

**CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DEL RECEPTOR,  
EN EL URÉTER DONADO DE RATA**



Res. No. 16740, 2017-2021.



Vigilada MinEducación.

**DANIEL FELIPE ROMERO BERNAL**

**2126450**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA  
PROGRAMA INGENIERÍA BIOMÉDICA  
SANTIAGO DE CALI  
2018**

**CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA DEL RECEPTOR,  
EN EL URÉTER DONADO DE RATA**



Res. No. 16740, 2017-2021.



Vigilada MinEducación.

**DANIEL FELIPE ROMERO BERNAL**

**Pasantía de investigación para optar al título de  
Ingeniero Biomédico**

**Director  
PAOLA ANDREA NEUTA ARCINIEGAS  
Ph.D**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE AUTOMÁTICA Y ELECTRÓNICA  
PROGRAMA INGENIERÍA BIOMÉDICA  
SANTIAGO DE CALI  
2018**

**Nota de aceptación:**

**Aprobado por el Comité de Grado en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Autónoma de Occidente para optar al título de Ingeniero Biomédico**

**Alejandra Salazar Arango**  
\_\_\_\_\_  
**Jurado**

**Claudia Lorena Mosquera Gil**  
\_\_\_\_\_  
**Jurado**

**Santiago de Cali, 17 de Mayo de 2018**

## CONTENIDO

	pág.
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	12
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GENERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
4. MARCO REFERENCIAL	17
4.1 MARCO TEORICO	17
4.2 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE	26
5. METODOLOGÍA	31
5.1 DISPOSITIVO DE RECIRCULACIÓN	31
5.2 EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA	31
5.3 EXTRACCIÓN DE URÉTER	32
5.4 MARCAJE CELULAR	32

<b>5.5 CULTIVO DE CÉLULAS EN URÉTER</b>	<b>33</b>
<b>5.6 MICROSCOPIA</b>	<b>33</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b>	<b>40</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>41</b>

## LISTA DE CUADROS

pág.

**Cuadro 1. Comparación fuentes de obtención de células madre mesenquimales**

**29**

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1. Sistema urinario.</b>	<b>17</b>
<b>Figura 2. Anatomía del uréter.</b>	<b>18</b>
<b>Figura 3. Viabilidad de trasplante.</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4. Células madre embrionarias.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 5. Células madre adultas.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6. Morfología fibroblastoide de BM-MSCs.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 7. Disposición de médula ósea en huesos largos.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 8. Esquemático del mecanismo de quimerización.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 9. Tibia y fémur de ambas extremidades posteriores, después del drenaje de médula ósea.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 10. Mantenimiento del órgano.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 11. Registro del órgano previo proceso de quimerización.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 12. Dispositivo de recirculación.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 13. Uréter quimerizado x20.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 14. Uréter de cerdo descelularizado con colorante de Papanicolaou.</b>	<b>38</b>

## LISTA DE TABLAS

	pág.
<b>Tabla 1. Resumen de factores claves involucrados en la inmunorregulación por MSCs</b>	<b>25</b>

## ABREVIATURAS

DMEM: *Dubelcco's Modified Eagle Medium.*

FBS: *Fetal Bovine Serum.*

PBS: *Phosphate-buffered saline.*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution.*

BM-MSCs: *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells.*

ADSCs: *Adipose derived Stem Cells.*

## RESUMEN

Los trasplantes constituyen el principal tratamiento para algunas afecciones del sistema urinario, específicamente en los uréteres, estructuras pequeñas que cumplen la labor de transportar la orina desde los riñones a la vejiga, sin embargo los trasplantes tienen una alta tasa de rechazo, por lo que debe ser contrarrestado a partir del uso de inmunosupresores. Por lo cual se ha investigado desde la medicina regenerativa un elemento reconocido dentro de la anatomía humana por su cualidad de inmunorregulación, la médula ósea, que además es fuente tanto de células madre hematopoyéticas como mesenquimales; siendo estas características idóneas para ser usada como variante a la supresión del sistema inmunológico, durante la práctica de trasplantes.

Las técnicas que utilizan células madre en terapia de reemplazo de órganos usualmente implican afectar el tejido para eliminar las células propias del donante. En esta investigación se plantea la posibilidad de implantar las células madre derivadas de la médula ósea directamente al órgano, generando un tipo de quimerismo (presencia de células de receptor y donante en el mismo tejido) que disminuyan las probabilidades de rechazo, gracias a su papel en la inmunorregulación. En este trabajo se demostró, por tinción con colorante *DAPI*, que el proceso de quimerización permite que las células madre extraídas de la médula ósea se adhieran y permanezcan en un uréter de rata. Los resultados son importantes dada la viabilidad del procedimiento y su impacto social al mejorar los resultados de los trasplantes.

**Palabras clave:** células madre, médula ósea, trasplante, sistema urinario, quimerización.

## INTRODUCCIÓN

El sistema urinario es uno de los sistemas más complejos en el cuerpo humano. En el tracto urinario se encuentran dos riñones, dos uréteres, la vejiga, y la uretra, todos estos propensos a desarrollar enfermedades urológicas [1]. Estas son un problema de salud mundial que afectan generalmente a la población mayor a 27 años, acrecentándose a partir de los 59 años de edad [2]. Durante el tratamiento, el uréter es uno de los órganos que se ve afectado con mayor frecuencia, requiriendo una sustitución para no acrecentar el daño [3].

La falta de soluciones efectivas para la sustitución de órganos, abre la posibilidad de tratar al órgano con nuevas herramientas terapéuticas como la transmisión de información genética a un aloinjerto, disminuyendo las posibilidades de rechazo, por medio del uso de células madre, lo cual sería propicio por la gran cantidad de órganos no usados de donantes (vivo o cadavérico) [4], en gran parte por las dificultades encontradas con respecto a la compatibilidad.

Las células madre utilizadas para la transmisión de la información genética proporcionan un amplio espectro de posibilidades por sus características como células multipotenciales, además de los factores de inmunorregulación asociados a su uso, en especial, cuando son extraídas de la médula ósea [5]. Los estudios acerca de la acción de estas se han realizado durante las últimas décadas, sin embargo, sigue sin esclarecerse cómo se logra obtener un quimerismo deseado de acuerdo a las investigaciones en curso.

En este proyecto se desarrolló un proceso de asimilación del uréter destinado a ser donado, para ser considerado como un órgano propio, a partir de las propiedades descritas de las células madre, de la médula ósea, con el que se espera que en fases posteriores permita identificar qué propiedades específicamente logran disminuir las posibilidades de rechazo al trasplante.

# 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

## 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema urinario es uno de los sistemas más complejos en el cuerpo humano, debido a que, entre otras, es el encargado de la osmorregulación, a través de la producción de orina, proceso mediante el cual se eliminan los desechos nitrogenados del metabolismo. En el tracto urinario se encuentran dos riñones, dos uréteres, la vejiga y la uretra, todos estos propensos a infecciones o a desarrollar cálculos [1]. El 60% de las mujeres adultas, a nivel mundial, pueden experimentar una infección del tracto urinario, esto debido a la anatomía femenina que está expuesta más fácilmente a infecciones, siendo los bacilos gramnegativos y *E. Coli* los agentes más comunes con más del 80% de las infecciones agudas en pacientes sanos. En el caso del género masculino, también se presentan tales infecciones, pero generalmente estos no acuden a los servicios médicos de inmediato, lo cual genera mayores riesgos futuros para los pacientes [6].

En Colombia, según un reporte del Ministerio de Salud del año 2013, las infecciones urinarias en personas adultas entre los 27 y 59 años se han incrementado notablemente en los últimos años, acrecentándose específicamente en las mujeres, siendo la cuarta causa de consulta más atendida frecuentemente (6.4%) mientras que, en hombres representa solo el 2.3% de las consultas atendidas. El mismo fenómeno se presenta en los servicios de hospitalización, siendo la causa más frecuente en mujeres, con 8225 casos, casi 4 veces más que los casos presentados en pacientes masculinos (2076). Los indicadores de morbilidad atendida en la población mayor a 59 años, población mayor, siguen el mismo comportamiento en la población femenina, mientras que en pacientes masculinos sí se presenta un incremento, llegando al 4.9% de los casos, con 3739 casos de hospitalización presentados [2].

Las lesiones de uréter pueden deberse a traumatismos externos, lesiones por irradiación, fuentes misceláneas de traumatismos y lesiones quirúrgicas [7]. Son estas últimas (operaciones urológicas, ginecológicas y de cirugía general) que buscan solucionar los problemas ocasionados por las infecciones urológicas, además de otros problemas fisiológicos en la región pélvica, las causales de 42%, 34% y 24% [8] respectivamente, de las lesiones ureterales, siendo estas las de mayor impacto. Hasta en un 6.4% de las cirugías pélvicas se presenta la lesión, convirtiéndose en la complicación más común de este procedimiento, viéndose incrementado por el uso de técnicas endoscópicas tanto para el tratamiento como para el diagnóstico de enfermedades [9].

Para el tratamiento de las lesiones ureterales se ha concebido la utilización de *stends* de apoyo, la reparación del tejido, y otros métodos no agresivos [3], pero estos son procedimientos para contener la lesión, por lo cual no ofrecen una solución permanente y estable [10]; los tratamientos de mayor índice de funcionalidad a largo plazo se encuentran en las técnicas de ingeniería de tejidos, con el uso de regeneración de tejido apoyado en *scaffolds* de materiales sintéticos [11] y el uso de injertos [12], sin embargo no están lo suficientemente desarrollados para presentar una solución viable.

La carencia de tratamientos efectivos y definitivos hace preciso abordar la problemática desde la ingeniería de tejidos, usando novedosas herramientas terapéuticas, como aloinjertos a los que se les realice un proceso de transmisión de la información genética, contenida en las células madre [13], [14], con el propósito de disminuir las probabilidades de rechazo y por consiguiente el uso de fármacos para inhibir el sistema inmune [15]; técnica que ha probado ser efectiva en otros tejidos trasplantados [16].

## **1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

Se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Es posible desarrollar un uréter quimerizado a partir del crecimiento de células madre de médula ósea del posible receptor?

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades urológicas son un problema de salud mundial afectando a la población mayor a 27 años, acrecentándose a partir de los 59 años de edad [2]. Las enfermedades urológicas causan alrededor de 60000 muertes de forma directa y están asociadas a casi un cuarto de millón de personas por año en Estados Unidos, afectando a hombres y mujeres por igual [17].

