

INGENIERÍA TISULAR: RETOS Y REALIDADES

TISSUE ENGINEERING: PROGRESS AND CHALLENGES

Gorka ORIVE¹, Rosa M. HERNÁNDEZ¹, Alicia R. GARCÓN¹, Manoli IGARTÚA¹, y José L. Pedr z M.^{1*}

RESUMEN

La ingeniería tisular es una técnica biomédica prometedora que implica la correcta combinación de células, materiales y procesos tecnológicos con el objeto de promover la regeneración tisular y orgánica. A pesar de estar todavía en su infancia, el potencial de esta disciplina abre nuevas vías para el tratamiento de múltiples enfermedades. Esta revisión resume el progreso y las aplicaciones terapéuticas más recientes así como las perspectivas.

Palabras clave: *ingeniería tisular, biomateriales, células.*

ABSTRACT

Tissue engineering is a newly promising biomedical strategy which involves the perfect combination of cells, materials and technological processes with the aim of promoting tissue and organ regeneration. Although it is still in its infancy, the potential of this technology opens new routes for the treatment of multiple diseases. This review summarizes recent progress and therapeutic applications as well as perspectives of tissue engineering.

Key words: *Tissue engineering, biomaterials, cells.*

INTRODUCCIÓN

La pérdida de tejidos y las fallas orgánicas constituyen uno de los problemas más frecuentes, devastadores y costosos para los sistemas sanitarios de los países desarrollados. Además, según estadísticas recientes, la demanda de órganos y tejidos, así como la aparición de enfermedades neurodegenerativas ligadas al progresivo envejecimiento de la población, van claramente en aumento.

El tratamiento actual para todo este tipo de alteraciones se basa en el trasplante de órganos y/o tejidos o en el empleo de sistemas mecánicos como los dializadores renales o hígados bioartificiales. A pesar que el número de

trasplantes de órganos va en aumento, son muchos los pacientes que fallecen esperando la llegada del órgano más adecuado a sus necesidades. Por otra parte, los sistemas mecánicos nunca cumplen todas las funciones del órgano al que sustituyen por lo que solo ofrecen una solución temporal, reduciendo en la mayoría de los casos la calidad de vida del paciente.

El interés creciente de la comunidad científica por resolver estos trastornos junto con los avances realizados en disciplinas como la biología, genética y tecnología han logrado impulsar el campo de la ingeniería tisular, permitiendo que lo que hasta hace poco resultaba ciencia ficción, hoy se convierta en una realidad clínica. Este artículo de revisión repasa los principios sobre los que se

1 Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Vitoria - Gasteiz. España.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia : knppemuj@vc.ehu.es

cimenta esta disciplina científica, las aplicaciones terapéuticas más significativas así como las limitaciones y perspectivas futuras.

¿QUÉ ES LA INGENIERÍA TISULAR?

La ingeniería tisular es un área multidisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud para el desarrollo de estructuras biológicas, con el fin de generar tejidos que permitan restaurar, mantener o mejorar la función del tejido u órgano primitivo (1-6). Para lograr este fin, la ingeniería tisular debe combinar armoniosamente materiales y componentes celulares con el objeto de utilizarlos en tratamientos específicos que garanticen el éxito terapéutico: (Figura 1)

Líneas celulares: Se debe identificar y aislar una línea celular, que sea fácil de multiplicar y por lo tanto satisfaga la demanda existente. La naturaleza y las características de las líneas celulares pueden ser muy variadas, pudiendo emplearse desde células autólogas (del propio paciente) hasta aloinjertos o xenoinjertos (células de otro paciente o de otra especie respectivamente) . Sin duda alguna, la administración de células autólogas es la más adecuada ya que evita el riesgo de rechazo inmunológico, pero en muchos casos resulta im-

