

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL



**MODELO DE MUCOSA VESICAL
HUMANA DESARROLLADO
MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR**

**Francisco Valle Díaz de la Guardia
Granada, 2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco Valle Díaz de la Guardia
D.L.: GR 3146-2011
ISBN: 978-84-694-4463-4



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Histología
Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular CTS – 115

**“MODELO DE MUCOSA VESICAL HUMANA
DESARROLLADO MEDIANTE INGENIERÍA
TISULAR”**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada por el Proyecto de Investigación FIS PI07-331 del Fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III.

Granada, 2011

“MODELO DE MUCOSA VESICAL HUMANA DESARROLLADO MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR”

Memoria que presenta el Licenciado en Medicina y Cirugía
Francisco Valle Díaz de la Guardia
para aspirar al título de Doctor

Fdo.: Francisco Valle Díaz de la Guardia

VºBº El Director de Tesis

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Antonio Campos Muñoz
Doctor en Medicina y Cirugía
Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Armando Zuluaga Gómez
Doctor en Medicina y Cirugía
Universidad de Granada

VºBº El Director de Tesis

Fdo.: Dr. Pascual Vicente Crespo Ferrer
Doctor en Medicina y Cirugía
Universidad de Granada

Departamento de Histología
Universidad de Granada

2011

Agradecimientos

Todo trabajo de investigación requiere además de un investigador principal a un equipo de personas que colaboren y ayuden a conseguir los objetivos propuestos. Su presencia ha sido aún más importante en un trabajo como éste en el que una persona con una formación muy básica en las técnicas de laboratorio ha necesitado que otras sean sus manos y sus ojos a la hora de realizar e interpretar correctamente el proceso de investigación.

Por eso me gustaría comenzar mis agradecimientos refiriéndome a mis directores de tesis por su acompañamiento durante todo este trabajo, por su insistencia y dedicación para que saliera adelante con optimismo y esfuerzo.

Al Servicio de Urología del Hospital Clínico San Cecilio de Granada, por su apoyo y ayuda a la hora de tomar las muestras a la vez que me iniciaban en la cirugía urológica, especialmente a los doctores Cámara y López-Carmona que tanto me han acompañado en el quirófano y al Dr. Arrabal por aficionarme a la investigación.

También a todos los médicos residentes del Servicio: Antonio, Víctor, Miguel Ángel, Sergio y Clara; por su amistad y apoyo en la recolección de muestras.

Al Departamento de Histología de la Universidad de Granada, especialmente a Miguel Alaminos y a Ingrid Garzón, alma y colaboradora de este estudio sin cuyo trabajo y tiempo no habría sido posible la realización de esta tesis. También a Renato y a Miguel, que han cuidado de mis cultivos en los días que me ausentaba.

A Susana, por ser mi compañera y amiga en los momentos de flaqueza. Gracias por ayudarme con tu apoyo a aprender a valorar mi trabajo y esfuerzo.

A mi padre, mi orgullo, ahora puedo valorar con toda su importancia el nivel profesional y científico que con años de trabajo ha alcanzado. Gracias por estar siempre a mi lado en todos los aspectos de mi vida.

A mi madre. A quien lo debo todo por llevarme de la mano desde mis primeros deberes escolares hasta esta meta. Gracias por inculcarme tu espíritu universitario, tu estímulo y tu fuerza.

A mi hermana por su alegría y cariño.

A Antonio, un paciente estudiante de biología, cistectomizado, y que durante su enfermedad me preguntó en varias ocasiones por mi tesis comprendiendo la lentitud de la ciencia pero reflejando en sus ojos lo ilusionante de nuestro trabajo.

A mi hijo Paco, lo mejor que me ha pasado en la vida. Que tu perfecta sonrisa me siga iluminando cada día. Me gusta pensar que con este trabajo he ayudado a mejorar un poquito el tratamiento futuro de problemillas como el tuyo.

“A mi hijo Paco”

Índice

1. Introducción.....	19
1.1. Historia y desarrollo de la Ingeniería Tisular.....	23
1.1.1. Breve introducción histórica a la Ingeniería Tisular.....	23
1.1.2. Concepto de Ingeniería Tisular.....	27
1.1.3. Componentes básicos de los tejidos artificiales construidos mediante Ingeniería Tisular.....	28
a) Células.....	29
b) Matrices extracelulares.....	30
c) Sistema de señalización: agentes farmacológicos y características genéticas.....	31
1.2. Histología del aparato urinario.....	32
1.2.1. Urotelio. Epitelio de transición.....	33
1.2.2. Proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas) en el urotelio.....	36
1.2.3. Corion.....	37
1.2.4. Órganos del aparato urinario recubiertos por urotelio.....	38
a) Cálices, pelvis renal y uréter.....	38
b) Vejiga.....	38
c) Estructura de la uretra.....	40
1.3. Patología de la vía urinaria en la que se hace necesaria la sustitución de tejido. Técnicas empleadas hasta la actualidad.....	41
1.3.1. Uréteres.....	42
1.3.2. Vejiga.....	45
a) Patología vesical en uropediatria.....	45
b) Patología vesical en el adulto.....	47
1.3.3. Uretra.....	50
a) Patología congénita.....	50

b) Patología uretral en el adulto.....	52
1.4. Ingeniería Tisular aplicada a la Urología.....	54
a) Uréter.....	56
b) Vejiga.....	56
c) Uretra.....	59
2. Objetivos.....	61
2.1. Objetivo general.....	63
2.2. Objetivos específicos.....	63
3. Material y métodos.....	65
3.1. Obtención de muestras de origen humano utilizadas en este estudio.....	67
3.2. Cultivos primarios de células epiteliales.....	69
3.3. Cultivos primarios de células estromales.....	71
3.4. Subcultivo de las células procedentes de cultivos primarios de mucosa vesical.....	73
3.5. Desarrollo de sustitutos del corion de la mucosa: formación del estroma artificial.....	74
3.6. Obtención de constructos de mucosa vesical artificial.....	76
3.7. Evaluación microscópica de la mucosa vesical artificial.....	78

3.7.1 Microscopía óptica.....	78
3.7.2. Microscopía electrónica de transmisión.....	78
3.7.3. Inmunohistoquímica.....	80
4. Resultados.....	83
4.1. Cultivos primarios de células procedentes de la mucosa del aparato urinario.....	85
4.1.1. Cultivo de células epiteliales.....	85
4.1.2. Cultivo de fibroblastos.....	88
4.2. Formación de estroma tridimensional.....	91
4.3. Desarrollo del modelo de mucosa vesical humana de espesor completo obtenido mediante Ingeniería Tisular.....	92
4.4. Evaluación por microscopía óptica de las muestras control y de los sustitutos de mucosa vesical desarrollados por Ingeniería Tisular.....	93
4.4.1. Cortes de control de muestras fijadas para microscopía electrónica de transmisión (cortes semifinos).....	96
4.5. Evaluación mediante microscopía electrónica de transmisión de los sustitutos de mucosa vesical desarrollados por Ingeniería Tisular.....	98
4.5.1. Epitelio de transición artificial.....	98
4.5.2. Sistemas de unión de membrana en el urotelio artificial.....	100
4.5.3. Fibroblastos.....	103
4.5.4. Estructura microscópica del gel de fibrina-agarosa.....	106

4.6. Evaluación del perfil de expresión de citoqueratinas en sustitutos de mucosa vesical desarrollados por Ingeniería Tisular.....	107
4.6.1. Pancitoqueratina (complejo de citoqueratinas 1, 5, 6, 8, 10, 18).....	107
4.6.2. Citoqueratina 7.....	109
4.6.3. Citoqueratina 8.....	109
4.6.4. Citoqueratina 4.....	112
4.6.5. Citoqueratina 13.....	112
4.6.6. Involucrina.....	115
4.6.7. Filagrina.....	115
5. Discusión.....	121
6. Conclusiones.....	139
7. Bibliografía.....	143

Índice de figuras:

Figura 1. Milagro de San Cosme y San Damián.

Figura 2. Tipos de epitelios.

Figura 3. Esquema de la estructura y localización de las proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas).

Figura 4. Esquema de patologías del aparato urinario.

Figura 5. Sustitución ureteral mediante íleon.

Figura 6. Técnica de ampliación vesical utilizando una porción de sigma.

Figura 7. Estadiaje del cáncer de vejiga. El estadio II indica la cistectomía.

Figura 8. Técnicas de sustitución vesical: reservorio de colon y asa de Bricker.

Figura 9. Corrección de hipospadias utilizando piel prepucial.

Figura 10. Toma de muestra de mucosa vesical. Imagen control de urotelio.

Figura 11. Esquema representativo del proceso de obtención, transporte y procesamiento de las muestras de mucosa vesical humana. Los valores I, II y III corresponden a 15, 30 y 45 minutos de tripsinización respectivamente.

Figura 12. Esquema de cultivo del sustituto estromal. Medios de cultivo utilizados en cada paso: primero para el estroma y posteriormente al sembrar el epitelio.

Figura 13. Esquema del proceso de elaboración de mucosa artificial.

Figura 14. Resultados de inmunohistoquímica de las distintas citoqueratinas en la muestra control y las obtenidas artificialmente.

Figura 15. Esquema de resultados en la expresión de citoqueratinas comparando muestra control y mucosa vesical artificial.

Tablas:

Tabla 1. Principales fechas y autores en la historia de la Ingeniería Tisular.

Tabla 2. Anticuerpos primarios usados en este trabajo y la dilución correspondiente para los ensayos de inmunofluorescencia. Laboratorio comercial y referencia para cada anticuerpo.

Imágenes:

Imagen 1. Malformación congénita. Ureterocele izquierdo.

Imagen 2. Tumor urotelial en la unión ureteropiélica.

Imagen 3. Vejiga neurógena de alta presión con reflujo bilateral.

Imagen 4. Estenosis de uretra posterior.

Imagen 5. Reflujo vésicoureteral izquierdo.

Imagen 6. Mucosa bucal obtenida mediante IT y tubulizada para sustituir uretra. (Bhargava et al., 2004).

Imagen 7. Células epiteliales de aparato urinario.

Imagen 8. Acúmulos de células uroteliales con prolongaciones.

Imagen 9. Crecimiento epitelial confluyente.

Imagen 10. Cultivo de fibroblastos a las 24 horas.

Imagen 11. Cultivo de fibroblastos 5^o día.

Imagen 12. Cultivo de fibroblastos. 7^o día. Confluencia.

Imagen 13. Formación de estroma vesical en gel de agarosa y fibrina.

Imagen 14. Control de mucosa vesical.

Imagen 15. Monocapa de células uroteliales sobre estroma de mucosa vesical obtenidas mediante IT.

Imagen 16. Detalle de la continuidad de las células epiteliales cubriendo el estroma.

Imagen 17. Mucosa vesical obtenida de forma artificial.

Imágenes 18, 19, 20, 21. Microscopio electrónico de transmisión (MET): cortes semifinos de mucosa vesical artificial.

Imágenes 22, 23, 24. MET: epitelio de transición artificial.

Imágenes 25, 26, 27, 28, 29. MET: sistemas de unión de membrana.

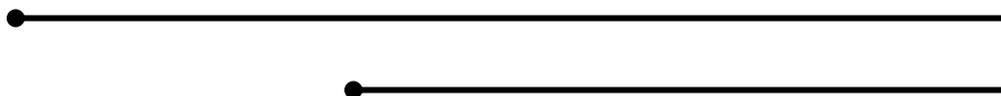
Imágenes 30, 31, 32, 33, 34, 35. MET: fibroblastos.

Imagen 36. MET: estructura del gel de fibrina-agarosa.

Imágenes 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49. Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina, CK 7, 8, 4,13, involucrin y filaggrin (respectivamente) en muestras de vejiga humana control (seña verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

Imágenes 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50. Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina, CK 7, 8, 4,13, involucrin y filaggrin (respectivamente) en muestras de mucosa vesical humana obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular (seña verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

1. Introducción



La sustitución del tejido dañado o perdido por otro sano es la finalidad de numerosas técnicas que los médicos y cirujanos han ido perfeccionando a lo largo de la historia. Sin embargo, la viabilidad y funcionalidad de estos nuevos tejidos una vez implantados en el ser humano es un factor fundamental para el éxito de todo el procedimiento y este punto sigue siendo una asignatura pendiente. La Ingeniería Tisular busca construir tejidos artificiales a partir de los propios del sujeto o de otro ser humano que se asemejen lo más posible a los originales. Para asegurar su buena evolución posterior es imprescindible conocer las características tanto del tejido original como del medio en el que se desenvuelve.

Es por esto que la comunicación entre el clínico y el investigador debe ser fluida y constante para conocer por una parte las patologías y técnicas en las que se necesita un determinado tejido con unas características (tamaño, función, resistencia, etc.); y por otra el clínico debe conocer las alternativas actuales en la sustitución de tejidos de los distintos aparatos corporales para poder aplicarlas y añadirlas a su arsenal terapéutico.

En la presente Tesis Doctoral se expondrá primero una introducción en la que destacaremos la evolución e importancia en los últimos años de la medicina regenerativa y la Ingeniería Tisular, las estructuras susceptibles de sustitución en el aparato urinario, objeto de interés de esta Tesis Doctoral, y las patologías que con mayor frecuencia conducen a su pérdida estructural y que requieren sustitución. Finalmente resumiremos las aportaciones de la Ingeniería Tisular en el campo de la Urología en el momento actual y la importancia de continuar la investigación para encontrar un sustituto adecuado para este tejido. Tras la introducción enumeraremos los objetivos de esta Tesis Doctoral así como el material y los métodos utilizados en el desarrollo de la misma. Después de la exposición de los resultados obtenidos y discusión de los mismos se enumerarán las conclusiones alcanzadas.

1.1. Historia y desarrollo de la Ingeniería Tisular. Conceptos

En este capítulo desarrollaremos primero esquemáticamente la historia de la medicina regenerativa y en segundo lugar describiremos el concepto de Ingeniería Tisular. Posteriormente revisaremos las unidades estructurales en que se fundamenta.

1.1.1. Breve introducción histórica a la Ingeniería Tisular

Encontrar un sustituto adecuado para el organismo humano enfermo que pierde su morfología o su funcionalidad ha sido una constante en la historia de la medicina. La posibilidad de reemplazar un órgano alterado por otro sano es uno de los eventos más sobresalientes del siglo XX.

Existen antecedentes en la antigüedad en los que se confunden ciencia y religión como el conocido “Milagro de San Cosme y San Damián”, mártires durante la época del emperador romano Diocleciano (284-305 d.C.) a los que se les atribuye el prodigio de implantar la pierna de un criado muerto a un presbítero con un tumor en la pierna. Según la iconografía el donador era de raza negra, o quizá la necrosis posterior del tejido le dio este color peculiar (Miranda et al., 1999). Esto no ha evitado que se consideren actualmente los patrones del trasplante de órganos (Figura 1).

En 1901 Alexis Carrel describió las suturas vasculares, punto de partida para la cirugía del trasplante, pero no es hasta 1954 en Boston cuando el equipo de Moore realiza el primer trasplante de riñón exitoso entre dos gemelos; desde entonces los estudios han evolucionado hasta intentar construir el riñón bioartificial (Humes et al., 2002).

A éste siguió el primer trasplante cardíaco en 1967 por C. Barnard y en los años 70 el desarrollo de la inmunosupresión permitió su expansión y la mejora en los resultados.



Figura 1. *Milagro de San Cosme y San Damián.*

A partir de los años cincuenta es cuando en el contexto de una serie de nuevos descubrimientos —primer trasplante renal exitoso (Murray et al., 1954), uso de inmunosupresores, replicación viral sobre células cultivadas, definición de las condiciones para congelar células en nitrógeno líquido, creación de la línea celular HeLa, primera de origen humano (Gey et al., 1952), entre muchos otros— se desarrolla la idea de poder formar un tejido completo desde una pequeña porción del mismo.

Se comienza a intuir que la aplicación de técnicas de laboratorio que permitan la recolección, cultivo y multiplicación celular para posteriormente reconstruir un tejido podría permitir adecuarlo a una función o poder utilizarlo para la reparación del organismo.

Las primeras investigaciones se realizaron en la piel, uno de los tejidos más expuesto a lesiones con pérdida de sustancia asociada (traumatismos, quemaduras...). Maltoltsy en 1960 toma tejido cutáneo y lo cultiva en distintos medios para intentar que prolifere. Rheinwald y Green (1975) describen la técnica para expandir un cultivo de células epiteliales a partir de células de ratón, momento fundamental pues postulan que su descubrimiento puede aplicarse a otros epitelios del organismo como el urotelio. Posteriormente comenzaron los injertos de este nuevo tejido en animales (Banks-Schelegel & Green, 1980).

Esta aproximación terapéutica se ha extendido a los distintos tejidos y especialidades médicas (otorrinolaringología, urología, traumatología, oftalmología, etc.), comenzando con el cultivo de los propios tejidos, su expansión y su implante en el paciente: Vacanti y Puelacher cultivan e implantan condrocitos (Puelacher et al., 1994); Mooney aísla osteocitos y osteoblastos obteniendo un tejido con una trabeculación ósea normal (Vacanti et al., 1993); Breuer (1995) crea la primera válvula cardíaca mediante técnicas de Ingeniería Tisular con buenos resultados funcionales; entre otros.

Nuevos avances se han ido sucediendo en relación a la obtención y cultivo de las células originarias de los tejidos. Como momentos clave para el desarrollo de este nuevo campo destacar que a mediados de 1980 Vacanti y Langer postulan la utilización de bases de polímeros para el transporte de las células cultivadas (Vacanti, 2006) y la creación en 1985 del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Trasplantes del Children's Hospital de Boston en colaboración con el Laboratorio de Polímeros Biodegradables del Instituto Tecnológico de Massachussets.

Allí se consolida esta nueva forma de trabajo procediéndose a la formación de un primitivo banco de células, cultivadas sobre polímeros sintéticos biodegradables, para posteriormente ser implantadas en el organismo.

En 1994 para favorecer la organización de los conocimientos que se iban produciendo se funda la Tissue Engineering Society (TES) en cuya junta directiva original se encontraban los doctores Vacanti, Langer o Atala entre otros; y en el mismo año se publica el primer número de la revista “Tissue Engineering” para difundir artículos relacionados con este campo (Vacanti y Mikos, 1995).

Las principales fechas y autores en relación a la historia de la Ingeniería Tisular se resumen en la Tabla 1.

1960	Maltoltsy	Cultivo de tejido epitelial
1975	Rheinwald y Green	Expansión de cultivos tisulares. Aplicación de la técnica a epitelios
1980	Banks-Schelegel	Injerto de cultivos expandidos artificialmente en animales
1980	Vacanti y Langer	Trasporte celular sobre bases de polímeros
1983	Reznikoff y Schmit	Recolección de células uroteliales, mejoran los medios de cultivo y logran obtener monocapas de células uroepiteliales que pueden mantener y subcultivar
1985		Creación del laboratorio de Ingeniería de tejidos y trasplantes del Children's Hospital de Boston
1992	Atala	Uso de polímeros biodegradables como vehículo para la creación de estructuras uroteliales a partir de células aisladas
1994		Se funda la Tissue Engineering Society

Tabla 1. Principales fechas y autores en la historia de la Ingeniería Tisular.

1.1.2. Concepto de Ingeniería Tisular

El término “Tissue Engineering” (Ingeniería Tisular) se gestó en 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias. Esta nueva ciencia se asienta sobre conocimientos de biología, histología, genética, medicina y por supuesto de la ingeniería clásica, así como de la química o la física.

Las técnicas reconstructivas habituales hasta el desarrollo de la Ingeniería Tisular (trasplantes, uso de tejido autólogo y colocación de materiales artificiales) estaban limitadas por el número de donantes y por la cantidad de tejido que se podía obtener del propio sujeto para la reparación del tejido dañado o perdido. Además la posibilidad del rechazo obligaba a tratamientos médicos agresivos. El uso de células del propio individuo, multiplicadas y organizadas como el tejido original gracias a la Ingeniería Tisular, presenta la ventaja de evitar la terapia inmunosupresora y aumentar la cantidad de tejido que se puede obtener y restaurar (Kim et al., 2002; Atala & Lanza, 2002).

La Ingeniería Tisular se basa en los principios del trasplante de células y de la ciencia de los materiales o ingeniería para el desarrollo de sustitutos biológicos que puedan mantener la estructura y función normal. En otras ocasiones se usan también matrices acelulares que emplean la capacidad natural de regeneración del cuerpo para orientar o dirigir el nuevo crecimiento tisular (Ikada, 2006).

Se define como el área científica interdisciplinaria que aplica los principios de la biología y la ingeniería celular cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas y la manipulación del entorno extracelular, para la creación o desarrollo de sustitutos biológicos que restauren mantengan o mejoren la función de órganos o tejidos dañados tras su implantación en el cuerpo.

Skalak y Fox (1988) recogen esta definición en la que destacan su multidisciplinaria. Otras definiciones posteriores se centran en su nueva

metodología: *“Conjunto de métodos que tienen como objetivo la elaboración y la reconstrucción funcional de tejidos biológicos a partir de sus elementos celulares y extracelulares”* (Langer & Vacanti, 1999).

La Ingeniería Tisular tendrá por tanto dos aplicaciones fundamentales en dos campos básicos de la ciencia. En la farmacia-cosmética va a permitir mimetizar y ensayar con fármacos, sustancias y materiales protésicos sobre un sustrato idéntico al vivo (Pariante et al., 1998; Pariante et al., 2000), y aplicada a la medicina buscará la reparación del tejido, su trasplante completo o la sustitución funcional.

Sus métodos se han incorporado progresivamente a las distintas especialidades dando respuestas y nuevas alternativas a patologías que antes tenían soluciones parciales. En la actualidad sigue principios industriales de productividad en algunos campos en los que es utilizado con frecuencia como en la dermatología. (Mansbridge, 2006).

A continuación describiré los componentes básicos de los tejidos artificiales contruidos mediante Ingeniería Tisular.

1.1.3. Componentes básicos de los tejidos artificiales contruidos mediante Ingeniería Tisular

La formación de tejido artificial se basa primero en la obtención de células potencialmente precursoras de tejido y segundo en crear una estructura con unas características determinadas (porosidad, degradabilidad, forma tridimensional) sobre la cual puedan cultivarse adecuadamente. Para conseguirlo debemos lograr además un ambiente favorable rico en nutrientes y factores de crecimiento.

Podemos así definir tres componentes fundamentales en cada tejido bioartificial: células, matrices extracelulares y sistemas de señalización.

a) Células

La proliferación de un tipo específico de células sobre un material de sostén es el primer paso que requiere la restauración de un tejido. El origen de estas células iniciales puede ser una biopsia autóloga órgano-específica cuando su procedencia es del propio sujeto y del tejido que se va a regenerar, o se pueden obtener a partir de las *stem cells* (células madre).

Se denominan células madre aquellas células que poseen la capacidad teórica de autorenovarse sin límite, un carácter indiferenciado y que son capaces de originar células hijas destinadas a la diferenciación terminal. (Campos, 2004).

En un principio se limitaban estas propiedades a las células totipotentes del embrión, aquellas capaces de originar un ser completo, y se afirmaba que una célula madre de una línea determinada, por ejemplo hematopoyética, sólo podía originar células de su misma estirpe. Distintos estudios han demostrado que células primarias adultas pueden originar células de otros tejidos, por ejemplo de células madre neuronales se pueden obtener células musculares (Rietze et al., 2001).

Además de estas células madre existen otras denominadas células progenitoras. Son células madre con cierto grado de diferenciación pero que todavía son multipotentes, es decir, pueden dar origen a precursores de una sola de las tres capas embrionarias (Rodríguez-Pardo, 2005).

En otras ocasiones células de un órgano mantienen capacidad de proliferación y de una pequeña muestra o bien de células aisladas se pueden obtener un gran número de células de la misma estirpe.

Así el primer paso para la restauración de un tejido mediante Ingeniería Tisular es identificar el tipo de células precursoras más adecuado para diferenciarse en el tejido que queremos sustituir y posteriormente aplicarle los estímulos necesarios para que se diferencie y prolifere en la línea deseada.

b) Matrices extracelulares

Los tejidos humanos están compuestos, en su mayoría, por células y tejido extracelular. La Ingeniería Tisular se basa en el mismo principio y por eso se ayuda de una serie de elementos sobre los cuales puedan crecer y desarrollarse las células.

Estos biomateriales buscan no sólo dar soporte físico sino también un ambiente agradable donde las células puedan nutrirse y dividirse con facilidad para la correcta formación tisular. Se basan en los conceptos de biocompatibilidad en cuanto a su grado de tolerancia por parte de la materia viva y biointegración por su habilidad para originar una respuesta biológica apropiada para una aplicación específica (Atala & Lanza, 2002).

Se han utilizado materiales naturales y sintéticos presentando todos unas características comunes: no toxicidad, esterilidad, estabilidad mecánica o posibilidad de manipulación quirúrgica. Y otras específicas como la porosidad, amplia superficie, resistencia o biodegradabilidad, según los casos, y estructura tridimensional.

Como materiales de origen natural se han utilizado principalmente el colágeno, los glicosaminoglicanos, los alginatos y otros polipéptidos. Todos manipulados y sintetizados en el laboratorio hasta niveles microscópicos incluso mediante nanotecnología (Wilkinson, 2004) para adecuar sus características. Sus

principales ventajas son su baja toxicidad y su biodegradabilidad, su desventaja el tener una menor resistencia.

Dentro de los materiales sintéticos destacan los polímeros y los vidrios bioactivos. Los más utilizados son los poliésteres como el ácido poliglicólico o el ácido poliláctico. La estructura de estos andamiajes varía según el tipo de tejido que se va a regenerar, cambiando el tamaño de los poros o su forma tridimensional, esta conformación espacial es actualmente el mayor desafío para los investigadores (Hilt & Byrne, 2004). En general son más fáciles de obtener y manipular pero presentan un menor grado de biointegración.

c) Sistemas de señalización: agentes farmacológicos y características genéticas

El ciclo y la fisiología celular vienen marcados por dos estímulos, uno interno, su contenido genético y otro externo, las señales moleculares. Respeto a la manipulación de las señales internas podemos decir que la terapia génica sobre los cultivos celulares será una realidad en el futuro sobretodo en relación a la selección celular, la diferenciación hacia un tipo celular u otro y la proliferación controlada (Aggarwal et al., 2010).

Las células por otra parte reciben estímulos exteriores en forma de sustancias químicas que modifican su comportamiento influyendo en su nutrición, actividad secretora, diferenciación, maduración, proliferación o muerte por apoptosis (Martin et al., 2004).

Los factores de crecimiento son las principales sustancias aplicadas actualmente, se utilizan como complementos del medio de cultivo. Colaboran en la proliferación, migración y diferenciación de los tejidos in vitro. También se

utilizan los ligandos o fragmentos peptídicos cortos incorporados al biomaterial para favorecer los procesos de adhesión celular.