Estas pueden deberse a infecciones de agentes patógenos, con un índice de morbilidad mayor en mujeres (una de cada 5 mujeres padece una infección del tracto urinario) [18], la presencia de quistes o cálculos, indiferente del órgano en el que se encuentran [7], afectando a casi 1 millón de norteamericanos por año [19], morfologías adversas, como el caso de la uropatía obstructiva [20], la presencia de cáncer en la zona pélvica o en zonas aledañas de las cuales las células afectadas se desplazan y terminan afectando el sistema urinario [21], siendo el cáncer de próstata el segundo tipo de cáncer más común entre hombres norteamericanos [22], al igual que la hiperplasia prostática benigna, la cual, se estima, es causante de cerca de 400000 operaciones por año para aliviar los síntomas de este trastorno, y de la muerte de 30 hombres por cada 100000 en los países desarrollados, siendo una de las enfermedades con mayor gasto sanitario [23].

Se prevé que, según el Observatorio Demográfico de América Latina, para el año 2030, debido a la longevidad extendida de la población, adicional al cuidado y tratamiento de enfermedades mortales, el número de pacientes potenciales de este tipo de afecciones aumente en casi un 78.1% más que los adultos actuales (2014, año del estudio) con un incremento sustancial en la población mayor a los 60 años, es decir, población adulta económicamente no activa, y un incremento de 230% en población mayor de 90 años [24].

En el año 2005, el hospital San José de Bogotá presentó, en el Congreso Colombiano de Urología, las complicaciones urológicas post-trasplante renal, en el cual se estudiaron los casos de 104 pacientes sometidos a trasplante renal, obteniendo como resultado que el 81.73% de ellos no presentaron complicaciones, mientras que el 14.42% presentaron infecciones de vías urinarias y el 3.85% complicaciones técnicas (estenosis ureterovesical, fístulas vesicocutaneas), siendo mayor en pacientes con trasplantes de cadáveres, comparado con receptores de donante vivo relacionado [25]. Las complicaciones urológicas son entonces el segundo problema urológico más común después de procedimientos quirúrgicos, como el trasplante renal, en Colombia.

Actualmente se usan diversos procedimientos invasivos para tratar esta afección, en los cuales la mayoría son pruebas experimentales ejercidas en hospitales de todo el mundo que buscan llegar a una solución viable para ser empleada en futuros pacientes [26]. Desde catéteres uretrales, microcirugía, hasta trasplantes de uréter en donde el mayor problema que evidencian los pacientes es la respuesta fisiológica del organismo después del procedimiento [27], convirtiendo la técnica de trasplante, sea cual sea el órgano o tejido, en una técnica muy costosa, sin presentar una solución adecuada y vista más como un ejercicio académico muy valioso.

El primer trasplante registrado en América Latina fue un trasplante renal realizado en 1957 en Argentina [28] [29], seguido de México [30] y Brasil [31]; no fue sino hasta 1965 cuando se realizó en Colombia [32], que en las décadas siguiente tuvo una evolución a pasos lentos, siendo la última incursión en trasplantes, con el trasplante de intestino, que se comenzó a realizar en el año 2004, y que solo se practica en 7 países de América Latina. Actualmente en Colombia más del 85% de los trasplantes se realizan con donantes cadavéricos, frente a países como México, Costa Rica, Bolivia y Guatemala que realizan trasplantes en su mayoría con donante vivo, tomando como referente el trasplante renal [4] [33]. El principal problema del uso de donante cadavérico es la poca supervivencia del tejido, pues la viabilidad del trasplante depende estrechamente del tiempo que pase desde la extracción hasta el implante, que en este caso se aumenta debido a la condición de cadáver, por lo que requiere el uso de técnicas para mantener el tejido a trasplantar lo mejor posible [34].

Hace algunos años se comenzó a estudiar a nivel mundial la recelularización como ayuda a los trasplantes para reparar o reemplazar la función que realiza un órgano o tejido, resultando en una opción muy factible. El foco de estas investigaciones consistía en extraer células madre para inducir el crecimiento celular, inicialmente en el tejido cardíaco para luego estudiar posibles efectos en otros órganos, obteniendo buenos resultados en implantes generados en laboratorio [35]. Esta técnica presenta dos problemas principalmente, la complejidad de la descelularización, para lograr dejar solamente la matriz extracelular, pero sin afectar el tejido [36], y la dificultad de extraer células madre embrionarias, sumado al dilema ético que sobrelleva [35], por tal razón se ha incursionado en estudiar otras técnicas que incluyen obtener células de otros tejidos para generar crecimiento celular sobre el tejido a trasplantar.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Generar crecimiento de células madre de médula ósea del receptor, en el uréter donado de rata, con el fin de disminuir el rechazo al trasplante ureteral.

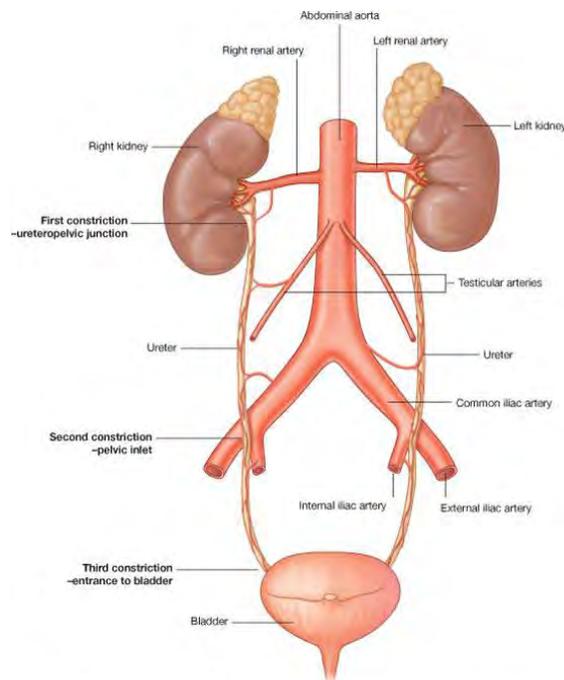
#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Extraer células madre adultas viables de médula ósea de rata.
- Cultivar el uréter donado con las células madre extraídas de la médula ósea del receptor.
- Caracterizar el tejido donado posterior a la quimerización, para evidenciar la presencia de las células del receptor.

## 4. MARCO REFERENCIAL

### 4.1 MARCO TEORICO

El sistema urinario es el conjunto de órganos encargados de la osmorregulación y de la producción de orina, mediante la cual se eliminan los desechos nitrogenados del metabolismo. En este, los uréteres son de vital importancia, pues, a partir de contracciones peristálticas de sus músculos, impulsa la orina desde el hilio renal hasta la pared posterior de la vejiga. El uréter consta de dos porciones anatómicas de similar tamaño, pélvica y abdominal. La porción abdominal tiene su arteria de suministro ubicada en la cara medial, mientras que en la porción pélvica se ubica en la cara lateral [37] (fig. 1). Es clínicamente importante reconocer su vascularización pues esto puede provocar estenosis o fuga [27].

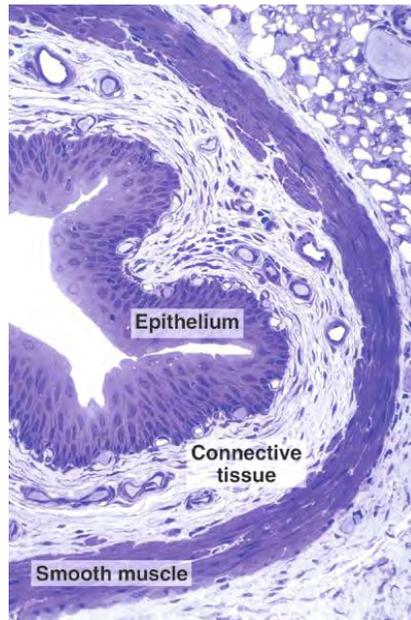


Drake: Gray's Anatomy for Students, 2nd Edition.  
Copyright © 2009 by Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier, Inc. All rights reserved.

**Fig 1.** Sistema urinario. Encargado de la osmorregulación y de la producción de orina [38].

El uréter tiene 3mm de diámetro aproximadamente, y al igual que el resto del tracto urinario, está revestido por un epitelio de transición. Más profundo a la capa epitelial,

está una matriz de tejido conectivo elástico seguido de la capa muscular, compuesta por dos capas de músculo liso dispuesta internamente de forma longitudinal, y externamente, circular. El recubrimiento más externo del uréter es una capa fibrosa, llamada adventicia, que lleva el suministro vascular [1] [37](fig. 2).

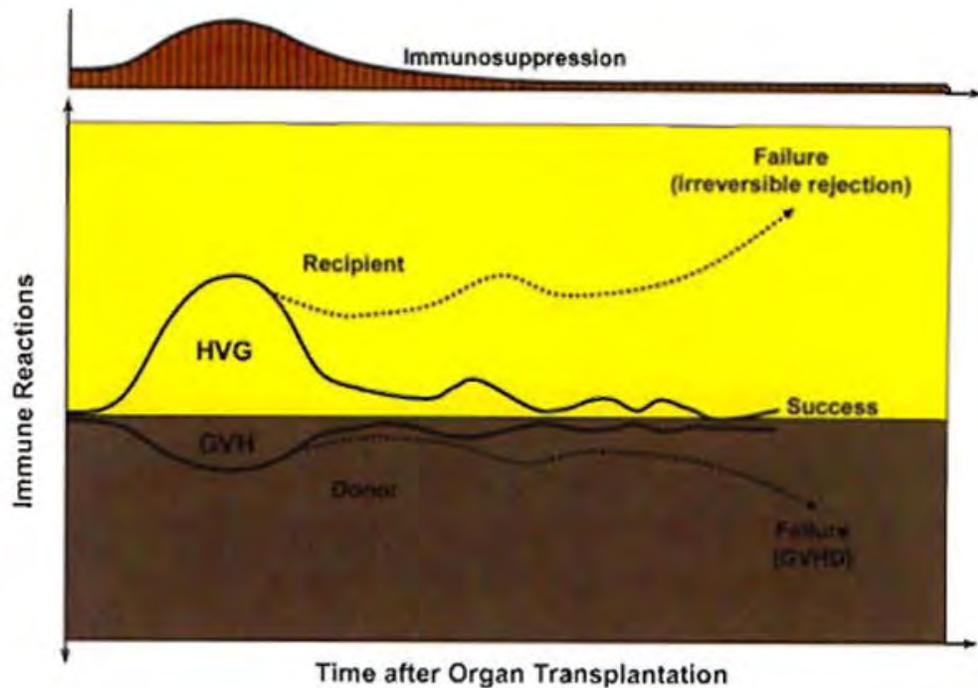


**Fig 2.** Anatomía del uréter. Histología donde se diferencian 3 capas de tejido [39].

Los trasplantes ureterales se formulan principalmente por la afectación producida por el manejo quirúrgico de otros órganos cercanos, o como solución a complicaciones fisiológicas como la isquemia, estenosis, o la presencia de células cancerígenas, complicaciones que afectan principalmente a la población adulta [40]. Dentro de las alternativas de tratamiento se han usado *stends*, como reemplazo por otras estructuras cercanas histológicamente, procedimientos quirúrgicos menores, que pueden generar un mayor trauma, y que adicionalmente no presentan una solución permanente en algunos casos [41].

