

Actualización

Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular

Dres. GERMAN F. FALKE* y ANTHONY ATALA*

Arch. argent. pediatr 2000; 98(2): 103

Ingeniería tisular: conceptos generales

Se conoce como ingeniería tisular al área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo. Es la intención de esta ciencia reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido.

La pérdida total o parcial de tejido, como así también la pérdida de la función de un órgano, es uno de los más graves y costosos problemas de salud de un ser humano. Actualmente, la cirugía reconstructiva y trasplantológica es el arma fundamental para la atención de estos pacientes. La utilización de órganos para trasplantes usualmente se ve limitada por la baja cantidad de donantes. Anualmente un gran número de pacientes muere en listas de espera y muchos otros no llegan siquiera a integrarlas. Esta creciente necesidad de órganos, llevó a los investigadores a utilizar células vivientes autólogas para la reconstrucción de órganos y tejidos. La ventaja de esta nueva tecnología es la de evitar la terapéutica inmunosupresora.

Tratar la pérdida de función de los tejidos y órganos ha sido preocupación continua de los investigadores, habiéndose intentado a través de los cuatro procesos básicos: trasplantes, injertos autólogos, prótesis y regeneración tisular.

Introducción

El término tissue engineering (ingeniería tisular) fue adjudicado a esta disciplina en la primavera de 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias, pero muchas de las técnicas utilizadas en ella habían sido desarrolladas en décadas anteriores.¹ La idea de la ingeniería tisular

se forjó con la unión de la experiencia ganada en diversos campos, como la biología celular, la bioquímica y la biología molecular y su posterior aplicación a la ingeniería de nuevos tejidos. El rol de la ingeniería química y biológica fue fundamental para la aplicación racional de los principios de los sistemas vivientes. La tercer arma de conocimiento fue proporcionada por la terapéutica humana brindada por médicos y cirujanos.

Hoy, científicos de diversas áreas (molecular, celular, biológica) colaboran activamente con ingenieros biomecánicos para desarrollar tejidos análogos que permiten a los médicos mejorar, mantener y restaurar la función de un órgano.

Matriz extracelular

Por muchos años se creyó que la matriz extracelular era sólo una superficie de soporte para los tejidos. Hoy sabemos que es un sistema dinámico integrado por diversas moléculas y su organización varía con los diferentes tejidos.^{2,3} La matriz extracelular está compuesta por diversas moléculas como colágeno, glucoproteínas, ácido hialurónico, proteoglicanos, glucosaminoglicanos, elastina y fibrina, además de otras tales como factores de crecimiento, citoquinas y diversas enzimas.⁴ La dinámica interacción entre las células y la matriz extracelular contribuye a la migración celular, proliferación, diferenciación, forma, metabolismo y la consecuente muerte celular.

Los tres pilares básicos sobre los cuales se sustenta la ingeniería tisular para desarrollar reemplazos de tejidos son:

1. Prevenir una respuesta inmunológica, ya sea inflamación, rechazo o ambas. Idealmente, si se pudieran manipular células pluripotenciales, una vez diferenciadas éstas en el medio disminuirán la respuesta inmunológica.
2. Será necesario crear el sustrato ideal para la sobrevida, desarrollo y diferenciación celular. La utilización de implantes biocompatibles compuestos por moléculas integrantes de la matriz extracelular sembradas por células autólogas será una estrategia a considerar.

* Laboratory for Tissue Engineering and Cellular Therapeutics. Department of Urology Children's Hospital Harvard Medical School.

Correspondencia: Dr. German F. Falke. Research Fellow in Paediatric Urology. Department of Urology. Children's Hospital. Harvard Medical School. 300 Longwood Av. En: 450.1 Boston, MA USA 02115.

El agregado de factores de crecimiento y diferenciación celular incrementará potencialmente la calidad del tejido a reemplazar.

3. Proveer un adecuado medio ambiente para el desarrollo celular y tisular es crucial para mantener la función celular y el desarrollo del tejido neoformado.

Transportadores celulares o polímeros

En la biología normal de los tejidos vivos, las células se mantienen en un continuo remodelamiento; de acuerdo a su información genética y a su entorno forman estructuras e intercambian con el medio sustancias para su nutrición, intercambio gaseoso y eliminación de detritus.

Mediante la utilización de sistemas de trasplante celular, las células se ponen en contacto directo con el segmento del organismo receptor. En esta situación muchas células no podrán ser incorporadas al receptor debido a múltiples factores locales. Aquí entonces surge la necesidad de utilizar diversas sustancias para el transporte celular que permitan a las células subsistir hasta su incorporación por el huésped. Estas sustancias son llamadas polímeros.

Las características básicas que un polímero debe tener para ser utilizado son: alta porosidad, gran superficie de contacto celular, estructura constante, forma tridimensional y biocompatibilidad.

La función de un polímero es dirigir el crecimiento celular, ya sea de los tejidos adyacentes o de las células sembradas en él. Para esto, el polímero debe proveer una adecuada adhesión celular, favorecer la proliferación y diferenciación celular y, en ciertos casos, favorecer la migración celular. Hay muchos materiales biocompatibles que pueden ser utilizados como polímeros, sin embargo, los biodegradables son preferidos debido a que el rol del polímero usualmente es temporario. Los polímeros biodegradables proporcionan un sustento celular hasta que las células son capaces de secretar su propia matriz extracelular.

El ácido poli-L-láctico (PLLA), el ácido láctico-co-glicólico (PLGA) y el ácido glicólico (PGA) son una línea de polímeros biocompatibles de degradación por simple hidrólisis y aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para ciertas aplicaciones (*Fotografía 2 B*).⁵⁻⁷ Entre los polímeros naturales más ampliamente utilizados están las matrices de colágeno aceluares obtenidas, procesadas, desecadas y esterilizadas de muy diversas formas.^{8,9}

Angiogénesis

Angiogénesis es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Como terapéutica, la inducción de la angiogénesis puede revertir condiciones de isquemia tisular. Actualmente se conocen varios tipos de factores de crecimiento: factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento transformador de células beta (TGF- β) y osteonectina (ON).^{10,11} Mucho se necesita investigar aún en cuanto al rol que juegan los factores de crecimiento y las citoquinas en los tejidos normales y los tejidos remodelados. El gran progreso de los últimos años en este campo fue el haberlos identificado, aislado, clonado y caracterizado. Lo más importante hasta el momento es que estas moléculas juegan un importante rol en el proceso normal que transcurre desde la injuria hasta la reparación de los tejidos. En el campo de la ingeniería tisular, la inducción de la vascularización podrá rescatar tejido necrótico, favorecer la infiltración del polímero o transportador celular y perfundir efectivamente los nuevos tejidos. Por lo tanto, una terapéutica angiogénica eficaz en el lugar del implante tendrá el potencial de proveer los nutrientes necesarios para desarrollar el nuevo órgano o tejido.^{11,12}

Piel

La piel, el órgano más grande del organismo, fue el primero en ser desarrollado utilizando técnicas de ingeniería tisular. También fue la primera aplicación clínica de esta nueva disciplina y hasta hoy, la más ampliamente utilizada. A comienzos de los años 80, células autólogas fueron utilizadas para el reemplazo de piel.¹³ Queratinocitos autólogos, tomados por una pequeña biopsia quirúrgica de una zona no lesionada, fueron cultivados y expandidos in vitro y posteriormente sembrados sobre las lesiones de estos pacientes. Otros investigadores simultáneamente utilizaron polímeros como vehículo para implantar estas células. En 1981, una dermis artificial fue creada con componentes básicos de la matriz extracelular, como colágeno y glucosaminoglicanos, cubiertos por una membrana de silastic. Este sistema, inicialmente acelular, favorece la migración celular con su consecuente vascularización. El silastic previene la pérdida de líquidos y protege el crecimiento celular.¹⁴

Otro sistema utilizado para la generación de la piel, es un doble cultivo conformado por células de la dermis y de la epidermis sembradas en una matriz de colágeno.¹⁵ Debemos citar que estos productos son

técnicamente fabricados con células alogénicas. Aparentemente estas células, fibroblastos y queratinocitos, no provocarían respuesta inmunológica del huésped.¹⁶ La posible explicación a este fenómeno sería que las células de la capa inferior de la piel, la dermis formada por fibroblastos diploicos en su mayoría, presentan un potencial de proliferación celular alto y no poseen en su superficie expresión de antígenos de leucocitos humanos (HLA-DR) por lo cual no estimularían la reacción inmune del huésped.¹⁷⁻¹⁹

Otra de las técnicas utilizadas ha sido el empleo de matrices de poliglactina, componente natural de la matriz extracelular, sembradas con fibroblastos obtenidos a través del procesamiento de prepucio neonatal humano removido quirúrgicamente.²⁰ Este producto actualmente ha sido utilizado en estudios clínicos en humanos con aparente buen resultado.²¹

La ventaja de utilizar tejido humano normal obtenido y procesado por diversas técnicas de cultivo *in vitro* es que desarrolla un tejido efectivo, seguro y constante, capaz de ser utilizado en amplios segmentos lesionados del organismo.