posible obtener estas células del propio paciente. Por esta razón, se estudia el empleo de tejidos que procedan de otros individuos u otras especies, para lo cual se requiere reducir al máximo la antigenicidad de los mismos y extremar las medidas de bioseguridad que eviten infecciones o zoonosis (7,8) (como la de los virus porcinos). Por último, la tecnología con células madre (tanto embrionarias como adultas) ofrece múltiples aplicaciones terapéuticas que van desde la creación de islotes pancreáticos, sangre y válvulas cardíacas hasta la construcción de cartílagos nasales o sustitución de órganos como la vejiga urinaria (9). No obstante, hoy por hoy quedan algunos obstáculos por resolver, como la búsqueda de marcadores celulares específicos que permitan la correcta identificación del tipo de línea celular, el desarrollo de nuevos medios celulares que mejoren la expansión celular in vitro, así como la demostración de la funcionalidad de estas células en modelos experimentales. A pesar de estar en su infancia, y de los obstáculos éticos y políticos que conlleva su desarrollo, fundamentalmente la negativa de algunos estados en financiar esta disciplina científica, la tecnología con células madre presenta innumerables usos potenciales y oportunidades de mercado (10,11).

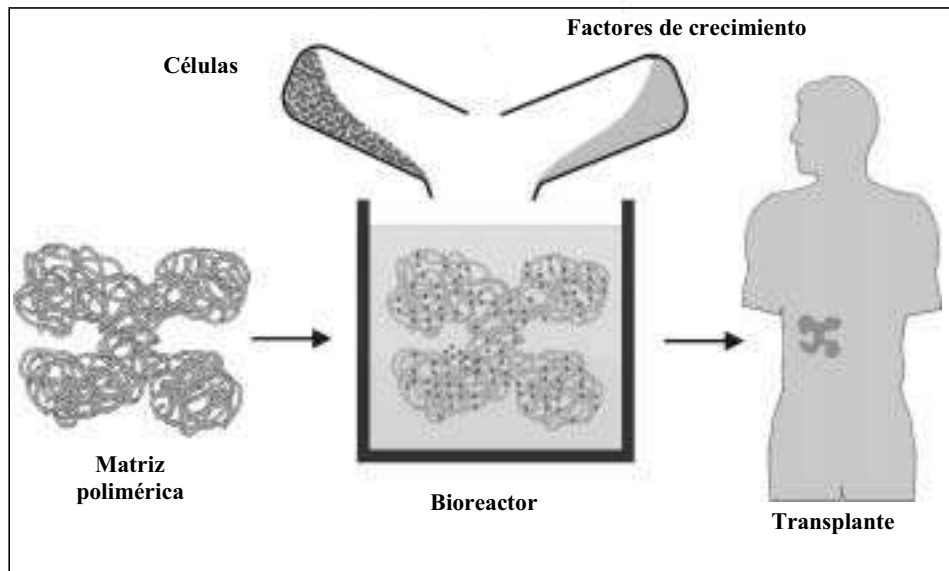


Figura 1:

La ingeniería tisular implica la combinación de células, materiales y factores de crecimiento y su posterior cultivo en bioreactores.

Materiales: Se debe seleccionar un material que pueda ser empleado como sustrato (matriz) o como vehículo (microcápsula) para las células, de forma que éstas crezcan en su superficie o en su interior. Los materiales empleados son tanto naturales (alginato, colágeno, fibrina) como sintéticos (ácido poliláctico, poliglicólico) y en líneas generales deberán degradarse en el huésped una vez implantados. Otro requisito fundamental es que el material simule las condiciones de la matriz extracelular en la que viven normalmente las células. Además, el material elegido deberá ser biocompatible (compatible con el sistema inmune del huésped en el que se transplanta), biodegradable, resistente y elástico, de modo que se adapte al tamaño y forma deseado (12,13). Muchos grupos de investigación y compañías biotecnológicas se esfuerzan por encontrar el material "perfecto" que además de cumplir estos requisitos, sea económico e inteligente. De hecho, hoy en día existen los llamados "materiales inteligentes", capaces de liberar el producto interno (fármaco, factores de crecimiento, factores angiogénicos) en función de múltiples estímulos como: el pH, la temperatura, estímulos mecánicos, etc. (14,15).