Otro tipo de señales químicas son los factores de crecimiento vascular fundamentales para la formación de vasos que permitan la introducción de nutrientes y la eliminación de los residuos celulares sobretodo una vez el tejido alcanza cierto volumen. A nivel experimental se están utilizando factores de crecimiento angiogénico recombinantes (VEGF, FGF) con dominios moleculares específicos para mejorar la vascularización de implantes o injertos óseos (Guerado et al., 2003).

1.2. Histología del aparato urinario

Conocer en profundidad las características de los tejidos que vamos a cultivar artificialmente es el primer paso en el desarrollo de la Ingeniería Tisular. Estos estudios deben abarcar desde su aspecto macroscópico, valorando su forma o tamaño original, hasta sus características a nivel molecular, receptores de membrana, conformación citoplasmática, incluso su base genética.

En este apartado vamos a analizar los tejidos del aparato urinario que van a estar implicados en nuestro posterior trabajo de investigación, centrándonos principalmente en el urotelio, en el corion y en los órganos revestidos por ambas estructuras.

1.2.1. Urotelio. Epitelio de transición

El sistema colector urinario comprende los cálices renales, la pelvis renal, el uréter, la vejiga urinaria y la uretra. Excepto la parte distal de la uretra, todos los componentes de este sistema están cubiertos por un epitelio adaptado que puede soportar el contacto permanente con la orina. Este epitelio se denomina epitelio de transición.

Dentro de los tipos de epitelio encontramos el epitelio simple, una única fila de células, pseudoestratificado, en el que todas las células contactan con la membrana basal, y estratificado cuando presenta varias capas. Epitelio escamoso de transición es aquel cuya capa más superficial está formada por células globulosas que cambian de forma según la situación del órgano cuya luz recubren: alargadas en la distensión y redondeadas en la relajación (Figura 2).

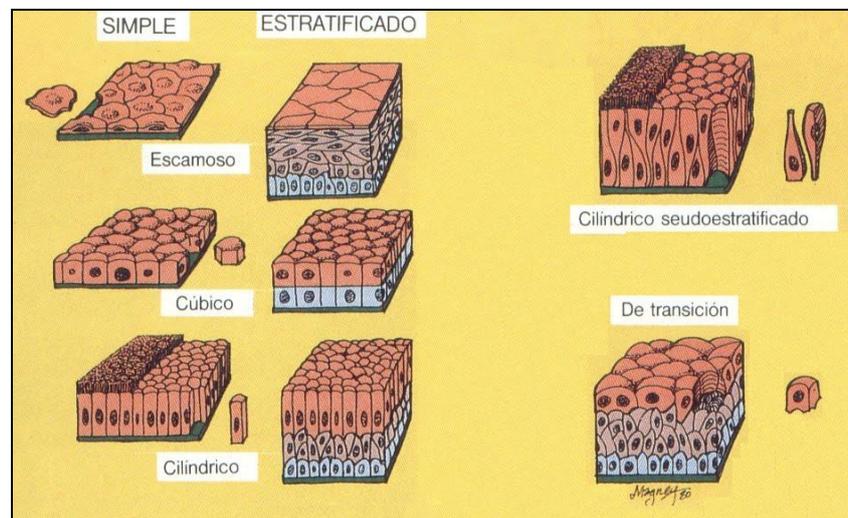


Figura 2. Tipos de epitelios. (Disponible en <http://sites.google.com/site/beastpp/embriologia>)

Este epitelio fue llamado así porque se pensaba que era una transición entre epitelio plano estratificado y epitelio cilíndrico. Reviste exclusivamente las vías urinarias por lo que a menudo se denomina urotelio.

Está compuesto de varias capas de células. Las células basales son las localizadas en la capa inferior, por encima de éstas se encuentran las células poliédricas, y las más superficiales son cúbicas con un extremo apical convexo. Las células basales tienen forma cuboidal, las intermedias poligonales y las superficiales son tubulares, alargadas o columnares. En ocasiones cubren la capa anterior y protuyen en la luz del órgano. Cada una cubre varias células intermedias (Geneser, 1990).

El urotelio presenta distintas formas a lo largo del aparato urinario, así en los cálices renales tiene entre 2 y 3 capas mientras que a nivel de uréter o vejiga presenta 5 o 6.

La configuración del urotelio ha sido motivo de controversia entre los investigadores pues algunos autores consideran al epitelio de transición como pseudoestratificado. Esto se debe a que aparentemente todas las células se anclan en la membrana basal pudiéndose considerar un epitelio pseudoestratificado multicapa.

Las células superficiales contienen numerosos lisosomas, sobretudo en la región supranuclear de la célula y presentan de forma característica núcleos polipoides si bien algunas son binucleadas. La zona apical del citoplasma es la zona en contacto con la orina y se caracteriza por contener una red densa de microfilamentos de actina. El citoplasma contiene además muchas otras vesículas que cuando el uréter o la vejiga urinaria se amplían presionan en la región apical de la célula.

Las células de la capa intermedia tienen formas irregulares y están separadas por anchos espacios intercelulares, pueden también contener lisosomas. Algunas tienen dos núcleos. El urotelio contiene también abundantes linfocitos.

La característica propia del urotelio es su capacidad para acomodarse a la tensión que se produce dentro de los órganos que sufren variaciones de volumen. En estado de contracción se distinguen muchas capas celulares. Ante la distensión el epitelio de transición aparece como epitelio escamoso de varias capas, se alargan las células superficiales y conforme aumenta su contenido las células de las capas más profundas también se aplanan.

Otra característica típica del epitelio que recubre la vejiga urinaria es constituir una barrera eficaz entre la orina y el tejido conectivo subyacente, fundamental para evitar el paso de sustancias tóxicas hacia el organismo. Las células luminales del urotelio o células paraguas se alinean en la superficie y cumplen esta función. Tienen una membrana plasmática especializada en su zona apical que tiene el doble de densidad que el otro polo. Esta asimetría es propia del urotelio y se debe a la conformación de tres proteínas integradas en la membrana, las uroplaquinas, con forma hexagonal (Truschel et al., 1999; Riedela et al., 2005).

Estas proteínas son abundantes en la membrana de las células superficiales y también aparecen en vesículas citoplasmáticas. Se cree que estas reservas tendrían un papel fundamental en la adaptación de la superficie vesical aumentando su presencia en la membrana con los cambios de volumen.

La función de barrera además sería el resultado de varios complejos de adhesión intercelular especializados de alta resistencia que impiden el flujo de iones hacia las células superficiales. Además las células superficiales presentan gran cantidad de glicosaminoglicanos en la zona apical que previenen la adherencia bacteriana al epitelio. Existen canales de sodio que

junto con otros sistemas de transporte regulan el flujo iónico y mantienen el gradiente osmótico entre la orina y el organismo (Veranic et al., 2004).

En nuestro trabajo nos referiremos con frecuencia al término *mucosa vesical* en el cual englobamos al epitelio y el corion de tejido conjuntivo subyacente. (Trias et al., 2007).

1.2.2. Proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas) en el urotelio

Las citoqueratinas son filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto de las células epiteliales. Sus funciones están relacionadas con el mantenimiento de la forma y estructura celular, y participan en las uniones intercelulares (Figura 3).

Forman una compleja familia con 20 tipos principales de polipéptidos y su presencia en distinta concentración es específica de los diferentes tipos de epitelio y de su estado madurativo, por este motivo se consideran excelentes marcadores de diferenciación epitelial .

En el urotelio se describe una presencia mixta de citoqueratinas de epitelio simple y estratificado. La vía urinaria presenta un patrón muy similar en todo su recorrido (pelvis, uréter, vejiga y tercio proximal de uretra) con positividad para las citoqueratinas 7, 8, 13, 18 y 19 (Achtstätter et al., 1985; Schaafsma et al., 1989).

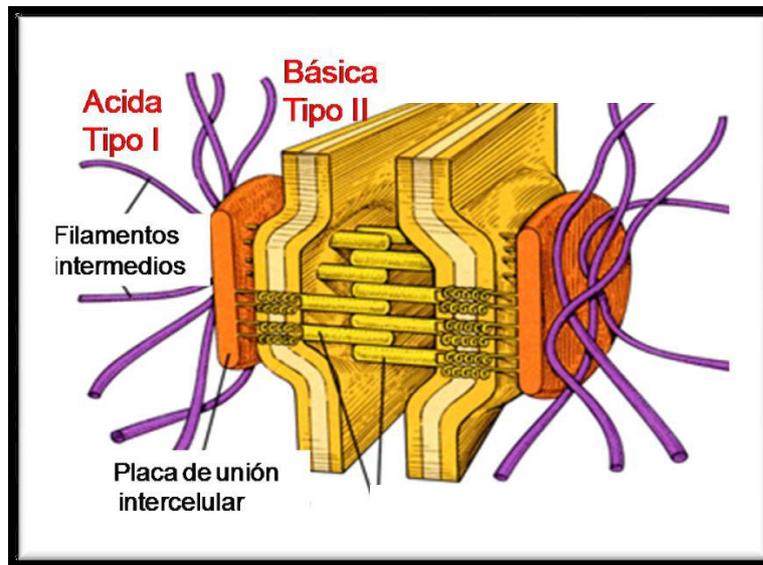


Figura 3. Esquema de la estructura y localización de las proteínas de filamento intermedio (citoqueratinas) (Garzón et al., 2009).

1.2.3. Corion

Está constituido por tejido conjuntivo rico en fibras de colágeno y fibroblastos, células fusiformes que sintetizan la matriz orgánica. Su función principal es el aporte vascular de nutrientes y el sostén del epitelio.

1.2.4. Órganos del aparato urinario recubiertos por urotelio

a) Cálices, pelvis renal y uréter

Desde los cálices renales hasta el tercio distal de la uretra el aparato urinario presenta una estructura similar basada en tres capas histológicas:

- Capa mucosa formada por urotelio y corion.
- Capa muscular: Contiene fibras musculares longitudinales, circulares y espirales, que permiten el peristaltismo para la progresión de la orina.
- Capa adventicia: Está formada por tejido conjuntivo que recubre al uréter y lo aísla del resto de tejidos (Welsch, 1999).

b) Vejiga

Por debajo de la mucosa formada por el epitelio y el tejido estromal se encuentra el músculo liso de la pared vesical que constituye el músculo detrusor. La túnica muscular de la vejiga está compuesta por tres capas de fibras, una longitudinal interna, circular media y longitudinal externa. En la zona superior las capas se fusionan en una trama no distinguible. La capa circular aparece en el tercio distal del uréter, cercano a la vejiga. En la parte proximal de la uretra la capa muscular de la vejiga forma el esfínter interno (Junqueira & Carneiro, 2005).

Las funciones principales de la vejiga son:

1. Almacenar la orina hasta que las condiciones sean adecuadas para la micción. Los cambios de tamaño de la vejiga dependen del urotelio, del tejido conectivo y de la capa muscular. En el tejido conectivo la presencia de colágeno y elastina permiten la distensibilidad. Conforme aumenta el contenido de la vejiga las fibras musculares y de colágeno se reorganizan, alargándose y colocándose en paralelo intentando disminuir su grosor y de esta forma la tensión.

2. Evitar la salida de la orina hasta que se dé la orden consciente de la misma. El esfínter del cuello de la vejiga es una condensación del músculo liso del detrusor, rica en la inervación simpática. El esfínter externo se compone de pequeñas fibras estriadas de contracción lenta. Tiene un tono constante y es el principal mecanismo de continencia.

3. Permitir y facilitar en el momento oportuno la evacuación y lograr una contracción sincrónica y equilibrada de todas las fibras. La micción es un proceso en el que toman parte la presión del detrusor y la presión abdominal por un lado, y la resistencia que opone la salida, cuello vesical y del esfínter uretral, por el otro. (Martínez Agulló et al., 2006).

c) Estructura de la uretra

La uretra tiene una longitud entre 2,5 y 4 centímetros en la mujer y de unos 20 centímetros en el hombre. Esta diferencia entre ambos sexos hace que la patología uretral en la mujer sea mucho menos frecuente que en el hombre.

La uretra masculina tiene distintas porciones que son uretra prostática donde abocan los conductos deferentes, uretra membranosa que contiene el esfínter uretral externo, y uretra anterior (bulbar y péndula) en el interior del cuerpo esponjoso del pene (Khünel, 2003).

La mucosa que recubre el interior de la uretra está formada por un epitelio transicional en su zona prostática, posteriormente es cilíndrico estratificado y cerca del meato urinario se transforma en epitelio plano estratificado (López-Sánchez et al., 2006).

La capa muscular presenta una capa profunda de fibras longitudinales y una superficial de fibras circulares. La uretra esponjosa o anterior carece de esta capa. A nivel de su porción distal existen pequeñas glándulas productoras de moco que la protegen de la orina.

1.3. Patología de la vía urinaria en la que se hace necesaria la sustitución de tejido. Técnicas empleadas hasta la actualidad

En el aparato urinario existen enfermedades que necesitan con frecuencia el reemplazo tisular (Figura 4). A lo largo de la historia los urólogos han utilizado una gran variedad de materiales para sustituirlo con multitud de técnicas quirúrgicas. Describiré las patologías más importantes y las técnicas utilizadas con más frecuencia.

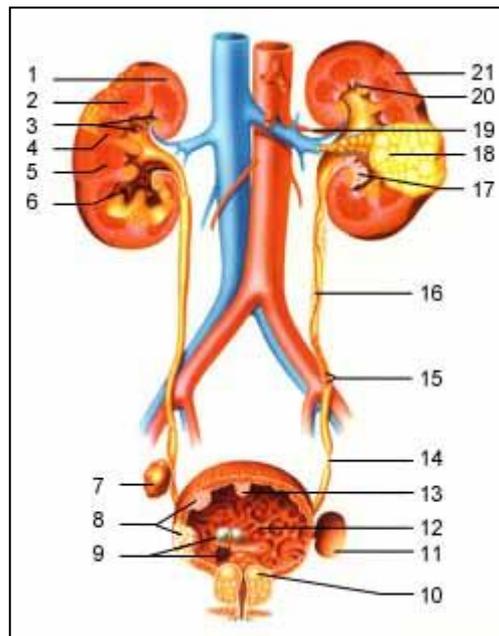


Figura 4. Esquema de patologías del aparato urinario.

1.3.1. Uréteres

Las malformaciones congénitas, las lesiones traumáticas (iatrogénicas principalmente), las litiasis, infecciones como la tuberculosis, o la patología tumoral urotelial de vías altas pueden afectar al uréter. Las alteraciones secundarias más frecuentes son la falta de distensión y la estenosis. Todas estas circunstancias pueden obligar a la utilizar distintos elementos y técnicas para su sustitución.

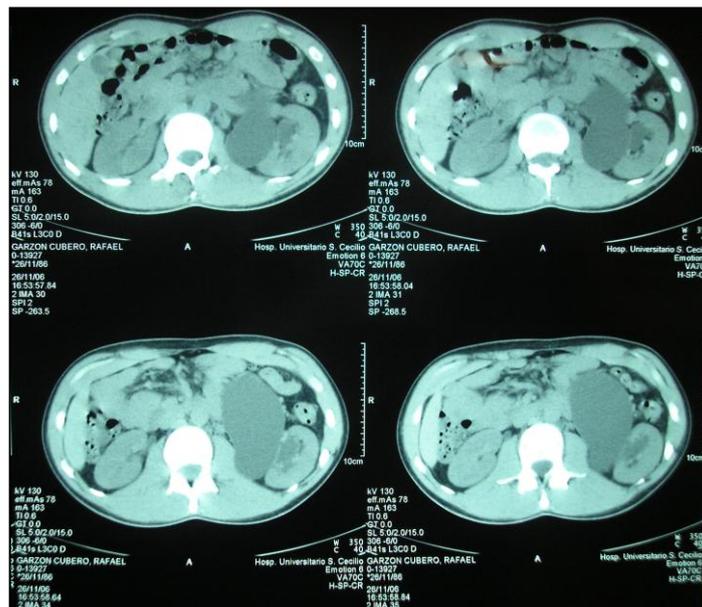


Imagen 1. Malformación congénita. Ureterocele izquierdo.

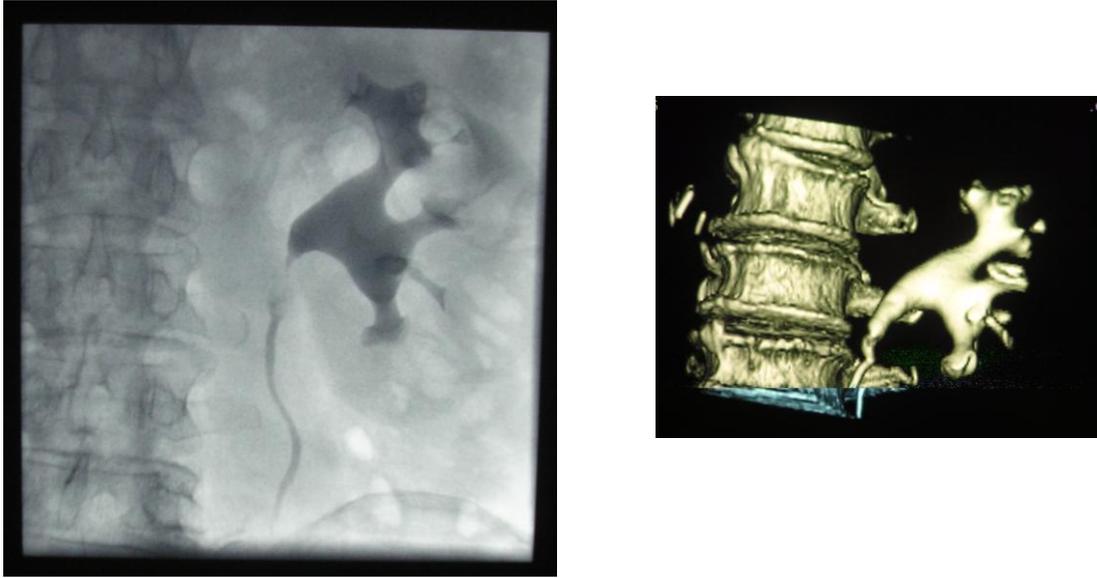


Imagen 2. *Tumor urotelial en la unión ureteropélica.*

En los defectos cortos se emplea en general la urétero-ureterostomía. En afectaciones extensas varía la técnica según la localización. Para las lesiones de uréter distal se puede emplear la ureteroneocistostomía o reimplantación directa en vejiga. La vejiga psoica, descrita por Turner-Warwick, y el colgajo de Boari se emplean en lesiones que afectan al uréter pélvico (Walsh, 2004).

La movilización caudal del riñón y el autotrasplante son algunas de las técnicas utilizadas cuando existe compromiso amplio del tercio proximal y medio del uréter.

Se ha observado que el apéndice o las trompas de Falopio son malos sustitutos del uréter y el íleon supone la primera alternativa (Figura 5). Se reserva para cuando no se han podido utilizar otras técnicas pues el tejido intestinal puede sufrir los efectos inflamatorios y carcinogénicos de la orina. La

contraindicación para la anastomosis urétero-ileal es la presencia de obstrucción urinaria baja, por el peligro de reflujo, y la patología intestinal. Monti (1997) describió una técnica que perfeccionaba los injertos mediante diversas tubulizaciones del segmento ileal.

Las complicaciones más frecuentes son la estenosis de la unión, alteraciones electrolíticas por la absorción intestinal o la producción de moco excesiva. (Rodríguez et al., 2005).

Los resultados funcionales contradictorios de las series publicadas son probablemente la causa del recelo de algunos urólogos a practicar sustituciones ureterales en caso de estenosis. En la actualidad están siendo desplazadas por el tratamiento endoscópico mediante dilataciones o ureterotomías internas con láser o tijera (Arrabal et al., 2006).

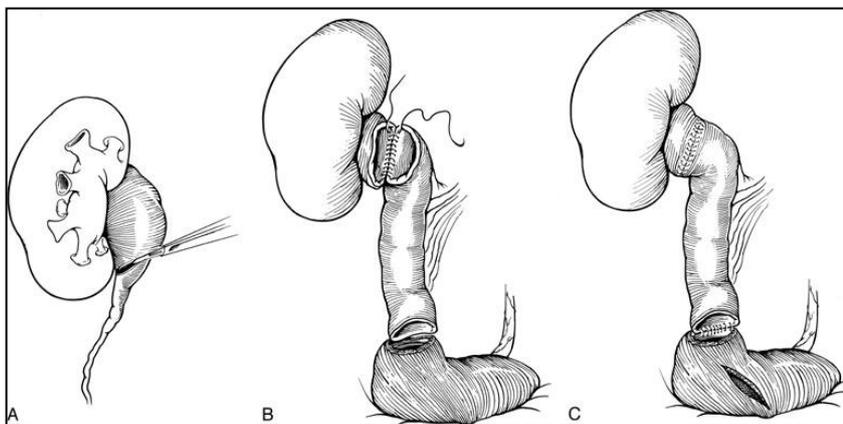


Figura 5. *Sustitución ureteral con íleon.*

1.3.2. Vejiga

a) Patología vesical en uropediatría

La patología vesical infantil que puede requerir de la ampliación o sustitución de este órgano está relacionada con una disfunción congénita que desencadena alteraciones en la capacidad de almacenamiento o de vaciado.

En casos de vejiga con una presión de llenado elevada como consecuencia de disfunción neurogénica, el tratamiento farmacológico o los cateterismos intermitentes pueden ser insuficientes y requerir una cistoplastia de ampliación (Adams & Joseph, 2004).



Imagen 3. *Vejiga neurógena de alta presión con reflujo bilateral.*

Para esta técnica se utilizan: segmentos de íleo, ciego, sigma y segmentos gástricos, principalmente, añadiendo o no el uso del apéndice como estoma (técnica de Mitrofanoff). El uso de fragmentos intestinales puede desencadenar episodios de obstrucción posquirúrgica, diarrea, alteraciones nutricionales según la zona reseca, alteraciones metabólicas por absorción de metabolitos del intestino trasplantado, infección o cálculos (Figura 6) (Adams y Joseph, 2004).

Los resultados de funcionamiento y contractilidad son desiguales pareciendo el íleon el tejido más efectivo si se conforma de manera circular (Studer & Zingg, 1997).

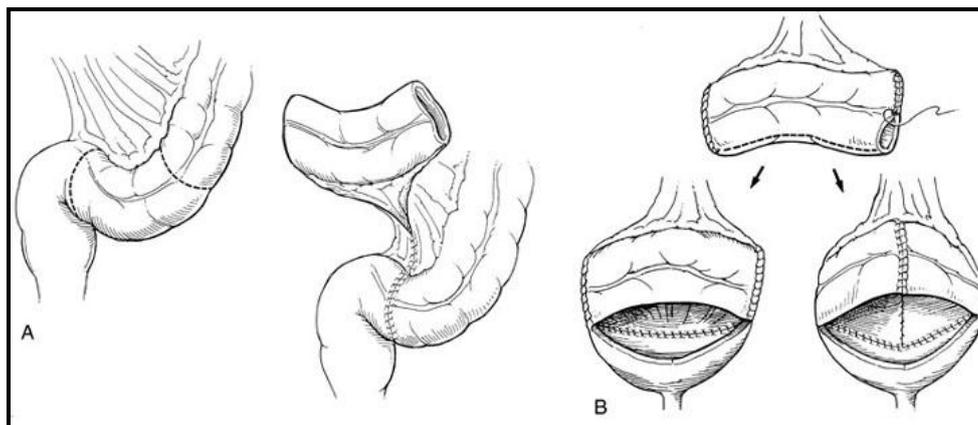


Figura 6. *Técnica de ampliación vesical utilizando una porción de sigma.*

Los primeros intentos de aumentar la vejiga mediante tejido autólogo datan de 1989 cuando Cartwright propone la técnica de autoampliación, liberar la mucosa de una zona de la vejiga del músculo detrusor y fijarla para que actúe como un divertículo y disminuya la presión intravesical. Sin embargo, su principal desventaja es el aumento limitado de la capacidad vesical por lo que

un volumen adecuado preoperatorio se hace imprescindible (Landa & Moorhead, 1994).

Una técnica que data de algunos estudios de 1955 y que se asemeja mucho a lo que actualmente conocemos como Ingeniería Tisular es la denominada enterocistoplastia seromuscular en la cual se inserta un fragmento de serosa de intestino sobre la vejiga abierta y se deja que el urotelio cubra el parche añadido. Su principal problema era la retracción del colgajo por lo que se suele combinar esta técnica con la autoampliación. También se intentó mantener la submucosa intestinal pero parece que favorece la formación de nueva mucosa intestinal. Los resultados a largo plazo no mejoran la enterocistoplastia tradicional (Walsh, 2004).

La cistoplastia se ha realizado en otras ocasiones con distintos materiales biodegradables ricos en colágenos con éxitos limitados.

b) Patología vesical en el adulto

En el caso del adulto la necesidad de exéresis y sustitución vesical suele derivar de un tratamiento radical secundario a patología tumoral o a secuelas de tipo fibroso tras radiación o infección (Figura 7).

La posibilidad del trasplante de vejiga de donante, al igual que se realiza con otros órganos (corazón o riñón), no resulta factible hasta el momento debido a la pérdida de inervación del órgano que ocurre durante su resección. Esto dejaría al nuevo órgano implantado sin capacidad contráctil ni sensación de distensión lo cual es fundamental para su función y para evitar complicaciones (insuficiencia renal, infecciones, litiasis...). Además presenta una vascularización compleja y un rico sistema inmunitario lo cual favorecería los rechazos.

Dentro de los reservorios utilizados para reemplazar la vejiga encontramos los continentes que requieren cateterismo. Para hacerlos se ha utilizado colon derecho o íleon, utilizando algunas técnicas el apéndice o la válvula ileocecal como mecanismo de válvula para la contención. El reservorio de Kock y el reservorio en T utilizan íleon, mientras que el tipo Mainz, Indiana o el de Penn y algunos otros utilizan colon y ciego. Todas estas técnicas abocan el reservorio a un estoma cutáneo por el que el paciente debe realizar cateterismos intermitentes a lo largo del día (Benson & Olsson, 2004).

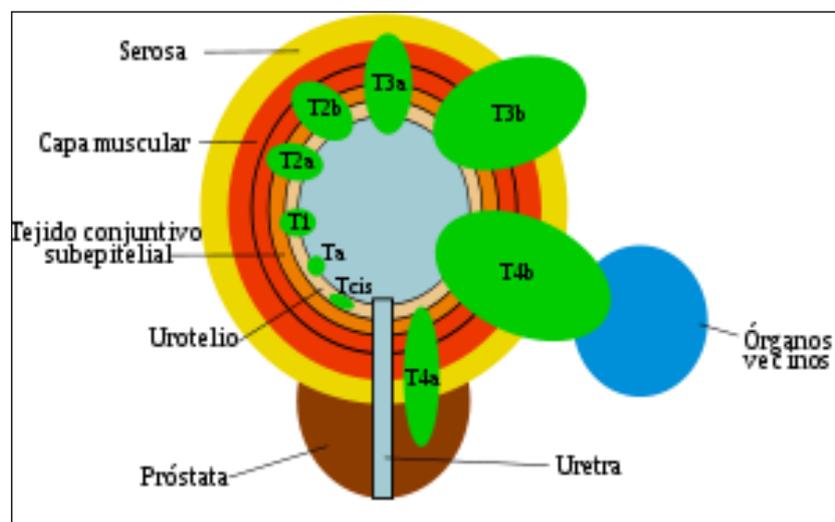


Figura 7. Estadía de cáncer de vejiga. El estadio 2 indica la cistectomía.