Actualmente se están desarrollando diversas etapas de investigación clínica utilizando piel obtenida y desarrollada por ingeniería tisular para tratamiento de quemados severos o úlceras crónicas en piel. Los resultados hasta el momento muestran un gran potencial para el reemplazo de piel ofreciendo una nueva alternativa para el tratamiento de estos pacientes.

Páncreas

Hay más de 100 millones de pacientes portadores de diabetes mellitus en el mundo.²² En pacientes con diabetes insulino dependientes hay una marcada disminución en el número de células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas.²² La utilización convencional de insulina no puede reemplazar la normal regulación de la glucemia realizada por el páncreas. Diversos grupos de estudio sugieren que estas fluctuaciones en la administración de insulina tendrían una activa repercusión en las complicaciones de la diabetes como nefropatía, retinopatía y neuropatía.²³

En los próximos años, la esperanza del trasplante de islotes de Langerhans no sólo eliminará la aplicación diaria de insulina, sino que también disminuirá las complicaciones asociadas a esta enfermedad.²⁴ El trasplante de estas estructuras conlleva la utilización de drogas inmunosupresoras que pueden exponer al paciente a serias complicaciones, como cáncer, infecciones, fallo renal y osteoporosis.²⁵⁻²⁷ Además, muchas de estas dro-

gas, como glucocorticoides y ciclosporina, producen un deterioro en la función de las células beta transplantadas dependiente de la dosis.²⁸⁻³⁰ En los últimos años han sido desarrollados y utilizados varios sistemas de aislamiento inmunológico. Con la utilización de técnicas de microencapsulación celular, sustancias de bajo peso molecular como nutrientes, oxígeno, electrolitos, secreciones de productos celulares, pueden pasar a través de la microcápsula mientras que células inmunológicas, anticuerpos y otras sustancias mediadoras del rechazo de injertos no pueden hacerlo debido a su alto peso molecular. Varios investigadores han logrado microencapsular células beta, logrando buenos niveles de glucemia.^{31,32} Este descubrimiento abre una nueva expectativa a este grupo de pacientes, dado que no sólo permite trasplantar células alogénicas sin respuesta inmunológica sino que también permite trasplantar células xenogénicas con similares resultados.

Lim y Sun fueron los primeros en utilizar microcápsulas a comienzos de los años 80.³³ Desde entonces, muchas modificaciones producidas a la técnica de microencapsulación mejoraron notablemente su biocompatibilidad. Estas modificaciones lograron incrementar dramáticamente la duración del islote celular microencapsulado, mostrando efectiva función en roedores diabéticos por más de un año.³⁴ Shoing y col., informaron regulación del nivel de glucosa en sangre por 172 días en perros diabéticos.³⁵ Utilizando esta misma tecnología, un paciente con diabetes tipo I logró mantener adecuados niveles de glucemia por un período de 9 meses sin requerir insulina.³⁶

El trasplante de células productoras de insulina microencapsuladas, inicialmente demostrado en roedores y recientemente informado en animales mayores, se encuentra hoy cerca de ser una variable real como terapéutica humana. En un futuro cercano deberán programarse estudios clínicos con mayor número de pacientes.

La utilización de estos sistemas transportadores de drogas tendrá aplicación, en un futuro cercano, en el tratamiento de diversas patologías como cáncer, hemofilia, fallo hepático y enfermedad de Parkinson, entre otras.²²

Vasos

Numerosas son las indicaciones para la utilización de prótesis vasculares. Ateroesclerosis avanzada, aneurismas, fístulas arteriovenosas para hemodiálisis y traumatismos, son sólo algunos ejemplos. Tanto el desarrollo de hiperplasia pseudointimal (subintimal) primaria como la trombo-

sis condicionan la utilidad del injerto.³⁷ La trombosis de cualquier injerto puede ocurrir en tres etapas. La primera etapa o temprana es la que ocurre dentro de los 30 días y generalmente es de causa técnica (mala elección del injerto, mala realización de las anastomosis, mala elección del vaso donante o receptor, etc.). Una segunda etapa, que comprende desde los 30 días a los 18 meses, es la debida a hiperplasia intimal y es la base de trabajo futuro para el éxito de los injertos y la disminución de trombosis de los mismos. La tercera etapa es luego de los 18 meses y está relacionada con la progresión del proceso aterosclerótico.

La continua búsqueda de una prótesis vascular ideal comenzó en 1952, cuando Voorhees introdujo el Vinyon N, que le permitió reparar correctamente 17 aneurismas de aorta y uno poplíteo.³⁸ Muchos investigadores continuaron intentando el desarrollo de prótesis biocompatibles. Actualmente polietileno-tereftalato (Dacron) y politetrafluoretileno (ePTFE) son las prótesis vasculares más ampliamente utilizadas.³⁹ Está comprobado que, tanto el Dacron como ePTFE, producen una reacción con proteínas del suero y los glóbulos rojos.⁴⁰ Experimentos en animales han logrado probar un aumento de niveles de tromboxano y, en consecuencia, una disminución de plaquetas luego de un año de implantes de prótesis de Dacron.⁴¹ Otros estudios probaron que hay una mayor adhesión plaquetaria a los injertos.⁴² Es sabido que los neutrófilos y los monocitos están relacionados con la viabilidad del parche. Los neutrófilos activados liberan radicales libres que disminuyen o inhiben la endotelización del injerto y, paralelamente, favorecerían su degradación.⁴³

En respuesta a estos problemas, diversos investigadores propusieron el tratamiento previo del injerto con albúmina, diversos geles y colágeno buscando así disminuir su porosidad. La impregnación con antibióticos disminuyó la colonización bacteriana.⁴⁴

En 1978, la utilización de sembrado de células endoteliales sobre injertos de Dacron y Teflon, demostró en animales una disminución de la adhesividad plaquetaria y aumento de la resistencia a la colonización bacteriana.⁴⁵ Pero estos estudios no pudieron reducir la hiperplasia seudo-intimal de las anastomosis realizadas.⁴⁶ Los resultados de estudios clínicos a largo plazo no pudieron demostrar grandes diferencias en la comparación de prótesis de Teflon sembradas con células endoteliales y no sembradas.⁴⁷ Otros estudios demostraron que la técnica de doble siembra de células endoteliales disminuyó la adhesión plaquetaria en

los by-pass femoro-poplíteos por un período de tres años.⁴⁸ Posiblemente la mayor densidad de la siembra celular lograda con esta técnica sea la resultante de la aparente mejoría clínica.