El diseño tecnológico del vehículo o matriz es un aspecto fundamental para controlar la cesión del producto biológico y simular las condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la elaboración de matrices que contenían tanto el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) encapsulado en microsferas de ácido poli-lactoglicólico (PLGA) como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) combinado con polvo del mismo polímero permitió la liberación rápida del VEGF y la más retardada del PDGF, simulando a la perfección la producción fisiológica de estos factores de crecimiento (16).

Combinación entre células y materiales: Las células y los materiales deben adaptarse perfectamente entre sí, y cultivarse en bioreactores bajo condiciones pre-establecidas. En este proceso es fundamental incorporar a los reactores factores de crecimiento que promuevan el desarrollo homogéneo y tridimensional de las células, simulando las características propias del tejido natural. De esta forma se garantizará la correcta estructura molecular y macroscópica de los tejidos, requisito necesario para su correcta función (17).

Lugar de administración: El sistema desarrollado se debe de transplantar al paciente en el lugar adecuado. En función de cual sea ese lugar, puede ser necesario aumentar la vascularización o administrar conjuntamente factores de crecimiento que estimulen la viabilidad del implante. En este sentido, se contempla incluir células microencapsuladas en biorreactores sólidos sintéticos que promuevan la vascularización del implante y de esta forma su funcionalidad a largo plazo (18-20).

APLICACIONES TERAPÉUTICAS

La comunidad científica ha estudiado el desarrollo de órganos y tejidos para casi todas las partes del cuerpo humano. La piel es uno de los órganos que más interés ha despertado entre los científicos, a pesar de que su trasplante es complejo debido a su potente repuesta inmune. Precisamente, un derivado tisular, el TransCyte®, fue el primero en ser aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) como recubrimiento temporal para quemaduras. Posteriormente, han ido surgiendo nuevos productos que emplean células epidérmicas o incluso fibroblastos embebidos en matrices tridimensionales para el tratamiento de úlceras venosas o diabéticas. Estos últimos además de secretar de forma natural proteínas de la matriz extracelular (como el colágeno, laminina, etc) son capaces de responder a los factores reguladores secretados por el huésped durante más de 6 meses (21).

Debido a que la pérdida o fractura de hueso y cartílago es muy frecuente en la población, se están desarrollando diversas alternativas para su sustitución (22-24). En general, éstas se basan en la incorporación de condriocitos autólogos sobre matrices poliméricas, que al cultivarse producen cantidades significativas de colágeno y glicosaminoglicanos, factores esenciales para la construcción de tejido cartilaginoso (25). En el caso del hueso, se prefiere cultivar osteoblastos y osteocitos alogénicos en matrices biodegradables que una vez desarrolladas en cultivo son implantadas en el huésped. En uno de estos trabajos, se comprobó que 10 semanas después del implante, el injerto había formado grandes cantidades de hueso de características idénticas al hueso natural (26).

A estas realidades hay que sumar los avances llevados a cabo en el diseño de nuevos biomateriales que hacen posible la sustitución del hueso de mandíbulas dañadas o reseccionadas. Valiéndose de estos materiales algunos investigadores han desarrollado tejidos óseos para sustituir las mandíbulas de cabras, obteniendo buenos resultados, ya que los tejidos se diferencian y toman la forma geométrica de mandíbulas caprinas. Recientemente también se ha presentado una revolucionaria técnica de regeneración de tejidos que llega a reducir a la mitad el tiempo de recuperación de pacientes con lesiones musculares tendinosas o fracturas óseas. La técnica consiste en extraer una pequeña cantidad de sangre del paciente a partir de la cual se obtiene un plasma rico en factores de crecimiento que se administra en la zona a tratar (Figura 2). Esta novedosa estrategia está siendo aplicada con éxito en múltiples alteraciones del aparato locomotor como fracturas óseas, dolencias de cartílago, úlceras de origen vascular, rotura de tendones y ligamentos además de implantes dentales y de cadera.