Los trasplantes representan una buena alternativa para el tratamiento de enfermedades y en ocasiones, como el trasplante renal en Colombia, que ya ha sido probado desde el año 1965 [32], logra disminuir los costos frente a otros tratamientos como reemplazo renal por diálisis [42]. Sin embargo, en los trasplantes que recién se comienzan a explorar como el trasplante de pulmón, páncreas e intestino, los costos relacionados al procedimiento, al mantenimiento del órgano, el cuidado de este, y todo el tratamiento pos-operatorio incluyendo la inmunosupresión en los casos requeridos [43] [44], hacen que se conviertan en investigaciones académicas que muy difícilmente puedan llegar al público objetivo en el corto plazo,

sin integrar otras técnicas que puedan aliviar los costos. Además el uso de donante cadavérico presenta el problema de la poca supervivencia del tejido, pues la viabilidad del trasplante depende estrechamente del tiempo que pase desde la extracción hasta el implante (fig. 3) [34].



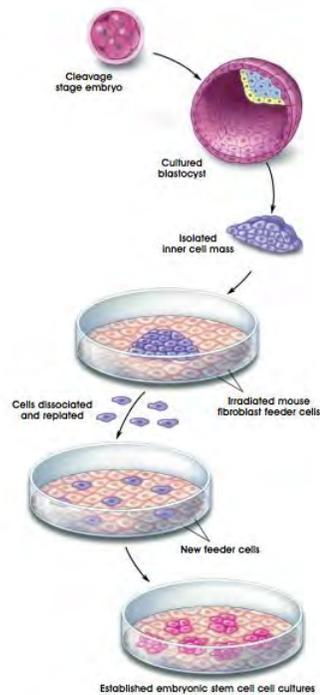
**Fig 3.** Viabilidad de trasplante. Es importante por la respuesta inmune que desencadena en el paciente y la poca tasa de éxito que se presenta. [34].

Con el avance en la medicina regenerativa, se han logrado avances en la regeneración de pequeñas porciones de uréter, además de la compatibilidad de materiales sintéticos, algunos de ellos, sin el uso de células madre [45]. Las células madre son células con la potencialidad de convertirse en muchos tipos diferentes de células (linajes), y poseen la capacidad de reparar sistemas o tejidos, estas se destacan de otras células del cuerpo debido a que:

- Pueden dividirse y renovarse a sí mismo durante un largo tiempo.
- No son especializadas, por lo que no pueden cumplir funciones específicas en el cuerpo [46].

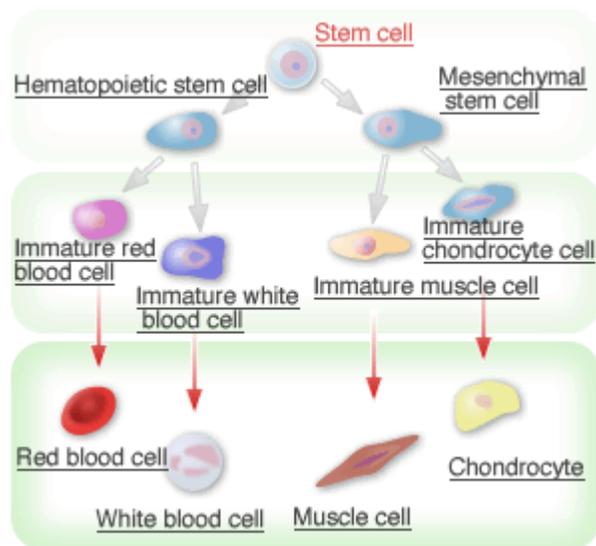
- Tienen el potencial de convertirse en células especializadas, como las células miogénicas, osteogénicas, entre otras [46].
- Regulan el número de células presentes en el cuerpo a partir de la muerte celular programada (apoptosis) [47].
- Migran a diferentes tejidos del cuerpo bajo ciertas condiciones [47].

Existen dos tipos de células madre principalmente, las células madre embrionarias y las células madre adultas. Las embrionarias son aquellas que se derivan del embrión de los mamíferos en su etapa de blastocito, alrededor del quinto día de fecundación, en donde uno de los polos del blastocito posee una agrupación celular, en donde se encuentran las células que poseen la capacidad de generar cualquier célula diferenciada en el organismo (fig. 4). Cabe aclarar que las células madre embrionarias en estado *in vivo* no mantienen su capacidad de generación de cualquier tipo celular, pero cuando se extraen del medio embrionario, y se cultivan *in vitro*, sí son capaces de proliferar ilimitadamente, y generar células con potencial diferenciador. Para crear cultivos de estas células manteniéndose indiferenciadas es necesario tener una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios y un suplemento de factor inhibidor de leucemia (LIF, *leukemia inhibitory factor*). Este tipo de células ha significado un importante adelanto científico para la medicina regenerativa, como tratamiento para múltiples enfermedades humanas, sin embargo, por su forma de obtención se presentan dilemas éticos, además de algunos inconvenientes técnicos, pues su diferenciación es poco predecible en algunos medios, y su trasplante puede generar teratomas o teratocarcinomas [46].



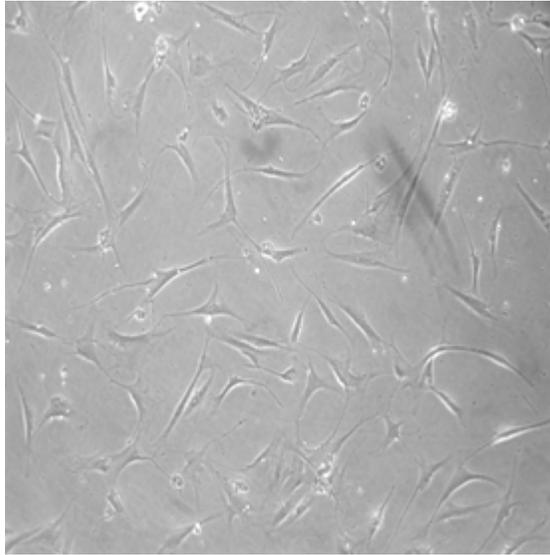
**Fig 4.** Células madre embrionarias. Fueron las primeras células madre obtenidas del ser humano [48].

Las células madre adultas (ASCs, *Adult Stem Cells*), generalmente se asocian a las células especializadas dentro de la organización de las células de un tejido específico, y por consiguiente, su capacidad de diferenciación está condicionada por el tejido que representa. Sin embargo, diversos estudios detallan la potencialidad de algunos tipo de células madre adultas de generar diferenciación en otros linajes diferentes al que representan (fig. 5). Es este el caso de las células madre hematopoyéticas, que son capaces de diferenciarse principalmente en todos los tipos de células sanguíneas, como glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas, además de la posibilidad de diferenciación en tejido endotelial, músculo cardíaco, entre otros [46].



**Fig 5.** Células madre adultas. Son células madre con la capacidad de diferenciarse en múltiples linajes celulares [49].

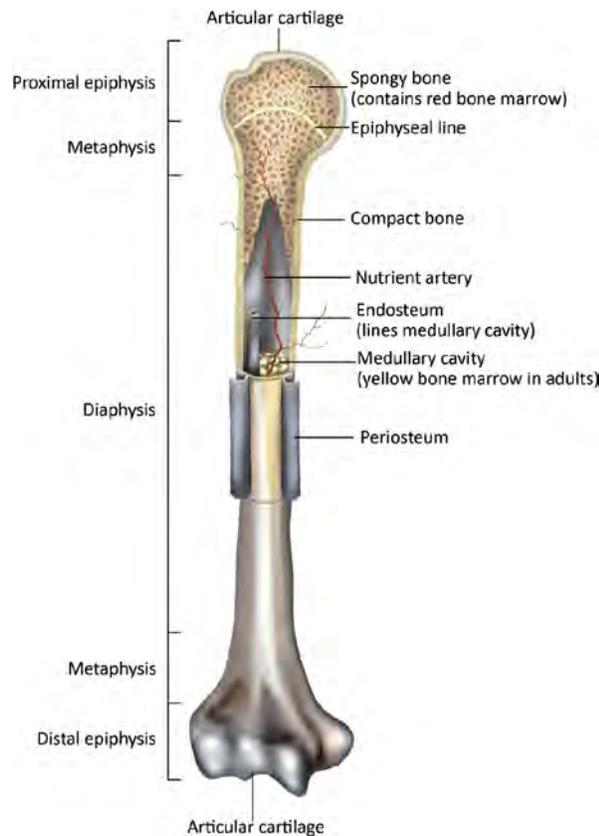
Durante varios años se consideró que las células madre hematopoyéticas eran las únicas existentes en la médula ósea, principal fuente de las células madre. Sin embargo, ahora se conoce de la presencia de células madre mesenquimales (MSC, *Mesenchymal Stem Cell*), células con potencial clonogénico. Dentro de sus características se encuentra su adherencia al plástico, por lo que son de fácil identificación en un medio de cultivo, el aspecto de fibroblastos fusiformes en cultivos no estimulados (fig. 6), y principalmente su capacidad de diferenciación en linajes condrogénico, osteogénico, miogénico y adipogénico, conocidas como células “multipotentes” por ello [50]. Las MSC proveen factores de crecimiento y una matriz extracelular como apoyo para la hematopoyesis de forma estructural y funcional, además, por su potencial clonogénico, contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimales del organismo [51].



**Fig 6.** Morfología fibroblastoide de BM-MSCs. De morfología alargada, y con extremos estirados hacia la superficie, es el criterio más rápido de identificación avalado por la Sociedad Internacional de Terapia Celular [52].

La principal limitación en el uso de BM-MSCs está relacionada con el procedimiento técnico y selección de donantes, por la cantidad obtenida y la edad del paciente [52]. Su extracción se realiza generalmente por punción medular en la cresta iliaca posterior, en el caso de humanos y animales grandes como cerdos, o por lavado de huesos largos como fémur y peroné, en animales pequeños como ratones y ratas (fig. 7). En este caso después de sacrificar al animal, se lava el cuerpo con etanol al 70% para eliminar impurezas, limpiando el área de trabajo, posteriormente se realiza la disociación de músculos, ligamentos, y tendones, de la tibia, peroné y fémur. Después de extraer los huesos, estos son lavados externamente con PBS estéril eliminando los posibles residuos y luego corta la epífisis para realizar el lavado interno con DMEM en una jeringa, expulsando la mayor cantidad posible de médula ósea [53]. Para su posterior identificación, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por sus siglas en inglés) ha propuesto 3 criterios de caracterización [52]:

- Aislamiento de células con morfología fibroblastoide de tipo adherente.
- Expresión de antígenos CD105, CD73 y CD90, en ausencia de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 o CD19 y HLA-DR
- Diferenciación *in vitro* en osteoblastos, adipoblastos y condroblastos.