Otros autores han dirigido sus esfuerzos a transfectar células endoteliales para lograr que produzcan un aumento en la secreción de factores de crecimiento endotelial.⁴⁹ Esto resultó en aumento de la proliferación celular. Otros factores de crecimiento ampliamente utilizados, capaces de inducir la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* son: factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).⁵⁰

Las prótesis biodegradables de Vycril, un copolímero de ácido poliglicólico (PGA), fueron utilizadas en la creación de nuevos vasos.⁵¹ Informes iniciales mostraron como complicación dilataciones aneurismáticas en estos nuevos tejidos. Estudios sucesivos utilizaron otros polímeros, como polidioxanona, intentando disminuir el tiempo de degradación del polímero.⁵² La eficiencia de un polímero está basada en el balance entre su rápida reabsorción, promoviendo una consecuente infiltración celular del mismo, desarrollando un tejido. Para lograr una buena inducción del crecimiento tisular antes de una significativa reabsorción del polímero, los investigadores han combinado el uso de varios biomateriales reabsorbibles y no reabsorbibles. Otros estudios utilizaron la combinación de los materiales reabsorbibles buscando lograr estabilidad del injerto mientras el nuevo tejido se va desarrollando. Hasta el momento el uso de estos sistemas no ha sido aplicado en humanos.

Prótesis cardíacas

Las valvulopatías cardíacas son habitualmente tratadas con reemplazos vasculares o bioprótesis. La utilización de válvulas mecánicas se asocia a flujo turbulento y requiere terapia anticoagulante de por vida.^{53,54} A comienzos de los años 60, se informaron válvulas tisulares realizadas con pericardio autólogo. Resultados desafortunados llevaron a los investigadores a utilizar válvulas heterólogas⁵⁵ previamente tratadas con una breve inmersión en glutaraldehído. Esto produce una reacción en el colágeno de la prótesis que disminuye la solubilidad y la inmunogenicidad del implante.⁵⁶ Otra manera de abordar este problema es el desarrollo de válvulas cardíacas con técnicas de ingeniería tisular. En estudios experimentales desarrollados en ovejas, células endoteliales y miofibroblastos autólogos fueron sembrados en polímeros de ácido poliglicólico conformando una

prótesis. Estas prótesis autólogas fueron utilizadas para reemplazo de la válvula pulmonar con buenos resultados en un período de 8 semanas.⁵⁷ Este método aún está lejos de poder ser utilizado en humanos, pero es un punto de partida para el desarrollo de una nueva terapéutica.

Intestino

El síndrome de intestino corto se caracteriza por malabsorción y malnutrición secundaria a las resecciones masivas de yeyuno, íleon y colon.

Los síntomas clínicos son muy variados y van desde diarreas intratables, esteatorrea, pérdida de peso, deshidratación, malnutrición, hipovitaminosis y anemias, entre otros.⁵⁸ Las causas se pueden agrupar de acuerdo a la edad de los pacientes. Entre las congénitas podemos citar atresias intestinales múltiples, aganglionosis extensas (enfermedad de Hirschprung), gastrosquisis y peritonitis meconial. De las adquiridas en el período neonatal, la enterocolitis necrotizante y los vólvulos intestinales tienen también el potencial de desarrollar intestino corto. En niños y adultos son causas de esta afección el trauma abdominal, la enfermedad de Crohn, la enteritis por irradiación y las enfermedades vasculares que comprometen los vasos mesentéricos.⁵⁹

Se consideran con síndrome de intestino corto a los niños con intestino completo de 10 a 15 cm de yeyuno-íleon con válvula íleocecal o 25 a 40 cm sin válvula ileocecal. La adaptación intestinal que producen estos pacientes demora aproximadamente 2 años.^{60,61} Fenómenos tales como hiperplasia de la mucosa intestinal, agrandamiento de las vellosidades intestinales, criptas más profundas y aumento del diámetro intestinal, son algunos ejemplos de estos mecanismos de adaptación.⁶²⁻⁶⁴

La sobrevida de estos pacientes se debe, sin duda, a las continuas mejoras que se implementan en la nutrición parenteral total, ya sea la realizada en el hospital o en la casa de los pacientes.⁶⁵ Complicaciones relacionadas con los catéteres, tales como infecciones, trombosis o mal funcionamiento, aumentan la frecuencia de re-hospitalizaciones de estos niños.⁶⁶ Problemas hepáticos, colestasis, coledoclitiasis, mal funcionamiento del hígado, cirrosis y desmineralización ósea, llevan a un 50% la mortalidad de los niños en nutrición parenteral total.⁶⁷

Se han desarrollado numerosas técnicas quirúrgicas novedosas para aumentar la superficie de absorción intestinal de estos pacientes. También son ampliamente utilizadas las sustancias para disminuir la motilidad intestinal. Nuevas técnicas, como la creación de válvulas ileocecales, el creci-

miento de células neointestinales y el trasplante de intestino, son algunas de las que ofrecen una nueva esperanza para el tratamiento de estos pacientes.

Los pasos a cumplir en la formación de neointestino por ingeniería tisular involucran: obtención de material intestinal, aislamiento de enterocitos, sembrado de enterocitos en el polímero adecuado y su consecuente implante del polímero como reemplazo de un segmento intestinal.⁶⁸

Se han llevado a cabo diversos experimentos en animales (hamsters, ratas, cerdos, conejos y pollos) utilizando ingeniería tisular. Inicialmente se ha logrado aislar y expandir enterocitos. Estos fueron sembrados en polímeros cilíndricos e implantados en ratones atímicos (sin capacidad de respuesta inmunológica). Luego de 72 días, el 86% de los tejidos desarrolló buen crecimiento celular, lo cual fue confirmado histológicamente.⁶⁹ Todavía resta mejorar la motilidad de estos neointestinos, como así también lograr una aceptable función absorptiva del mismo. Mucho falta por desarrollar en esta área pero será una posible alternativa en el futuro cercano.

Hígado

El trasplante hepático, es actualmente la mejor terapéutica para el tratamiento del fallo hepático. Sin embargo, la escasa oferta de donantes, sumada al constante aumento de la demanda de pacientes, ha llevado a investigadores a desarrollar nuevas técnicas utilizando el trasplante celular como una terapéutica alternativa.

En modelos experimentales se utilizó el aislamiento de hepatocitos para su empleo en diversos sistemas, como biorreactores extracorpóreos o implantados en sistemas de microencapsulación, para el tratamiento de la insuficiencia hepática.^{70,71} Hepatocitos de una gran cantidad de animales pueden ser aislados, expandidos y sembrados en diversos transportadores celulares.⁷² Hasta el momento no se ha podido lograr sobrevida funcional a largo plazo de estas células.

La microencapsulación de hepatocitos en una matriz tridimensional de colágeno cubierta por una membrana semipermeable, mostró recuperación de la función hepática en modelos animales de ratas Gunn, logrando disminuir los niveles de bilirrubina a largo plazo.⁷² Además, se comprobó que los hepatocitos microencapsulados y criopreservados presentan similar función a los frescos.⁷⁰ Hasta hoy no hay estudios clínicos utilizando estos procedimientos, debido tal vez a la limitación de la funcionalidad de estas técnicas y de la viabilidad celular (6 a 8 semanas). El número

de hepatocitos viables puede ser estimulado con la utilización de sustancias que tienen directa relación con su mitosis, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF).^{73,74} La utilización de hepatocitos fetales demostró que estas células tienen un gran potencial proliferativo, varias veces superior al de los hepatocitos adultos.^{75,76}

Otros estudios han desarrollado técnicas de sembrado directo de hepatocitos sobre diversos polímeros e implantados intraperitonealmente en la raíz del mesenterio con posterioridad. En animales, hepatocitos trasplantados han logrado producir albúmina y otros metabolitos. También se logró disminuir la bilirrubina y mejorar la depuración de urea.⁷⁷

Biorreactores hepáticos, también conocidos como hígados bioartificiales, utilizan cultivos primarios de hepatocitos o líneas celulares hepáticas específicas. Hasta hoy, hay tres sistemas básicos: 1) membranas multiperforadas sembradas con hepatocitos que actúan como dializadores, 2) fibras capilares semipermeables multiperforadas y 3) sistemas de hemoperfusión.