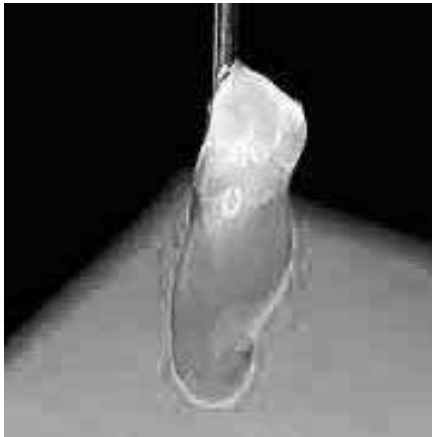


Figura 2:

Imagen del plasma rico en factores de crecimiento una vez coagulado y listo para su implante.

Estos avances han permitido que la ciencia actual pueda dar respuesta a demandas más complejas como los injertos de nariz u oreja. Para ello, es necesario desarrollar no solo la epidermis sino también la dermis y vasos sanguíneos que irrigan el tejido natural. De hecho, la ausencia de vasos sanguíneos es lo que ha llevado al incremento de resultados negativos al utilizar bypasses. Diversos grupos han estudiado colocar células musculares

lisas junto a células endoteliales en tubos poliméricos bajo condiciones pulsátiles (similares a las que suceden en el cuerpo como consecuencia de los latidos cardiacos). Los investigadores comprobaron que los vasos sanguíneos formados eran físicamente más resistentes que los creados bajo condiciones estáticas y presentaban propiedades farmacológicas similares a los vasos naturales (27). A partir de estas consideraciones, se pretende desarrollar e implantar tejido vascularizado que contenga un estructura tridimensional adecuada y vasos sanguíneos con un tamaño suficiente como para fusionarse con la vasculatura del huésped.

Un concepto similar es el que se está estudiando para desarrollar válvulas cardiacas. Incorporando células endoteliales y fibroblastos en matrices con forma de válvula y transplantándolas en ovejas, se ha logrado mantener la función cardíaca durante más de 6 meses (28).

No obstante, el mayor de los objetivos de la ingeniería tisular es el de crear órganos completos que puedan posteriormente ser transplantados. Lo que hasta hace unos años parecía imposible, hoy se está convirtiendo en un objetivo a mediano largo plazo. Uno de los órganos en investigación es la vejiga urinaria. En la actualidad, se han logrado crear vejigas "artificiales" capaces de funcionar en perros durante más de 11 meses (29,30).

El aumento de la incidencia de enfermedades como la diabetes o la falla hepática han provocado que órganos como el páncreas y el hígado también estén siendo objeto de estudio (31,32). En ambos casos se emplea la tecnología de inmovilización de células (33,34), bien sean islotes de Langerhans en la diabetes (35-40) o hepatocitos en las fallas hepáticas (41-47). En conjunto, los resultados obtenidos en animales y en algún paciente son esperanzadores pero se requiere un mayor esfuerzo dirigido a la búsqueda de materiales más biocompatibles y el escalado a nivel industrial de los cultivos celulares. En el caso del hígado, una segunda posibilidad es la emplear sistemas extracorporales, ubicados fuera del paciente. Estos sistemas, encargados de sustituir al hígado enfermo y que sirven como solución temporal hasta la llegada de un nuevo órgano, han sido ya usados en más de 100 pacientes. Por otro lado, un grupo de investigación, como el de la Universidad de Toronto se ha propuesto un objetivo todavía más ambicio-

so, generar un corazón completo; todo hace pensar que se necesitarán de 10 a 20 años hasta empezar a ver algún resultado positivo (48,49).

Por último, la ingeniería tisular también puede ser empleada para diseñar modelos fisiológicos *in vitro* que permitan estudiar la patogénesis de muchas enfermedades e infecciones víricas con el objeto de desarrollar fármacos y terapias moleculares que prevengan o curen dichas dolencias.