**Fig 7.** Disposición de médula ósea en huesos largos. La médula ósea se encuentra especialmente accesible en los huesos largos, en la cavidad medular, por debajo de la epífisis [51].

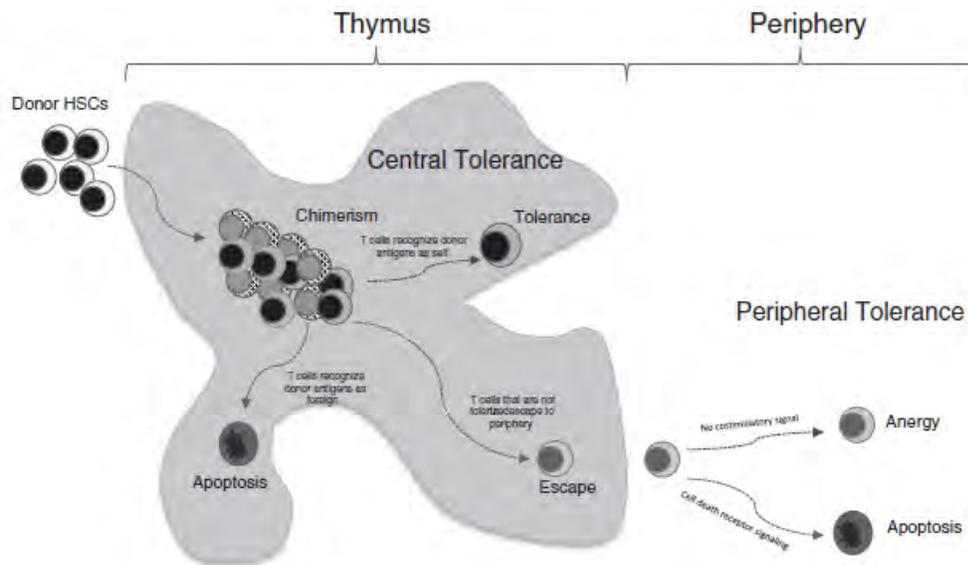
El mayor obstáculo que enfrenta la terapia celular, durante un trasplante, es el rechazo inmunológico que se presenta en el receptor. Esto se debe a que el sistema inmune del receptor detecta que los antígenos en las células del órgano son diferentes o no son “compatibles” [54]. La propiedad más interesante de las MSCs en cuanto a reparación de tejidos se refiere es su capacidad de inmunosupresión de respuestas innatas y adaptativas, inducida por citoquinas inflamatorias, como la  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  o IL-1. Estudios han demostrado que las MSCs pueden modular la activación y función de células inmunes como macrófagos, células *natural killer*, células dendríticas, neutrófilos, células T y B [5].

**TABLA I. RESUMEN DE FACTORES CLAVES INVOLUCRADOS EN LA INMUNORREGULACIÓN POR MSCS [5].**

Factor clave	Papel en inmunorregulación por MSCs
Antígeno leucocitario humano (HLA-G)	Inhíbe células mononucleares de sangre periférica
Factor inhibidor de la leucemia (LIF)	Inhíbe proliferación de células T
Factor de necrosis tumoral $\alpha$ , estimulada por gen 6 (TSG6)	Regula macrófagos Inhíbe inflamación
Hemo-oxigenasa-1 (HO-1)	Inhíbe respuesta de células T Induce interleucina 10 y células reguladoras T de TGF- $\beta$
Interleucina 6 (IL-6)	Inhíbe la diferenciación de células dendríticas Inhíbe proliferación de células T
Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Induce células reguladoras T Inhíbe activación y funcionamiento de células <i>natural killer</i>
Prostaglandina E2 (PGE2)	Induce células reguladoras T de Foxp3 Inhíbe funcionamiento de células <i>natural killer</i> Induce macrófagos tipo II Inhíbe maduración de células dendríticas.

Adicionalmente, según recientes estudios, existe una característica celular que juega un papel muy importante para conseguir la inhibición de la respuesta inmune al realizar un trasplante. La proteostasis es la homeostasis proteínica dentro de la célula, desde su síntesis hasta su vida media y degradación [55], sin embargo también se sugiere que esta comunicación entre células cercanas, no solo ocurre con proteínas, sino que también es posible transferir organelas entre una célula y otra [56]. Una de estas organelas es la mitocondria, siendo la encargada de dirigir algunos procesos celulares, encaminados a promover la supervivencia de la célula en estados de estrés celular [57], como la producción de energía, activación de muerte celular programada, control de metabolismo de  $Ca^{2+}$ , síntesis de varias biomoléculas [58], además de factores de inmunoregulación relacionados con *TFAM* (*Mitochondrial transcription factor A*) [59].

La respuesta inmune posterior al trasplante de médula ósea ha sido estudiada principalmente para reconocer el quimerismo presente en el cuerpo, y los mecanismos de acción que esta supone, identificando si el sistema linfohematopoyético del donante ha sido capaz de implantarse en el receptor, y si coexiste con este último, o por el contrario lo desplaza. El quimerismo se clasifica de acuerdo a la cantidad de células del donante en el receptor: quimerismo total, mixto, dividido y microquimerismo; ya sea de forma accidental o inducida. La cantidad de células del donante también condiciona el riesgo, pues el quimerismo total presenta mayor riesgo de presentar *GVHD* (*Graft-Versus-Host-Disease*), y por el contrario, un quimerismo transitorio no presenta *GVHD* pero sí genera una respuesta de *Tregs* (linfocito T regular) [60] [61]. En el proceso de quimerización de timo (fig. 8), la presencia de células progenitoras donantes en el timo conduce al desarrollo de las células T que reconocen los antígenos del donantes expresados por el órgano trasplantado como uno mismo, y por lo tanto el anfitrión se vuelve tolerante al aloinjerto. La influencia de la respuesta inmune innata en el proceso del trasplante se extiende más allá de lo observable en el tiempo, y se genera un proceso no visible de cambio celular [62].



**Fig 8.** Esquemático del mecanismo de quimerización. Es importante reconocer el quimerismo presente en el cuerpo, y los mecanismos de acción que esta supone, con el estudio del sistema linfohematopoyético [62].

#### 4.2 ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

Desde hace más de 30 años se han registrado experimentos relacionados con las células madre. En 1981 los científicos descubrieron la forma de obtener células

madre embrionarias procedentes de ratones, y gracias al estudio detallado de estas células se logró que en 1998 se obtuvieran células madre de embriones humanos y realizar cultivos en laboratorio. Estas células fueron finalmente llamadas células madre embrionarias humanas. En el 2006 investigadores identificaron las condiciones que permitían que algunas células adultas se pudieran especializar y ser reprogramadas genéticamente para asumir un estado similar al de las células madre. Estas son las llamadas células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs) [63]. La extracción y posterior uso de estas células madre adultas, si bien presenta procesos más engorrosos para su utilización, tiene la ventaja de no tener incertidumbres en su especialización, y tampoco problemas éticos como sí los tiene el uso de las células madre embrionarias [64].

Las primeras células madre estudiadas han sido las obtenidas desde la médula ósea, mostrando su capacidad para diferenciarse en otras células mesenquimales y posteriormente la potencialidad de ser utilizadas en la terapia génica para tratar con éxito enfermedades cardíacas, la esclerosis lateral amiotrófica, y enfermedades propias de trasplantes [65]. Pero el principal problema que reviste el uso de las células madre provenientes de la médula ósea es el proceso de obtención de estas, pues es altamente invasivo y doloroso, y, aun así, la concentración de células madre es baja [35].

En el año 2001 se consideró la existencia de células madre pluripotenciales en otros tejidos, como el tejido adiposo, cuando se describió una población celular multipotente con morfología fibroblastoide [66], conocida como ADSCs, con el fin de mantener y reparar el tejido conectivo de órganos de origen mesodérmico. El tejido adiposo posee dos características que lo hacen un candidato especial para la extracción de ADSCs: permite obtener un gran número de células que pueden proliferar en cultivo y su procedimiento asociado, la lipoaspiración, es un procedimiento con una aceptación social creciente [67].

En el año 2007, un estudio realizado en la Clínica Planas de Barcelona, España, mostró la gran cantidad de MSC que pueden ser obtenidas con gran facilidad mediante la lipoaspiración [68]. Igualmente en el año 2013, también en España, un estudio realizó la estandarización de un protocolo de extracción y procesamiento de células madre del tejido adiposo abdominal, concluyendo que es precisamente esta zona la de mayores resultados tanto en calidad como en cantidad de células obtenidas [69]. Ambos estudios concluyen que el tejido, el procedimiento de extracción, y el protocolo de procesamiento, tienen una alta fiabilidad, corroborando también la gran cantidad de células madre que pueden ser extraídas, sin embargo, su uso no se ha extendido en la investigación científica, pues aún se están conociendo sus ventajas frente a otras fuentes de obtención.

Debido a lo reciente de estos descubrimientos, históricamente se han usado diversos métodos relacionados con la recuperación ureteral, aplicando injertos sintéticos y autoinjertos para recuperar la funcionalidad, sin el uso de células madre. Dentro de estos se destaca el trabajo desarrollado por Greenberg y Coleman, en 1983 como uno de los primeros trabajos sobresalientes en este campo, quienes presentaron un trabajo experimental en perros, trabajando con injertos libres de mucosa vesical, logrando demostrar que el injerto es capaz de mantener su integridad en el periodo postoperatorio, fusionándose con la línea del urotelio ureteral, y manifestando una regeneración muscular alrededor de la superficie exterior de la mucosa vesical [70]. En la actualidad los procedimientos siguen involucrando estas técnicas por su confiabilidad en la predicción de resultados, mejorando la praxis e identificando los biomateriales correctos para reconstruir el uréter se han obtenido resultados más sobresalientes [45].

En el 2008, se realizó un estudio acerca de las posibilidades de las BM-MSCs para la reconstrucción del tejido muscular liso, para ser aplicado en la recuperación renal; concluyeron que si bien las BM-MSCs mostraba potencial para ser completamente funcional, después de la diferenciación, los porcentajes de eficiencia eran bajos, por lo cual no confirmaban que el uso de estas células para la recuperación directa por diferenciación fuera la mejor técnica [71]. En el 2016, un estudio realizado en Corea del Sur, destacó las propiedades de las células madre derivadas del tejido adiposo como de la médula ósea en el tratamiento de la enfermedad renal aguda y crónica, practicado en ratas, dando buenos resultados en la recuperación del tejido, aunque por vías de acción diferentes. El tratamiento con ADSCs logró reducir la progresión de la fibrosis renal inducida por isquemia, a través de la regulación negativa de la inflamación y la hipoxia, mientras que, afirman, el tratamiento con BM-MSCs se sustenta en la transdiferenciación de estas en células renales específicas, como células tubulares renales, células mesangiales, células endoteliales glomerulares y podocitos, además se le atribuye su acción gracias a citoquinas y factores de crecimiento que son secretadas por BM-MSCs, como acción paracrina y autocrina. El estudio también explora la recuperación del tejido a partir de *scaffolds* pero con el uso de células extraídas del mismo tejido a recuperar [72].