Sus inconvenientes principales derivan de la manipulación habitual que requieren lo que provoca infecciones y sangrado.

Otro tipo de derivaciones en las que también se utiliza intestino son las ortotópicas o neovejigas. Se mantienen continentes, pero requieren de vaciado periódico por parte del paciente. Los mecanismos de continencia deben ser

cuidadosamente respetados en la cirugía radical previa, y no están exentas de riesgo de recidiva tumoral en esa zona. La técnica tipo Studer utiliza un segmento ileal para la creación de la neovejiga (Studer et al., 1996).

Una de las técnicas de derivación más utilizadas actualmente por su seguridad y eficacia es la derivación en asa de “Bricker” en la que se anastomosan ambos uréteres a un asa de íleon previamente aislada, y ésta se aboca a piel. Es una derivación no continente y puede ser origen de infecciones, sangrados o cálculos (Figura 8).

En otras épocas se intentó suplir el tejido vesical con materiales biológicos: piel, peritoneo, dura, etc., y sintéticos: teflón, polivinilo, entre otros. El rechazo de las prótesis, las infecciones y la formación de litiasis obligó a descartarlos (Elbahanasy et al., 1998).

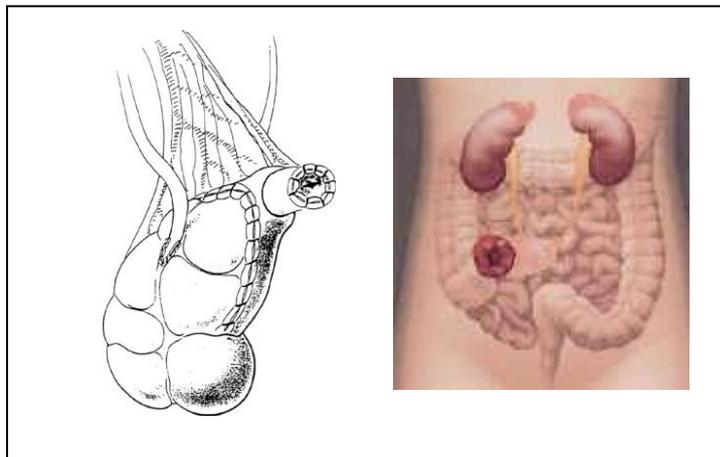


Figura 8. *Técnicas de sustitución vesical: reservorio de colon y asa de Bricker.*

1.3.3. Uretra

Las indicaciones de reconstrucción uretral responden a dos tipos de patologías: alteraciones en su morfología de tipo congénito (hipospadias y epispadias), y patologías adquiridas secundarias a traumatismos, iatrogenia o infecciones que desembocan en estenosis.

a) Patología congénita

Se denomina hipospadias a la mala implantación del meato uretral en la zona ventral del pene y se clasifican según la altura a la que aparezca el orificio (glande, pene, escroto). Suelen asociar prepucio redundante y curvatura peneana.

Para su corrección es necesario utilizar colgajos de tejido cercano e injertos de otros órganos en aquellos casos en los que la falta de tejido es abundante. Lo más frecuente es la utilización de un colgajo del tejido yuxtapuesto al meato, colgajos fascículo-cutáneos, que conservan su pedículo vascular propio (Figura 9). Esta neouretra también necesita ser cubierta por una segunda capa que puede ser del prepucio, del dartos subcutáneo, de la túnica vaginal escrotal o del cuerpo esponjoso (Snow et al., 1995).

Cuando la cantidad de material necesario para la formación de la neouretra es grande se utilizan injertos libres locales o extragenitales. Usualmente se utiliza la propia piel del prepucio, pero tiene la limitación de que es muy poca la cantidad de tejido disponible, así como otros problemas como la presencia de folículos pilosos. También se ha utilizado piel de localización extragenital. La mucosa vesical se usó en otra época presentando el inconveniente de la retracción (Retik & Borer, 2004).

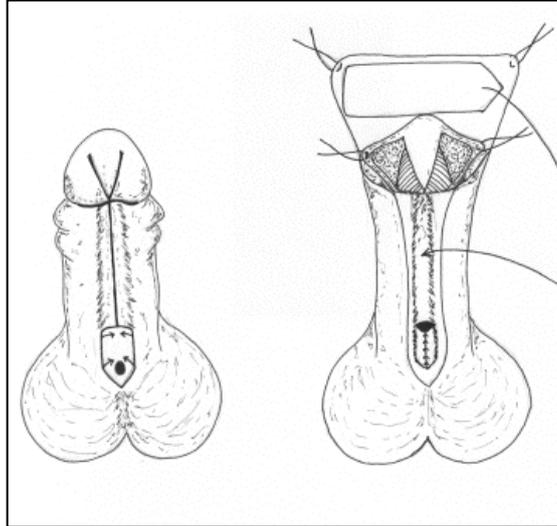


Figura 9. Corrección de hipospadias utilizando piel prepucial.

La mucosa bucal es también frecuentemente empleada en estas técnicas de sustitución uretral con el inconveniente de que requiere otra lesión añadida, en la cara interna labial o de la mejilla, que también limita el tamaño del injerto.

A este respecto Lauer et al. (2001) publica un trabajo en el que cultivó mucosa bucal a partir de una pequeña biopsia para aumentar su superficie y posteriormente implantarlo en casos de hipospadias severos con buenos resultados.

b) Patología uretral en el adulto

A la hora de sustituir tejido uretral estenótico del adulto se han utilizado 4 tipos de injertos: injerto cutáneo completo, injerto cutáneo de espesor dividido, epitelio vesical y mucosa bucal.

El mayor inconveniente de la transferencia tisular es la dificultad para que el tejido desplazado desarrolle una nueva irrigación. El injerto cutáneo de espesor completo es más resistente pero tiene más dificultades para su irrigación por mantener toda la dermis mientras que el dividido tiene buena predisposición a la vascularización pero es más frágil.



Imagen 4. *Estenosis de uretra posterior.*

Otra técnica es el llamado injerto en malla. Cuando el tejido a sustituir es extenso se toma un fragmento de piel amplia y se coloca en un primer tiempo sobre la zona a restaurar dejándose abierta un periodo largo, en un segundo tiempo se cierra y reconstruye.

También se han utilizado prótesis de dacrón, teflón, silicona, incluso aleaciones pero su falta de biocompatibilidad y complicaciones secundarias han provocado que dejen de utilizarse (Elkassaby et al., 2007).

Todas estas patologías han generado inquietudes en el mundo de la investigación, encaminadas a idear sustitutos totales o parciales de defectos, que se originan en distintos órganos urinarios, con la esperanza de poder constituir una alternativa a las distintas técnicas existentes, para reemplazar, agrandar o recubrir defectos congénitos, traumatismos o infecciones que ocurren en ellos. De ahí el amplio y apasionante campo donde trabaja la Ingeniería Tisular.

1.4. Ingeniería Tisular aplicada a la Urología

La Ingeniería Tisular ha encontrado en la Urología una especialidad donde poder desarrollar y completar muchos de sus objetivos. En el tratamiento de la patología de las vías urinarias se hace imprescindible encontrar una forma viable de sustituir un tejido especializado que resulta dañado o extirpado con frecuencia. Como hemos visto en el apartado anterior la importancia funcional de estas estructuras ha llevado a los científicos a buscar distintas formas de sustitución: trasplantes, colgajos, injertos de otros tejidos, segmentos de otros órganos y materiales sintéticos (Humes et al., 1999; Humes, 2002).

La Ingeniería Tisular en Urología plantea una buena alternativa al utilizar tejido del propio paciente, multiplicado mediante cultivos, que posteriormente se vuelve a implantar para sustituir las zonas lesionadas. En los últimos años se ha avanzado tanto a nivel experimental en el cultivo del urotelio como en la fase clínica pudiéndose aplicar en muchos pacientes (Chung et al., 2002; De Diego et al., 2004; Atala, 2009).

El aparato urinario tiene una estructura sencilla pero presenta una serie de características propias. Estas cualidades fundamentales para poder realizar su función como la elasticidad, contractilidad o resistencia, y otros componentes como la vascularización o inervación son difíciles de conseguir con un tejido artificial. En este apartado repasaremos la evolución de la Ingeniería Tisular dentro del campo de la Urología, su utilización actual y algunas aplicaciones futuras.

Las primeras investigaciones dentro de la Ingeniería Tisular en Urología se basaban en el cultivo de urotelio neoplásico, con la escasa aplicación clínica que esto aportaba.

En los años setenta y principios de los ochenta diversos autores intentan la obtención de urotelio no neoplásico aplicando diferentes técnicas pero presentando dificultades a nivel de la obtención de las células, de su expansión y de la contaminación de los cultivos. Reznikoff en 1983 y un año después Schmit perfeccionan la metodología de recolección de células uroteliales, mejoran los medios de cultivo y logran obtener monocapas de células uroteliales que pueden mantener y subcultivar.

Romagnoli et al. (1993) utilizan láminas de células uroteliales obtenidas mediante cultivo y las aplican clínicamente para la corrección de 10 casos de hipospadias. Es la primera ocasión en Urología en que se describe cómo una pequeña muestra de tejido tomado por biopsia es cultivado para la reconstrucción del tejido original. Utilizó una prótesis de goretex para tubularizarla y posteriormente realizar la uretroplastia.

Atala et al. (1993) definen la necesidad de formar pequeños islotes de tejido sobre un sustrato sintético adecuado para conseguir una mayor cantidad de tejido urotelial. En su trabajo describen el uso de polímeros biodegradables como vehículo para la creación de estructuras uroteliales a partir de células aisladas. Las células obtenidas de conejo se cultivaron in vitro sobre polímeros de ácido poliglicólico y posteriormente se implantaron en el animal. Se usaron polímeros sin células como control. Se sacrificaron los animales con distinto tiempo de evolución desde el implante y se analizaron al microscopio sus células observándose varias hileras de células identificadas como uroteliales.

En un trabajo posterior aplica este sistema de cultivo a urotelio de vejiga humana. Estos experimentos demostraron la capacidad de reproducción y viabilidad de las células uroteliales sobre una base sintética una vez implantada lo que podría permitir la sustitución de estructuras de gran tamaño (Atala, 2006).

En relación con las indicaciones de la Ingeniería Tisular en Urología describiré a continuación las que se aplican a los distintos órganos recubiertos por urotelio.

a) Uréter

Se ha intentado sustituir fragmentos de uréter en perro por matrices acelulares con resultados dispares, siendo la estenosis y la falta de contractilidad los problemas más frecuentes. (Osman et al., 2004).

Otros estudios han intentado trasplantar células uroteliales al uréter usando como vehículos matrices artificiales. Las células eran obtenidas de vejiga humana y se han llegado a cultivar junto con células de músculo liso comprobándose así la capacidad de cultivarse células de distinta especie al mismo tiempo. El cultivo se hizo sobre una matriz tubular facilitando así su implante en el organismo (Atala et al., 1992).

b) Vejiga

Se ha demostrado que se puede regenerar mucosa vesical a partir de submucosa intestinal o vesical tratadas para eliminar todas sus células. La técnica se basa en la sustitución de la pared con estructuras basadas en el colágeno como el SIS (Small Intestine Submucosa). Este biomaterial se obtiene de un pequeño fragmento de intestino que puede derivar de yeyuno o de segmentos ileales. Se consigue una malla acelular retirando de dicha porción la mucosa, la capa muscular y la serosa (Hafez et al., 2005; Feil et al., 2006).

La otra técnica de sustitución es el uso de matrices acelulares de vejiga, BAM (Bladder Acellular Matrix), que se obtiene retirando las células de forma mecánica o química. Si se utilizan en gran cantidad dan complicaciones como fibrosis o inflamación irritativa. (Kropp et al, 2004).

Distintos experimentos han demostrado la regeneración vesical a partir de estos preparados (Falke & Atala, 2000). Se ha observado también que el nuevo tejido presenta en la biopsia todas las capas (mucosa, muscular y serosa) de la vejiga. La única limitación de su uso es la cantidad que se puede sustituir, pero se ha comprobado cómo el uso de mallas con células uroteliales cultivadas permite aumentar la superficie regenerada hasta en un 100%, mientras que las mallas acelulares nos permiten un 30%. Posiblemente esto se deba a una menor reabsorción de los materiales cubiertos por células. (Yoo et al., 1998).

Schultheiss et al. (2005) utilizaron el modelo porcino para evaluar la regeneración vesical a partir de una matriz obtenida de intestino y sometida a procesos de descelularización; posteriormente se implantó en vejiga manteniendo su vascularización original y se observó como fue repoblada por células uroteliales que aprovechaban dicha nutrición.

También se ha logrado sustituir parcialmente la vejiga por tejido cultivado mediante técnicas de Ingeniería Tisular con células uroteliales y músculo liso. Se han llegado a sustituir vejigas completas cultivadas sobre matrices de polímeros biodegradables en perros. Estas neovejigas a los 11 meses presentaban una distensión y contractilidad normales, además de una histología vesical completa (Oberpenning et al., 1999).

La Urología Pediátrica tiene puestas numerosas esperanzas en la Ingeniería Tisular como tratamiento de las vejigas neurógenas. Atala et al. (2006) publican la primera serie de pacientes tratados con tejidos vesicales obtenidos mediante ingeniería. Estos tejidos se usaron para la realización de cistoplastias de aumento en 7 pacientes con mielomeningocele y vejigas neurógenas de alta

presión. En la intervención se unió la vejiga nativa con una porción de vejiga artificial similar a una cúpula formada por una matriz de colágeno y células de los propios pacientes expandidas mediante cultivo. Las evaluaciones posteriores de capacidad y contractilidad reflejaron buenos resultados. Sin embargo este ensayo clínico, el más importante en la aplicación terapéutica de la Ingeniería Tisular en Urología, no ha podido repetirse hasta la fecha (Stanasel et al., 2010).

Actualmente se investiga también la posibilidad de una neovejiga autóloga para el tratamiento de otras patologías de origen neurológico (Hotges & Atala, 2008; Roth & Kropp, 2009).

Dentro de la patología vesical podemos incluir el reflujo vésico-ureteral, paso de orina desde la vejiga hacia el uréter. Hasta la actualidad se han obtenido buenos resultados con el tratamiento mediante cirugía de reimplantación y el tratamiento endoscópico con inyecciones submeatales de sustancias como el deflux o el macroplástico.

Se ha investigado el uso de suspensiones de condrocitos para dicha inyección endoscópica obteniendo el material autólogo del pabellón auricular con anestesia local. El material implantado no demostró reacción inflamatoria circundante, migración o pérdida de volumen (Kershen & Atala, 1999). Se están desarrollando procedimientos similares para el tratamiento de la incontinencia, inyectando condrocitos que aumenten la resistencia de salida al flujo miccional (Koh & Atala, 2004).



Imagen 5. *Reflujo vésicoureteral izquierdo.*

c) Uretra

El uso de injertos externos al propio organismo para sustituir uretra evita alargar la cirugía pues no se realiza el paso de obtención de tejido de mucosa bucal o colgajo de prepucio. Atala (1999) utilizó matriz acelular de colágeno procedente de vejiga de cadáver para corregir defectos congénitos de uretra con buenos resultados.

El-Kassaby et al. (2003) tomaron una matriz de colágeno de submucosa vesical para la sustitución uretral en 26 pacientes. La matriz se obtuvo de vejiga de cadáver y se anastomosó a la zona de uretra sana. El estudio cistoscópico

posterior demostró un buen calibre y el análisis microscópico reveló un epitelio uretral normal que había recubierto por completo la matriz. También se han utilizado cultivos de epitelio uretral autólogo in vitro para su posterior reimplantación (Romagnoli et al., 1993).

En un reciente estudio en niños con hipospadias severo se estadifica la corrección en tres pasos: toma de células uroteliales mediante lavado vesical, cultivo y expansión en laboratorio y trasplante al paciente como colgajo ventral. Los resultados en flujometría y estética fueron comparables a otras técnicas que utilizan tejido local para la reparación (Fossum & Nordenskjöld, 2010).

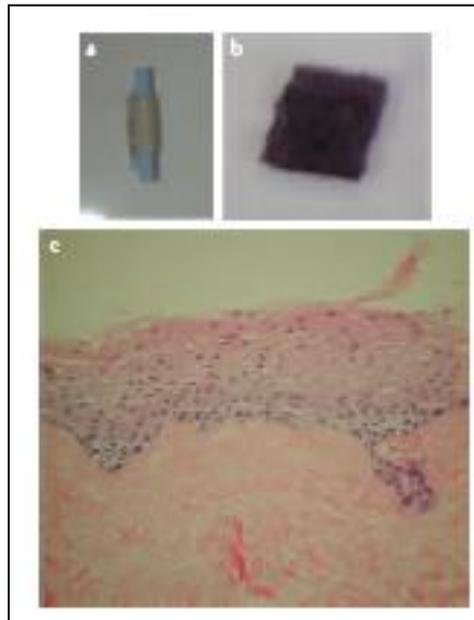


Imagen 6. *Mucosa bucal obtenida mediante IT y tubulizada para sustituir uretra. (Bhargava et al., 2004)*

2. Objetivos

- —————
- —————

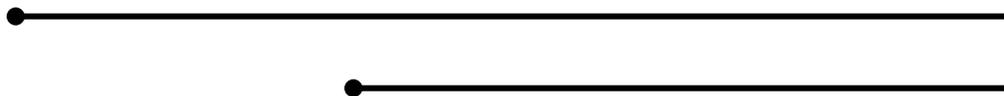
2.1. Objetivo general

Elaboración de un sustituto artificial de la pared vesical generado en el laboratorio mediante Ingeniería Tisular a partir de muestras de mucosa vesical humana.

2.2. Objetivos específicos

1. Establecer y optimizar las condiciones de laboratorio para el cultivo de células epiteliales y estromales de la pared vesical humana.
2. Desarrollar en el laboratorio un modelo de mucosa vesical humana basado en biomateriales de fibrina humana y agarosa al 0,1% con células estromales sobre el que se puedan cultivar células epiteliales.
3. Analizar histológicamente mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión el sustituto de mucosa vesical desarrollado mediante Ingeniería Tisular.
4. Evaluar el modelo de mucosa vesical desarrollado mediante Ingeniería Tisular mediante la expresión inmunohistoquímica de marcadores epiteliales.

3. Material y métodos



3.1. Obtención de muestras de origen humano utilizadas en este estudio

Para nuestro estudio de la construcción de mucosa urotelial artificial hemos utilizado un total de 25 biopsias de pared vesical humana (16), uréter (4) y pelvis renal (5) procedentes de pacientes sometidos a intervenciones de cirugía abierta no relacionadas con tumores uroteliales. En su mayoría cirugía de la hiperplasia benigna de próstata (adenomectomías), pielolitomías, y cirugía renal por carcinomas de células claras que requirieron nefrectomía. En ningún caso se alteró la técnica habitual para dicha toma siguiendo los pasos habituales para cada intervención.

Del total de muestras 5 fueron fijadas e incluidas en parafina para su uso como control histológico de mucosa vesical humana normal y el grupo restante (20) fue usado para el aislamiento de fibroblastos y células epiteliales.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les solicitó previamente consentimiento informado para el uso de los tejidos donados, una vez que éstos habían sido informados del procedimiento.

La muestra se tomó mediante corte frío de la mucosa vesical en el caso de la cirugía abierta de vejiga y de pared completa en el caso de uréteres y pelvis renal. El tamaño medio de las mismas fue de 15x5 mm (Figura 10).

Todos los pacientes fueron varones de entre 44 y 72 años, (media de 61 años). Se excluyeron del estudio previamente a aquellos pacientes con patología tumoral urotelial, litiasis vesical o piélica y aquellos con sospecha de infección bacteriana del tracto urinario.

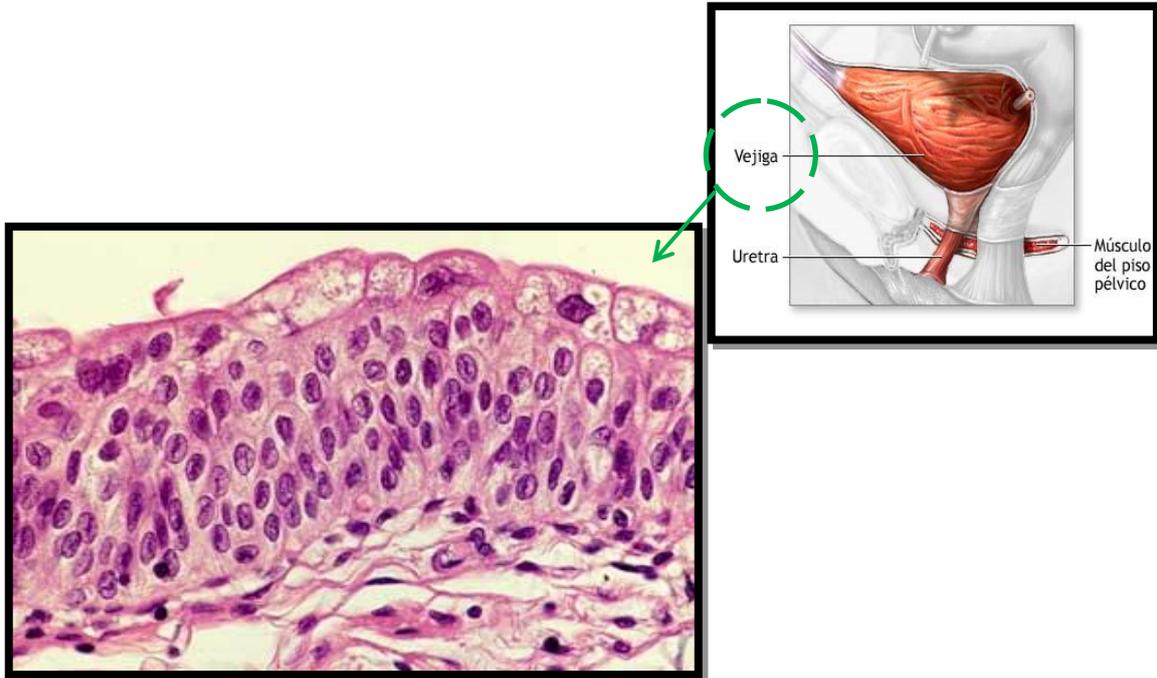


Figura 10. Toma de muestra de mucosa vesical. Imagen control de urotelio.

Inmediatamente tras la toma todas las muestras se introdujeron en un medio de transporte estéril constituido por medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich Ref.D5796, Saint- Quintin-Favallier, Francia), suplementado con antibióticos: 500 U/ml de penicilina G, 500 de estreptomina, y antifúngicos: 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de afontericina B para evitar una posible contaminación de la muestra, y se mantuvieron a 4°C.

Todas se procesaron en las primeras 24 horas tras la extracción.

3.2. Cultivos primarios de células epiteliales

A la llegada al laboratorio las muestras utilizadas para cultivo fueron lavadas al menos dos veces con solución tamponada estéril PBS (phosphate buffered saline) con penicilina, estreptomycin y anfotericina B (500 U/ml, 500 µg/ml y 1,25 µg/ml respectivamente). En algunas ocasiones requirieron de más lavados hasta liberarlas de restos de grasa o hemáticos.

Tras la preparación los tejidos se introdujeron en 5 ml de una solución de tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 15 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas al estroma.

Una vez que las células epiteliales se desprenden del tejido conectivo, se procede a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 10 ml de medio de cultivo MF (medio de fibroblastos del que posteriormente comentaremos su composición). La presencia de abundantes proteínas séricas en dicho medio de cultivo es capaz de inactivar la acción proteolítica de la tripsina.

Con posterioridad, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en 5 ml de medio QC (medio de cultivo de queratinocitos) y estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² de superficie (Figura 11).

Para el cultivo de células epiteliales uroteliales se empleó medio de cultivo selectivo QC, el cual favorece preferentemente el crecimiento de las células epiteliales.

La composición del medio QC fue la siguiente:

1. Medio de cultivo de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con Lglutamina (Sigma-Aldrich ref. D5796, Steinhem, Alemania).
2. Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinhem, Alemania).
3. Adenina (24 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. A9795).
4. Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomycin y 0.25 µg/ml de anfotericina B).
5. Factores de crecimiento para células en cultivo:
 - Insulina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. I2767).
 - Triiodotironina (1.3 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. T5516).
 - Toxina colérica (8 ng/ml) (Sigma-Aldrich Ref. C3012).
 - Hidrocortisona (0.4 µg/ml) (Sigma-Aldrich Ref. H0888).

Las células fueron incubadas a 37°C y 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

La muestra restante es nuevamente introducida en tripsina (tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l, Sigma Aldrich Ref. T4799) durante 15 minutos a 37°C repitiéndose el proceso anterior y realizándose un nuevo ciclo posteriormente.

En total la muestra se somete a tres procesos de tripsinización con lo que la liberación de las células epiteliales se puede valorar a los 15, 30 y 45 minutos.

3.3. Cultivo primario de células estromales

El tejido conectivo que permanece tras la liberación enzimática de las células epiteliales con tripsina, compuesto por células estromales, es incubado a 37°C en una solución estéril de colagenasa tipo I de *Clostridium hystoliticum* (Gibco BRL Life Technologies Ref. 17100-017, Karlsruhe, Alemania) al 2% en medio de cultivo DMEM durante 10-12 horas.

De esta manera se logra realizar la digestión de la matriz extracelular del corion de la mucosa vesical y conseguir así la separación de los fibroblastos estromales incluidos en dicha matriz.

Los fibroblastos liberados se recogen mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos de la solución de digestión que contenía las células estromales disgregadas del corion, tomándose el pellet celular correspondiente en frascos de cultivo de 15 ml (Figura 11).

Como medio de cultivo para las células del estroma, se utilizó DMEM enriquecido en glucosa (Sigma-Aldrich Ref. 5796) suplementado con antibióticos y antimicóticos (100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B; Sigma-Aldrich Ref. A5955) y suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich Ref. F9665) al 10%. A este medio básico de cultivo lo denominamos MF (medio de fibroblastos).

La incubación se realizó con una temperatura constante de 37°C y concentración de CO₂ al 5% renovándose los medios cada 3 días.