Estudios recientes relacionan la sobrevivencia de los hepatocitos en directa proporción al polímero utilizado.⁷⁸ Se han utilizado diversos sistemas tridimensionales de sembrado celular buscando incrementar la adhesión celular, tales como matrices de ácido poliláctico y esponjas conformadas por derivados de carbohidratos (polistireno). A pesar de que la secreción inicial de albúmina de estas células fue baja, variando el tipo de polímero se logró incrementar significativamente su excreción celular. La morfología típica de los hepatocitos se vio parcialmente alterada mostrando los mismos una forma redondeada.⁷⁹ Estudios más recientes, utilizando ratas del tipo Lewis, han logrado mantener hepatocitos en cultivo y con buena adhesión celular por un período de un año utilizando un polímero a base de alcohol tipo polivinilo. Este es, tal vez, el mayor tiempo informado de mantenimiento de hepatocitos trasplantados en un sistema vivo.⁸⁰ Queda aún pendiente demostrar con mayor eficiencia y rigor científico su función al cabo de un año.

A pesar de las diversas tácticas utilizadas en la formación de tejido hepático con técnicas de ingeniería celular, sigue siendo un desafío lograr tejido hepático funcional y capaz de ser implantado debido a la complejidad de su funcionamiento y los distintos grupos celulares que lo integran. Se ha visto que los hepatocitos son capaces de repoblar el polímero utilizado, pero debemos encontrar el polímero tridimensional adecuado que permita el

desarrollo de este tejido.

Recientemente, diversos tipos de sistemas hepáticos artificiales han sido aprobados por la FDA para iniciar estudios clínicos en humanos, buscando evaluar su utilidad y actividad biológica.⁸¹

Cartílago

Actualmente se utilizan dos tecnologías en la formación de cartílago a través de la ingeniería tisular: trasplante de injertos osteocondrales y trasplante de condrocitos. En trabajos realizados con el trasplante de injertos osteocondrales, resultados iniciales mostraron problemas de rechazo inmunológico.⁸² A raíz de estos estudios, otros autores utilizaron cartílagos xenogénicos o alogénicos con una breve inmersión en glutaraldehído antes de ser implantados.⁸³ La intención es que este tejido sirva y actúe como matriz para la regeneración tisular ulterior en el sitio de implante. Los segmentos premoldeados de periostio han sido ampliamente utilizados en diversos tipos de cirugías reconstructivas. Un ejemplo es la formación de sistemas de fijación traqueal con segmentos de periostio obtenidos del mismo paciente, con buenos resultados.⁸⁴

El trasplante de condrocitos, es otra de las técnicas utilizadas. El primer informe del aislamiento de condrocitos fue realizado por Smith en 1965.⁸⁵ El implante de condrocitos en diversos sistemas inicialmente tuvo baja sobrevivencia celular. La experiencia evolutiva mostró que la alta densidad celular favorece la condrogénesis, optimizando la interacción entre la célula y el sustrato. El trasplante de condrocitos ha sido realizado por dos formas: la inyección directa de células o la implantación de matrices sembradas por células.

En 1977, Green reportó experimentos iniciales en los que sembró condrocitos sobre una matriz ósea estéril y, luego de ser implantados en ratones atímicos (sin capacidad de respuesta inmunológica), formaron tejido cartilaginoso.⁸⁶ Tiempo después, áreas cartilaginosas de diversas articulaciones fueron experimentalmente reparadas con la utilización de condrocitos autólogos. Se comprobó proliferación de condrocitos, 48 hs después del implante y a las 8 semanas el defecto estaba completamente reparado.⁸⁸ Experimentos similares mostraron que condrocitos alogénicos e isogénicos cultivados en un gel de colágeno demostraron ser útiles para reparar defectos osteocondrales en ratas. A las 12 semanas, los ocho defectos tratados con cartílago isogénico fueron reparados, en comparación con solamente

cuatro de los ocho tratados con cartílago alogénico.⁸⁸ Diversos sistemas de transporte de condrocitos han sido utilizados: polímeros sintéticos como PGA, ácido poliláctico (PLA), gel de agarosa y otros.⁸⁸⁻⁹⁰ Los polímeros conformados por PGA y sembrados con condrocitos lograron formar tejido luego de ocho semanas *in vitro*.⁹⁰ Estos polímeros permiten la diferenciación, respetando la morfología y manteniendo el fenotipo celular. Los polímeros conformados por PLA y sembrados con condrocitos, pudieron ser utilizados con tejido para el reemplazo de defectos cartilagosos articulares creados en conejos.⁹¹ Similares estudios realizados en conejos pero con una alta densidad de sembrado celular lograron resultados muy significativos, probando la potencial capacidad reparativa articular que presenta este tejido (*Fotografía 1*).⁹² A partir de estos interesantes estudios se avanzó a una etapa clínica de la aplicación de condrocitos, utilizándose en 23 pacientes con defectos articulares en el cartílago de la articulación de la rodilla. La mayoría de ellos mostró una mejoría radiológica y 14 mostraron una mejora clínica luego de 2 años del implante.⁹³

Organos genitourinarios

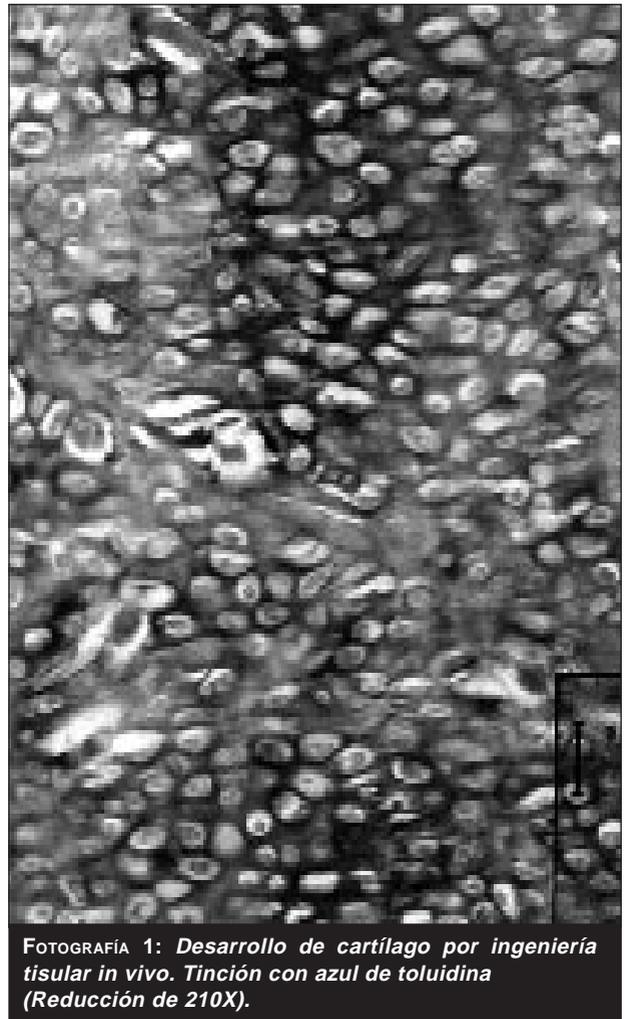
El sistema genitourinario está expuesto a una gran cantidad de injurias que comienzan en el momento en que el feto se desarrolla. Además de las anomalías congénitas, otras enfermedades, como cáncer, trauma, infecciones, pueden producir daño a veces irreversible de diversos órganos del sistema genitourinario y eventualmente requerir reconstrucción quirúrgica.

Ante la falta de tejido urológico nativo muchas veces se utilizan diversos tejidos para reparar distintos segmentos urológicos. La utilización de piel y colgajos cutáneos para la reconstrucción de hipospadias y de segmentos de tubo digestivo (colon, intestino delgado, estómago) para la ampliación vesical, son sólo algunos ejemplos.⁹⁴ La utilización de tejidos autólogos no urológicos para las reconstrucciones urológicas aparece como una mejor alternativa, a pesar de los posibles efectos adversos. La utilización de intestino en las ampliaciones vesicales puede ocasionar alteraciones metabólicas, infecciones, perforaciones, urolitiasis, aumento de la producción de moco y posibilidad de malignización en algunos pacientes.⁹⁵ También se ha explorado la utilización de materiales sintéticos como otra alternativa. Las prótesis más comúnmente utilizadas en urología son de silicona. Esfínteres urinarios artificiales, prótesis penéneas y siliconas para la corrección del reflujo

vesicoureteral son algunos ejemplos.⁹⁶⁻⁹⁸ Sustancias como el teflón, que durante cierto tiempo fue ampliamente utilizado para la corrección del reflujo y la incontinencia, han tenido que ser sustituidas debido a severos trastornos de biocompatibilidad y migración local del producto.