Las investigaciones desarrolladas en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, en Colombia, en su gran mayoría han estado concentradas en el uso de BM-MSCs, es por esto que se cuenta con una amplia bibliografía referente. Aunque, debido a lo relativamente novedoso de la ingeniería de tejidos no se encuentran trabajos que relacionen las BM-MSCs con el uréter como órgano principal.

Sin embargo ya en el año 2007 en Colombia se conocía el uso de las células madre, muestra de ello es la revisión realizada por el Laboratorio de Hematología de la Pontificia Universidad Javeriana, donde realizaron un muy completo compilado

sobre las MSC, desde la forma de obtención de estas, su posterior diferenciación y las posibles aplicaciones médicas en las que pueden estar involucradas. De este se destaca las características de las células obtenidas del tejido adiposo frente a las de médula ósea (ver cuadro 1), validando la información que ya se tenía de las ADSCs. Las principales aplicaciones clínicas de las MSC consisten en la reparación de hueso, tendón, miocardio y como inhibidor del sistema inmune [50].

**TABLA II . COMPARACIÓN FUENTES DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES [50].**

Parámetro	Médula ósea	Tejido adiposo
Éxito de aislamiento	100%	100%
Formación de monocapa adherente	4-5 días	4-5 días
UFC-F obtenidas en la monocapa adherente	83±61	557±673
Capacidad de diferenciación osteogénica	71.4%	78.8%
Capacidad de diferenciación adipogénica	100%	94%
Capacidad de diferenciación condrogénica	100%	100%

En el año 2009 se reportó un estudio, realizado en el Hospital de San José, sobre la construcción de la vía urinaria, usando la técnica de ureteroneocistostomía con túnel transmural y submucoso antirreflujo como implante ureteral. Este procedimiento tiene como ventaja la localización del implante ureteral en el área trigonal lo más anatómicamente posible, lo cual facilita cualquier manipulación diagnóstica e instrumental, no se requiere intubación con catéter de auto retención, disminuyendo así complicaciones. Aun así reportaron que la tasa de éxito fue menor a la esperada según experiencias de otros centros de investigación, y se destacó la necesidad de una buena conservación de la vasculatura arterial del uréter para minimizar las complicaciones urológicas mayores como la extravasación y obstrucción urinaria [10].

En el año 2010 nuevamente en la Pontificia Universidad Javeriana, un estudio abarcó el aislamiento y caracterización de BM-MSCs humanas según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular, realizando la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica, estandarizando unos protocolos de diferenciación con una tasa de aceptación alta [52]. Adicionalmente en Colombia se han realizado diferentes investigaciones como trasplante autólogo para revascularización [73], biocompatibilidad con biomateriales [74], caracterización y comparación de MSCs de diferentes fuentes de obtención [75], como aplicaciones en medicina dental [76], tratamiento para lesiones óseas [77] [78], por lo cual, aunque es relativamente nuevo su uso en investigación en el país, es la de mayor aceptación y resultados probados.

Anteriormente, en la Universidad Autónoma de Occidente, se ha trabajado con estas células en el año 2012, realizando la diferenciación *in vitro* de BM-MSCs a cardiomiocitos, estandarizando los protocolos de aislamiento, cultivo, diferenciación y verificación asociados [79]; en el año 2014 al inducir la recelularización de un vaso sanguíneo después de la diferenciación a linaje endotelial [80]. En ambas investigaciones los resultados fueron satisfactorios, además de la estandarización de protocolos propios, se ha comprobado la diferenciación de BM-MSCs, dando paso a nuevas investigaciones locales para tratar enfermedades y recuperar tejidos.

Finalmente en Colombia, en el tema de quimerización, la institución puntera es la Universidad del Valle como líder de más de 12 grupos multidisciplinarios que trabajan en un Macroproyecto de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa. Estos reportan el primer trasplante de tráquea quimerizada en el 2009 a una paciente con cáncer de tráquea, la cual ya no presenta inmunosupresión y reporta un buen estado de salud; adicional a este, han realizado 2 trasplantes más, en el año 2010 y 2012 respectivamente, y múltiples ensayos realizados en animales, convirtiendo a Cali en líder de esta técnica en Colombia y Latinoamérica [16] [81].

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 DISPOSITIVO DE RECIRCULACIÓN

El cultivo de las células en contacto con el uréter para propiciar la quimerización, se realizó con un dispositivo de recirculación que se diseñó a partir de un sistema de Langendorff, fabricado en el marco del desarrollo de este proyecto. El receptáculo para el uréter fue un vaso de precipitado con doble fondo de 250mL, al cual previamente se le adaptó una entrada de fluido, y una salida por drenaje gravitacional, configurándose como módulo principal. Para generar una recirculación constante se usó una bomba peristáltica con motor DC, a la cual se le adaptó una manguera de macrogoteo, tanto para la salida como entrada de la bomba, y por medio de un adaptador del área transversal construido con impresión 3D aditiva en material PLA (*Polylactic Acid*), a una manguera de 3/8 que se conectó con la salida del vaso de precipitado. Para realizar los cambios de temperatura se usó un vaso de precipitado con agua a la temperatura deseada, transfiriendo el calor por conducción al sumergir la manguera dentro de este.

### 5.2 EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA

Este proyecto hace parte del proyecto “Investigación y producción de tejidos, órganos y biodispositivos para uso en medicina regenerativa”, conjunto entre la Universidad del Valle y la Universidad Autónoma de Occidente, que cuenta con el aval de la Comisión de Ética en Investigación Animal de la Universidad del Valle.

Se utilizó una rata Wistar macho de 4 semanas de edad. El procedimiento se inició con el sacrificio de la rata, mediante inhalación de isoflurano, posteriormente fue limpiado con alcohol yodado y enjuagado con suero fisiológico estéril y transferido a la zona delimitada para la disección. La disección se realizó con incisiones alrededor de la conexión entre las extremidades posteriores y el tronco, y se dislocaron las articulaciones que los une para separarlas. Se removió cuidadosamente músculo, ligamentos y tendones de la tibia y fémur usando un bisturí quirúrgico. Una vez estos estuvieron completamente limpios se colocaron en tubos Falcon® de 15mL y fueron llevados a la cabina de flujo laminar. Todo el procedimiento desde el sacrificio del animal hasta la puesta en la cabina de flujo laminar se realizó en menos de 30 minutos para asegurar una mayor viabilidad celular.

En la cabina los huesos fueron transferidos a una placa de Petri con DMEM suplementado con 10% FBS y 1% penicilina. Para la recolección de la médula ósea,

se lavaron internamente los huesos con HBSS, para ello, se cortaron los extremos de los huesos, por debajo del final de la cavidad medular, usando un costotomo, y se insertó una aguja con jeringa de 5mL de HBSS por uno de los extremos descubiertos de cada hueso, la cavidad medular fue lavada repetidamente hasta que la tonalidad de los huesos se tornó pálida. El resultado del lavado de la cavidad medular se recolectó en dos tubos Falcon® de 15mL y se centrifugó a 2000rpm por 5 minutos, descartando el sobrenadante, y se volvió a centrifugar adicionando HBSS, para lavar la médula.

### **5.3 EXTRACCIÓN DE URÉTER**

Se llevó a cabo una cirugía abierta, a partir de una incisión en la línea media ventral abdominal. Se expuso la vejiga por el desplazamiento de las asas intestinales hacia un costado, cuando se identificó el punto de inserción del uréter en la vejiga, se disecó el uréter en toda su longitud hasta llegar al hilio renal por donde entra la arteria renal y sale la vena renal y el uréter, evitando cortar la vascularización, y se trasladó a un tubo Falcon® de 50mL donde se lavó con 25mL de suero salino fisiológico externamente.

Internamente el uréter se lavó con RPMI suplementado, realizando inyecciones del medio con jeringa de 5mL, eliminando todos los posibles desechos, y se trasladó al dispositivo de recirculación, dejándolo suspendido por medio de una jeringa insertada axialmente. Se agregaron 150mL de RPMI suplementado cubriendo el uréter, y el flujo de la bomba se ajustó a 0.9L/h, manteniéndolo a una temperatura entre 4°C y 7°C, durante 1 hora.

### **5.4 MARCAJE CELULAR**

Antes de hacer el procedimiento de quimerización, se realizó la tinción de todo el lavado de la cavidad medular con *DAPI Nucleic Acid Stain*, el cual es un colorante que se intercala con el ADN celular, con una absorción máxima a una longitud de onda de 358nm, y su máximo de emisión a 461nm. Para esto cada tubo con el lavado de la médula ósea se incubó con 1mL de la solución DAPI + DMEM (1:10) por 10 minutos a 37°C y luego se centrifugó por 10 minutos a 1200 rpm. Después se retiró el sobrenadante de la solución de DAPI + DMEM y se realizó un lavado con HBSS centrifugando por 10 minutos a 1200 rpm para eliminar los restos del colorante, y finalmente el pellet celular se resuspendió en 25mL de DMEM suplementado con 10% FBS y 1% penicilina. Debido a su condición de emisor fluorescente, fue necesario mantenerse siempre en ausencia de luz.

## 5.5 CULTIVO DE CÉLULAS EN URÉTER

Se retiró el medio presente en el dispositivo de recirculación y se reemplazó por medio de cultivo DMEM suplementado con 10% FBS y 1% penicilina y la temperatura se elevó a 30°C. La médula ósea ya marcada se adicionó en el dispositivo de recirculación, y se mantuvo durante 3 horas en oscuridad, controlando que la temperatura se mantuviera entre 30°C y 32°C. Terminado este tiempo, el uréter se trasladó un tubo de 50mL con 30mL de DMEM suplementado con 10% FBS y 1% penicilina y se guardó en oscuridad a 4°C, durante 4 días, por disponibilidad del microscopio.

## 5.6 MICROSCOPIA

Se usó un microscopio de fluorescencia Leica DMIL Led para verificar la presencia de las células en el uréter, para lo cual se trasladó a una placa de Petri y se realizaron cortes con una hoja de bisturí quirúrgico N°20, seccionándolo de tal forma que el haz de luz lograra penetrar el tejido. En el microscopio se comprobó la presencia de células propias por medio de un campo claro, y luego la presencia de las células marcadas de la médula ósea en campo oscuro, por filtro de luz para colorante *DAPI*. Adicionalmente se comparó el tejido con una muestra de uréter de cerdo, previamente descelularizada con SDS al 2%, y marcada con colorante de Papanicolau.