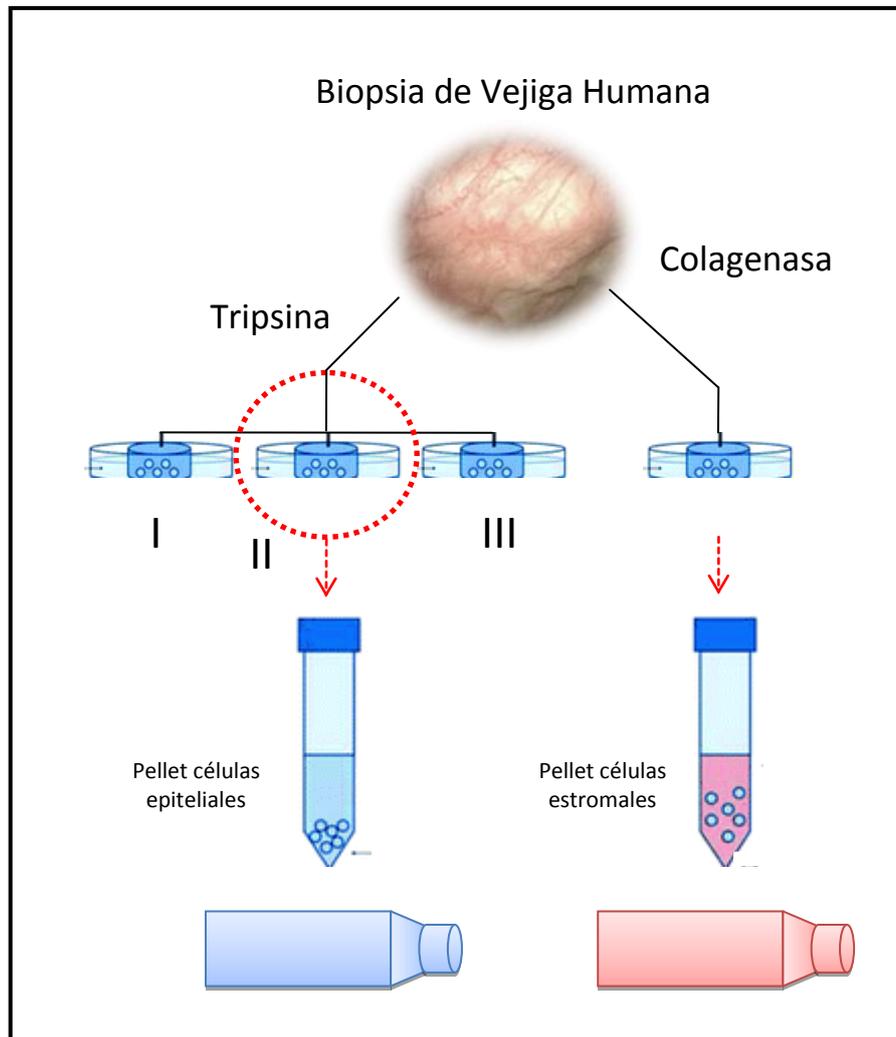


Figura 11. Esquema representativo del proceso de obtención, transporte y procesamiento de las muestras de mucosa vesical humana. Los valores I, II y III corresponden a 15, 30 y 45 minutos de tripsinización respectivamente.

3.4. Subcultivo de las células procedentes de cultivos primarios de mucosa vesical

Una vez alcanzada la confluencia celular, es decir, cuando las células tanto epiteliales como estromales cubrían por completo la superficie de los frascos de cultivo poniendo en peligro su viabilidad, los distintos cultivos celulares se lavaron con PBS estéril y se incubaron en 1 ml de una solución de tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma Aldrich Ref. T4799) a 37°C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo.

Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 2 ml de medio de cultivo MF, o QC. La acción proteolítica de la tripsina es inactivada por las abundantes proteínas séricas presentes en estos medios de cultivo.

Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas, se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para obtener un botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina.

El *pellet* celular se resuspendió en 5 ml de medio MF o QC, según el origen de las células, estromales y epiteliales respectivamente, y estas células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm² de superficie.

3.5. Desarrollo de sustitutos del corion de la mucosa: formación del estroma artificial

La conformación tridimensional de un tejido conjuntivo obtenido en laboratorio a partir de una proliferación celular en cultivo monocapa se logró mediante un gel de agarosa al 0,1% y fibrina, sobre el que pueden dividirse los fibroblastos.

La fibrina se obtiene de plasma humano congelado de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería, España) siguiendo las recomendaciones de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT).

La fabricación de sustitutos estromales de fibrina con fibroblastos de mucosa vesical se llevó a cabo utilizando una modificación de la técnica previamente descrita por Meana y colaboradores (Llames et al., 2004; Meana et al., 1998) que ya había resultado efectiva para otros tejidos como la mucosa oral y la córnea (Garzón et al., 2009; Alaminos et al., 2006).

Se utilizaron células procedentes de los cultivos primarios de fibroblastos, resuspendidos en 2 ml de medio de cultivo DMEM, a los cuales se añadieron unos 5 ml de plasma sanguíneo humano (equivalente a 10-12 mg de fibrinógeno) y 14 ml de suero salino al 0,9%. Para evitar la fibrinólisis de los geles de fibrina, se añadieron 200 μ l de ácido tranexámico (Amchafibrín®, Fides Ecofarma, Valencia, España).

Simultáneamente, se empleó agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich Ref. A9045). La agarosa sólida al 2% (p/v) se disuelve en PBS, calentando la mezcla hasta ebullición para favorecer la disolución de la agarosa. Esta solución de agarosa al 2% en PBS se esterilizó a 120°C y 2 atmósferas de presión mediante autoclavado.

Para la fabricación de sustitutos estromales, se incubaron al baño María unos 2 ml del gel de agarosa al 2% hasta alcanzar el punto de fusión, en ese momento fue agregada a la mezcla de fibrina y células estromales cultivadas, hasta obtener una concentración final de 0,1%. Finalmente, la reacción de coagulación de la fibrina se precipitó mediante la adición inmediata de 1 ml de Cl_2Ca 0,025 mM a la mezcla, esta mezcla, aún líquida se alicuotó en recipientes estériles de cultivo celular y se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Los geles alicuotados se dejaron en el incubador a 37°C con un 5% de CO_2 , durante 2 horas para que coagularan y secaran. Después de este tiempo se cubrieron con 10 ml de medio de cultivo MF (Figura 12).

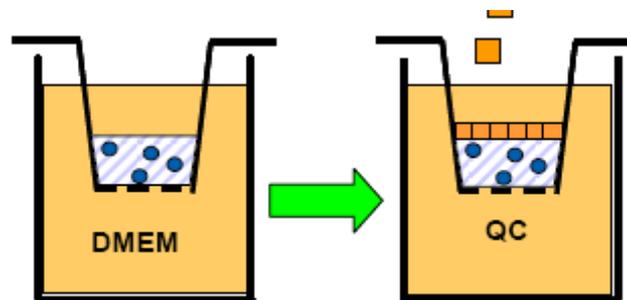


Figura 12. Esquema de cultivo del sustituto estromal. Medios de cultivo utilizados en cada paso: primero para el estroma y posteriormente al sembrar el epitelio. La técnica utilizada fue la inmersión completa del constructo en medio sin exponer el epitelio al aire.

3.6. Obtención de constructos de mucosa vesical artificial

Los constructos de mucosa vesical se consiguieron a partir de los cultivos descritos previamente y de la conformación del gel estromal de fibroblastos en fibrina-agarosa.

Para la construcción de mucosa vesical artificial mediante Ingeniería Tisular, una vez fabricado el sustituto estromal (fibroblastos embebidos en geles de fibrina y agarosa) se espera su solidificación 24 horas más tarde. Los cultivos primarios de epitelio de la mucosa vesical se tripsinizan y se cultivan las células epiteliales individualizadas sobre las superficie de los sustitutos estromales inmersas en medio QC (Figura 13).

En el proceso buscamos unas condiciones similares a las que el epitelio encuentra en estado natural para garantizar una correcta diferenciación y proliferación. Las células se cultivaron sobre el estroma inmersas en líquido durante todo el tiempo del cultivo sin utilizar la técnica de interfase aire-líquido, que mantiene el epitelio al aire durante algunas fases del proceso (Reichl y Müller-Goymann, 2003) (Figura 12).

Los constructos de mucosa vesical se elaboraron en sistemas de cultivo Transwell® con membranas porosas de 0.4 μm (Costar, Corning Inc., Corning, Nueva York, EEUU). Estos sistemas de cultivo están compuestos por una placa estéril de 6 pocillos en el interior de los cuales se aloja una pieza de plástico móvil cuya base está formada por una membrana porosa y permeable de nylon o policarbonato. El tamaño de estos poros permite a los nutrientes pasar a través de la membrana de la placa pero evita la migración de las células de un compartimento a otro.

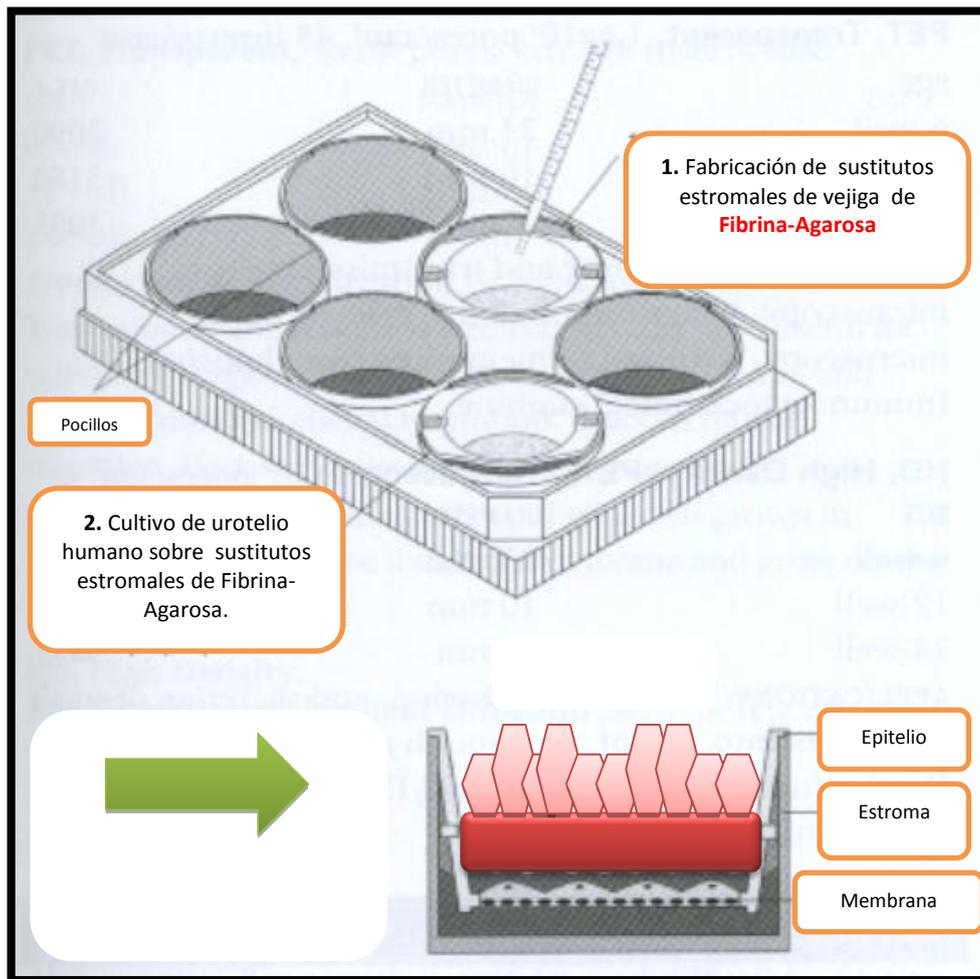


Figura 13. Esquema del proceso de elaboración de mucosa artificial.

3.7. Evaluación microscópica de la mucosa vesical artificial

3.7.1. Microscopía óptica

Para el análisis de los tejidos mediante microscopía óptica, tanto las muestras control como los diferentes tejidos artificiales se fijaron en formaldehído al 4% tamponado y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%). Tras esto, el etanol se substituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4 μm de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico.

3.7.2. Microscopía electrónica de transmisión

Para el estudio de los tejidos mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se fijaron en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,2) a 4°C durante 4-6 horas, lavándose a continuación dos veces en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,2) a 4°C. Tras esto se siguió el siguiente protocolo:

Fijar en OsO_4 1% (en agua), conteniendo ferricianuro potásico 1%, 60 min, 0-4°C en oscuridad. Lavar en agua destilada.

Ácido tánico 0,15% en tampón 1 minuto a temperatura ambiente. Tampón y agua destilada posterior.

Acetato de uranilo 2,0% en agua bidestilada 120 minutos en oscuridad. Lavar en agua bidestilada.

Deshidratar en etanol (50, 75, 90, 95 y 3x100)%, 5 minutos, en cada paso, 0-4°C.

Infiltrar en Epon: etanol 3 x 60 minutos y finalmente infiltrar en Epon completo 48 horas a 60°C.

Los cortes se obtuvieron a través de un ultramicrotomo Reichter Ultracut.

Cortes control para microscopía óptica.

Para la obtención de cortes control o semifinos se realizaron en un ultramicrotomo cortes de entre 0,5 y 1 micra de espesor. Dichos cortes fueron teñidos utilizando la técnica del azul de toluidina alcalino. Dicho colorante fue fabricado disolviendo 0,5 gr de azul de toluidina en 100 mL de agua destilada a la que se añadió borato sódico al 1%.

Una vez seco el corte semifino, se le añaden unas gotas de esta solución colorante colocando el porta sobre una placa caliente hasta que comience a emitir vapores sin llegar a la ebullición. Una vez teñido el corte puede ser deshidratado, aclarado y montado en bálsamo (García, 1993). Para su observación se utilizó el microscopio Nikon Eclipse 90i.

Cortes para microscopía electrónica de transmisión.

Para el estudio microscópico de transmisión se realizaron secciones ultrafinas (500-700 micras), las cuales fueron montadas en rejillas de cobre y contrastadas con acetato de uranilo y citrato de plomo. La observación se realizó con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM902 (Oberkochem, Alemania).

3.7.3. Inmunohistoquímica

La detección de proteínas específicas de las principales citoqueratinas (CKs), involucrin y filagrina humanas se realizó utilizando secciones transversales de 4 micras de espesor de los diferentes tejidos incluidos en parafina (controles de mucosa vesical normal y muestras de mucosa vesical artificial obtenidas mediante Ingeniería Tisular).

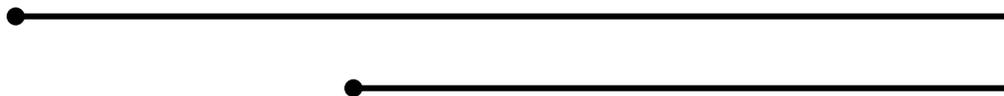
La inmunofluorescencia se llevó a cabo de la siguiente manera: Las muestras tisulares seccionadas y depositadas en cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina se desparafinaron en xileno, se lavaron en alcohol y se rehidrataron con agua. Posteriormente, se preincubaron durante 20 minutos en una solución de albúmina sérica bovina al 2% con un 10% de suero de caballo en PBS, utilizándose posteriormente esta misma solución para diluir los diferentes anticuerpos primarios, incubándose las muestras durante 2 horas a 37°C con estos anticuerpos. Las diluciones utilizadas para los anticuerpos primarios se muestran en la tabla 2.

Con posterioridad, se lavaron las muestras en PBS y se aplicó durante 1 hora un anticuerpo secundario anti-anticuerpo de ratón o anti-anticuerpo de conejo marcado con un pigmento fluorescente (FITC o Cy3), lavándose después con PBS. Tras contrateñir los núcleos con DAPI, se cubrieron las muestras con cubreobjetos de vidrio y se analizaron las mismas en un microscopio fluorescente Nikon Eclipse 90i. La evaluación de los resultados se realizó determinando la presencia e intensidad de señales positivas.

Anticuerpos primarios	Dilución	Laboratorio comercial	Referencia
Anti-Pancitoqueratina	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain	001607QD
Anti-CK4	1:1000	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	C5176
Anti-CK7	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain	001004QD
Anti-CK8	Prediluido	Master diagnostica, Granada, Spain	005095QD
Anti-CK13	1:400	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	C0791
Anti-involucrininas	1:500	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA	I9018
Anti-filagrininas	1:50	ABCam	SPM181

Tabla 2. *Anticuerpos primarios usados en este trabajo y la dilución correspondiente para los ensayos de inmunofluorescencia. Laboratorio comercial y referencia para cada anticuerpo.*

4. Resultados



4.1. Cultivos primarios de células procedentes de la mucosa del aparato urinario

4.1.1. Cultivo de células epiteliales

La disgregación enzimática de las muestras de mucosa para la liberación de las células epiteliales por ruptura de las uniones intercelulares fue efectiva en las muestras de biopsias que se procesaron. La proteasa utilizada (tripsina) permitió obtener abundantes células en todos los casos. En nuestro estudio utilizamos la inmersión en tripsina en 3 tiempos con lavado y neutralización entre cada uno de ellos. De esta forma el primer grupo de células se liberó a los 15 minutos con tripsina, el segundo a los 30 y el tercero a los 45 minutos.

Estas células se observaron al microscopio óptico como elementos esféricos de pequeño tamaño (alrededor de 2 μm de diámetro) que permanecían en suspensión en el medio de cultivo las primeras horas posteriores a su aislamiento.

El mayor número de células liberadas se obtuvieron en el segundo pase de tripsinización así como la mayoría de los cultivos de células epiteliales viables partieron de este grupo. El uso de esta enzima está limitado por el tiempo ya que un contacto excesivo de las células con esta sustancia afecta directamente a su supervivencia, mientras que si utilizamos poco tiempo de contacto con la muestra no obtenemos suficiente número de células aisladas para cultivar.

El crecimiento de las células uroteliales resultó más lento que el de los fibroblastos o el de células epiteliales de otras estirpes. La adhesión a la superficie de los frascos de cultivo se apreció a las 12-14 horas, las primeras divisiones a los 2-3 días y la expansión celular entre el 7^o-10^o día.

Estas células se caracterizan por un tamaño pequeño y un aspecto redondeado con pequeñas espículas a modo de prolongaciones que posteriormente contactan con otras células formando pequeñas colonias. La confluencia total de las células cubriendo toda la superficie cultivada no se logró en todas las muestras y en aquellas que sí completaron la proliferación se tardó entre 21 y 28 días.

Generalmente no esperamos a la confluencia para realizar los subcultivos o utilizarlas para la construcción de la mucosa vesical artificial. Una vez comprobada una correcta proliferación de las células y una superficie amplia celular se procedía a la tripsinización del cultivo para liberar las células y poder utilizarlas. De media logramos realizar entre 2 y 3 pases de cultivo con éxito.

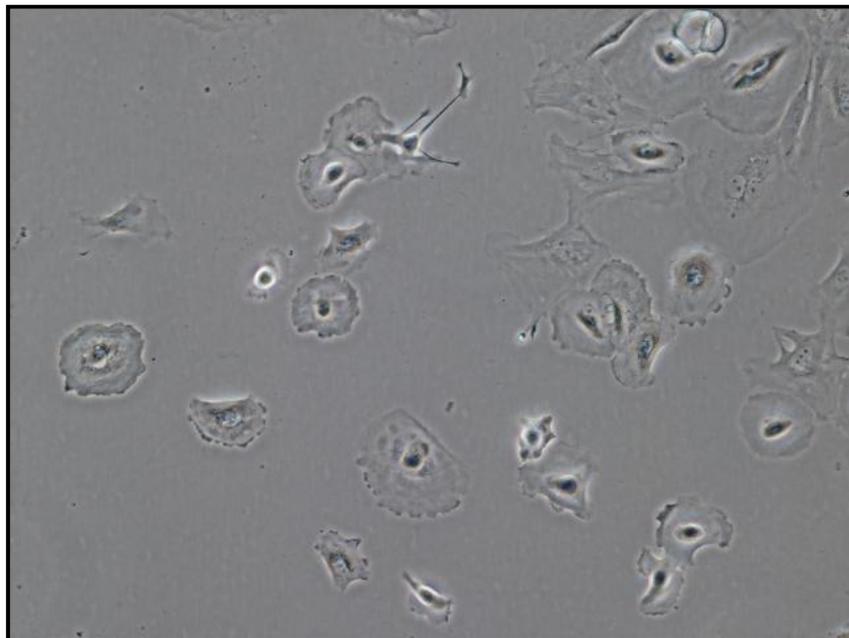


Imagen 7. *Células epiteliales de aparato urinario.*

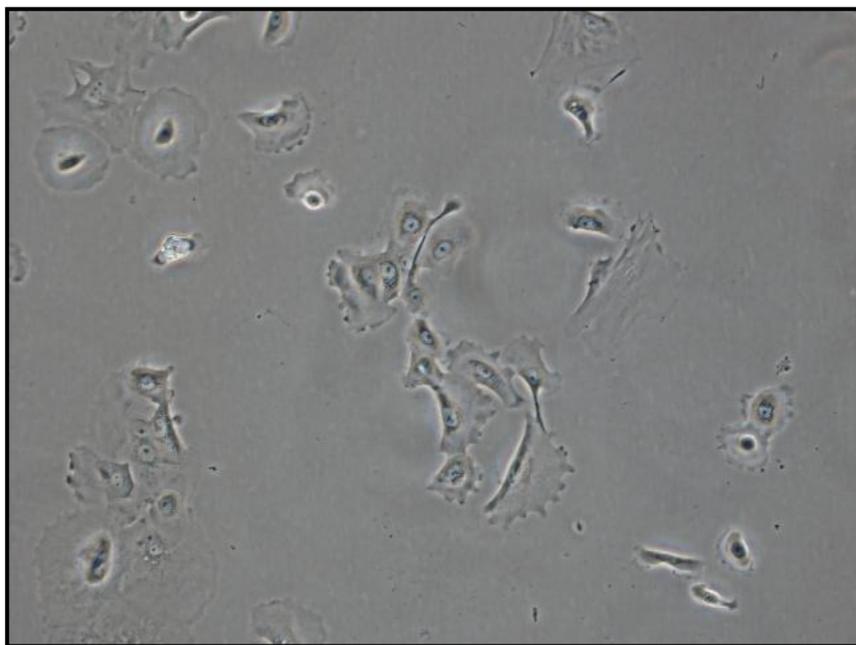


Imagen 8. *Acúmulos de células uroteliales con prolongaciones.*

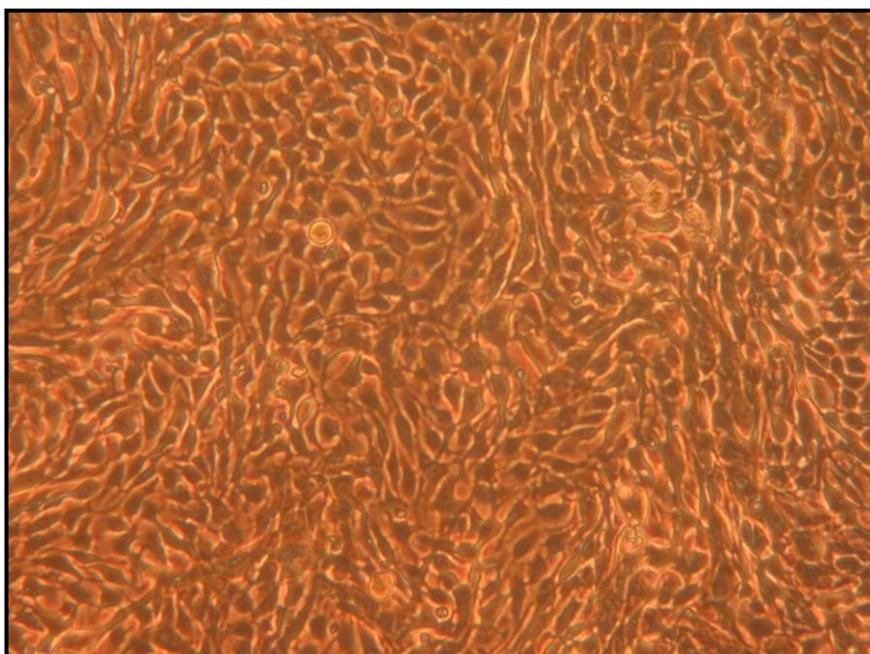


Imagen 9. *Crecimiento epitelial confluyente.*

4.1.2. Cultivo de fibroblastos

La colagenasa que se utilizó para la disgregación del estroma, resto de muestra de mucosa liberada de epitelio, fue también efectiva obteniéndose gran cantidad de células, fibroblastos, de cada una de las biopsias.

Estas células demostraron una gran capacidad de adhesión y proliferación en laboratorio. A las 24 horas aproximadamente se observó una buena fijación de las células al fondo del frasco de cultivo comenzando a emitir pequeñas prolongaciones a modo de pseudópodos en busca del contacto con otras células similares como estímulo para la proliferación.

Entre 48 y 72 horas es lo que tardan los fibroblastos en configurar una trama de células que toman aspecto alargado y a partir del 5º día se observan zonas confluentes de células fusiformes que se alinean hasta cubrir toda la superficie de cultivo entre el 5º y el 7º día.

Respecto a los subcultivos y número de pases realizados mediante tripsinización rápida del cultivo los fibroblastos demostraron una gran capacidad proliferativa manteniendo su viabilidad y formación de nuevos cultivos hasta el 6º-7º pase.