Una de las limitaciones iniciales de la aplicación de técnicas de ingeniería tisular en el área genitourinaria se debió a la dificultad de lograr el crecimiento de grandes cantidades de tejido genitourinario. En los últimos tiempos se ha logrado obtener, expandir y desarrollar células uroteliales humanas a partir de una pequeña biopsia quirúrgica, en un medio de cultivo específico formado por la asociación de diversos metabolitos vitales para el desarrollo celular.⁹⁹

La sustancia utilizada como transportador celular es sumamente importante para la reconstrucción de tejidos urológicos. Estudios desarrollados previamente han demostrado que la utilización de



FOTOGRAFÍA 1: Desarrollo de cartílago por ingeniería tisular *in vivo*. Tinción con azul de toluidina (Reducción de 210X).

sustancias artificiales (teflón y silicona), utilizadas como estructuras de soporte intravesical, tienen una acción litogénica.⁹⁵ Otros investigadores han utilizado injertos homólogos y heterólogos de duramadre. Estos provocan diversos problemas clínicos debido a que, con el paso del tiempo, reducen la superficie vesical reparada, disminuyendo la capacidad vesical total. La utilización de implantes de intestino autólogo desmucosado mantiene sus buenas propiedades, pero con el tiempo la mucosa intestinal invariablemente vuelve a crecer. La utilización de submucosa vesical como soporte natural fue inicialmente planteada en 1961, resurgiendo en la actualidad esta posibilidad para el reemplazo vesical.^{100,101} La submucosa intestinal también fue propuesta como material para la ampliación vesical.¹⁰² Ninguno de los materiales propuestos, sintéticos y naturales, incluyó la utilización de células. La mayoría de ellos mostró adecuados resultados histológicos, no funcionales.

Los investigadores han logrado crear tejidos urológicos en animales, con la combinación de materiales biodegradables y células. En un estudio conducido en perros se obtuvo urotelio y músculo liso vesical a través de una mínima biopsia quirúrgica. Los tejidos obtenidos fueron expandidos in vitro y sembrados en polímeros biodegradables de ácido poliglicólico. Estas estructuras fueron tubulizadas y luego utilizadas para la reconstrucción del uréter.¹⁰³ Con una estrategia similar a la previamente lograda para la reconstrucción del uréter se logró la reconstrucción de vejiga. En un estudio en perros sabuesos con técnicas de ingeniería celular se realizó una cistectomía amplia y se reemplazó este segmento con la fabricación de una neovejiga, con células autólogas; se comprobó histología, capacidad y función vesical normal, por más de 11 meses luego de la implantación.¹⁰⁴ Resultados similares fueron obtenidos utilizando la matriz de colágeno de la vejiga sembrada con células autólogas (*Fotografía 2*).^{105,106} La interacción célula-polímero permite que las estructuras mantengan la forma y el volumen vesical deseado en comparación con la utilización de polímero acelular.

Otros tejidos urológicos posibles de ser reconstituidos con ingeniería tisular son el cuerpo cavernoso y el clítoris. Estudios iniciales lograron aislar, expandir y sembrar células del músculo liso del cuerpo cavernoso y sembrarlas en polímeros de PGA. Un segundo paso fue el doble sembrado celular utilizando células del músculo liso del cuerpo cavernoso y la inclusión de células endoteliales sembradas en polímeros similares.¹⁰⁷ Un tercer

paso utilizó las mismas líneas celulares pero sembradas en polímeros bionaturales constituidos por la matriz de colágeno del cuerpo cavernoso. Esto recientemente nos permitió desarrollar tejido corporal con organización similar al tejido normal.

La reconstrucción de tejido renal a través de la ingeniería tisular, continúa siendo un gran desafío. Diversos investigadores han explorado la posibilidad de aislar y expandir células renales in vitro y sembrarlas en polímeros tridimensionales, intentando lograr una organización celular, e implantándolas in vivo. Estos estudios han logrado obtener un fluido semejante a la orina. Diversas líneas de investigación han propuesto el implante de células renales en polímeros especiales de polisulfatos.^{108,109} Esos polímeros son fibras multiperforadas sembradas con células renales y endoteliales. En el líquido obtenido de este filtrado se demostró un transporte activo de sal y agua. A través de la biología molecular, con técnicas similares se intentó modificar genéticamente a estas células, antes de sembrarlas, para aumentar su productividad.

La incontinencia de orina, como así también el reflujo vesicoureteral, son afecciones muy comunes en el sistema genitourinario. La primera es el resultado de la debilidad o deficiencia de la musculatura del cuello vesical. El reflujo vesicoureteral primario es el resultado de una deficiencia congénita de haces musculares longitudinales submucosos que produce un flujo urinario anómalo desde la vejiga hacia el sistema urinario alto. Estas dos patologías son posibles de ser tratadas con técnicas endoscópicas utilizando diversos agentes (colágeno, teflón, etc.) para aumentar la resistencia local. La sustancia ideal para la corrección endoscópica de estas patologías será la que sea capaz de ser inyectada, no produzca reacción antigénica, no migre, mantenga un volumen estable y sea segura para su uso en humanos. El aporte de la ingeniería tisular a esta área ha sido de suma importancia. Estudios in vivo a largo plazo han logrado utilizar condrocitos en suspensión sembrados en un gel específico. Otro experimento realizado en cerdos permitió la inyección de condrocitos autólogos para tratamiento del reflujo vesicoureteral con excelentes resultados, dado que todos los animales curaron su reflujo.¹¹⁰

Recientemente, la primera aplicación de ingeniería tisular basada en una terapéutica celular, fue utilizada en el Hospital de Niños de Boston. La utilización de condrocitos autólogos expandidos y sembrados en un gel específico y posteriormente inyectados en el espacio subureteral para el trata-

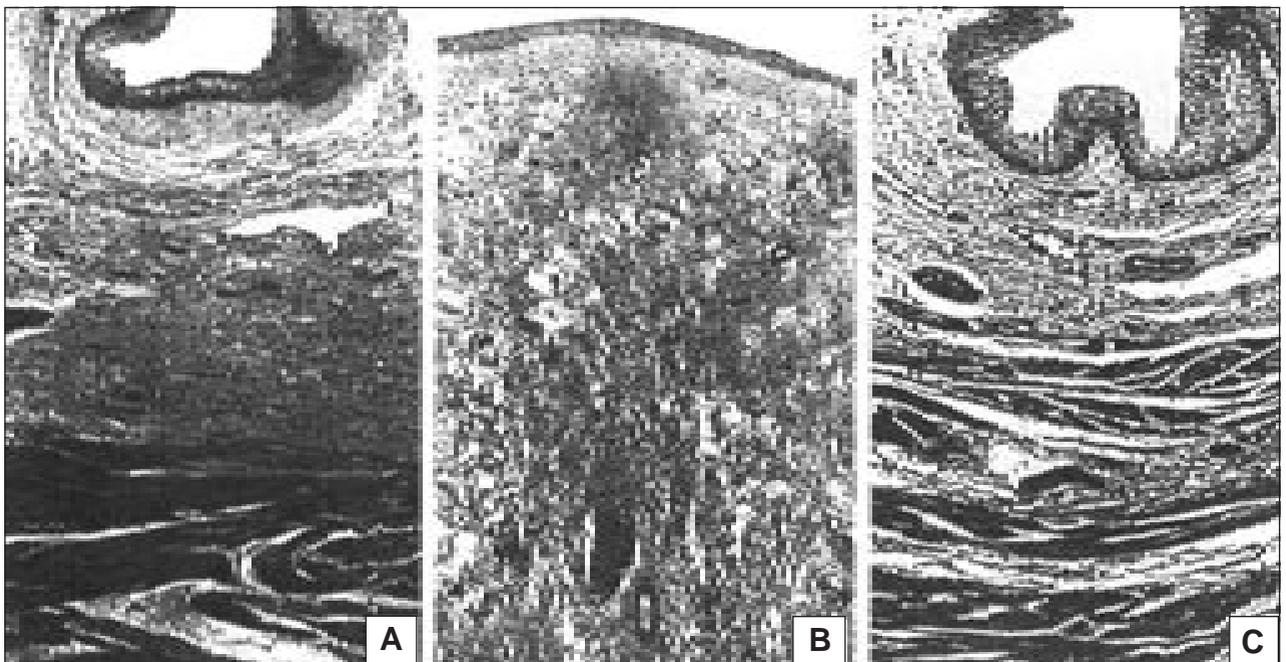
miento de reflujo vesicoureteral es hoy una realidad y se realiza en este hospital.¹¹¹ Desde 1998, en varios centros de Estados Unidos se están desarrollando estudios clínicos utilizando esta técnica para el tratamiento de la incontinencia. La realización de neovejigas por ingeniería tisular ha comenzado a ser aplicada en un grupo reducido de pacientes. La utilización de matrices de colágeno para la reconstrucción uretral de hipospadias severas también se está aplicando hoy en humanos con buenos resultados.^{9,112} Mucho falta todavía por investigar en esta nueva disciplina, pero hoy es una alternativa real para el tratamiento de pacientes.