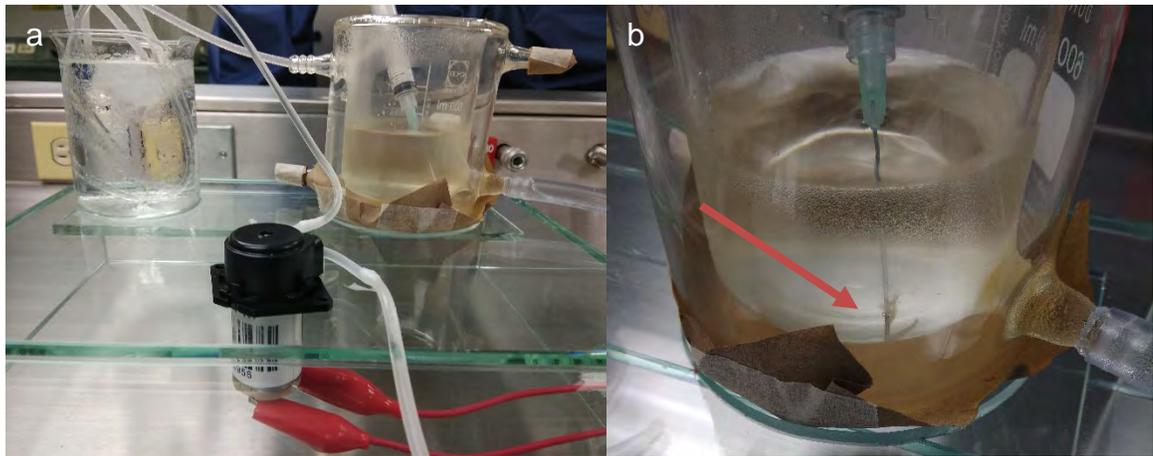
## 6. RESULTADOS

Al extraer la médula ósea se realizaron los lavados solamente a las tibias y fémures (fig. 9) ya que las extremidades posteriores son más desarrolladas que las anteriores; se extrajeron aproximadamente 14mL entre la médula y el HBSS. Se centrifugó para eliminar la solución manteniendo la médula lo más concentrada posible para realizar el marcaje.



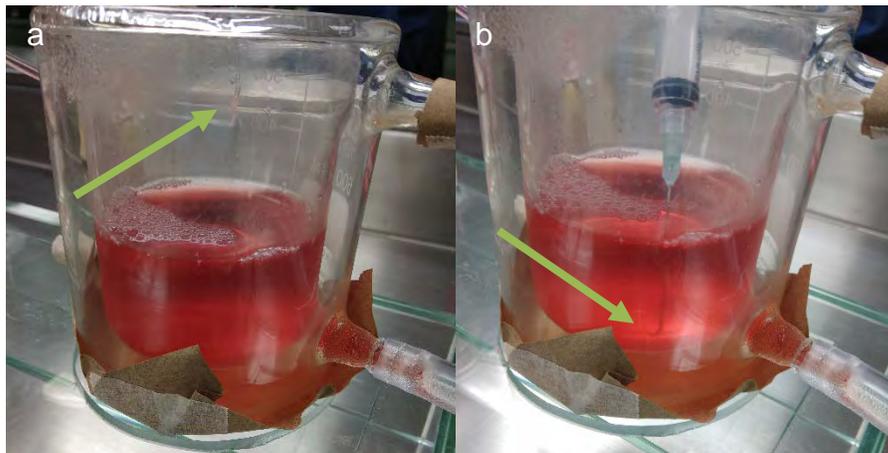
**Fig 9.** Tibia y fémur de ambas extremidades posteriores, después del drenaje de médula ósea.

Durante la cirugía para extracción de uréter no se tuvo indicios de la existencia del uréter derecho, pues en la vejiga solo era visible un conducto, al igual que en el hilio renal derecho donde no se vio el conducto, por tanto solo se extrajo el uréter izquierdo, con un largo de aproximadamente 20mm y un diámetro aproximado a 0.8mm. Durante el lavado con RPMI el uréter se tornó a un color pálido como indicador de la no presencia de restos no deseado (fig. 10). Ya en el dispositivo de recirculación, el uréter permaneció durante 1 hora a temperatura cercana a los 4°C en busca de la conservación de los componentes celulares.



**Fig 10.** Mantenimiento del órgano. A) dispositivo de recirculación con un flujo de 0.9l/h a 4°C. B) uréter diseccionado sujeto por jeringa estéril.

Desde el marcaje de la médula ósea con el colorante fluorescente se mantuvo tanto el dispositivo, como los materiales de transporte cubiertos con papel aluminio para evitar la luz directa sobre el colorante (fig. 12) lo que disminuiría la respuesta de fluorescencia del *DAPI* dificultando la visualización de las células en el microscopio de fluorescencia. Previo a la adición de la médula ósea marcada, ya con DMEM suplementado y a 32°C, no se evidenció a simple vista, ninguna variación en el aspecto del uréter (fig.11).



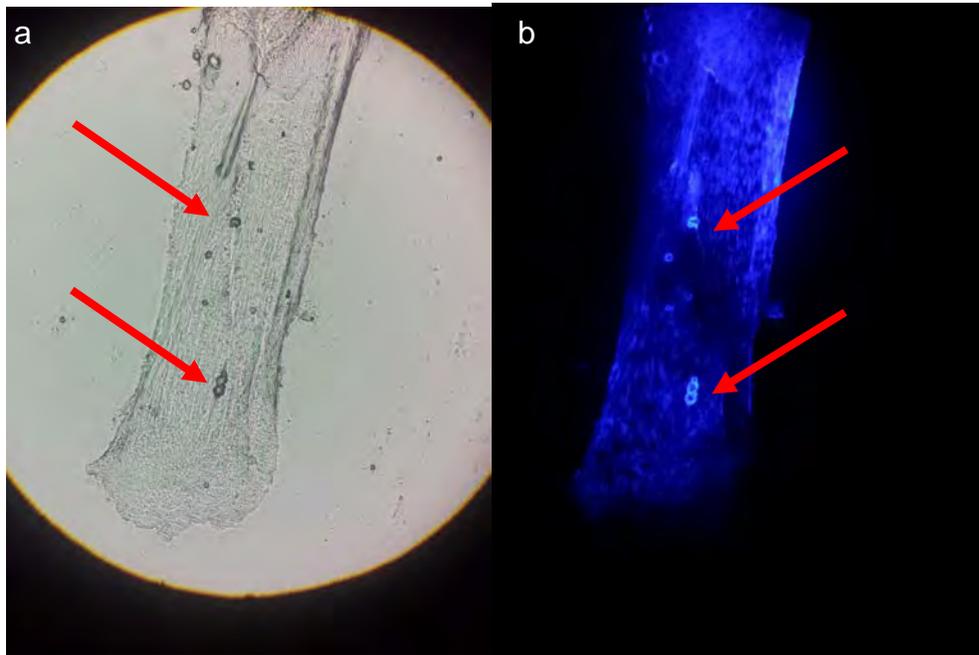
**Fig 11.** Registro del órgano previo proceso de quimerización. a) Aspecto físico del uréter antes de adicionar la médula ósea. b) Ureter en dispositivo de recirculación a 32°C, justo antes del inicio de la quimerización



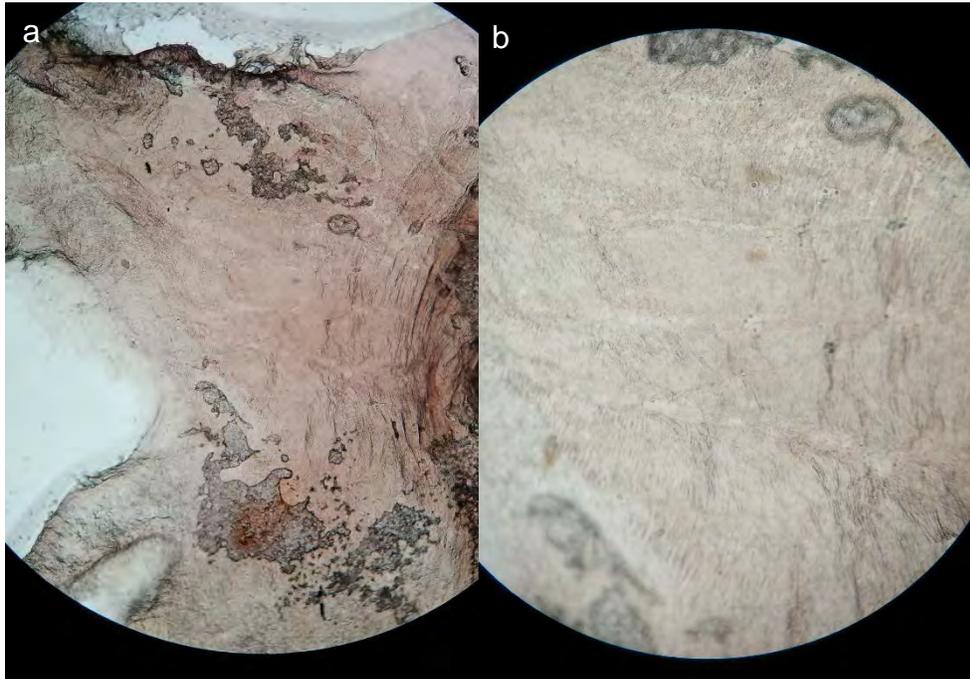
**Figura 12.** Dispositivo de recirculación. a) Vista del dispositivo funcionando durante la quimerización, totalmente cubierto para evitar la luz directa. b) Vista del dispositivo funcionando. Nota: Ambas fotografías fueron tomadas después de extraer el uréter del dispositivo, por lo cual no se afectó la protección de luz directa.

El uréter se observó inicialmente por microscopía de luz para verificar la presencia de células (fig. 13.a) y posteriormente la misma sección del tejido se observó con microscopía de fluorescencia con el filtro específico para el colorante *DAPI* (Fig. 13.b). El *DAPI* es un colorante que se intercala con el ADN en el núcleo de las células, lo que permitió evidenciar en el tejido la presencia de células provenientes de la médula ósea.

Como control que contrasta la diferencia entre un uréter normal y un uréter sin células, se observó con microscopía de luz un uréter de cerdo, que para la investigación tienen anatomía muy similar, previamente descelularizado, teñido con colorante de Papanicolau (fig. 14). A las muestras de uréter de rata no se les realizó la misma coloración pues el proceso para lograrla alteraría la tinción fluorescente por *DAPI*.



**Fig 13.** Uréter quimerizado x20. a) Microscopia en campo claro, muestra la presencia de células. b) Microscopia de fluorescencia, focos de emisión fluorescente de colorante *DAPI*



**Fig 14** Uréter de cerdo descelularizado con colorante de Papanicolau. a) Uréter de cerdo en microscopio biológico x4. b) Uréter de cerdo en microscopio biológico x10

## 7. CONCLUSIONES

A partir de la investigación se logró establecer una metodología inicial para la quimerización de órganos en animales pequeños, además de probar el dispositivo de recirculación acondicionado para tal fin. No se detectó ninguna diferencia apreciable visualmente en el uréter durante el proceso de quimerización, cabe resaltar que al no tener el compromiso de un posterior implante, no se realizó una perfusión ni se hizo un seguimiento al comportamiento químico de las células.