RETOS FUTUROS

Los avances llevados a cabo en ingeniería tisular y los logros obtenidos, hacen pensar que con el tiempo, todo aquello que se pretenda podrá ser posible (Figura 3). No obstante, hoy en día, son muchos los aspectos que quedan por mejorar. Por un lado resulta fundamental mejorar la calidad y biocompatibilidad de los materiales (50) y las propiedades de las células, de modo que los sistemas terapéuticos desarrollados sean más duraderos. Así

mismo, es necesario mejorar las condiciones de cultivo de las líneas celulares y su producción a media escala, con el objeto de que esta tecnología llegue a un mayor número de pacientes. Es también una prioridad investigar en el campo de las células madre, llevando a cabo más estudios experimentales que refuercen el conocimiento de los investigadores especialmente en el área de la diferenciación celular. Por último, es necesario desarrollar una producción a escala que asegure unas condiciones de bioseguridad y esterilidad adecuadas.

En resumen, la ingeniería tisular es una ciencia en continuo desarrollo que presenta innumerables posibilidades terapéuticas. Alguno de los productos logrados con esta tecnología han sido aprobados por la FDA y muchos se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos. Todo hace pensar que en un futuro cercano, la ingeniería de órganos y tejidos permitirá no solo crear estructuras orgánicas, sino también vehículos para la liberación continua y controlada de fármacos, genes y proteínas en los pacientes.

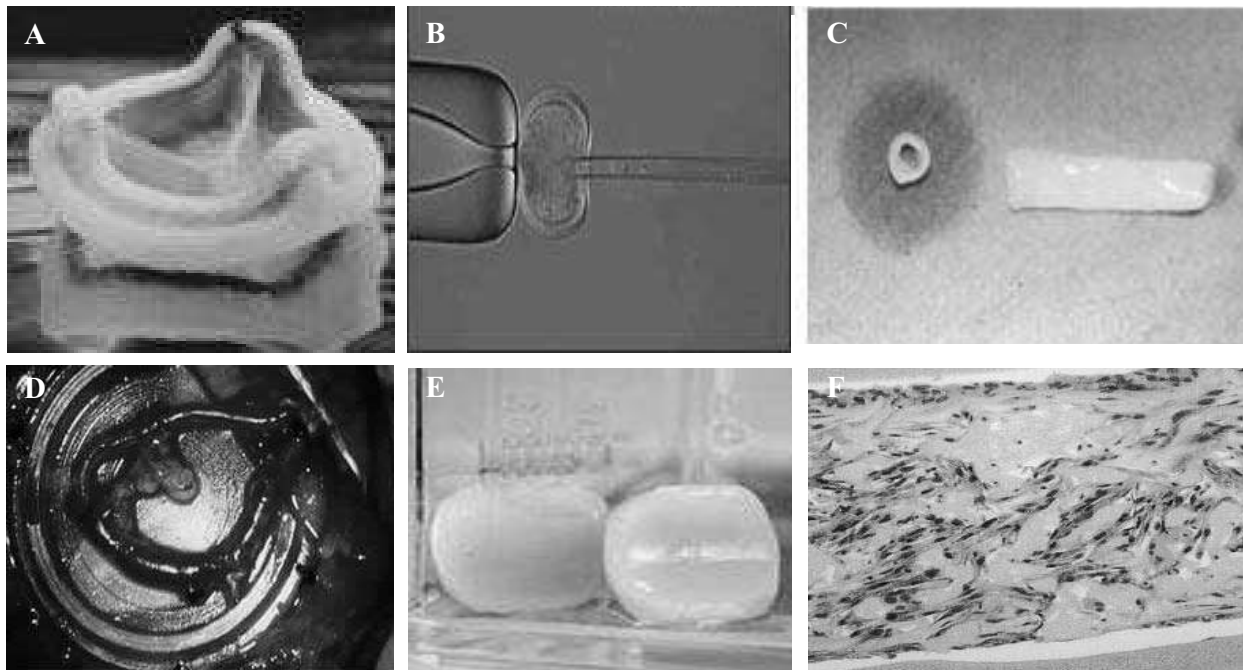


Figura 3:

Aplicaciones terapéuticas de la ingeniería tisular. A) Válvulas cardíacas porcinas, B) Clonación celular para el desarrollo de células madre embrionarias, C) Desarrollo óseo, D) Desarrollo de vasos sanguíneos, E) Articulaciones listas para ser transplantadas, F) Células musculares encapsuladas en sistemas de inmovilización.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Langer, R., Vacanti, JP. (1993) Tissue engineering. *Science* 260 : 920-926.
2. Langer, R., Vacanti, JP. (1999) Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am* 280 : 62-65.
3. Wickware, P. (2000) Exploring the territory in tissue engineering. *Nature* 403 : 464-465.
4. Langer, R. (2000) Tissue engineering. *Mol Ther* 1 (1) : 12-15.
5. Stock, UA., Vacanti, JP. (2001) Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 52 : 443-451.
6. Niklason, LE., Langer, R. (2001) Prospects for organ and tissue replacement. *JAMA* 285 (5) : 573-576.
7. Günzburg, WH., Salmons, B. (2000) Xenotransplantation: Is the risk of viral infection as great as we thought? *Mol Med Today* 6 : 199-208.
8. Bach, FH., Fineberg, HV. (1998) Call for moratorium on xenotransplants. *Nature* 391 : 236.
9. Tabata, Y. (2001) Recent progress in tissue engineering. *Drug Discov Today* 6 (1) : 483-487.
10. Orive, G., Hernández, RM., Gascón, AR., et al (2003) Controversies over stem cell research. *Trends Biotechnol.* 21 : 109-112.
11. Bianco, P., Robey, PG. (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414 : 118-121.
12. Vacanti, JP., Langer, R. (1999) Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet* 354 (1) : 32-34.
13. Wang, Y., Ameer, GA., Sheppard, BJ., et al. (2002) A tough biodegradable elastomer. *Nat Biotechnol.* 20 : 620-606.
14. Lee, KY., Peters, MC., Anderson, KW., et al. (2000) Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* 408 : 998-1000.
15. Lendlein, A., Langer, R. (2002) Biodegradable, elastic shape-memory polymers for potential biomedical applications. *Science* 296 : 1673-1676, 2002.
16. Vacanti, CA., Cima, LG., Rodkowsky, D., et al. (1992) Tissue-inducing biomaterials. Warrendale PA. Materials Research Society. pp 323-330.
17. Griffith, LG., Naughton, G. (2002) Tissue engineering, current challenges and expanding opportunities. *Science* 295 : 1009-1014.
18. Orive, G., Hernández, RM., Gascón, AR., et al. (2003) Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* 9 (1) : 104-107.
19. Leoni, L., Desai, TA. (2001) Nanoporous biocapsules for the encapsulation of insulinoma cells: biotransport and biocompatibility. *IEEE Trans Biomed Eng* 48 : 1335-1341.
20. De Vos, P., Marchetti, P. (2002) Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *Trends Mol Med* 8 : 363-366.
21. Kern, A., Liu, K., Mansbridge, J. (2001) Modification of fibroblast gamma-interferon responses by extracellular matrix. *J Invest Dermatol* 117 (1) : 112-118.
22. Koppel, PGJ., van Osch, GJVM., Carel, DA., et al. (2001) A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the rabbit pinna punch-hole model. *Biomaterials* 22 : 1407-1414.
23. Freed, LE., Langer, R., Martin, I., et al. (1997) Tissue engineering of cartilage in space. *PNAS* 94 : 13885-13890.
24. Marijnissen, WJCM., van Osch, GJVM., Aigner, J., et al (2002) Alginate as a chondrocyte-delivery substrate in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 23 : 1511-1517.
25. Vunkaj-Novankovic, G., Freed, L., Biron, RJ., et al. (1996) Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. *Am Inst Chem Eng J* 42 : 850-860.