Ingeniería tisular fetal

La utilización de ingeniería tisular con tejido fetal es un área nueva y fascinante de la ingeniería tisular que busca reparar defectos congénitos, ya sea intraútero o en el posparto inmediato utilizando tejidos autólogos. El objetivo fundamental será obtener una biopsia de tejido fetal a través de un procedimiento mínimamente invasivo mediante técnicas de cirugía fetal abierta o bien, la implementación de procedimientos tales como la fetoscopia, cultivo de las distintas líneas celulares y desarrollo de tejidos fetales in vitro, para su posterior aplicación in vivo

(Gráfico 1). Nuestro laboratorio, pionero en esta área y uno de los pocos en el mundo que desarrolla la investigación sobre el tema, ha informado en animales la corrección de defectos congénitos tan invalidantes como la extrofia vesical utilizando tejidos autólogos.¹¹³ Se han evaluado diferentes líneas de crecimiento de células fetales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Hemos logrado desarrollar diversas líneas celulares: queratinocitos, fibroblastos, condrocitos, músculo estriado, músculo liso vesical y urotelio fetal.¹¹⁴ Las células fetales presentan un amplio potencial reproductivo, lo que se traduce en una mayor velocidad de crecimiento celular. Receptores específicos de membrana obtenidos de células fetales serían los responsables de este fenómeno.¹¹⁴ Es interesante destacar que receptores similares y con iguales mecanismos de acción han sido aislados en varias líneas de células tumorales.¹¹⁴ Informes iniciales probaron la utilización de técnicas de ingeniería tisular fetal para la reparación de defectos urogenitales y dérmicos.^{113,115}

La corrección intrauterina del mielomeningocele con diferentes técnicas de ingeniería tisular es otra de las líneas de desarrollo de nuestro grupo. Es sabido que la corrección intrauterina del mielomeningocele mejora el desarrollo neurológico del feto-bebé, no habiéndose encontrado hasta el pre-



FOTOGRAFÍA 2: Reconstitución de vejiga constituida por células uroteliales y musculares autólogas con la utilización de ingeniería tisular. Análisis histológico, tinción con hematoxilina y eosina a los 6 meses de implantada la neovejiga. A) Vejiga normal en un canino. B) Polímero sin células. C) Tejido vesical realizado con ingeniería tisular. Nótese ambos tipos celulares (urotelio y músculo liso vesical) con adecuada organización estructural (Reducción 140X). Cortesía Dr. Atala y Nature Biotech, 1999.

sente el material ideal para su corrección.¹¹⁴ Se han probado diversas maneras de corregir esta patología con colgajos musculares, parches de peritoneo, utilización de piel materna, entre otras técnicas.¹¹⁴ Estudios iniciales desarrollados en nuestro centro nos permiten pensar en la utilización de matrices bionaturales de colágeno (tipo III-IV) como posible material para la corrección intraútero de esta patología.¹¹⁴

La obtención de condrocitos a través de fetoscopia o bien por cirugía fetal a cielo abierto nos permitió desarrollar cartílago hialino fetal, el cual fue utilizado para reemplazo de defectos traqueales creados, logrando sobrevida a largo plazo de los animales tratados.

Músculo estriado fetal obtenido con técnicas similares fue utilizado para la confección de músculo fetal in vitro y su utilización ulterior para el reemplazo de músculos cervicales.

La utilización de células fetales humanas obtenidas de fetos humanos abortados naturalmente como terapéutica de distintas patologías neurológicas, como la enfermedad de Parkinson, abrió un amplio debate ético en Estados Unidos, lo que motivó una legislación específica sobre el tema. Por el momento, los resultados clínicos de la utilización de estas células se presentan como promisorios. ■

BIBLIOGRAFIA

1. Skalak R, Fox F. Tissue Engineering. New York: Liss, 1988.
2. Ingber D. Extracellular matrix and cell shape: potencial control points for inhibition of angiogenesis. J Cell Biochem 1991; 47: 236-241.
3. Boudreau N, Myers C, Bissell MJ. From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. Trends Cell Biol 1995; 5: 1-4.
4. Martins-Green M. The dynamics of cell-ECM interactions with implications for tissue engineering. Principles of Tissue Engineering. Landes Co. 1997; Chapter 3: 22-39.
5. Thomson RC, Ishaug SL, Mikos AG et al. Polymers for biological systems Molecular Biology and Biotechnology: A comprehensive desk reference. New York: VCH Publishers, 1995: 717-24.
6. Mikos AG, Bao Y, Cima LG et al. Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. J Biomed Mater Res 1993; 27: 183-89.
7. Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA et al. Preparation and characterization of poly (l-lactic acid) foams. Polimer 1994; 35: 1068-77.
8. Badylak SF, Record R, Lindberg K, Hodde J, Park K. Small intestinal submucosa: a substrate for in vitro cell growth. J Biomater Sci Polym Ed 1998; 8: 863-878.
9. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. Urology 1999 Sep; 54 (3): 407-410.
10. Freeman MR, Yoo JJ, Raab G, Soker S, Adam RM, Schneck FX, Renshaw AA, Klagsbrun M, Atala A. Heparin binding EGF-like growth factor is an autocrine growth factor for human urothelial cells and is synthesized by epithelial and smooth muscle cells in the human bladder.