Los resultados de la quimerización con médula ósea permitieron confirmar que es posible la adherencia *in vitro* de células madre a un órgano mediante un procedimiento que no implique primero descelularizarlo, sino que por el contrario permita encontrar tanto las células de la médula ósea como las propias del tejido, en el mismo. Además permite establecer que de hacerse un procedimiento de implantación del órgano, podrían obtenerse resultados similares en cuanto a aceptación del órgano, como han reportado otras instituciones. Sin embargo se debe realizar una fase posterior para determinar si la sola presencia de estas células en el tejido genera la compatibilidad o influyen otros factores de la médula ósea.

Los resultados obtenidos son muy importantes dado la viabilidad del procedimiento y su impacto social al mejorar los resultados de trasplantes, disminuyendo los costos relacionados a la inmunosupresión, además de abrir la puerta a nuevas investigaciones en el campo como el uso de órganos de reemplazo en humano.

## 8. RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir la metodología planteada para el proceso de quimerización en investigaciones con estructuras de anatomía similar a la del uréter, pues se pudo observar la conservación de la estructura, y promete resultados en un corto tiempo. Respecto a estructuras más complejas, no se podrían extrapolar los resultados obtenidos, por lo que podrían ser necesarios unos procedimientos distintos para cada tipo de órgano.

Se sugiere realizar ensayos posteriores en busca de optimizar la técnica empleada, tales como, la caracterización de factores presentes en la médula ósea, determinando cada uno de los efectos que se producen en el órgano, así como establecer las variables óptimas de trabajo del dispositivo de recirculación, en términos de flujo, cantidad de médula ósea frente al volumen del órgano, el tiempo necesario para alcanzar un resultado aceptable, etc.

En futuros proyectos se sugiere realizar los procedimientos en condiciones de esterilidad completa, para no comprometer los resultados con posible contaminación sobre todo si el tejido va a ser implantado en un animal experimental; realizar un conteo de células obtenidas de la médula ósea; realizar cortes histológicos usando un micrótopo que garantice cortes precisos; realizar un seguimiento de este comportamiento de ambas fuente de células en el tiempo; comparar el resultado frente al obtenido mediante la recelularización (ya que se considera como una técnica estándar), y su comportamiento al estrés físico propio de los movimientos peristálticos, para determinar el comportamiento mecánico del uréter quimerizado.

Finalmente se sugiere evaluar la pertinencia y viabilidad de trabajar con otras fuentes de obtención de MSC como las derivadas del tejido adiposo, las cuales prometen buenos resultados en otras áreas de investigación, aunque se desconoce si las propiedades de estas son similares en cuanto a inmunoregulación, también tener en consideración las células madre derivadas de orina (USC) por tratarse exclusivamente de un desecho que podría ser aprovechado.

## REFERENCIAS

- [1] Z. Moinuddin y R. Dhandra, «Anatomy of the kidney and ureter,» *Anaesthesia and intensive care medicine*, pp. 247-252, 2015.
- [2] Ministerio de salud y protección social, «Análisis de poblaciones diferenciales relevantes,» Bogotá, Colombia, 2013.
- [3] European Association of Urology, *Tratamiento de los cálculos renales y ureterales*, 2012.
- [4] The transplantation society of latin america and the caribbean, «Latin america transplantation. Report 2009,» Latin america transplantation report, 2009.
- [5] K. Qi, N. Li, Z. Zhang y G. Melino, «Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response,» *Cellular immunology*, 2017.
- [6] S. Hadley, «Infecciones del tracto urinario,» de *Medicina integrativa 2da Edición*, Elsevier Masson, 2009, pp. 256-260.
- [7] J. L. Lobato, D. Andía, G. Garay y M. López-Valverde, «Lesiones del tracto urinario en cirugía ginecológica,» *Clínica e investigación en ginecología y obstetricia*, vol. 38, nº 3, pp. 100-103, 2011.
- [8] J. A. Rodríguez-Robles, L. Almazan-Treviño, J. I. Monjaras-Guerra, V. I. Victoria-Mejía, A. C. Martínez-Barz, M. P. Ávila-Boza y M. A. Reyes-Gutierrez, «Sustitución de uréter con apéndice cecal en un paciente con estenosis ureteral: primer caso reportado en México y revisión de la literatura,» *Revista mexicana de urología*, vol. 76, nº 1, pp. 60-63, 2016.
- [9] V. Gonzalo Rodríguez, M. D. Rivero Martínez, J. Trueba Arguiñarena, J. Calleja Escudero, C. Müller Arteaga y E. Fernández del Busto, «Diagnóstico y

tratamiento de las complicaciones urológicas del trasplante renal,» *Actas urológicas españolas*, vol. 30, nº 6, pp. 619-625, 2006.

- [10] J. A. Guzmán Charry, «Construcción de la vía urinaria en el trasplante renal,» *Revista urológica colombiana*, vol. 18, nº 3, pp. 53-62, 2009.
- [11] Q. Wang, D.-d. Xiao, H. Yan, Y. Zhao, S. Fu, J. Zhou, Z. Wang, Z. Zhou, M. Zhang y M.-J. Lu, «The morphological regeneration and functional restoration of bladder defects by a novel scaffold and adipose-derived stem cells in a rat augmentation model,» *Stem cell reseach & therapy*, vol. 8, nº 149, 2017.
- [12] J. Yifeng, X. Shujie, S. Hongbin, X. Yaoting, F. Jie y T. Xiaoda, «Use of free peritoneal and bladder mucosal grafts as ureteral mucosa substitutes for management of avulsion of the ureteral mucosa in a dog model,» *Journal of endourology*, vol. 22, nº 4, pp. 729-734, 2008.
- [13] Z. Zhao, H. Yu, F. Xiao, X. Wang, S. Yang y S. Li, «Differentiation of adipose-derived stem cells promotes regeneration of smooth muscle for ureteral tissue engineering,» *Journal of surgical research*, vol. 178, pp. 55-62, 2012.
- [14] L. C. Meng, W. B. Liao, S. X. Yang, Y. H. Xiong, C. Song y L. Q. Liu, «Seeding homologous adipose-derived stem cells and bladder smooth muscle cells into bladder submucosa matrix for reconstructing the ureter in a rabbit model,» *Transplantation proceedings*, vol. 47, pp. 3002-3011, 2015.
- [15] B. L. Phillips y C. Callaghan, «The immunology of organ transplantation,» de *Surgery*, Oxford International Edition, 2017, pp. 333-340.
- [16] Cámara de comercio de Cali, «Con la 'quimerización' de células madre, la región da un paso adelante en trasplantes,» 6 Agosto 2012. [En línea]. Available: <http://goo.gl/MUP5Hd>. [Último acceso: 15 Marzo 2018].
- [17] J. Coresh, E. Selvin, L. A. Stevens, J. Manzi, J. W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente y A. S. Levey, «Prevalence of chronic kidney disease in the United

States,» *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, vol. 298, nº 17, pp. 2038-2047, 2007.

- [18] National institute of diabetes and digestive and kidney diseases, «Bladder infection (Urinary tract infection - UTI) in adults,» U.S. Department of health and human services, [En línea]. Available: <https://goo.gl/52OUeh>. [Último acceso: 15 3 2018].
- [19] National institute of diabetes and digestive and kidney diseases, «Diabetic kidney disease,» U.S. Department of health and human services, [En línea]. Available: <https://goo.gl/QNgGPC>. [Último acceso: 15 3 2018].
- [20] I. Jiménez-Vázquez, I. A. Reyes-García, A. R. Aragón-Tovar, G. C. Palacios-Saucedo, A. García-Mendoza, A. Michel-Chávez y M. E. Huitrado-Duarte, «Factores asociados al fracaso en la colocación de catéteres doble J en pacientes con uropatía obstructiva por cáncer,» *Revista mexicana de urología*, vol. 76, nº 2, pp. 71-75, 2016.
- [21] National cancer institute, «Cáncer de células de transición de pelvis renal y de uréter: Tratamiento (PDQ®)-Versión para pacientes,» 2015.
- [22] C. E. Bayne y T. W. Jarrett, «Chapter 14 Cancer of the prostate: Incidence in the USA,» de *Prostate Cancer (Second Edition)*, Elsevier, 2016, pp. 119-125.
- [23] M. R. Rosas, «Hiperplasia benigna de próstata,» *OFFARM*, vol. 25, nº 8, pp. 102-108, 2006.
- [24] Latin america and the caribbean demographic observatory, «Population projections,» Economic comission for latin america and the caribbean, Santiago de Chile, 2015.
- [25] L. A. Blanco, J. Guzmán, J. R. Corrales y A. L. Cáceres, «Complicaciones urológicas en el primer mes post-trasplante renal,» de *Congreso colombiano de urología*, Cali, 2005.

- [26] J. Escribano Subías y B. Valenciano Fuentes, «Relujo vesicoureteral,» Asociación española de pediatría, 2014.
- [27] European Association of Urology, «Guía clínica sobre los traumatismos urológicos,» 2009.
- [28] A. Challú, «Historia da nefrología iberoamericana: Argentina,» *Nefrología*, vol. 12, nº 3, pp. 11-14, 1992.
- [29] F. Cantarovich y Bacqué, «Trasplantes en la Republica Argentina,» de *Trasplante de órganos (2 Edición)*, México, JGH Editores, 1999, pp. 27-51.
- [30] A. Dib-Kuri, J. B. Anznar y J. A. Gómez, «El trasplante en México,» de *Trasplante de órganos (2 Edición)*, México, JGH Editores, 1999, pp. 83-86.
- [31] M. Vasconcelos, P. Menezes y J. Menezes, «O transplante renal no Hospital dos Servidores do Estado - Rio de Janeiro. Revisão de 380 transplantes,» *Jornal brasileiro de transplantes*, vol. 1, pp. 71-83, 1998.
- [32] R. R. D'Achiardi, «Historia da nefrología iberoamericana: Colombia,» *Nefrología*, vol. 12, nº 3, pp. 35-36, 1992.
- [33] The transplantation society of latin america and the caribbean, *Latin america transplantation registry*, 2016.
- [34] T. E. Starzl y F. G. Lakkis, «The unfinished legacy of liver transplantation: Emphasis on immunology,» *Hepatology*, vol. 43, nº 2, pp. 151-163, 2006.
- [35] L. A. Marquez-Curtis, A. Janowska-Wieczorek, L. E. McGann y J. A. W. Elliott, «Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects,» *Cryobiology*, vol. 71, pp. 181-197, 2015.
- [36] M. Morales-Valencia, M. I. Patiño-Vargas, L. A. Correa-Londoño y L. M. Restrepo-Múnera, «Evaluación del método químico-enzimático de

descelularización para la obtención de matrices extracelulares de tráquea en el modelo porcino,» *IATREIA*, vol. 22, nº 2, pp. 144-156, 2016.