26. Vacanti, CA., Kim, W., Upton, J., et al. (1993) Tissue engineering growth of bone and cartilage. *Transplant Proc* 25 : 1019.
27. Niklason, LE., Gao, J., Abbott, WM., et al. (1999) Functional arteries grown in vitro. *Science* 284 : 489-493.
28. Shinoka, T., Ma, PX., Shum-Tim, D., et al. (1996) Tissue-engineered heart valves: autologous valve leaflet replacement study in a lamb model. *Circ.* 94 : 164-168.
29. Hubbel, JA., (1999) A new-for-old urinaru bladder. *Nature* 398 : 198-199.
30. Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, JJ., et al. (1999) De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol* 17 (2) : 149-155.
31. Orive, G., Hernández, RM., Gascón, AR., et al. (2002) Encapsulated cell technology: from research to market. *Trends Biotechnol* 20 (9) : 382-387.
32. Orive, G., Hernández, RM., Gascón, AR., et al. Hígado bioartificial: ¿qué nos puede aportar hoy la bioingeniería?. SOMIAMA (In press).
33. Dove, A. (2002) Cell-based therapies go live. *Nat Biotechnol* 20 : 339-343.
34. Orive, G., Hernández, RM., Gascón, AR., et al. (2003) Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharm Sci* 24 (5) : 207-210.
35. Prokop, A., (2001) Bioartificial pancreas: materials, devices, function and limitations. *Diabetes Technol* 3 (3): 431-449.
36. De Vos, P., Hamel, AF., Tatarkiewicz, K. (2002) Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 45 : 159-173.
37. Check, E. (2002) diabetes trial stirs debate on safety of xenotransplants. *Nature* 419 : 5.
38. Wang, W., Gu, Y., Tabata, Y., et al. Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation* 73 (1) : 122-129.
39. Kobayashi, T., Aomatsu, Y., Iwata, H., et al. (2003) Indefinite islet protection from autoimmune destruction in nonobese diabetic mice by agarose microencapsulation without immunosuppression. *Transplantation* 75 (5) : 619-625.
40. Dickson, BC., Yang, H., Savelkoul, HFJ., et al. (2003) Islet transplantation in the discordant tilapia-to-mouse model: a novel application of alginate microencapsulation in the study of xenograft rejection. *Transplantation* 75 (5) : 599-606.
41. Strain, A., Neuberger, JM. (2002) A bioartificial liver: state of the art. *Science* 295 : 1005-1009.
42. Flendrig, LM., Calise, F., Di Florio, E., et al. (1999) Significantly improved survival time in pigs with complete liver ischemia treated with a novel bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 22 : 701-709.
43. Abouna, GM., Ganguly, PK., Hamdy, HM., et al. (1999) Extracorporeal liver perfusion system for successful hepatic support pending liver regeneration or liver transplantation: A preclinical controlled trial. *Transplant* 67 : 1576.
44. Iwata, H., Sajiki, T., Maeda, H., et al. (1999) In vitro evaluation of metabolic functions in a bioartificial liver. *ASAIO J* 45 : 299-306.
45. Mazariegos, GV., Patzer, JF., Lopez, RC., et al. (2002) First clinical use of a novel bioartificial liver support system (BLSS). *Am J Transplant* 2 : 260-266.
46. Allen, JW., Hassanein, T., Bhatia, S. (2001) Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology* Vol 34 (3) : 447-455.
47. Morsiani, E., Pazzi, P., Puviani, AC., et al (2002) Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. *Int J Artif Organs* 25 : 192-202.
48. Petit-Zeman, S. (2001) Regenerative medicine. *Nat Biotechnol* 19 : 201-206.
49. Zandonella, C. (2002) The beat goes on. *Nature* 421 : 884-886.
50. Angelova, N., Hunkeler, D. (1999) Rationalizing the desing of polymeric materials. *Trends Biotechnol* 17 : 409-421.

Fecha de Recibo: Julio 7 de 2003

Fecha de Aceptación: Septiembre 2 de 2003