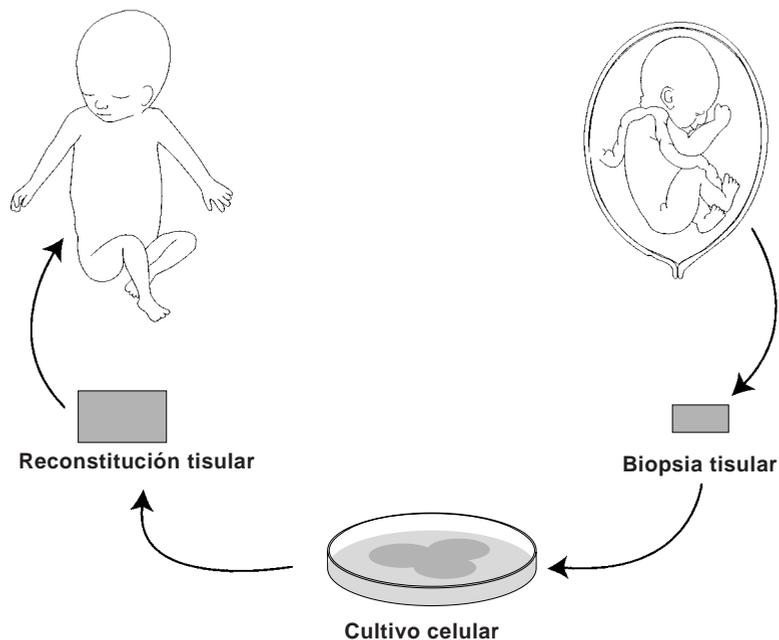


GRÁFICO 1

Desarrollo del concepto de ingeniería tisular fetal

- J Clin Invest 1997; 99 (5): 1028-1036.
11. Ahrendt G, Chikering DE, Ranieri J. Angiogenic growth factors: a review for tissue engineering. *Tissue engineering*, 1998; 4 (2): 117-130.
 12. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*. 1996; 333: 1757.
 13. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-451.
 14. Burke JF, Yannas IV, Quimby WC et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of an extensive burn injury. *Ann Surg* 1981; 194: 413-428.
 15. Bell E, Irvansson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 1274.
 16. Sher Se, Hull B, Rosen set al. Acceptance of allogenic fibroblasts in skin equivalent transplants. *Transplant* 1983; 36: 552-557.
 17. Hansbrogh JF. Current status of skin replacements for coverage of extensive burn wounds. *J Trauma* 1990; 30: 155-162.
 18. Cuono CB, Langdon R, Mc Guire J. Use of cultured autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet* 1986; 1123.
 19. Cuono CB, Langdon R, Birchall N. Composite autologous-allogenic skin replacement: development and clinical application. *Plast Reconstr Surg* 1987; 80: 626.
 20. Landeen LK, Ziegler FC, Halberstadt C et al. Characterization of human dermal replacement. *Wound* 1992; 5: 167-175.
 21. Purdue GF, Hunt JL, Still JM et al. A multicenter clinical trial of biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with Cryopreserved human skin for temporary coverage of excised burn wounds. *Journal of Burn and Care & Rehabilitation* 1997; 18: 52-57.
 22. Lanza RP, Chick WL. *Endocrinology: Pancreas. Principles of Tissue Engineering*. Landes Co. 1997; Chapter 27: 405-425.
 23. The diabetes control and complication trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977.
 24. Mauer SM, Steffes MW, Sutherland DER et al. Studies on the regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation. *Diabetes* 1975; 24: 280-285.
 25. Kahan BD. Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321: 1725.
 26. Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmagd K et al. Adverse effects associated with the use of FK 506. *Transplant Proc* 1992; 23: 3105.
 27. Gunnarsson R, Klintmaln G, Lundgren G et al. Deterioration in glucose metabolism in pancreatic transplant recipients given cyclosporin. *Lancet* 1983; 2: 571.
 28. Alejandro R, Feldman EC, Bloom AD et al. Effects of cyclosporin on insulin and C-peptide secretion in healthy beagles. *Diabetes* 1989; 38: 698.
 29. Schlumpf R, Largiader F, Uhlschmid GK et al. Is cyclosporine toxic for transplanted pancreatic islets? *Transplant Proc* 1986; 28: 1169.
 30. Van Schilfgaarde R, Van Der Burg MPM, Van Suylichen HG et al. Does cyclosporine influence beta cell function? *Transplant Proc* 1986; 28: 1175.
 31. Chick WL, Like AA, Lauris V. Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science* 1975; 187: 847-9.
 32. Darquy S, Reach G. Immunoisolation of pancreatic B cells by microencapsulation. *Diabetologia* 1985; 28: 776.
 33. Lim F, Sum AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210: 908-910.
 34. O'Shea GM, Sun AM. Prolonged survival of transplanted islets of Langerhans encapsulated in a biocompatible membrane. *Biochim Biophys Acta* 1984; 804: 133-136.
 35. Soon-Shiog P, Feldman E, Nelson R et al. Long-term reversal of diabetes by injection of immunoprotected islets. *Prot Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5843-5847.
 36. Soon-Shing P, Heints RE, Merideth N et al. Insulin independence in a type-1 diabetic patient after encapsulated islets transplantation. *Lancet* 1994; 143: 950-951.
 37. Matsumoto T, Naiki T, Hayashi K. Flow visualization analysis in a model of artery-graft anastomosis. *Biomed Mater Eng* 1992; 2 (4): 171-83.
 38. Voorhees AB, Jaretzki A, Blakemore AH. The use of tubes constructed of vinyon N cloth in bridging arterial defect. *Ann Surg* 1952; 135: 332-337.
 39. Cowes AW, Koheler T. Graft endothelialization: the role of angiogenic mechanisms. *J Vasc Surg* 1991; 13: 734-736.
 40. Ito RK, Rosenblatt MS, Contreras MA et al. Monitoring platelet interaction with prosthetic graft implants in a canine model. *Trans AM Soc Artf Intern Organ* 1990; 36: 175-178.
 41. Starton Jr, Thiele BL, Ritchie JL. Natural history of platelet deposition on Dacron aortic bifurcation graft in the first year after implantation. *Am J of Cardiol* 1983; 52: 371-374.
 42. Deuel TF, Senior RM, Chang D et al. Platelet factor 4 is a chemotactic for neutrophils and monocytes. *Prot Nalt Acad Sci USA* 1981; 78: 4584-4587.
 43. Bevilacqua MP, Pober JS, Weeler ME, Cotran RS et al. Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell line. *J Clin Invest* 1984; 76: 1581.
 44. Park KD, Okano T, Jojiri C et al. Heparin immobilization onto segmented polyurethane area surface: effect of hydrophilic spacers. *J Biomed Mater Res* 1988; 22: 977-992.
 45. Herring MB, Gardener AL, Glover J. A single staged technique for seeding vascular grafts with autologous endothelium. *Surgery* 1978; 84: 498-504.
 46. Graham LM, Brothers TE, Vincent CK et al. The role of an endothelial cell lining in limiting distal anastomotic intimal hyperplasia of 4 mm ID. Dacron grafts in a canine model. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 525-533.
 47. Jensen N, Linblad B, Bergovist D. Endothelial cell seeded Dacron aorbifurcated grafts: platelet deposition and long term follow up. *J Cardiovas Surg* 1994; 35: 425-432.
 48. Zilla P, Deutsch M, Meinhart J et al. Clinical in vitro endothelialization of femoropopliteal bypass grafts: an actuarial follow-up over three years. *J Vasc* 1994; 35: 425-432.
 49. Gosselin C, Ren D, Ellinger J et al. In vivo platelet deposition on polytetrafluoroethylene coated with fibrin glue containing fibroblast growth factor 1 and heparin in a canine model. *Am J Surg* 1995; 170: 126-130.
 50. Thomson JA, Anderson KD, Ci Pietro J et al. Site-direct neovessel formation in vivo. *Science* 1988; 241: 1349-1352.
 51. Bowald S, Buch C, Eriksson I. Arterial regeneration following polyglactin 910 suture mesh grafting. *Surgery* 1979; 86: 722-729.
 52. Greisler HP, Ellinger J, Schwarcz TH et al. Arterial regeneration over polydioxanone prostheses in the rabbit. *Arch Surg* 1987; 122: 715-721.
 53. Lowe JW. *Autologous Tissue Heart Valves*, 1993, Austin, TX: RG Landes.
 54. Lowe JW. *Cardiac Prothesis. Principles of Tissue Engineering*. Landes Co. 1997; Chapter 25.