- [37] T. Bohnenpoll y A. Kispert, «Ureter growth and differentiation,» *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 36, pp. 21-30, 2014.
- [38] R. Drake, A. Wayne Vogl y A. Mitchell, *Gray's anatomy for students*. 2nd Edition, Churchill Livingstone, 2009.
- [39] Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, «Anatomía de uréteres. Notas de clase. Aula virtual de anatomía humana,» [En línea]. Available: <https://goo.gl/2fn58z>. [Último acceso: 16 Abril 2018].
- [40] M. Giessing, «Transplant ureter stricture following renal transplantation,» *Transplantation proceedings*, vol. 43, pp. 383-386, 2011.
- [41] M. Eltemamy, A. Crane y D. A. Goldfarb, «Urinary diversion in renal transplantation,» *Urology clinics*, vol. 45, nº 1, pp. 113-121, 2018.
- [42] D. Rosselli, J. D. Rueda y C. E. Diaz, «Cost-effectiveness of kidney transplantation compared with chronic dialysis in end-stage renal disease,» *Saudi journal of kidney diseases and transplantation*, vol. 26, nº 4, pp. 733-735, 2015.
- [43] ABC Sociedad, «¿Cuánto cuesta un trasplante?,» 4 Septiembre 2014. [En línea]. Available: <https://goo.gl/wKLbSx>. [Último acceso: 16 3 2018].
- [44] Organización Nacional de Trasplantes, «Newsletter transplant 2017,» Council of europe european committee on organ transplantation, 2017.
- [45] T. Kloskowski, A. Jundzill, T. Kowalczyk, M. Nowacki, M. Bodnar, A. Marszalek, M. Pokrywczyńska, T. A. Kowalewski y T. Drewa, «A comparison of two biomaterials for ureter reconstruction in a rat model,» *European urology supplements*, vol. 12, p. 1165, 2013.

- [46] P. Hernández Ramírez y E. Dorticós Balea, «Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas,» *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*, vol. 20, nº 3, 2004.
- [47] S. Liu, «Chapter 9. Regeneration of adult cells, tissues and organs,» de *Bioregenerative engineering: principles and applications*, New Jersey, John Wiley & Sons, 2007, pp. 380-417.
- [48] T. Winslow y C. Duckwall, *Técnicas para generar cultivos celulares de célula madre embrionarios*, 2001.
- [49] Seishin Regenerative medicine center., «Stem cells therapy,» Mediclude Co. Ltd, [En línea]. Available: <https://goo.gl/5S6ZEY>. [Último acceso: 16 Abril 2018].
- [50] J. A. Arévalo Romero, D. M. Páez Guerrero y V. M. Rodríguez Pardo, «Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas,» *NOVA*, vol. 5, nº 8, pp. 177-184, 2007.
- [51] L. M. Martínez, V. Labovsky, V. B. Fernández Vallone, C. H. Choi, M. A. Amorós, C. Phillips y N. A. Chasseing, «Chapter 15. Mesenchymal stem cells as regulators of the bone marrow and bone components,» de *Mesenchymal stromal cells as tumor stromal modulators*, Elsevier Inc, 2017, pp. 369-400.
- [52] V. M. Rodríguez Pardo, M. F. Fuentes Lacouture, J. A. Aristizabal Castellanos y J. P. Vernot Hernandez, «Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular,» *Universitas scientiarum*, vol. 15, nº 3, pp. 224-239, 2010.
- [53] S. Huang, L. Xu, Y. Sun, T. Wu, K. Wang y G. Li, «An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow,» *Journal of orthopaedic translation*, vol. 3, pp. 26-33, 2015.

- [54] L. J. Martin, «Transplant rejection,» MedlinePlus. U.S. National Library of Medicine, 21 Mayo 2017. [En línea]. Available: <https://goo.gl/UER3tD>. [Último acceso: 16 3 2018].
- [55] F. Triana Martínez, L. E. Gómez Quiroz y M. Königsberg Fainstein, «El flujo de la información y la proteostasis: Consecuencias fisiológicas,» *REB*, vol. 31, nº 4, pp. 136-144, 2012.
- [56] Boston Children's Hospital Heart Center, «Transplanting a patient's own mitochondria to rescue their heart,» [En línea]. Available: <https://goo.gl/qTcLSg>. [Último acceso: 18 3 2018].
- [57] J. L. Gollihue y A. G. Rabchevsky, «Prospects for therapeutic mitochondrial transplantation,» *Mitochondrion*, vol. 35, pp. 70-79, 2017.
- [58] A. V. Kozlov, S. Bahrami, E. Calzia, P. Dungal, Giller Lars, A. V. Kuznetsov y J. Troppmair, «Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patient die from mitochondrial failure?,» *Annals of intensive care*, vol. 1, nº 41, 2011.
- [59] S. M. Kapnick, S. E. Pacheco y P. J. McGuire, «The emerging role of immune dysfunction in mitochondrial diseases as a paradigm for understanding immunometabolism,» *Metabolism*, vol. 81, pp. 97-112, 2017.
- [60] J. Zuber y M. Sykes, «Mechanisms of mixed chimerism-based transplant tolerance,» *Trends in immunology*, vol. 38, nº 11, pp. 829-843, 2017.
- [61] A. Amor Vigil y G. Martínez Antuña, «Importancia del estudio del quimerismo en el trasplante alogénico de médula ósea,» *Instituto de hematología e inmunología*, vol. 19, pp. 2-3, 2003.
- [62] R. Elahimehr, A. T. Scheinok y D. B. McKay, «Hematopoietic stem cells and solid organ transplantation.,» *Transplantation reviews*, 2016.

- [63] National institutes of health, «Stem cell information,» U.S. Department of health & human services, 2016. [En línea]. Available: <https://goo.gl/nJyXlp> . [Último acceso: 16 3 2018].
- [64] J. Polak, «Regenerative medicine: A primer for pediatricians,» *Early human development*, vol. 85, nº 11, p. 685, 2009.
- [65] Y. Lin, G. Li y J. Liao, Adipose-derived stem cells: Clinical applications, biological characteristics and therapeutic potential in regenerative medicine, Nova Science Pub Inc, 2017.
- [66] B. B. Socarrás Ferrer, L. O. del Valle Pérez, K. de la Cuétara Bernal, J. A. Galván Cabrera, A. Bencomo Hernández y C. Macías Abraham, «El tejido adiposo como fuente alternativa en la medicina regenerativa,» *Revista cubana hematología, inmunología y hemoterapia*, vol. 29, nº 4, pp. 340-348, 2013.
- [67] M. Meruane y M. Rojas, «Células troncales derivadas del tejido adiposo,» *International journal of morphology*, vol. 28, nº 3, pp. 879-889, 2010.
- [68] J. Planas Ribo y R. Coronel Gagliardi, «Obtención y criopreservación de células madre del tejido graso mediante liposucción,» *Cirugía plástica ibero-latinoamericana*, vol. 37, nº 4, pp. 319-324, 2011.
- [69] E. Serna Cuéllar y L. Santamaría Solís, «Protocolo de extracción y procesamiento de células madre adultas del tejido adiposo abdominal: coordinadas del cirujano plástico en la investigación traslacional,» *Cirugía plástica ibero-latinoamericana*, vol. 39, nº 1, pp. 44-50, 2013.
- [70] R. Greenberg, J. W. Coleman, C. C. Quiguyan, D. Marion, C. Albanese, G. O'Dell y J. H. MCGovern, «Bladder mucosal grafts: experimental use as a ureteral substitute and observation of certain physical properties,» *The journal of urology*, vol. 129, nº 3, pp. 634-636, 1983.
- [71] R. Antoon, H. Yeger, J. Haig, K. Moore y W. A. Farhat, «Bone marrow mesenchymal stem cells as a source of urinary bladder smooth muscle cells:

phenotypic and functional characterization in a mouse model,» *The journal of urology*, vol. 179, nº 4, pp. 73-74, 2008.

- [72] K. H. Moon, I. K. Ko, J. J. Yoo y A. Atala, «Kidney diseases and tissue engineering,» *Methods*, vol. 99, pp. 112-119, 2016.
- [73] J. M. Senior, F. Cuéllar, Ó. Velásquez, M. Velásquez, C. M. Navas, S. Ortiz, J. A. Delgado, G. Blanco, J. L. Londoño, M. A. Coronado, F. Gómez, F. León Alzate y A. Zuluaga, «Trasplante de células progenitoras derivadas de la médula ósea y factor de crecimiento granulocítico en cardiopatía isquémica aguda y crónica,» *Revista colombiana de cardiología*, vol. 14, nº 6, pp. 341-352, 2007.
- [74] C. Carretero, C. Bernal, M. L. Torres, K. J. Thevi, F. A. Zakaria y J. Mikán, «Evaluación de la biocompatibilidad de apatita carbonatada de síntesis por medio de cultivo de células osteoprogenitoras de porcino,» *Revista facultad de medicina, Universidad Militar Nueva Granada*, vol. 17, nº 2, pp. 231-244, 2009.
- [75] D. Paéz Guerrero, J. Arévalo Romero y V. M. Rodríguez Pardo, «Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea,» *NOVA*, vol. 5, nº 8, pp. 114-126, 2007.
- [76] J. Gallón Nausa, «Evaluación clínica y radiográfica de injertos biocerámicos tipo hidroxiapatita como alternativa en la reconstrucción de alveolos dentarios postexodoncia,» *NOVA*, vol. 12, nº 21, pp. 157-164, 2014.
- [77] M. P. López, *Uso autólogo de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea para el tratamiento de lesiones osteocondrales: revisión de protocolos y métodos de criopreservación*, Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana, 2014.
- [78] L. M. Franco González y L. M. Restrepo Múnera, «Células madre mesenquimales: Una alternativa para la regeneración ósea,» *Revista nacional de odontología*, vol. 8, nº 15, pp. 79-86, 2012.

- [79] D. M. Rojas González, *Inducción de cardiomiocitos a partir de células mesenquimales de médula ósea diferenciadas in vitro*, Cali: Universidad Autónoma de Occidente, 2012.
- [80] M. M. Cadena Moreno y J. M. Rivera Arbeláez, *Inducción de la re-celularización con tejido endotelial de un vaso sanguíneo utilizando su matriz extracelular como andamiaje, a partir de células endoteliales in vitro*, Cali: Universidad Autónoma de Occidente, 2014.
- [81] Redacción de El País, «La tecnología 'made in' Univalle que revoluciona el mundo de los trasplantes,» *El País*, p. B3, 14 Febrero 2018.