gao X, Li D, Li Y, & Zheng X. The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration. *Biomaterials* 2014, 35, 5700–5710, 2014.
27. Inoguchi H, Tanaka T, Maehara Y, & Matsuda T. The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft. *Biomaterials*, 28, 486–495, 2007.
28. Centola M, Rainer A, Spadaccio C, De Porcellinis S, Genovese, J. & Trombetta, M. (2010). Combining electrospinning and fused deposition modeling for the fabrication of a hybrid vascular graft. *Biofabrication* 2010, 2, 014102.
29. Wu H, Fan J, Chu C, & Wu J. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 21, 3207–3215, 2010.
30. McAllister T, Garrido S, Velez J, Chronos N, L'Heureuz N. Bioengineered arteriovenous grafts. *Endovascular Today*. 62 -65, June 2011.
31. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685–95, 2005.
32. Ward MR, Stewart DJ, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. *Catheter Cardiovasc Interv* 70:983–98, 2007.

33. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* 331:496–501, 1994.
34. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 331:489–95, 1994.
35. Bhargava B, Karthikeyan G, Abizaid AS, Mehran R. New approaches to preventing restenosis. *BMJ* 327:274–9, 2003.
36. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* 231:397–400, 1986.
37. Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 3:225–243, 2001.
38. L'Heureux, N. Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization, *N. Engl. J. Med.* 357 (14): 1451–1453, 2007.
39. Avci-Adali M, Ziemer G, Wendel HP. Induction of EPC homing on biofunctionalized vascular grafts for rapid in Vivo self-endothelialization — A review of current strategies. *Biotechnology Advances* 28: 119–129, 2010.
40. Wendel HP, Ziemer G. Coating-techniques to improve the hemocompatibility of artificial devices used for extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 16:342–50, 1999.
41. Jordan SW, Chaikof EL. Novel thromboresistant materials. *J Vasc Surg* 45 (Suppl A):A104–15, 2007.
42. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 28: 5009-5027, 2007.
43. Herring M. Endothelial seeding of polytetrafluoroethylene femoral popliteal bypasses: the failure of low-density seeding to improve patency, *J. Vasc. Surg.* 20 (4): 650–655, 1994.
44. Jensen N. Endothelial cell seeded dacron aortobifurcated grafts: platelet deposition and long-term follow-up, *J. Cardiovasc. Surg* 35 (5): 425–4298, 1994.

45. Zilla P. Clinical in Vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years, *J. Vasc. Surg.* 19 (3): 540–548, 1994.
46. Deutsch, M. Clinical autologous in Vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience, *Surgery* 126 (5): 847–855, 1998.
47. Bordenave L. In Vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization, *Clin. Hemorheol. Microcirc* 33 (3): 227–234, 2005.
48. Riepe G, Loos J, Schroder A, Schneider E, Petermann J, Rogge A, Ludwig M, Schenke A, Nassut R, Chafke N, Morlock M. Long-term in Vivo alterations of polyester vascular grafts in humans. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 13: 540-548, 1997.
49. Lanutti J, Reneker D, Ma T, Tomarko D, Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials science & Engineering.* 27: 504-509. 2007.
50. Reneker DH, I. Chun. *Nanotechnology* 7 (3): 216, 1996.
51. Reneker DH, A.L. Yarin, H. Fong, S. Koombhongse, *Journal of Applied Physics* 87 (9): 4531, 2000.
52. Sill TJ, Von Recum HA. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials.* 29: 1989-2006, 2008.
53. Chandra R, Rustgi R. Biodegradable polymers. *Progr Polym Sci* 23:1273–335, 1998.
54. Okada M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. *Progr Polym Sci* 27:87–133, 2002.
55. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progr Polym Sci* 32:762–98, 2007.
56. Woodruff MA and Hutmacher DW. The return of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science.* 35: 1217-1256, 2010.
57. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin –based functional and implantable small – diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1451 – H1460, 2004.

58. Tuan TL, Song A, Chang S, Younai S, and Nimni ME. In Vitro fibroplasia: matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Exp Cell Res* 223: 127–134, 1996.
59. Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. A fibrin-based arterial media equivalent. *J Biomed Mater Res* 66A: 550–561, 2003.
60. Long JL and Tranquillo RT. Elastic fiber production in cardiovascular tissue equivalents. *Matrix Biol* 22: 339–350, 2003.
61. Wozniak G. Fibrin sealants in supporting surgical techniques: the importance of individual components. *Cardiovasc Surg* 11: 17–21, 2003.
62. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and Stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 117: e25-e146, 2008.
63. Lee SJ, Oh SH, Atala A, Yoo JJ. Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions. *Biomaterials*. 29: 2891-2898, 2008.
64. Min Ju Y, Choi JS, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. *Biomaterials* 31:4313-4321, 2010.
65. Padilla S.L., Valle G.A., Carrillo L.H., Di Silvio L.M., Viniegra R.F., Sánchez C.R. Polytetrafluoroethylene microposthesis in the arterial system of the rat. *J. Reconstr. Microsurg.* 4:33-37, 1987.
66. Padilla S. L., Rodríguez-Trejo J.M, Gasca O; Carranza C. P. H., Martínez L.; Mota E.; Díaz X.; Landero Y. T., Polaco J.; Mondragón-Terán P. Técnica para evaluar Neo-vascularización o angiogénesis experimental en la extremidad isquémica de la rata. (Inyección de resina intraarterial). *Rev. Méx. de Angiol.*, 42; 115-118; 2014.
67. Sarkar R, Arnold G, Coran AG, Robert E, Cilley RE, Lindenauer SM, et al. Arterial aneurysms in children: clinic pathologic classification. *J Vasc Surg.* 1991;13:47-57
68. Vaccarino G, Piccinini F, Nacinovich F, Delli Carpini, Dorsa A, Navia D, et al. Seudoaneurisma de la aorta ascendente luego de reemplazo valvular aórtico:

una emergencia quirúrgica. Rev. Argent. Cardiol. Buenos Aires. 2005; 73(4):277-82.

69. Isselbacher EM. Enfermedades de la aorta. En: Braunwald. Tratado de Cardiología. T II-V. 6ta. ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2005. p. 1739-40.
70. Elzein, T; Nasser, M; Delaite, C; Bistac, S. and Dumas, P. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. Journal of colloid and interfaces science, vol. 273, p. 381-387 (2004).
71. Bogie R, Willigendael EM, de Booi M, Meesters B, Teijink JAW. Acute thrombosis of an abdominal aortic aneurysm: A short report. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2008;35:590-2.