55. Carpenier A, Lemaigre G, Robert L: Biological factor affecting long term results of valvular heterograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; 48: 467-483.
56. Fabiani JN, Dreyfus GD, Marchand M et al. The autologous tissue cardiac valve; a new paradigm for heart valve replacement. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 189-194.
57. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE et al. Tissue Engineered heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 5513-5516.
58. Tilson M. Pathophysiology and treatment of short bowel syndrome. *Surg Clin North Am* 1980; 60, 5: 1273-84.
59. Dudwick SJ, Latif R, Fosnocht DE. Management of short bowel syndrome. *Surg Clin North Am* 1991; 71: 3.
60. Williamson R. Intestinal adaptation (part I) Structural, functional and cytokinetic changes. *N Engl J Med* 1978; 298 (25): 1393-1402.
61. Williamson R. Intestinal adaptation (part II) Mechanisms of control. *N Engl J Med* 1978; 298 (26): 1444-1450.
62. Chaves M, Smith MW, Williamson W. Increased activity of digestive enzymes in ileal enterocytes adapting to proximal small bowel resection. *Gut* 1987; 28: 981-987.
63. Unger RH Ohneda A, Valverde et al. Characterization of the responses of circulating glucagonlike immunoreactive to intraduodenal and intravenous administration of glucose. *J Clin Invest* 1968; 47: 48-65.
64. Lak G, Baylin SB. Polyamines and intestinal growth-increased biosynthesis after jejunectomy. *Am J Physiol* 1983; 245: 656-660.
65. Dorney SF, Ament ME, Berquist WE et al. Improved survival in very short small bowel of infancy with the use of long-term parenteral nutrition. *J Pediatr* 1985; 107: 521-525.
66. Thomson J. Recent advances in the surgical treatment of short-bowel syndrome. *Surgery Annual* 1990; 22: 107-127.
67. Foldes J, Rimon B, Muggia-Sullam et al. Progressive bone loss during long-term home total parenteral nutrition. *J Parenteral and Enteral Nutrition* 1990; 14 (2): 139-142.
68. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
69. Organ GM, Mooney DJ, Hansen KL et al. Design and transplantation of enterocyte polymer constructs: a small animal model for neointestinal replacement in short bowel syndrome. *Am Coll Surg-Surgical Forum* 44432, 1993.
70. Dixit V, Arthure M, Gitnic et al. Criopreserved microencapsulated hepatocytes: transplantation studies in Gunn rats. *Transplantation* 1993; 55: 616-622.
71. Anand AC. Bioartificial liver: The state of the art. *Tropical Gastroenterology* 1996; 17: 202-211.
72. Demetriou AA, Whiting JF, Feldman D et al. Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Science* 1986; 233: 1190-1192.
73. Sano K, Cusick RA, Lee H et al. Regenerative signals for heterotopic hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1996; 298 (3): 1857-1858.
74. Pollok JM, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Seminars in Ped Surg.* 1996; 5 (3): 191-196.
75. Signal SH, Brill S, Reid LM et al. Characterization and enrichment of fetal rat hepatoblasts by immunoabsorption and fluorescence-activated cell sorting. *Hepatology* 1994; 19: 999-1006.
76. Cusick RA, Sano K, Lee HM et al. Heterotopic fetal rat hepatocyte transplantation non biodegradable polymers. *Surg Forum* 1995; 46: 658-661.
77. Uyama S, Kaufmann P, Takeda T et al. Delivery of whole liver-equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotropic stimulation. *Transplantation* 1993; 55: 932.
78. Mooney D, Hanson L, Vacanti J et al. Switching from differentiation to growth in hepatocyte: control by extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1992; 497-505.
79. Kaufmann PM, Heimrath S, Kim BS et al. Highly porous materials as a tridimensional culture system for hepatocytes. *Cell transplantation* 1997; 6: 463-468.
80. Ranucci CS, Batra SP, Moghe PV et al. Control of liver cell morphogenesis and differentiation in porous collagenous matrices. *Tissue Engineering*. August, 1999.
81. Jauregui HO, Mullon CJP, Solomon B. Extracorporeal artificial liver support. *Principles of Tissue Engineering* 1997. Landes Co. 1997; Chapter 30: 463-479.
82. Seligman G. Transplantation of whole knee joint in the dog. *Clin Orthop* 1972; 87: 332.
83. Sailer H. Transplantation of lyophilized cartilage in maxillofacial surgery. Basel: Switzerland Karger Verlag, 1983.
84. Vinograd I, Filler RM, England SJ et al. Tracheomalacia: an experimental animal model for a new surgical approach. *J Surg Res* 1987; 42: 597-605.
85. Smith AU. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. *Nature* 1965; 205: 783-784.
86. Green WT. Basic science and pathology. *Orthopaedic and Related Research* 1977; 124: 237-250.
87. Italy S, Abramovici D, Nevo Z. Use of cultured embryonal chicken epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chicken articular cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1987; 220: 284-303.
88. Takashi N, Masanori OKA, Madoka F et al. Cultured chondrocytes-compression of allograft and xenograft. *Clinical Orthopaedics Research* 1994; 302: 351-258.
89. Grande Da, Halberstad C, Naughton G et al. Evaluation of matrix caffolds for tissue engineering. *J Biomedical Material Research* 1997; 34: 111-120.
90. Vacanti C, Langer R, School B et al. Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation in vivo. *Plas Reconstr Surg* 1991; 88: 753-759.
91. Wakitani S, Kimura T, Hirooka T et al. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gels. *J Bone Joint Surg* 1989; 753-759.
92. Fred LE, Grande DA, Lingbin Z et al. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymers scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 891-899.
93. Brittberg M, Lindhl A, Nilsson A et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *New Engl J Med* 1994; 331: 889-895.
94. Atala A, Retik A. Hypospadias. *Reconstructive urologic surgery*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1997.
95. Atala A, Retik A. *Pediatric Urology: Future perspectives*. Clinical Urology, Philadelphia, 1994, p 507.
96. Levesque PE, Bauer SB, Atala A et al. Ten years experience with artificial urinary sphincter in children. *J Urol* 1991; 156: 625.
97. Atala A, Peters C, Retik A et al. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a self-dettachable balloon system. *J Urol* 1992; 152: 724.
98. Riehmman M, Gasser TC, Bruskewitz RC. The hydroflex penile prosthesis: A test case for the introduction of a new urological technology. *J Urol* 1993; 149: 1304.
99. Cilento BJ, Freeman MR, Atala et al. Phenotypic and cytogenic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *J Urol* 1994; 152: 665-670.
100. Tsuji I, Ishada Hand Fujieda J. Experimental cystoplasty using preserved bladder graft. *J Urol* 1961; 85: 42-44.
101. Probst M, Dahiya R, Tanagho EA et al. Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. *Brit J Urol* 1997; 79: 505-515.
102. Kropp BP, Rippy MK, Badylak SF et al. Regenerative

- urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assesment in long term canine bladder augmentation. *J Urol* 1996; 155: 2098-2104.
103. Yoo JJ, Satar N, Atala A et al. Ureteral replacement using biodegradable polymer scaffolds seeded with urothelial and smooth muscle cells. *J Urol* 1995; 153: 4 (suppl).
104. Oberpenning F, Meng J, Joo JJ et al. Bladder replacement with tissue engineered neo-organs. *Pediatrics* 1997; 100: 538.
105. Yoo J, Atala A. Bladder augmentation using a new bioartificial composed of allogenic bladder. *Urology* 1998; 51, 2: 221-225.
106. Oberpenning F, Meng J, Joo JJ, Atala A. De novo reconstitution of afunctional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology* 1999; 17 (2): 149-155.
107. Park HJ, Yoo JJ, Kershner RT et al. Reconstitution of human corporal smooth muscle and endothelial cells in vivo. *J Urol* 1999; 162 (3 PT 2): 1106-1109.
108. Atala AR, Schluskel RN, Letick AB. Renal cell growth in vivo after attachment to biodegradable polymer scaffolds. *J Urol* 1995; 153: 4 (supl).
109. Joo JJ; Ashkar S, Atala A. Creation of functional kidney structures with excretion of urine-like fluid in vivo. *Pediatrics* 1996; 98: 605.
110. Atala A, Cima LG, Kim W et al. Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potencial treatment for vesicoureteral reflux. *J Urol* 1993; 150: 745-747.
111. Diamond DA, Caldamone AA. Endoscopic correction of vesicoureteral reflux in children using autologous chondrocytes: Preliminary results. *J Urol* 1999; 162 (3 Pt 2): 1185-1188.
112. Atala A, Guzman L, Retik AB. A novel collagen matrix for hypospadias repair. *J Urol* 1999 Sep. 162 (3 Pt 2): 1148-1151.
113. Fauza Do, Fisman SJ, Atala A et al. Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: bladder augmentation. *J Pediatr Surg* 1998; 33, 1: 7-12.
114. Falke G, Halla H, Atala A. Urologic Tissue Engineering: aplicacion in the fetus. *Worl J Urol* (in press).
115. Fauza DO, Fishman SJ, Atala A et al. Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: skin replacement. *J Pediatr Surg* 1998; 33 (2): 357-361.