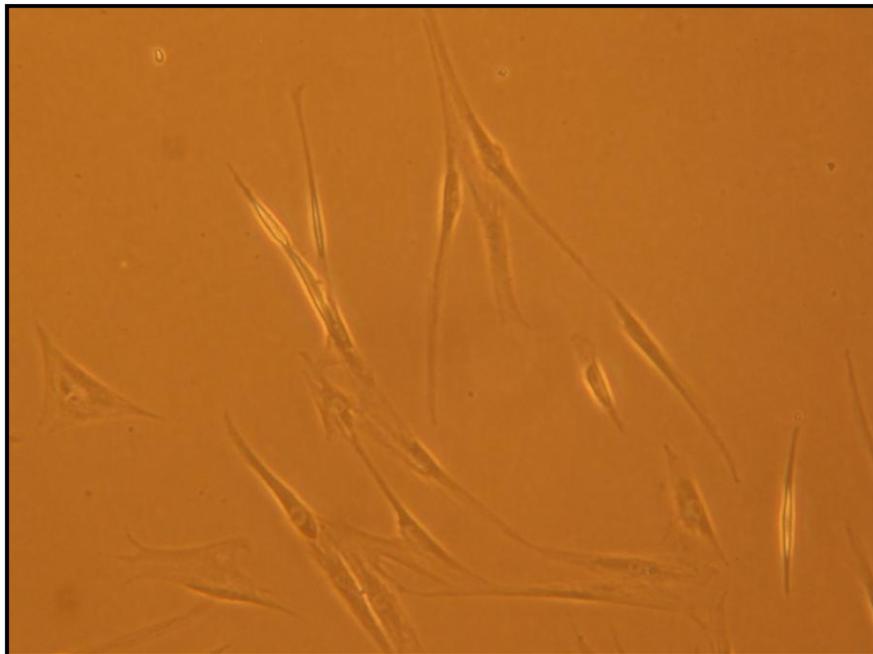


Imagen 10. *Cultivo de fibroblastos a las 24 horas.*

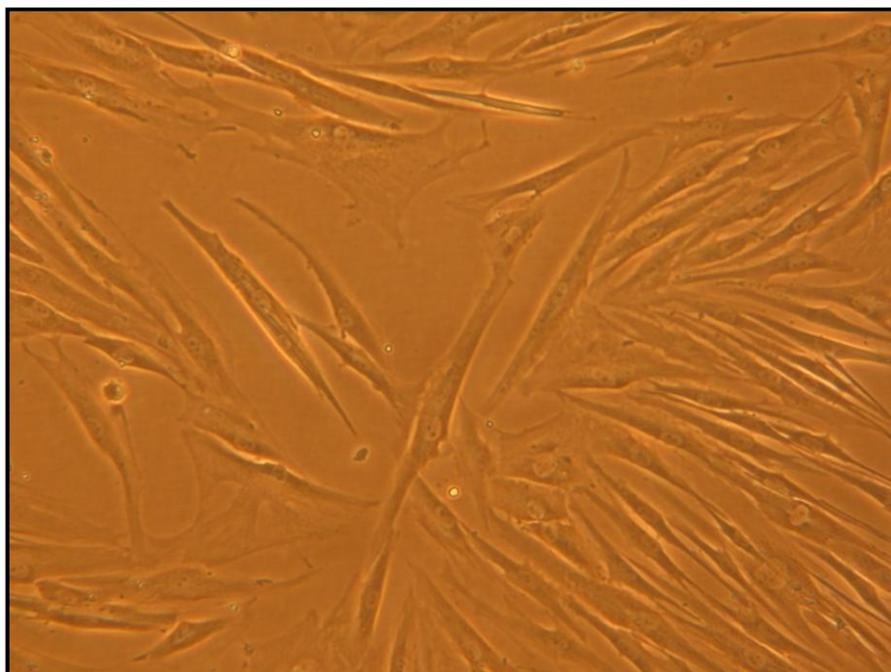


Imagen 11. *Cultivo de fibroblastos 5º día.*

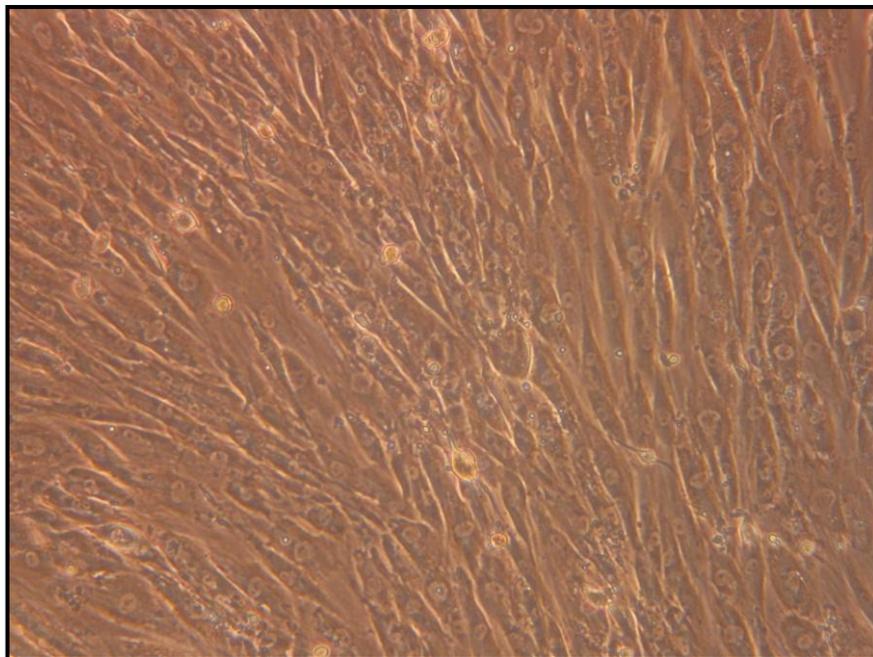


Imagen 12. *Cultivo de fibroblastos. 7º día. Confluencia.*

4.2. Formación de estroma tridimensional

Para la formación del gel estromal se utilizaron fibroblastos subcultivados de las muestras originales aproximadamente al 7º día desde la siembra. La proliferación de estas células en los pozos de cultivo fue correcta, los soportes porosos permitieron un correcto crecimiento celular en toda su espesor.

Los fibroblastos mostraron buen índice de supervivencia y proliferación en el interior de los sustitutos estromales. Después de 2 días de cultivo, los fibroblastos incorporados dentro de los geles de fibrina y agarosa al 0,1%, mostraron una morfología redondeada con abundantes prolongaciones, apareciendo extendidos por toda la superficie de la malla estromal.

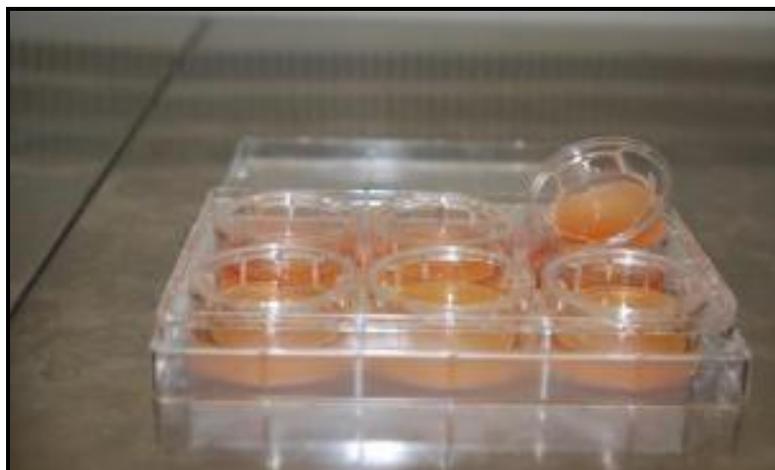


Imagen 13. *Formación de estroma vesical en gel de agarosa y fibrina.*

4.3. Desarrollo del modelo de mucosa vesical humana de espesor completo obtenido mediante Ingeniería Tisular

La base de un sustituto eficaz del aparato urinario es una mucosa con características similares a la natural en relación a su resistencia a la concentración iónica de la orina.

Para la formación completa de la mucosa vesical artificial necesitamos por un lado de un cultivo exitoso de urotelio que se pudiera subcultivar y por otro de un gel con base de fibrina y agarosa en el que hubieran proliferado fibroblastos tomando una conformación tridimensional. Debido a la exigencia de las células epiteliales del aparato urinario para su cultivo se utilizó el primer subcultivo, tomado al 7º día de la siembra original, para colocarlo directamente sobre el gel obteniendo más éxitos que cuando utilizamos el segundo o tercer pase.

El epitelio presentó más facilidad reproductiva que sobre la superficie habitual de cultivo. Se observó buena proliferación en las primeras 24-48 horas sobre las células estromales tomando una morfología redondeada similar a los cultivos previos. Esta técnica de cultivo en soportes porosos permitió un buen desarrollo de ambos compartimentos sin encontrarse migraciones de células entre uno y otro. Los cultivos de células uroteliales sembrados sobre el sustituto estromal desarrollado mantuvieron una estructura consistente aunque con escasa resistencia, lo cual dificultó el manejo y la manipulación de los mismos.

Los fibroblastos mostraron buen índice de supervivencia y proliferación en el interior de los sustitutos estromales. Después de 2 días de cultivo, las células epiteliales situadas sobre los geles de fibrina y agarosa al 0,1%, aparecieron extendidos por prácticamente toda la superficie de la malla estromal. En ninguno de los casos se apreció contracción o pérdida de volumen de los geles de fibrina y agarosa después de generar los sustitutos de mucosa vesical.

4.4. Evaluación por microscopía óptica de las muestras control y de los sustitutos de mucosa vesical desarrollados por Ingeniería Tisular

Las muestras de control de mucosa vesical normal con microscopía óptica y tinción de hematoxilina-eosina presentaron el característico epitelio de transición con una capa de células superficiales redondeadas con gran adhesión entre sí. Bajo la misma se aprecia un estroma bien poblado de fibroblastos.

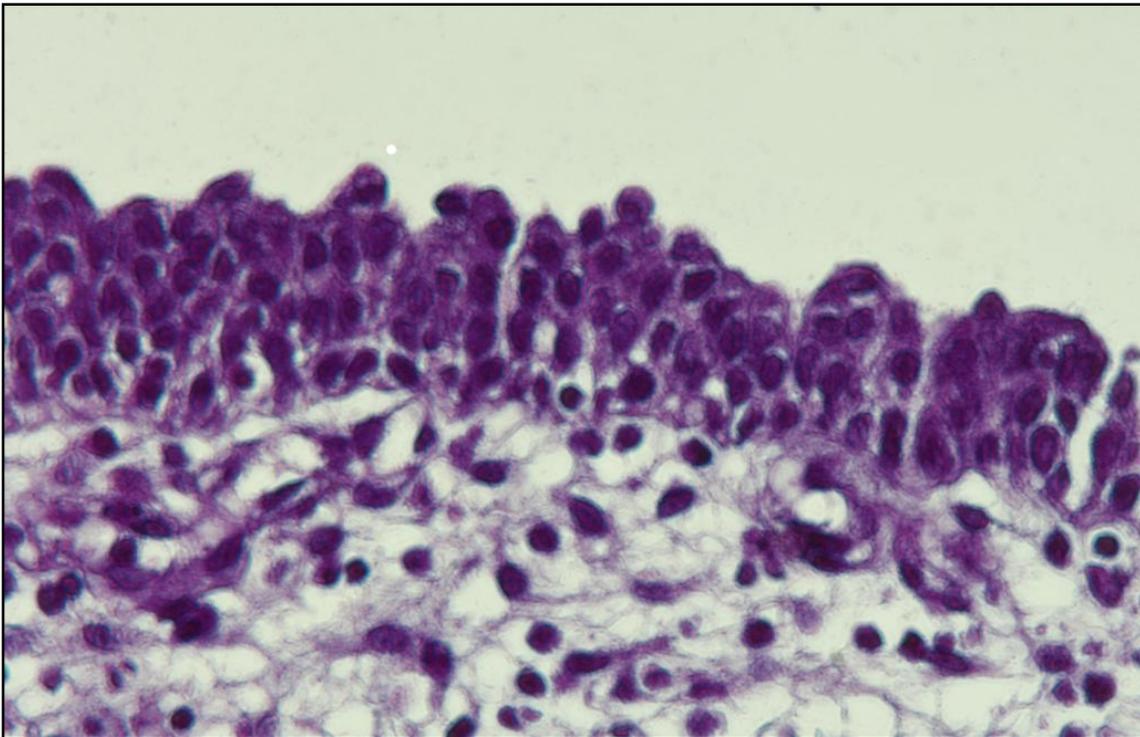


Imagen 14. *Control de mucosa vesical. 40X.*

Analizando la mucosa artificial obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular observamos al séptimo día una monocapa de células sobre el estroma, células en general alargadas con buena adhesión entre ellas. El cultivo del epitelio sobre las células estromales vesicales resultó eficaz cubriendo la totalidad de la superficie de cultivo entre el 7^o y el 10^o día como se pudo observar mediante el microscopio óptico.

En los días posteriores se observa un aumento de la proliferación. No se aprecian diferencias en el aspecto del epitelio sobre el estroma que se mantiene en monocapa.

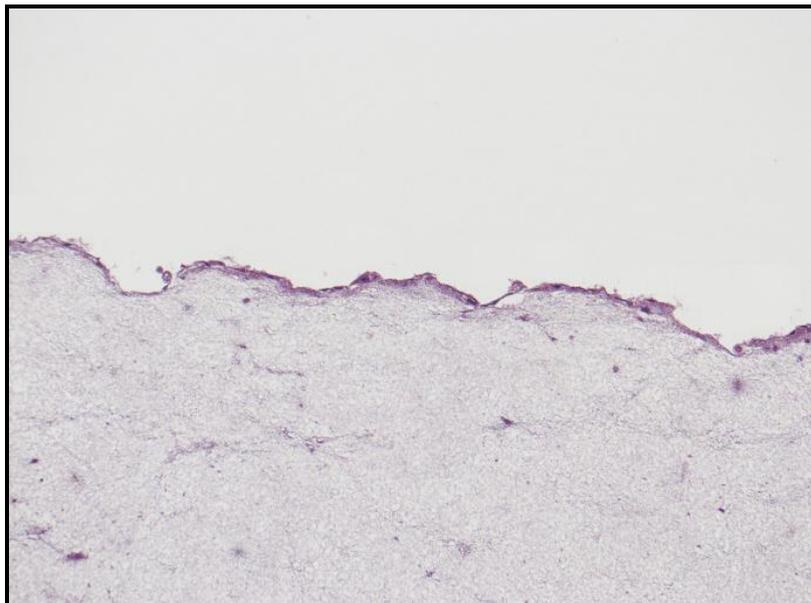


Imagen 15. *Monocapa de células uroteliales sobre estroma de mucosa vesical obtenidas mediante Ingeniería Tisular. 10X.*

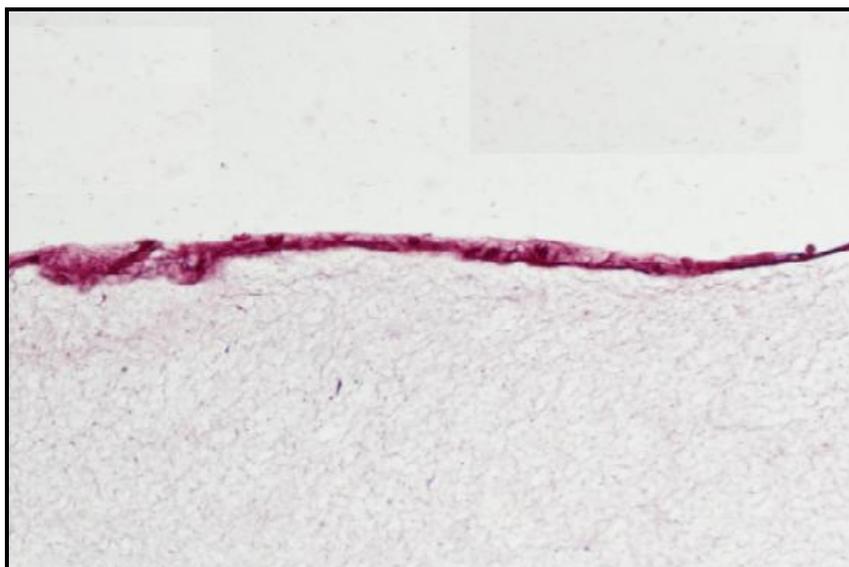


Imagen 16. *Detalle de la continuidad de las células epiteliales cubriendo el estroma. 20X.*

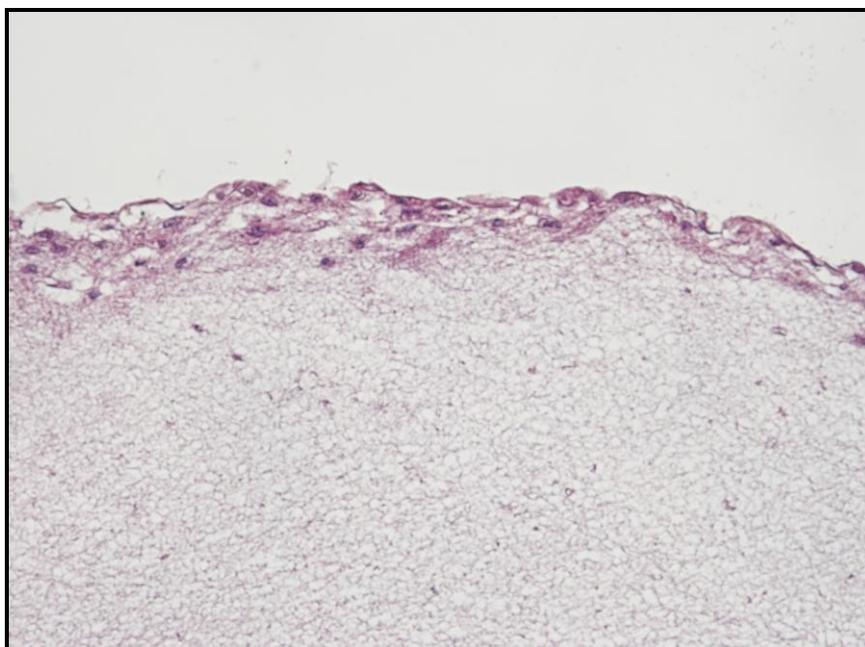


Imagen 17. *Mucosa vesical obtenida de forma artificial. 20X.*

4.4.1. Cortes de control de muestras fijadas para microscopía electrónica de transmisión (cortes semifinos)

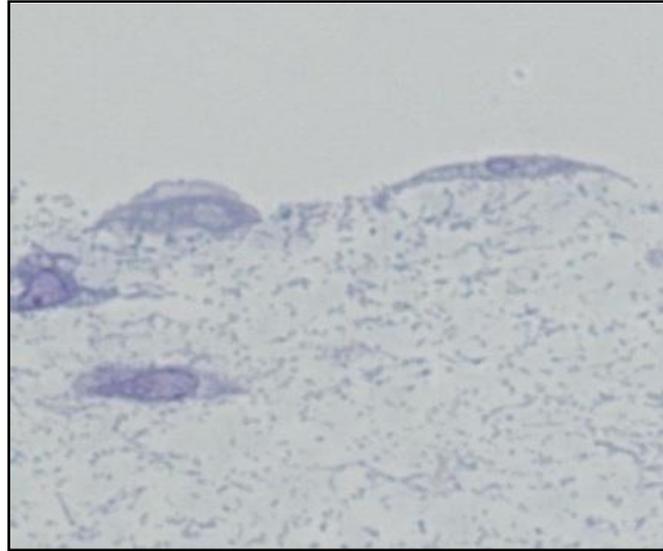


Imagen 18. *Mucosa vesical artificial. Células epiteliales en superficie sobre gel estromal de fibrina con presencia de fibroblastos en su interior. 40X.*

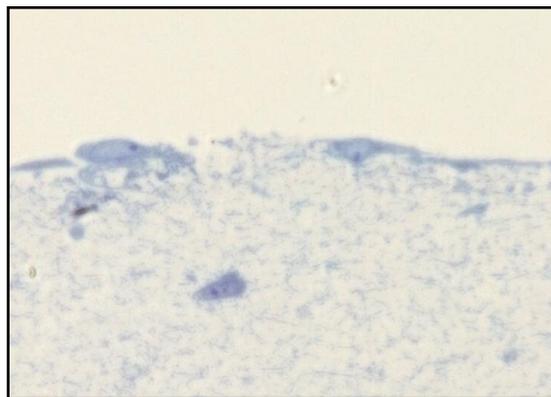


Imagen 19. *Las células uroteliales cultivadas se disponen de forma lineal con uniones intercelulares sobre el gel. 40X.*



Imagen 20. *Las células epiteliales emiten prolongaciones cubriendo la superficie del estroma. 40X.*

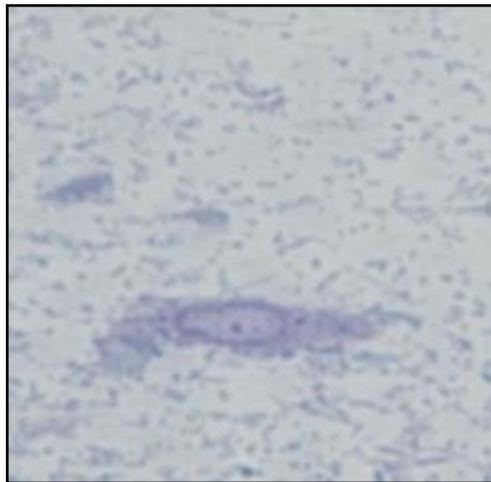


Imagen 21. *Detalle de fibroblasto con nucleolo y citoplasma rico en organelas inmerso en el estroma con base de fibrina y agarosa. 40X.*

4.5. Evaluación mediante microscopio electrónico de transmisión de los sustitutos de mucosa vesical desarrollados por Ingeniería Tisular

4.5.1. Epitelio de transición artificial

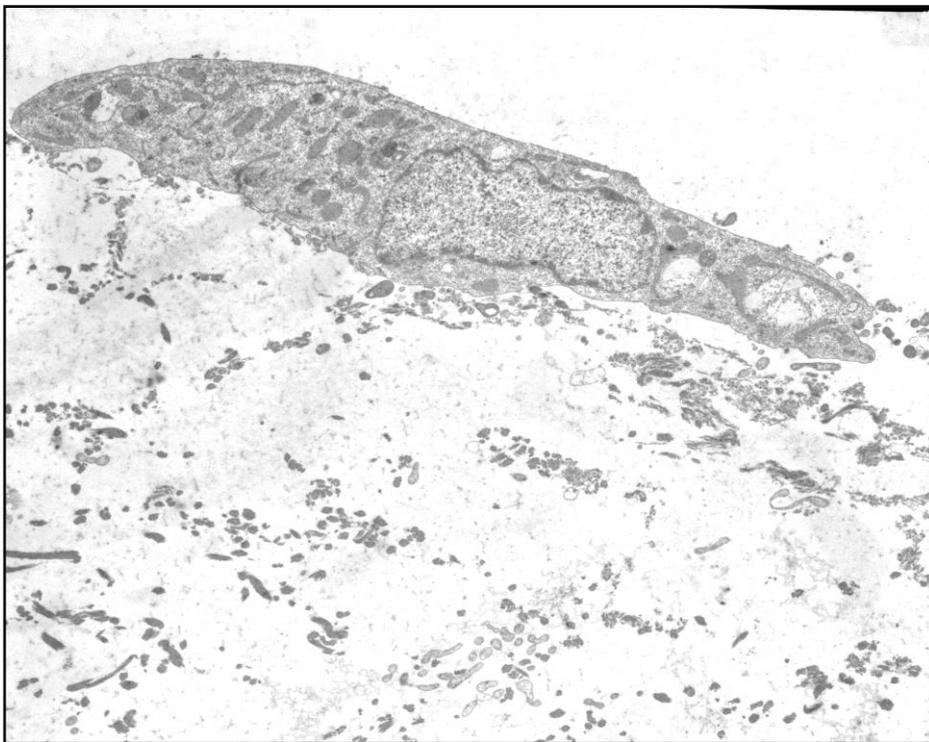


Imagen 22. *Célula del epitelio urotelial artificial sobre el estroma de fibrina-agarosa; destaca su aspecto inmaduro con abundantes organelas y comienzo de formación citoesquelética. Las células uroteliales se disponen lineales sobre el estroma buscando el contacto intercelular. (3000x)*



Imagen 23. *Detalle del inicio de desarrollo de interdigitaciones típicas del urotelio entre dos células epiteliales con gran cantidad de material denso secretado entre ellas. En el interior de las células destaca la presencia de una abundante red fibrilar y algunas vacuolas mielínicas. (7000x)*



Imagen 24. *Detalle de las zonas de aproximación entre células uroteliales sin observarse placas de unión ni un contacto completo en una primera fase de maduración. (20000x)*

4.5.2. Sistemas de unión de membrana en el urotelio artificial

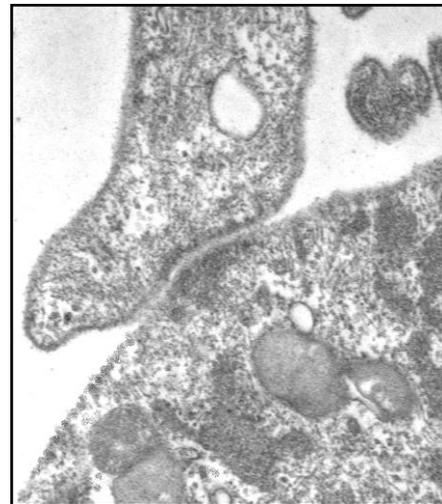
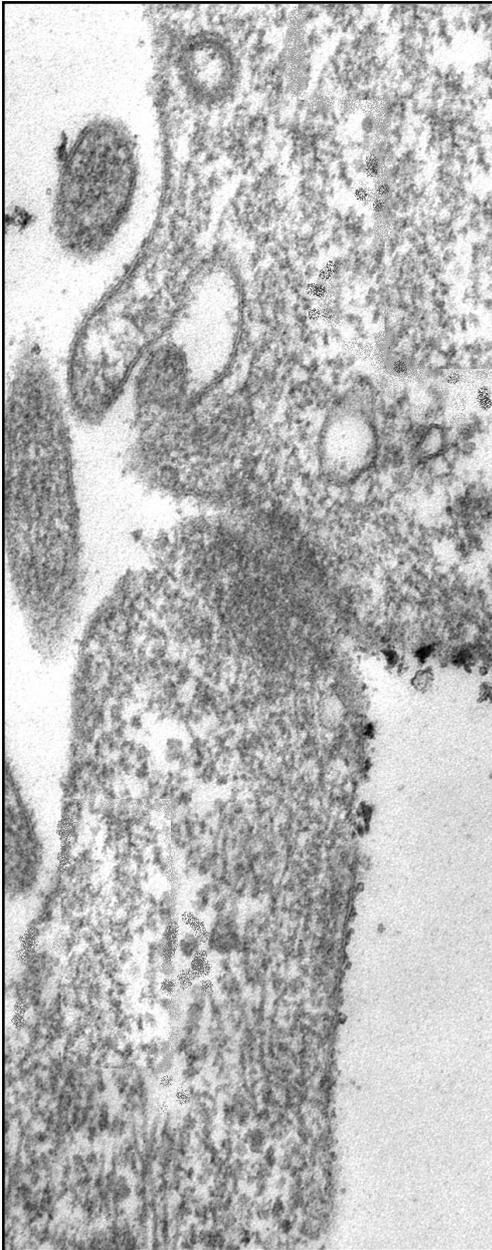


Imagen 25. *En las células uroteliales de la mucosa artificial se observan estructuras microtubulares que reflejan la existencia de un importante citoesqueleto. A nivel de la membrana celular se reconocen además unas uniones intercelulares similares a desmosomas inmaduros. (30000x y 20000x)*



Imagen 26. *Uniones intercelulares. El epitelio presenta gran cantidad de material granulado en su interior y una estructura fibrilar intracitoplasmática orientada. (7000x)*

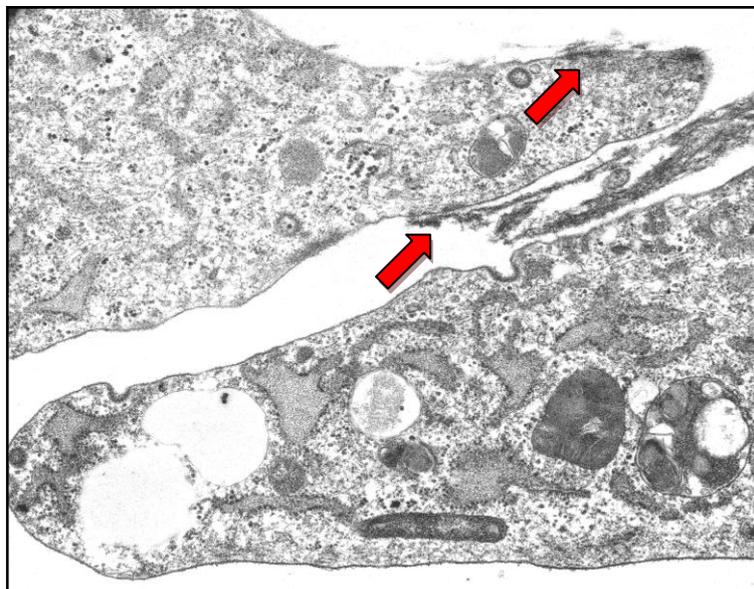


Imagen 27. *Entre las células epiteliales se observa gran cantidad de material fibroso producido por las propias células. En algunas zonas de la membrana se observan imágenes similares a sistemas de anclaje sobre un inicio de membrana basal. (12000x)*



Imagen 28. *En la cara estromal de algunas células uroteliales podemos observar una membrana basal con soluciones de continuidad y en la membrana sistemas de unión que podrían ser rudimentos de hemidesmosomas lo cual confirma su estirpe epitelial. (3000x)*

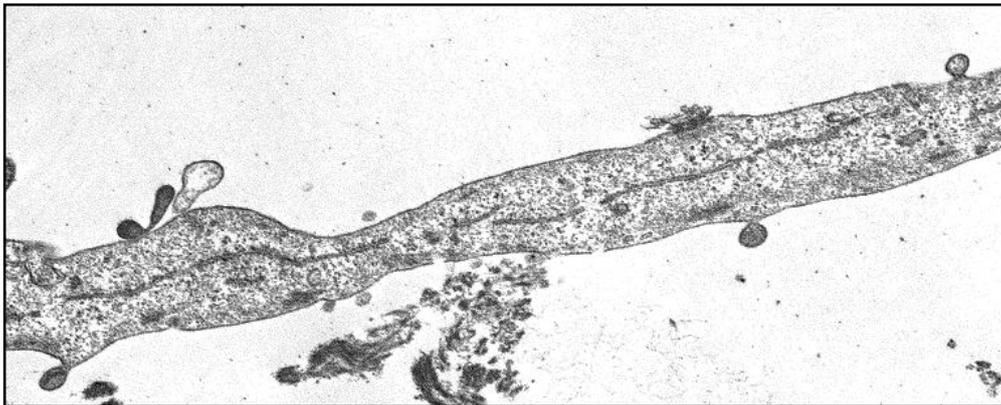
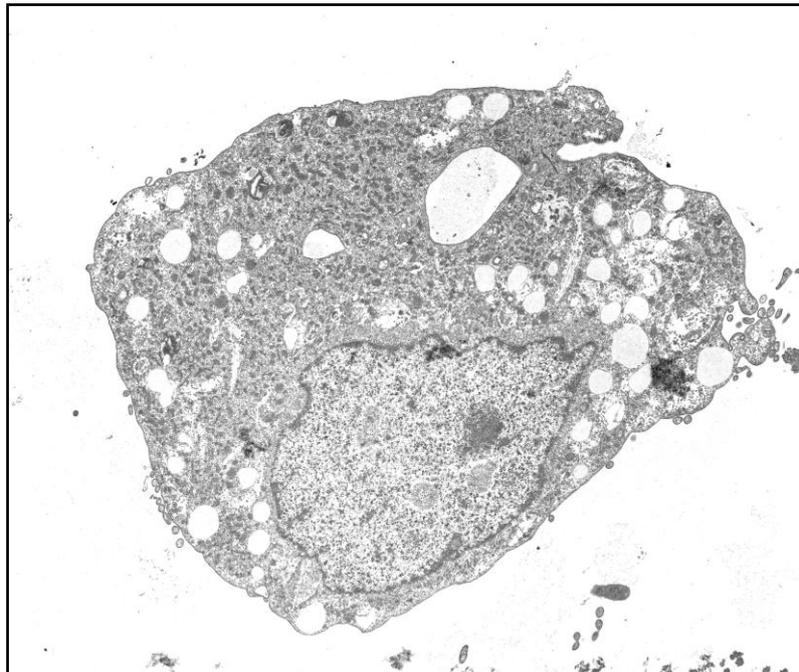
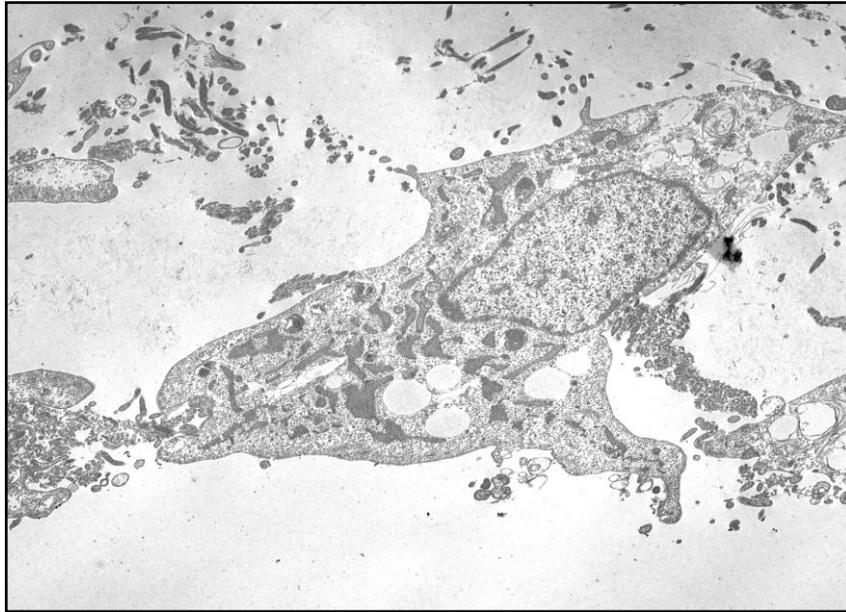


Imagen 29. *Detalle del citoplasma de una célula del epitelio de transición obtenido mediante Ingeniería Tisular. En su interior observamos una red fibrilar de proteínas de sostén que forman el citoesqueleto (citoqueratinas); destacar también su actividad secretora hacia la matriz. (3000x)*

4.5.3. Fibroblastos



Imágenes 30 y 31. *Fibroblastos vesicales en estroma artificial con base de fibrina y agarosa. Destacar la gran riqueza de organelas citoplasmáticas, propia de una alta actividad de síntesis. (3000x)*

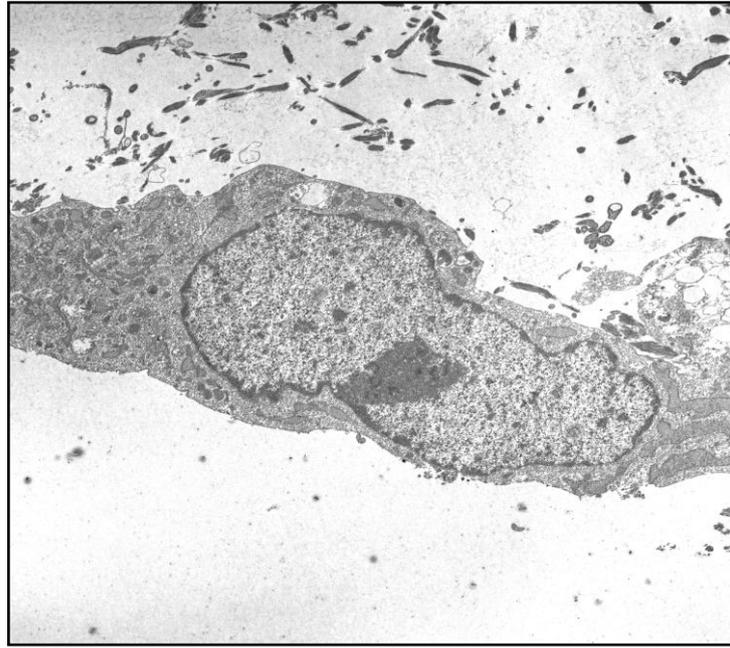
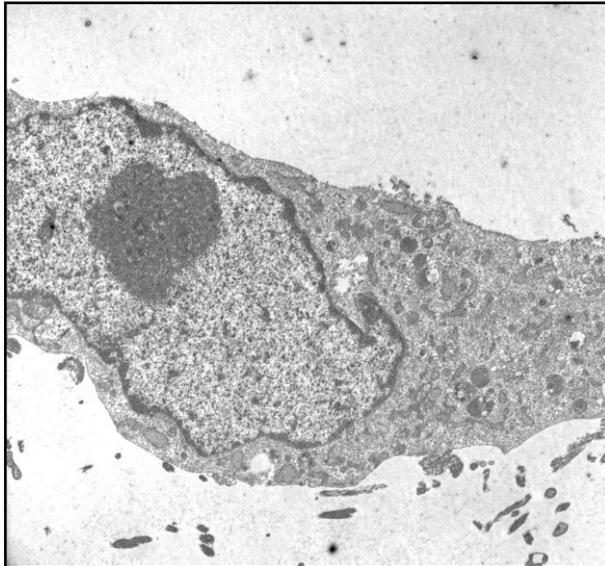
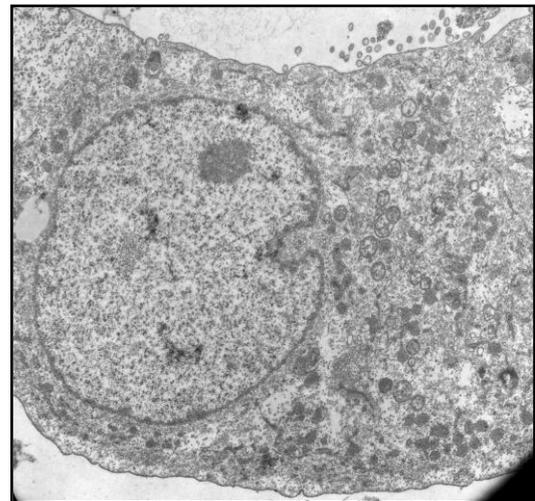


Imagen 20. (3000x)



4400x



7000x

Imágenes 32 y 33. *Análisis de la estructura interna del fibroblasto de origen vesical humano en el estroma artificial. Se observa un abundante sistema vacuolar y reticular así como la presencia de nucleolo en el interior del núcleo señal del estado de actividad de estas células.*

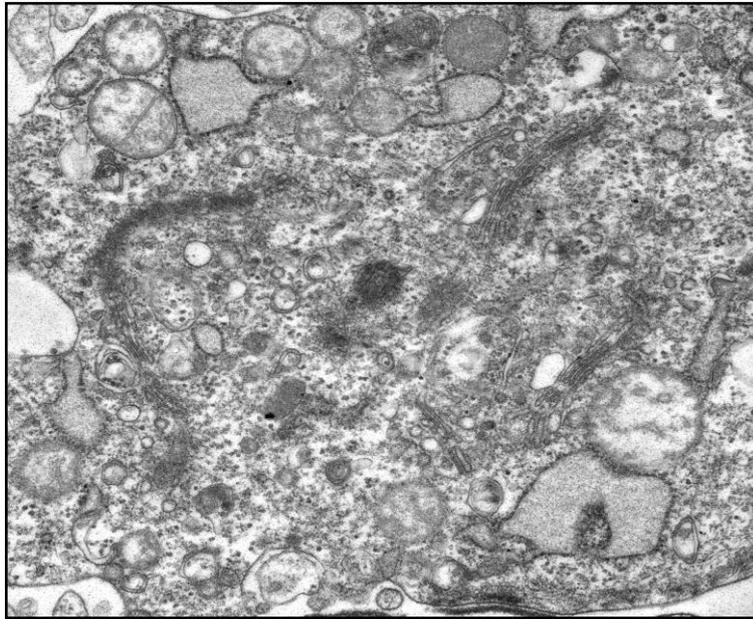


Imagen 34. *La observación del citoplasma del fibroblasto artificial revela la existencia de un complejo sistema de endomembranas con presencia de abundante retículo endoplasmático y numerosas vacuolas. (12000x)*

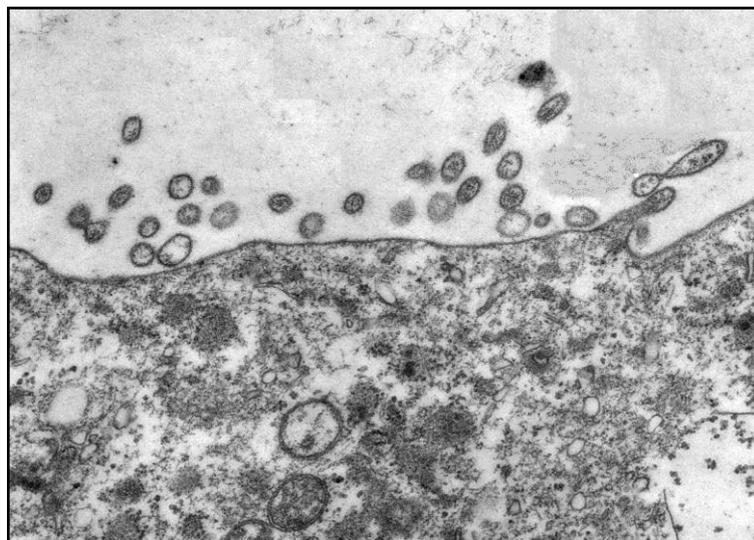


Imagen 35. *Actividad secretora de los fibroblastos en el gel de fibrina-agarosa. (12000x)*

4.5.4. Estructura microscópica del gel de fibrina-agarosa

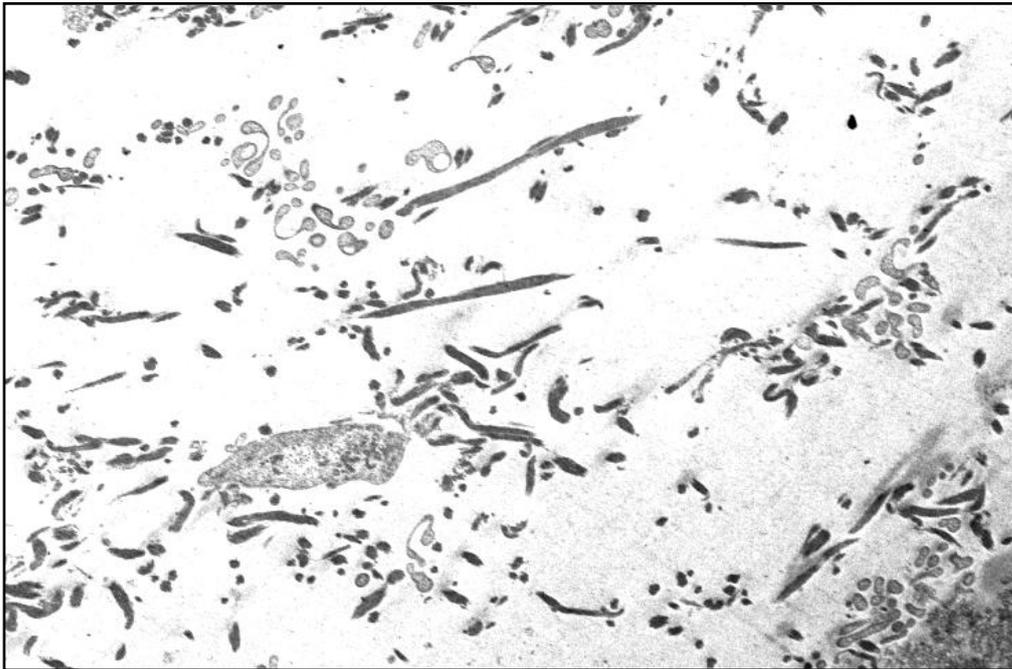
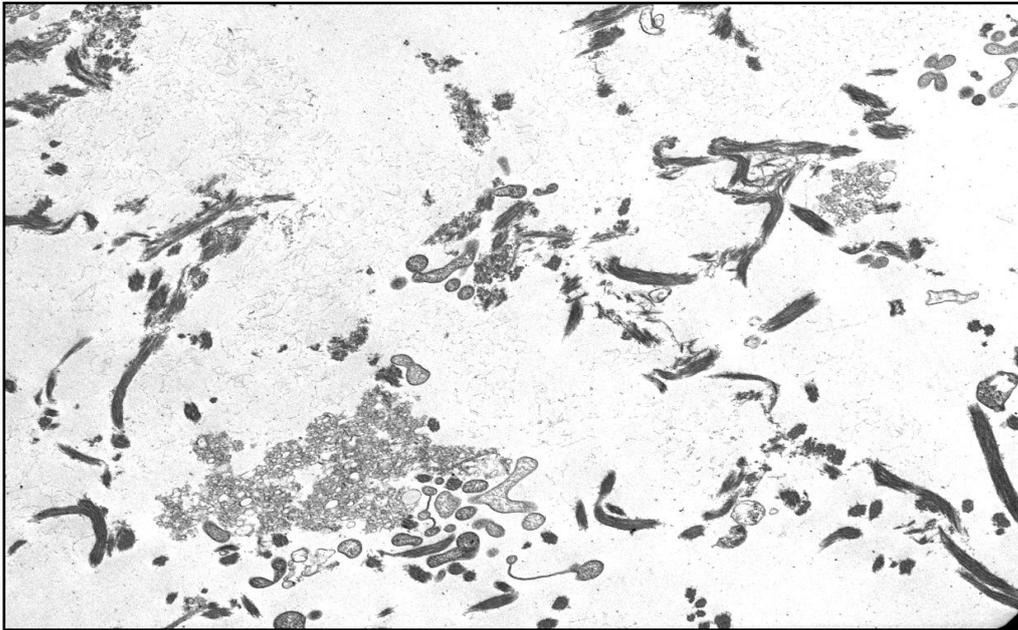


Imagen 36. *Estructura interna del gel estromal basado en fibrina y agarosa. Destacar su riqueza en fibras y material denso sobre el que asientan los fibroblastos. (3000x y 1100x)*

4.6. Evaluación del perfil de expresión de citoqueratinas en sustitutos de mucosa vesical desarrollados por Ingeniería Tisular

Los resultados inmunohistoquímicos obtenidos para cada tipo de citoqueratinas en los dos grupos, control y mucosa vesical artificial obtenida mediante técnicas de Ingeniería son descritos detalladamente en los siguientes apartados.

4.6.1. Pancitoqueratina (complejo de citoqueratinas 1, 5, 6, 8, 10 y 18)

El análisis de las muestras control de vejiga humana demostró la presencia de este complejo en el epitelio urotelial.

Todas las muestras de mucosa artificial a los 7 y 14 días de cultivo presentaron buena expresión de esta citoqueratina con intensidad similar al urotelio humano.

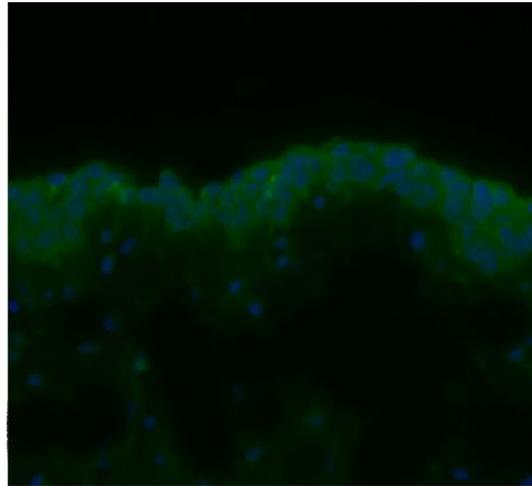


Imagen 37. *Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina en muestras de vejiga humana control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.*

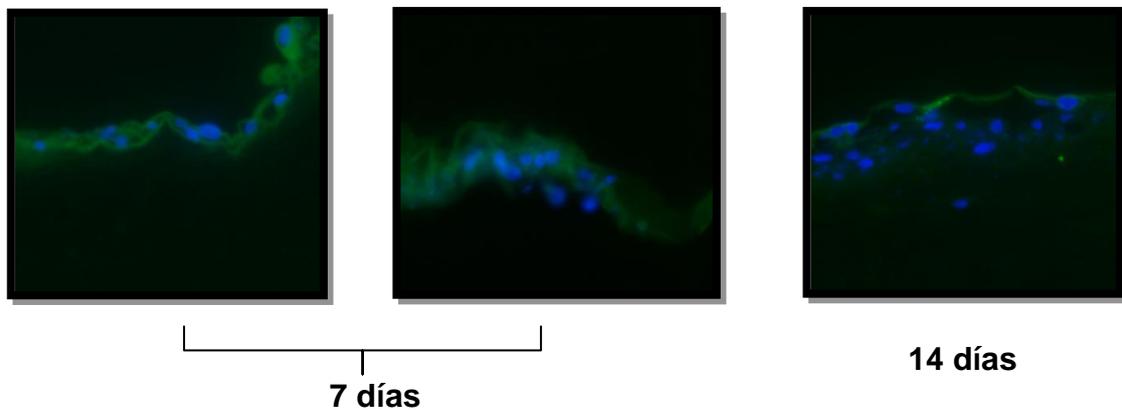


Imagen 38. *Análisis de inmunofluorescencia para Pancitoqueratina en muestras de mucosa vesical humana obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.*

4.6.2. Citoqueratina 7

Las muestras de control presentaron una expresión muy alta de citoqueratina 7 en las células epiteliales urinarias.

En los cortes de mucosa vesical artificial se observa una presencia importante de esta citoqueratina que se distribuye homogéneamente a lo largo del epitelio a los 7 y 14 días.

4.6.3. Citoqueratina 8

En la mucosa vesical control se demostró la presencia de citoqueratina 8 en todo el espesor urotelial de las muestras analizadas.

Igualmente la mucosa vesical artificial expresa esta citoqueratina comprobándose una positividad a la tinción importante a los 7 días y algo menor a los 14. .

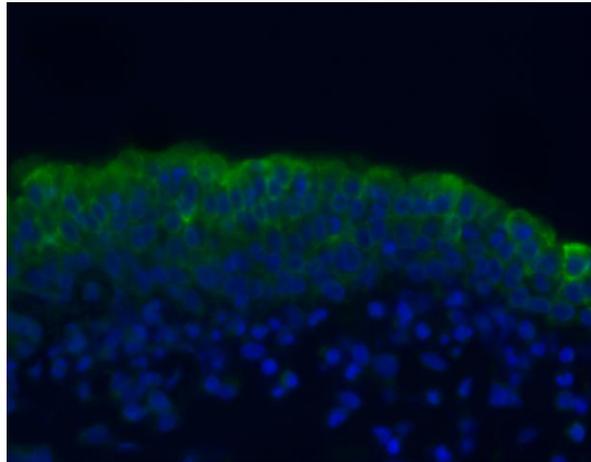


Imagen 39. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 7 en muestras de vejiga humana control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

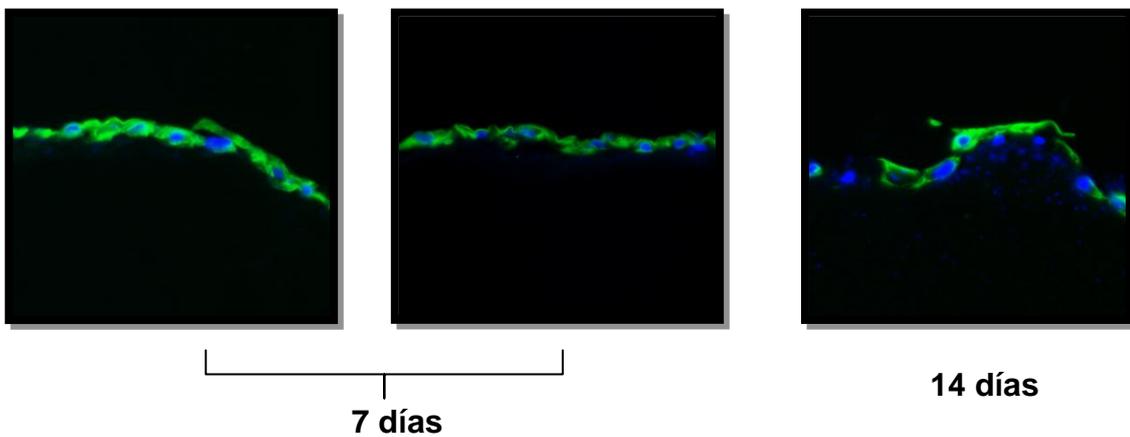


Imagen 40. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 7 en muestras de mucosa vesical humana obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

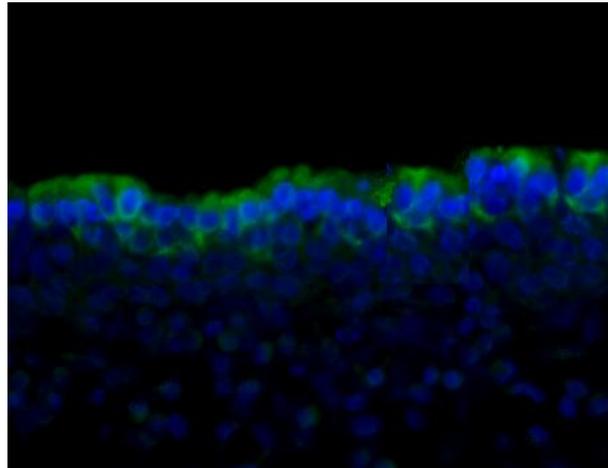


Imagen 41. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 8 en vejiga control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

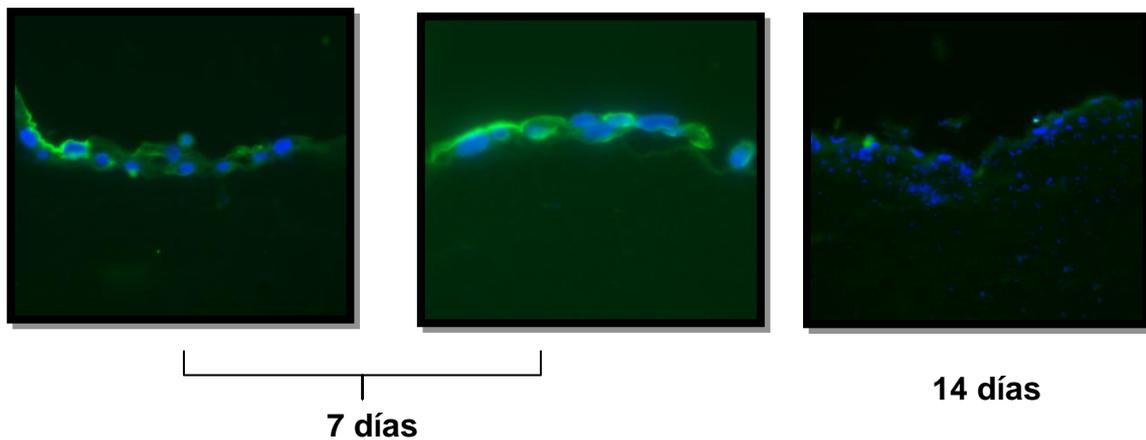


Imagen 42. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 8 en muestras de mucosa vesical artificial (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

4.6.4. Citoqueratina 4

En el urotelio normal no se observa expresión de la citoqueratina 4.

El epitelio de la mucosa vesical artificial tampoco muestra positividad para esta citoqueratina en ninguna de las muestras.

4.6.5. Citoqueratina 13

El urotelio humano control presentó una alta positividad para la citoqueratina 13, con mayor intensidad en la cara luminal del epitelio de transición que en su zona basal.

En las muestras de mucosa con epitelio cultivado sobre el gel con base de agarosa y fibrina se observó también la presencia de esta citoqueratina aunque con una expresión más baja que en los controles. Su positividad fue mayor a los 7 que a los 14 días.

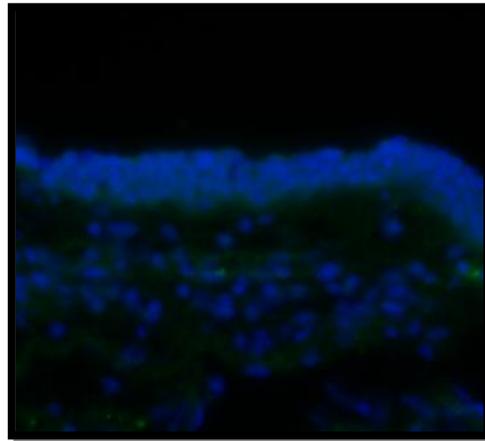


Imagen 43. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 4 en vejiga control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

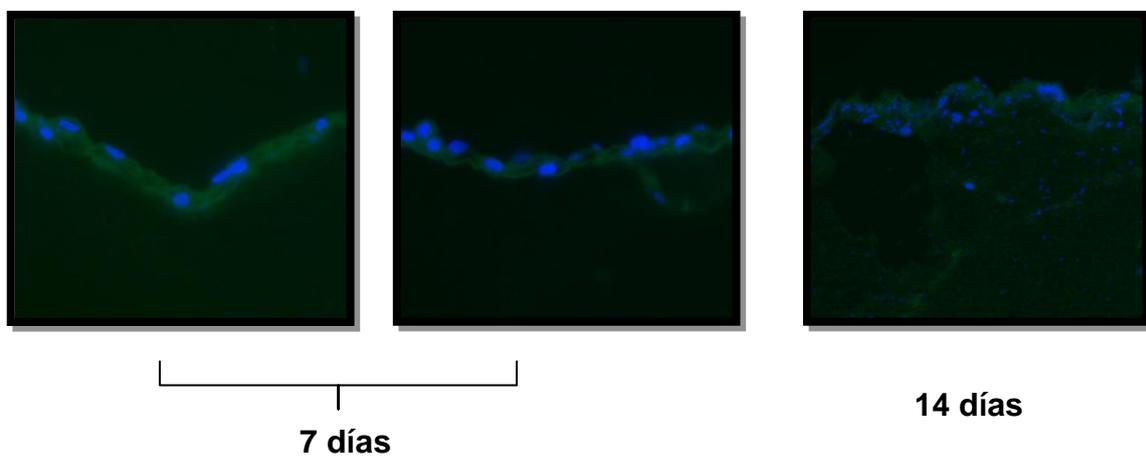


Imagen 44. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 4 en epitelio de mucosa vesical artificial (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

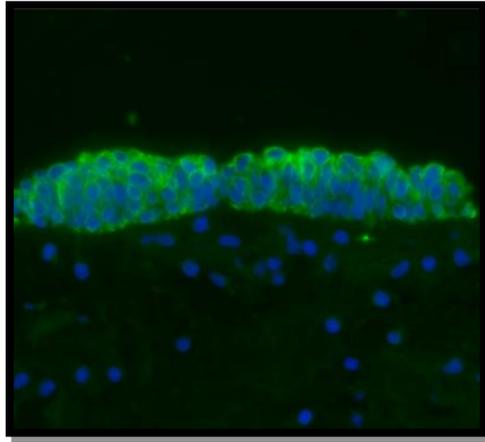


Imagen 45. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 13 en vejiga control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

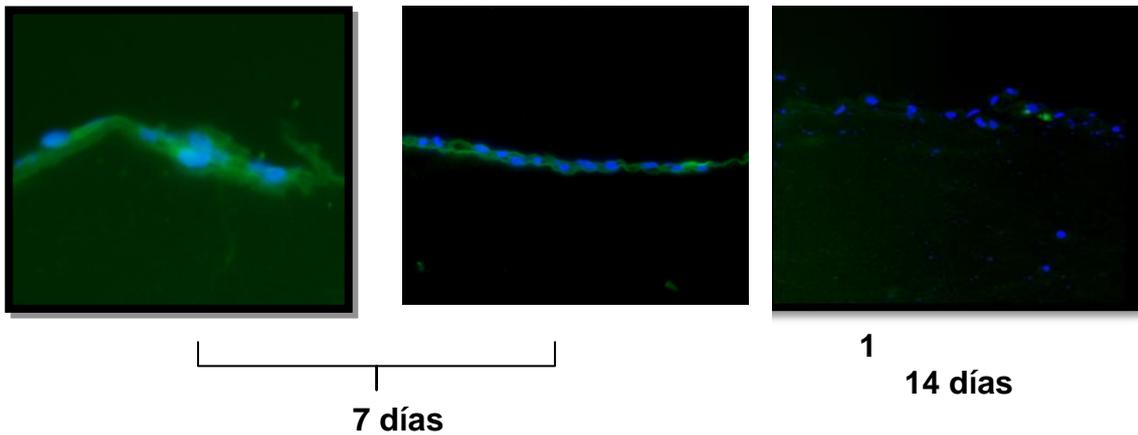


Imagen 46. Análisis de inmunofluorescencia para citoqueratina 13 en epitelio vesical artificial (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

4.6.6. Involucrina

La involucrina aparece con una expresión positiva leve en la mucosa vesical humana normal analizada como se demuestra en la inmunofluorescencia de los grupos control.

El epitelio artificial cultivado a partir de muestras de urotelio humano expresa dicha proteína con buena intensidad tanto a los 7 como a los 14 días.

4.6.7. Filagrina

Tanto el epitelio urotelial control como el cultivado artificialmente fueron negativos para la expresión de esta proteína.

En resumen nuestra mucosa vesical obtenida mediante técnicas de Ingeniería Tisular expresó con diferente concentración citoqueratinas 7, 8, 13, involucrina y pancitoqueratina (citoqueratinas 5, 8 y 18) (Figuras 14 y 15).

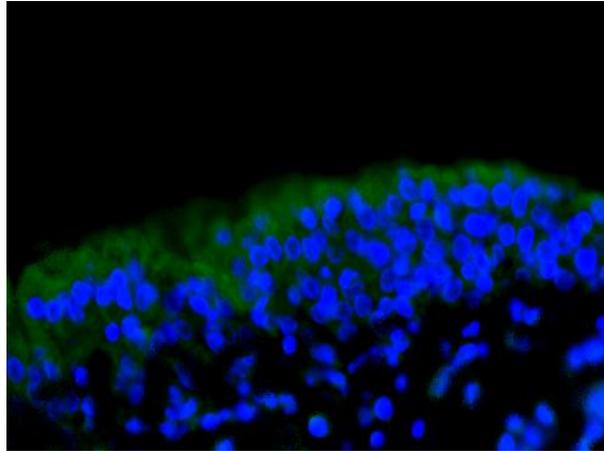


Imagen 47. Análisis de inmunofluorescencia para Involucrina en epitelio vesical control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

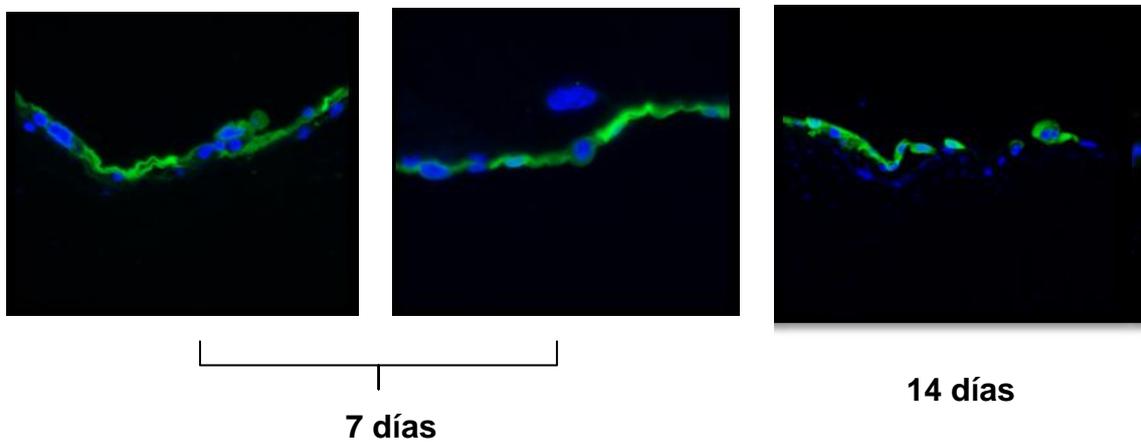


Imagen 48. Análisis de inmunofluorescencia para Involucrina en epitelio vesical artificial (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

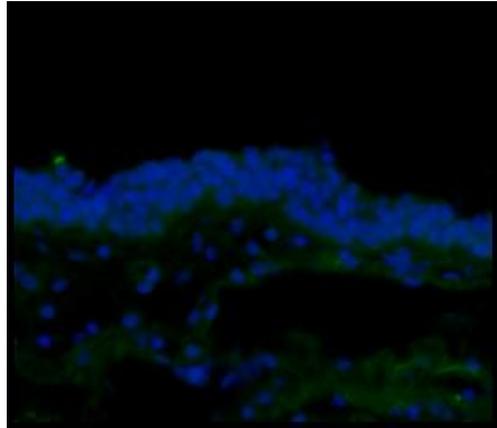


Imagen 49. Análisis de inmunofluorescencia para Filagrina en epitelio vesical humano control (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

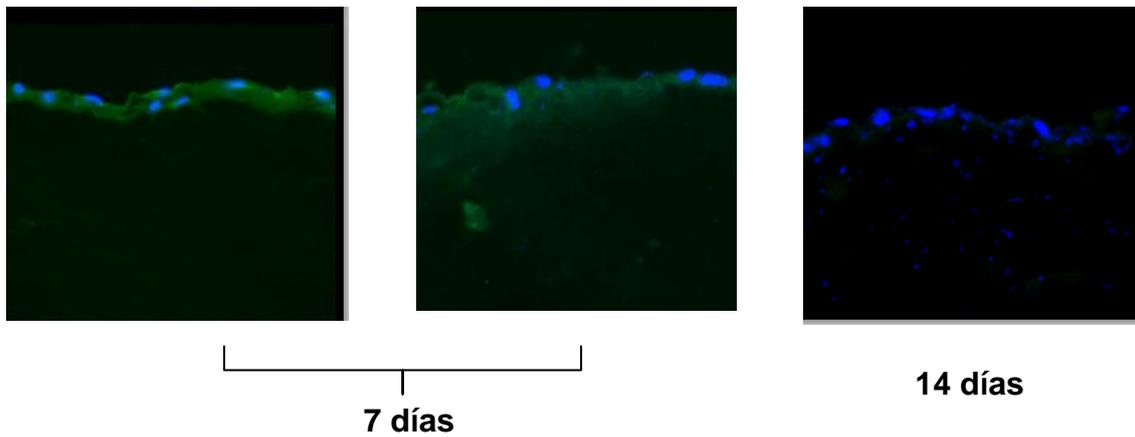


Imagen 50. Análisis de inmunofluorescencia para Filagrina en epitelio vesical artificial (señal verde-FITC). La señal azul corresponde a los núcleos celulares contrateñidos con DAPI.

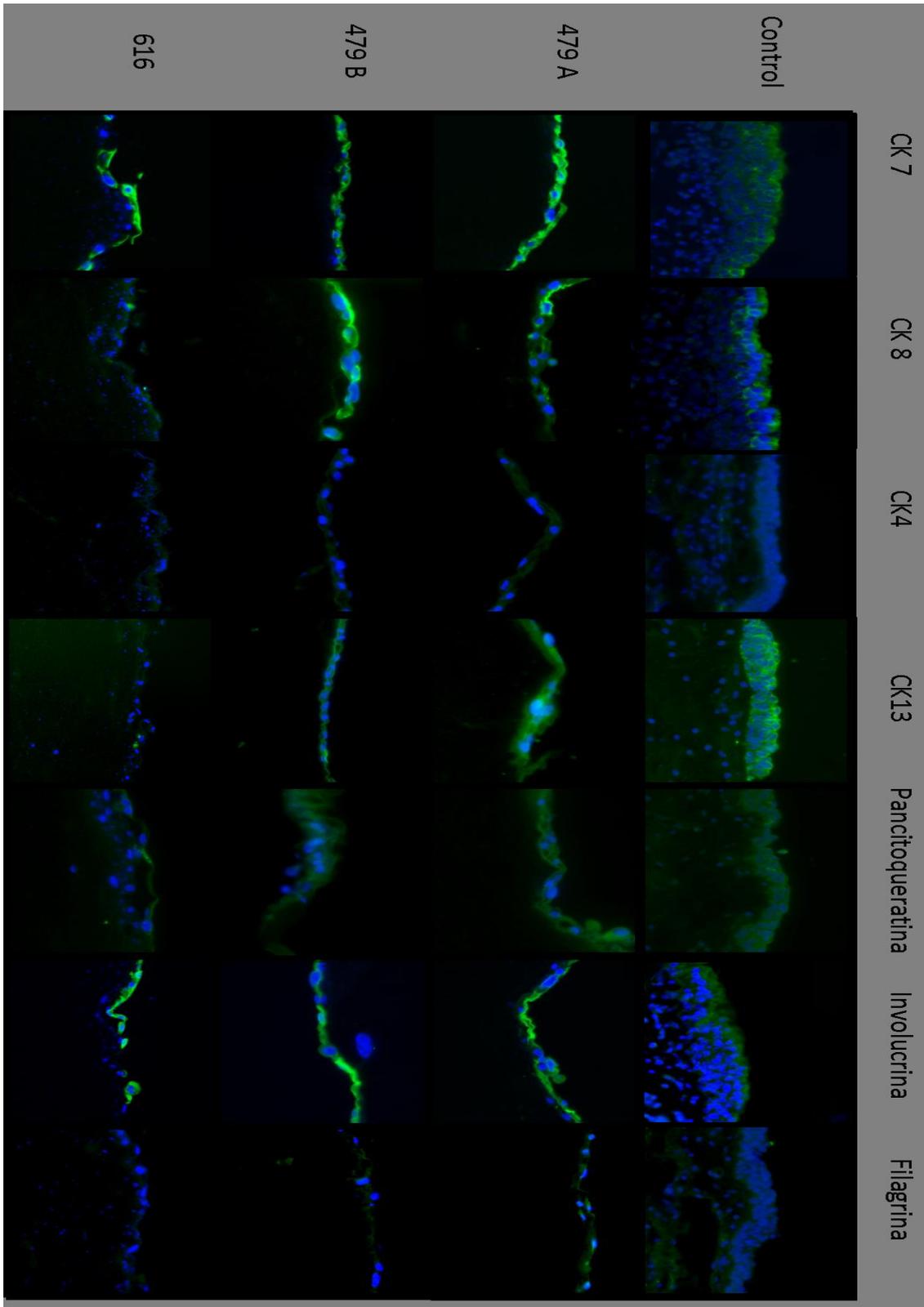


Figura 14. Resultados de inmunohistoquímica de las distintas citoqueratinas en la muestra control y las obtenidas artificialmente.

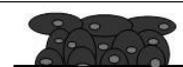
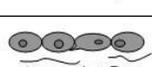
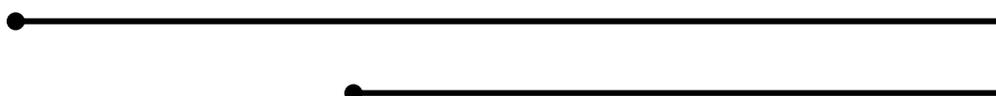
	Mucosa nativa	Mucosa artificial
Pancitoqueratina		
CK7		
CK8		
CK4		
CK13		
Involucrina		
Filagrina		

Figura 15. Esquema de resultados en la expresión de citoqueratinas comparando muestra control y mucosa vesical artificial. La positividad se simboliza en negro.

5. Discusión



La Ingeniería Tisular en el campo de la Urología ofrece amplias perspectivas ante la necesidad de la sustitución tisular que exigen numerosas patologías del aparato génito-urinario. En el futuro podría convertirse en una alternativa terapéutica al reemplazo anatómico de un órgano como la vejiga o la uretra. Para ello la búsqueda de un sustituto artificial eficaz del tejido urinario se hace imprescindible. Al contrario que otros tejidos que crecen y proliferan de forma relativamente fácil el cultivo artificial de urotelio resulta difícil y complejo (Lai & Atala, 2002; Lanza et al., 2002).

En nuestra Tesis Doctoral hemos obtenido una mucosa vesical con conformación tridimensional mediante técnicas de Ingeniería Tisular. El resultado es una estructura histológica similar a la natural: una mucosa vesical con un urotelio superficial y un estroma conjuntivo bajo él que lo nutre y sostiene. Para la formación de estas estructuras necesitamos obtener células viables tanto uroteliales como estromales, desarrollar técnicas de cultivo y proliferación eficaces y formar un tejido de sostén adecuado.

La inmersión en EDTA de la muestra de mucosa completa ha demostrado ser una técnica con la que se liberan abundantes células epiteliales con buena proliferación posterior. La utilización de células liberadas en diferentes tiempos de inmersión (15, 30 y 45 minutos) nos permitió observar que a los 30 minutos de inmersión se obtienen mayor cantidad de células liberadas.

Este dato coincide con otros autores (Hutton et al. 1993; Southgate et al., 1994) que utilizan la disgregación enzimática para la obtención de células uroteliales. Las dos enzimas proteolíticas más utilizadas son la dispasa que logra disociar el epitelio de la membrana basal y la tripsina que libera un número elevado de células.

En nuestra experiencia el raspado de la muestra sobre superficie de cultivo (se intentó al menos en 3 muestras previas al estudio) no resultó útil por la fácil contaminación de los cultivos y la falta de capacidad de proliferación de las células obtenidas. Sin embargo otros autores afirman que el simple raspado de

la superficie de la muestra con hoja de bisturí puede bastar para obtener un cultivo de células uroteliales (Liebert et al., 1990; Cilento et al., 1994). Esta técnica puede comprometer la viabilidad de las células y por tanto el éxito del cultivo.

En otros estudios se han cultivado células uroteliales procedentes de la descamación celular del aparato urinario sedimentando la orina (Herz et al., 1985; Zhang et al., 2008) aunque esta técnica presenta el inconveniente de un bajo número celular por muestra y la posibilidad que en el sedimento se encuentren otro tipo de células o microorganismos diferentes a las uroteliales. Por el contrario presenta la ventaja de poder utilizar células del propio organismo sin necesidad de toma de biopsia ni intervención quirúrgica (Southgate et al., 2002).

Respecto a la procedencia de las biopsias hemos observado en general una mejor viabilidad y proliferación celular epitelial en las muestras de pared de uréter y pelvis frente a las de vejiga.

Las razones para estas diferencias posiblemente se deban a que las muestras de vejiga eran obtenidas de intervenciones de adenomectomía prostática lo cual supone una vejiga sometida a cierto grado de obstrucción distal. Esto implica vejigas de lucha, hipertrofiadas, con un urotelio que ha sufrido mayor trabajo e incluso retención urinaria crónica con el consiguiente desgaste del epitelio. Además estos pacientes eran más añosos de media que los pacientes sometidos a cirugía de vías altas (riñón y uréter). Estos dos factores parecen influir en la presencia de células con capacidad proliferativa y regenerativa en el interior del urotelio aunque no hemos encontrado datos en la literatura al respecto.

Es conocido sin embargo que las células adultas órgano-específicas, como las utilizadas en nuestro trabajo, poseen ciertas limitaciones como la dificultad de obtención, la baja capacidad de proliferación y la reducida funcionalidad del tejido obtenido in vitro (Mora, 2009). Por eso en el futuro se plantea la utilización de células troncales multi y pluripotenciales capaces de renovarse

indefinidamente y diferenciarse específicamente a los tipos celulares deseados.

Recientemente se ha publicado la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón a tejido urinario. En dicho trabajo se cultivan estas células de ratón con células del mesénquima de la vejiga. Las células de origen vesical estimulan la diferenciación de las células troncales a epitelio urinario (Ottamasathien et al., 2006). Además las señales emitidas por estas células son capaces de estimular también la diferenciación de células multipotentes adultas como las de médula ósea hacia urotelio (Anumanthan et al., 2008). Conocer esas señales y sus mecanismos de acción será otra interesante línea de investigación en el futuro.

Zhu et al. (2010) han realizado constructos de mucosa vesical con matrices acelulares de vejiga en las que se sembraron células madre adipocíticas. En la autopsia posterior del animal donde se implantaron, se observó un tejido con urotelio en superficie, células musculares y tejido nervioso. Su uso por tanto mejora los reemplazos realizados únicamente con matriz acelular.

En la actualidad no se han podido localizar las células madre uroteliales por lo que partimos de células uroteliales adultas obtenidas en biopsia o descamación. Poder identificarlas y obtenerlas para a partir de ellas lograr un cultivo y una proliferación más efectiva, es una línea de investigación interesante con muchas posibilidades de futuro. Quizá conocer en qué zona anatómica son más abundantes, algunos autores apuntan al trigono vesical (Pastor-Navarro et al., 2010), o poder disponer de algún marcador específico facilitará su conocimiento y su posterior uso en medicina regenerativa

Respecto al cultivo de las células de la matriz, la inmersión de la muestra en colagenasa y la utilización de medios no enriquecidos para el cultivo de fibroblastos ha demostrado ser una técnica sencilla y eficaz. Se obtuvieron con ella gran cantidad de células estromales con una rápida proliferación. Estos resultados coinciden con los datos publicados por otros investigadores (Orwin & Hubel, 2000; Alaminos et al., 2007; Sánchez- Quevedo et al., 2007).

En cuanto al desarrollo de cultivo en esta Tesis Doctoral hemos utilizado contenedores habituales, como la mayoría de estudios (De Boer et al., 2008), con buenos resultados. Otros autores cultivan el urotelio sobre fibroblastos atenuados 3T3 que funciona como capa de alimentación para las células epiteliales (De Diego et al., 2006; Zhang et al., 2001). Estas células son fibroblastos de ratón atenuadas con radiación o con mitomicina, lo cual inhibe su crecimiento pero le permite nutrir a la capa superficial de epitelio.

Las células uroteliales en nuestro trabajo no fueron sometidas a más de 2-3 pases utilizándose en la mayoría de las ocasiones directamente el cultivo primario para el crecimiento sobre gel de fibrina-agarosa. Observamos que los sucesivos subcultivos presentaban una velocidad de proliferación mucho más limitada que los tejidos primarios. Sin embargo las células estromales de mucosa vesical demostraron una capacidad proliferativa mantenida hasta el 7^o-8^o pase de subcultivo con gran facilidad para la confluencia. Otros autores han descrito cómo las células uroteliales se mantienen estables tras varios pases en subcultivo (Hutton et al., 1993; Southgate et al., 1995) pudiendo obtenerse entre 6-11 cultivos consecutivos sin perder su patrón cromosómico normal. Además mantienen su capacidad expansora en cultivo y su viabilidad.

Una vez desarrollada una técnica efectiva de obtención y cultivo de células uroteliales se procedió a la construcción de una mucosa sembrando el epitelio sobre una base estromal. El cultivo celular sobre geles de quitosan, agarosa, colágeno y fibrina, entre otros materiales, ya ha demostrado buenos resultados. Estos materiales se han utilizado para el cultivo de células epidérmicas, corneales, endoteliales y también de epitelio uretral (Meana et al., 1998; Bach et al., 2001; Llames et al., 2004; Talbot et al., 2006).

En nuestra Tesis Doctoral hemos conseguido una buena proliferación urotelial sobre un gel mixto de fibrina y agarosa al 0,1% donde se siembran células estromales vesicales que crecen en estructura tridimensional. Este modelo estromal ya había demostrado su eficacia en otros tejidos como la mucosa oral

y la córnea (Sánchez-Quevedo et al., 2007; Alaminos et al., 2006), sin embargo es la primera vez que este biomaterial se aplica en el aparato urinario.

Nuestro modelo favorece el crecimiento urotelial que se estimula por la capa inferior de fibroblastos vesicales. La utilización de fibrina tiene una ventaja adicional y es que, al proceder del plasma sanguíneo, incorpora numerosas citoquinas y factores de crecimiento que facilitan la generación de un excelente micromedioambiente que potencia la proliferación y el desarrollo de las células utilizadas en el constructo.

Otros autores han utilizado para el cultivo de urotelio distintos biomateriales que buscan no sólo dar soporte físico sino también un ambiente adecuado en el que las células puedan nutrirse y dividirse con facilidad para conformar una correcta estructura tridimensional. Se han utilizado materiales naturales y sintéticos presentando todos unas características comunes como la porosidad, resistencia, biodegradabilidad y estructura tridimensional específica.

Tanaka et al. (2010) demostraron en un modelo experimental en conejos que el uso de pared vesical completa (en teoría el sustituto perfecto) de donante para cubrir una porción vesical producía hiperplasia del urotelio con engrosamiento del estroma y zonas inflamatorias con colonización de las células en uno y otro sentido incluso meses después del trasplante.

En general, descartado el uso de vejiga completa, se han usado tres tipos de biomateriales para la ingeniería de los tejidos génito-uritarios: materiales derivados de la naturaleza (colágeno y alginato), matrices acelulares (submucosa vesical e intestinal) y polímeros sintéticos (ácido poliglicólico, ácido poliláctico) (Atala, 2003). La biocompatibilidad de es estos materiales se ha probado en urotelio humano y células musculares vesicales (Pariante et al., 2001; Pariante et al., 2002).

En muchos estudios se ha utilizado submucosa vesical como bioestructura sobre la que multiplicar el urotelio con buenos resultados (Atala et al., 1999; Yoo et al., 1998). La técnica habitual suele ser la descelularización de vejigas

obtenidas generalmente de cadáver con microdissección posterior de la submucosa separándola de la mucosa y muscular-serosa. De esta forma se obtiene una matriz acelular de colágeno que puede implantarse directamente en el paciente siendo colonizada por tejido sano o que se puede utilizar para cultivar células uroteliales sobre ella.

Se ha demostrado en modelo animal que al implantar matrices acelulares obtenidas de segmentos de vejiga completa o estómago en una vejiga sana a modo de reconstrucción aparece neoformación vascular en la matriz de forma precoz y que a las cuatro semanas el músculo liso coloniza su interior. La superficie de estas neovejigas se cubrió además completamente por urotelio (Sutherland et al., 1996; Southgate et al., 2002).

Kundu et al. (2010) proponen una optimización de estas matrices acelulares cubriéndola con una lámina fina de polímeros. Esto favorece el crecimiento del epitelio, ya que una superficie fibrosa inhibe la proliferación de las células uroteliales. Además favorece las uniones intercelulares, disminuye la permeabilidad del tejido y mejora su función de barrera.

Sin embargo otros estudios demuestran que los resultados del uso de matrices con células del aparato urinario cultivadas son superiores al implante de matrices acelulares. Jayo et al. (2008), tras utilizar un modelo canino de cistectomía subtotal con sustitución artificial posterior, afirman que las matrices acelulares, aunque colonizadas por material celular tras su colocación, presentaban mayor cantidad de fibrosis y retracción, y un aspecto menos similar a la vejiga natural microscópicamente que aquellos injertos con células cultivadas previamente en laboratorio que presentaron resultados más fisiológicos. De esta forma el uso de constructos con células cultivadas de forma artificial parece mejorar los resultados del uso de matrices aisladas para la sustitución del tejido.

Al comparar el cultivo de células uroteliales en diferentes matrices acelulares para valorar su actividad proliferativa y viabilidad se ha demostrado que independientemente del tipo de matriz de colágeno utilizada (submucosa

intestinal o vesical) las células uroteliales presenta mejor proliferación y viabilidad utilizando medios extraídos de cultivos de fibroblastos y por tanto enriquecidos con sustancias producidas por estas células (Ram-Liebig et al., 2004).

Analizados los resultados de otros autores todo parece apuntar que una matriz como el gel de fibrina, agarosa y fibroblastos que asegure la presencia de colágeno podría suponer el sostén y el estímulo necesario para una correcta formación de urotelio y, de esta forma conseguir una matriz con células cultivadas artificialmente que constituya un sustituto eficaz y fisiológico de la vejiga.

Nuestro trabajo utilizando un estroma artificial con fibroblastos en un gel de fibrina-agarosa ha demostrado una adecuada biocompatibilidad al permitir un buen crecimiento de las células. Este crecimiento y expansión se ve limitado por el tamaño de la superficie de cultivo. Quizá podamos obtener áreas de cultivo más extensas con el uso de contenedores de mayor tamaño y por tanto consiguiendo a la vez mayor cantidad de estroma, aunque esto podría afectar a la viabilidad del implante en el vivo.

Un posible defecto que plantea el constructo obtenido es su escasa resistencia física para un futuro implante en un organismo. Sería necesario estimular la síntesis de colágeno por los fibroblastos para que formen una red de esta sustancia en el gel o el uso de alguna matriz de sujeción, tipo malla de poliglactin por ejemplo, para mejorar esta característica. El uso combinado de malla y gel de fibroblastos ya se ha realizado con éxito en otros trabajos y podría permitir su paso al sujeto vivo (De Diego et al., 2004; De Diego et al., 2006).

Después de seleccionar las células a utilizar en número suficiente y elegido el sustrato estromal más apropiado, es importante evaluar histológicamente el tejido artificial formado. Para ello en este trabajo hemos utilizado la microscopía óptica y microscopía de transmisión. Nuestros resultados revelan que la

mucosa generada en el laboratorio por Ingeniería Tisular muestra gran similitud estructural con la mucosa vesical humana nativa utilizada como control.

Por microscopía óptica podemos observar un estroma con alta presencia celular en todo el espesor y sobre la misma un epitelio monocapa con buena adhesión intercelular y con zonas en las que la confluencia de células da lugar a imágenes similares al epitelio transicional del urotelio.

En comparación al urotelio normal no podemos establecer en nuestra mucosa distintas zonas (basal, intermedia y superficial). Nuestras células aparecen aplanadas buscando la conexión intercelular y el epitelio parece una forma más inmadura de urotelio semejante al de la mucosa vesical cuando la vejiga se encuentra distendida.

La utilización de la técnica completa de inmersión para buscar unas condiciones similares a la vejiga humana en el desarrollo del urotelio podría ser la causa de haber obtenido una capa de células epiteliales en lugar de varias como en es el caso de la muestra control.

El cultivo de interfase aire-líquido sí ha demostrado favorecer la formación de distintos epitelios estratificados (Casasco et al., 2001; Sánchez-Quevedo et al., 2007). Asimismo, en el caso del urotelio, otros autores han logrado aumentar el número de capas utilizando dicha técnica (Scriven et al., 1997). Dicho aumento también se ha conseguido con el aporte exógeno en el medio de cultivo de calcio, en una concentración de 1.5 mMol/litro, configurándose un epitelio transicional urinario ortotípico (Southgate et al., 1994; Sugasi et al., 2000; Nagele et al., 2008).

El tiempo de cultivo también ha podido influir en la citoarquitectura del epitelio urotelial ya que el crecimiento tridimensional de estas células suele ser lento, una media de 30 días entre cultivo primario y formación de capas según algunos estudios (Nagele et al., 2008). Mientras que en nuestro estudio que ha

sido objeto de esta Tesis Doctoral hemos realizado el análisis de los constructos a los 7 y 14 días, con el fin de asegurar la viabilidad de nuestros sustitutos de mucosa vesical y poder realizar un análisis histológico correcto.

La utilización de cortes semifinos nos permitió valorar correctamente la presencia de las células epiteliales aplanadas sobre un gel muy rico en estructuras fibrilares y en cuyo interior destacaba la presencia de fibroblastos con abundantes prolongaciones, citoplasma denso y núcleo prominente con nucleolos. La actividad celular por tanto en el equivalente de mucosa vesical parece completa y viable.

Entre el epitelio cultivado y el gel de agarosa y fibrina con fibroblastos vesicales no hemos observado mediante microscopía óptica la formación de una membrana basal desarrollada, aunque las células epiteliales se disponen de forma lineal sobre el estroma con un límite claro de separación. En otros estudios con urotelio cultivado sobre mallas de colágeno sí se ha podido comprobar su existencia utilizando anticuerpos frente a laminina (Moriya et al., 2003).

Sin embargo al analizar las muestras con microscopio electrónico de transmisión sí destacaba en la interfase epitelio-conectiva unas zonas de condensación lineales con unas imágenes sugerentes de uniones de membrana a este nivel en la cara citoplasmática. Esta observación nos hace pensar que el urotelio inmaduro forma en algunas zonas una membrana basal a la que busca unirse desarrollando sistemas de anclaje propios de este epitelio (Matthews & Martin, 1974).

El estudio mediante microscopía electrónica de transmisión del urotelio humano artificial reveló también la presencia de complejos de unión intercelular, fundamentales en la función de este epitelio como barrera. En el citoplasma encontramos abundancia de estructuras fibrilares compatibles con un citoesqueleto algo inmaduro. La célula epitelial urotelial presenta también

microvellosidades en su cara luminal sin embargo en nuestras células no observamos su formación.

En las zonas intercelulares de nuestro epitelio destaca una gran presencia de matriz secretada y abundantes interdigitaciones celulares. Dentro de las uniones de membrana se observaron uniones estrechas y desmosomas de tipo inmaduro. La presencia de prolongaciones citoplasmáticas hacia el espacio intercelular así como abundantes uniones entre células son algo propio de este tipo de epitelio (Zhang & Frey, 2003).

Con esta técnica se observó también la riqueza del conectivo subyacente de fibrina-agarosa con abundancia de fibrillas y fibroblastos con extensas prolongaciones en cuyo interior destaca la presencia de retículo endoplásmico con vacuolas mielínicas. Se pudo comprobar también la gran actividad metabólica y secretora de estas células. El conectivo fibroso no parece organizado salvo en algunas zonas limitadas.

El resultado final del modelo tras la evaluación microscópica, tanto utilizando la microscopía óptica como el microscopio electrónico de transmisión, permite comprobar que la utilización de células uroteliales y fibroblastos obtenidos a partir de biopsias, y la utilización de un sustituto estromal de fibrina y agarosa posibilita el desarrollo de una mucosa artificial constituida por un epitelio con una buena diferenciación y por un estroma con estructura semejante a la mucosa urinaria.

El epitelio de la mucosa vesical, al igual que el resto de epitelios humanos, cumple sus funciones a través de la expresión de una serie de proteínas especializadas. Entre ellas destacan las citoqueratinas (CKs), proteínas de filamento intermedio, típicas de las células epiteliales que forman una compleja familia de 20 polipéptidos diferentes (Franke et al., 1981; Rojas et al., 1998).

Las citoqueratinas son codificadas por un elevado número de genes. Estas proteínas pueden ser encontradas en las células en diferentes combinaciones de polipéptidos tipo I, ácidos, y tipo II básicos. Como proteínas de filamento intermedio, las funciones en el epitelio de las citoqueratinas están asociadas al citoesqueleto y a las uniones intercelulares. Por este motivo son necesarias para el mantenimiento de la forma celular, integridad, morfología y cohesión entre las células epiteliales.

Se consideran excelentes marcadores de los diferentes patrones de diferenciación epitelial (Moll et al., 1982). Particularmente, la expresión de diferentes grupos de citoqueratinas parece ser específica de cada tipo de epitelio y de su momento de maduración (Raul et al., 2004).

Su estudio en diferentes epitelios formados mediante técnicas de Ingeniería Tisular se viene realizando desde hace años sirviendo de evaluación histológica del tejido formado respecto al control pudiéndose comparar la expresión de proteínas de cada uno de ellos (Moll et al., 1982; Petzoldt et al., 1994; Moriya et al., 2003; Alaminos et al., 2007).

El epitelio simple tiende a expresar CKs 7, 8, 18 y 19, mientras que el epitelio estratificado no queratinizado expresa grandes cantidades de CKs 4 y 13 en células de la capa suprabasal, y CKs 5 y 14 en las células de la capa basal (Sánchez-Quevedo et al., 2007).

El epitelio transicional o urotelio es un tipo especial de epitelio que expresa una serie de citoqueratinas comunes a distintos tipos de epitelios (simple, pseudoestratificado y estratificado). Expresa citoqueratinas 7, 8 y 18 en todas sus capas, CK 5 en la capa superficial, y CK 13 en todas sus capas salvo en la superficial.

El patrón de citoqueratinas mostrado por el urotelio es similar para vejiga adulta, uréter y pelvis con pequeñas diferencias respecto a la distribución de las mismas según el estrato basal, medio y superficial (Alonso et al., 2009).

También existen algunas diferencias entre la vejiga madura desarrollada y embrionaria (De la Rosette et al., 2002).

En nuestro estudio encontramos mucha similitud en la expresión de citoqueratinas entre la mucosa vesical humana control y la obtenida a partir del cultivo de urotelio sobre un gel con base de fibrina y agarosa con fibroblastos de vejiga humana.

En relación con las citoqueratinas de epitelio simple, las **citoqueratinas 7 y 8**, hay que señalar que su presencia está descrita en el epitelio transicional (Alonso et al., 2009), y que fueron positivas para la muestra control. Su expresión fue positiva también en nuestros epitelios de mucosa vesical artificial.

Este resultado coincide con otros autores (Scriven et al., 1997) que observa expresión moderada de CK 7 en las muestras control y también en las células obtenidas tanto de cultivos primario como en el urotelio formado sobre un estroma descelularizado. Respecto a la CK 8 encuentra una expresión baja en capas inferiores de los controles y de las muestras cultivadas, observando sin embargo una muy alta expresión en las células superficiales, al igual que en nuestro estudio.

Sugasi et al. (2000) encuentran también expresión de CKs 7 y 8 tanto en urotelio nativo como en constructos de vejiga artificial con una expresión moderada o baja en todas las capas.

Este resultado indica que el modelo de estroma de fibrina-agarosa facilita un desarrollo secuencial y progresivo en la maduración epitelial como refleja la expresión de las citoqueratinas 7 y 8.

En nuestro estudio ambos tipos de epitelio (nativo y artificial) expresaron **citoqueratina 13**. Esta citoqueratina, como hemos comentado previamente, es

un marcador de estratificación propio de epitelio pavimentoso no queratinizado (Van der Velden et al., 1999; Montenegro et al., 1998; Rojas et al., 1998).

La citoqueratina 13 aparece en todas las capas del urotelio humano de forma irregular según la localización del mismo (papila, uréter o vejiga) y su expresión suele ser negativa en la capa más superficial (Moll et al., 1988; Alonso et al., 2009). Otro aspecto importante de esta citoqueratina es que su expresión se pierde en algunos tipos de tumores vesicales según su grado y estadio (Southgate et al., 1999).

Se ha observado que el epitelio vesical tanto in vivo como in vitro es negativo para la **citoqueratina 4** (White et al., 1996), un marcador de estratificación como indicamos con anterioridad (Rojas et al. 1998). Este resultado coincide con los datos aportados en nuestro estudio ya que no se expresa en ninguna de las muestras. En ninguno de los estudios consultados se analiza la expresión de esta citoqueratina en urotelio cultivado (Petzoldt et al., 1994; Scriven et al., 1997; Sugasi et al., 2000).

Algo similar ocurre con la **filagrina**, una proteína de adhesión propia de epitelios queratinizados, que no se expresa en el urotelio nativo humano y que fue negativa en nuestras muestras control y en las mucosas obtenidas en laboratorio.

En nuestro estudio el urotelio cultivado sobre gel de fibrina y agarosa mostró ser positivo para la expresión de **involucrina**, una proteína citoplasmática relacionada con el engrosamiento de la cara interna de la membrana celular. La involucrina se expresa con mayor concentración en las capas superficiales de la epidermis pero también en la superficie del urotelio normal. Se considera por algunos autores un marcador de diferenciación urotelial alterándose su distribución en distintos tipos de tumores uroteliales como los de alto grado o los de tipo escamoso (Walts et al., 1985). La expresión de involucrina en

nuestro material se relaciona asimismo con la falta de expresión de filagrina como ha sido asimismo descrito en los epitelios malpighianos.

En relación con el complejo de citoqueratinas 5, 6, 8, 18, 10, 1 — **pancitoqueratina**— se comprobó su expresión tanto en la muestra control, posiblemente en relación a las citoqueratinas 5, 8 y 18 presentes habitualmente en el urotelio humano (Achtstätter et al., 1985), como en la mucosa artificial. Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura (Sugasi et al., 2000; Southgate et al., 1999; Scriven et al., 1997).

La expresión de este importante complejo de proteínas es utilizada por algunos autores como marcador único de la presencia de urotelio en un cultivo demostrando la eficacia o no de una técnica (Feil et al., 2006).

Al analizar la evolución en la presencia de citoqueratinas en el urotelio artificial a los 7 y 14 días de cultivo sobre el estroma de fibrina-agarosa y fibroblastos, no hemos encontrado diferencias de interés salvo una leve mayor expresión de citoqueratinas 8 y 13 a los 7 días frente a los 14.

Respecto a la relación entre patrón de citoqueratinas expresadas por el urotelio y estado de maduración del mismo De la Rosette et al. (2002) publican un trabajo en el que analizan la presencia de citoqueratinas en urotelio humano en distintas semanas de gestación y el primer año de vida. Sus principales conclusiones son que la maduración del epitelio en relación al aumento del volumen vesical produce una disminución progresiva de la expresión de CK 7 (aunque permanece presente en urotelio maduro), una pérdida de la CK 13 en la capa superficial manteniéndose en el resto de estratos y una expresión constante de CK 8 en todas las etapas.

Nuestro urotelio, con presencia en alta concentración de estos tres filamentos intermedios, sería por tanto similar a un epitelio vesical en estado inmaduro o fetal.

Aunque nuestra mucosa vesical no alcanzó en los días estudiados las capas o zonas existentes en la muestra control la expresión de citoqueratinas observada es compatible con la que presentan las células de la muestra control lo que indica la analogía del constructo desarrollado.

A nivel del **corion** pudimos observar que las muestras del constructo artificial formado sobre gel de fibrina-agarosa presentaban buena celularidad en todo su espesor con presencia de numerosos núcleos teñidos. Este nuevo material desarrollado en el laboratorio constituye por tanto una matriz biológica útil para la proliferación de fibroblastos formando un estroma viable para el crecimiento epitelial y la sustitución vesical.

En su conjunto los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral demuestran que la mucosa vesical artificial que hemos obtenido mediante técnicas de Ingeniería Tisular presenta numerosas similitudes en el epitelio y en el estroma con la mucosa vesical normal. Las pruebas realizadas demuestran la progresiva formación y maduración del epitelio en los sustitutos de mucosa vesical obtenidos en el laboratorio.

Por todo ello, consideramos que nuestro modelo de mucosa vesical artificial humana fabricada a partir de fibrina y agarosa podría ser útil en el tratamiento de diferentes patologías que afectan la integridad de la vejiga. Estudios posteriores a realizar en el contexto de un ensayo clínico determinarán la utilidad de estos tejidos en la clínica humana.

Aún nos encontramos lejos de una sustitución completa y funcional de la vejiga, pero esta nueva línea de investigación nos permite no solo trabajar hacia el reemplazo de órganos sino también en un mayor conocimiento de la fisiología de dichas estructuras y a su aplicación en otros campos como la cirugía pediátrica y la farmacología.

6. Conclusiones



De acuerdo con los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral concluimos que:

1. La metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral, permite el aislamiento y cultivo de células madre epiteliales de estirpe urotelial y estromales de estirpe fibroblástica a partir de biopsias de mucosa vesical humana, y su posterior utilización para la elaboración de constructos de mucosa vesical artificial.

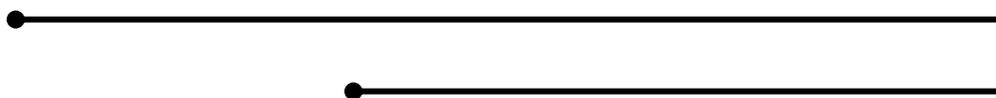
2. La asociación de biomateriales constituidos por fibrina y agarosa y de poblaciones celulares de estirpe urotelial y fibroblástica procedentes de biopsias permite la elaboración de un sustituto de mucosa vesical artificial humana similar a la mucosa vesical ortotípica.

3. La evaluación *in vitro* de la mucosa vesical artificial humana elaborada de acuerdo con la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral pone de relieve la existencia de un patrón histológico, con microscopía óptica y microscopía electrónica, constituido por un epitelio simple y un estroma mixto de fibroblastos y fibrina-agarosa que resulta ser análogo al patrón histológico ortotípico de la mucosa vesical humana, y, en consecuencia, potencialmente utilizable en los sustitutos de Ingeniería Tisular del aparato urinario.

4. La evaluación *in vitro* de la mucosa vesical artificial humana elaborada de acuerdo con la metodología desarrollada en la presente Tesis Doctoral pone de relieve, en el urotelio, la existencia de un patrón híbrido de expresión de citoqueratinas caracterizado por la presencia de citoqueratinas de epitelio simple y estratificado, y en el estroma la

existencia de un patrón de soporte biocompatible que en su conjunto configuran una mucosa vesical.

7. Bibliografía



Achtstätter T, Moll R, Moore B, Franke WW. Cytokeratin polypeptide patterns of different epithelia of the human male urogenital tract: immunofluorescence and gel electrophoretic studies. *J Histochem Cytochem.* 1985; 33:415-426.

Adams MC, Joseph DB. Reconstrucción del tracto urinario en los niños. En: Walsh, P. Campbell: *Urología.* 8ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2004. p. 2731-2790.

Aggarwal R, Pompili VJ, Das H. Genetic modification of ex vivo expanded stem cells for clinical application. *Front Biosci.* 2010; 15:854-71.

Alaminos M, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(8):3311-7.

Alaminos M, Garzon I, Sánchez- Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández Montoya A, et al. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007; 1(5):350-359.

Alonso A, Ikinger U, Kartenbeck J. Staining patterns of keratins in the human urinary tract. *Histol Histopathol.* 2009; 24:1425-1437.

Anumanthan G, Makari JH, Honea L, Thomas JC, Wills ML, Bhowmick NA, et al. Directed differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells into bladder urothelium. *J Urol.* 2008; 180(4):1778-83.

Arrabal Martín M, Ocete Martín C, Jiménez Pacheco A, Miján Ortiz JL, Pareja Vilchez M, Zuluaga Gómez A. Metodología y límites de la ureteroscopia ambulatoria. *Arch Esp Urol.* 2006; 59:261-272.

Atala, A. Recent applications of regenerative medicine to urologic structures and related tissues. *Curr Opin Urol*. 2006; 16(4):305-309.

Atala A. Regenerative medicine and tissue engineering in Urology. *Urologic Clinics of North America*. 2009; 36(2):199-209.

Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning for the regeneration of urologic organs. *Clinics in Plastic Surgery*. 2003; 30(4):649-667.

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*. 2006; 367:1241-1246.

Atala A, Freeman MR, Vacanti JP, Shepard J, Retik AB. Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle. *J Urol*. 1993; 150:608-612.

Atala A, Guzman L, Retik AB. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. *J Urol*. 1999; 162:1148-1151.

Atala A, Lanza RP. *Methods of Tissue Engineering*. 1^a ed. San Diego: Academic Press; 2002.

Atala A, Vacanti JP, Peters CA, Mandell J, Retik AB, Freeman MR. Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J Urol*. 1992; 148:658-662.

Bach AD, Bannasch H, Galla TJ, Bittner KM, Stark GB. Fibrin glue as matrix for cultured autologous urothelial cells in urethral reconstruction. *Tissue Eng*. 2001; 7(1):45-53.

Banks-Schlegel S, Green H. Formation of epidermis by serially cultivated human epidermal cells transplanted as an epithelium to athymic mice. *Transplantation*. 1980; 29(4):308-311.

Benson MC, Olsson CA. Derivación urinaria continente cutánea. En: Walsh, P. Campbell: Urología. 8ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2004. p. 4151-4197.

Bhargava S, Chapple CR, Bullock AJ, Layton C, Macneil S. Tissue-engineered buccal mucosa for substitution urethroplasty. *BJU International*. 2004; 93:807-811.

Breuer CK, Schinoka T, Tanel RE. Tissue engineering lamb heart valve leaflets. *Biotch Bioeng*. 1996; 50:562-567.

Campos A. Cuerpo, histología y medicina. De la descripción microscópica a la ingeniería tisular. Discurso de ingreso. Real Academia Nacional de Medicina. 2004.

Casasco A, Casasco M, Zerbinati N, Icaro Cornaglia A, Calligaro A. Cell proliferation and differentiation in a model of human skin equivalent. *Anat Rec*. 2001; 264:261-272.

Chung HY, Atalla T, Atala A. Epithelial cell culture: Kidney. En: Atala A, Lanza RP. *Methods of Tissue Engineering*. 1ª ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 229-233.

Cilento BG, Freeman MR, Scneck FX, Retik AB, Atala A. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *J Urol*. 1994; 152(2):665-670.

De Boer W, Van der Kwast TH, Chopin DK. A physiological and morphological in vitro model for normal human urothelium cultured on BD Falcon cell culture inserts. *BD Biosciences*. 2008; Technical Bulletin 412.

De Diego E, Roca A, Villanueva A, Meana A, Gómez S, Martín B, et al. Reconstrucción tridimensional in vitro de mucosa vesical humana. *Actas Urol Esp*. 2006; 30(2):195-205.

De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Meana A, Gómez S. Estado actual de la ingeniería de tejidos en urología. Revisión de la literatura. *Actas Urol Esp.* 2004; 28(9):636-645.

De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Mana A, Gómez S, et al. Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado in vitro. *Actas Urol Esp.* 2004; 28(10):714-731.

De la Rosette J, Smedts F, Schoots C, Hoek H, Laguna P. Changing patterns of keratin expression could be associated with functional maturation of the developing human bladder. *J Urol.* 2002; 168:709-717.

Elbahnasy AM, Shalhav A, Hoenig DM, Figenschau R, Clayman RV. Bladder wall substitution with synthetic and non-intestinal organic materials. *J Urol.* 1998; 159(3):628-637.

Elkassaby A, Al-Kandari AM, Shokeir A. The surgical management of obstructive stents used for urethral strictures. *J Urol.* 2007; 178(1):204-7.

Elkassaby AW, Retik AB, Yoo JJ, Atala A. Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *J Urol.* 2003;169(1):170-173.

Falke GF, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr.* 2000; 98(2):103-113.

Feil G, Christ-Adler M, Maurer S, Corvin S, Rennekampff HO, Krug J, et al. Investigations of urothelial cells seeded on commercially available small intestine submucosa. *European Urology.* 2006; 50:1330-1337.

Fossum M, Nordenskjöld A. Tissue-engineered transplants for the treatment of severe hypospadias. *Horm Res Paediatr.* 2010; 73(2):148-52.

Franke WW, Schiller DL, Moll R, Winter S, Schmid E, Engelbrecht I, et al. Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytoquertin polypeptides in ephitelial cells and tissues. *J Mol Biol.* 1981; 153(4):933-959.

García del Moral, R. Laboratorio de Anatomía Patológica. 1ª ed. Madrid: Ed. McGraw-Hill; 1993.

Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, et al. In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontal Res.* 2009; 44(5):588-597.

Geneser F. Histología. 2ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 1990.

Gey GO, Koffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research.* 1952; 12: 264-265.

Guerado E, Díaz-Martín A, Arrabal MP, Cifuentes M, Andrades JA, Becerra J. Células madre e ingeniería tisular ósea. Bases celulares y perspectivas terapéuticas. *Rev Ortop Traumatol.* 2003; 47:362-374.

Hafez AT, Afshar K, Bägli DJ, Bahoric A, Aitken K, Smith Cr, et al. Aerosol transfer of bladder urothelial and smooth muscle cells onto demucosalized colonic segments for porcine bladder augmentation in vivo: a 6-week experimental study. *J Urol.* 2005; 174:1663-1667.

Herz F, Gazivoda P, Papenhausen PR, Katsuyama J, Koss LG. Normal human urothelial cells in culture. Subculture procedure, flow cytometric and chromosomal analyses. *Lab Invest.* 1985; 53(5):571-574.

Hilt JZ, Byrne ME. Biomedical applications: Tissue Engineering, therapeutic devices, and diagnostic systems. En: Schwarz JA. *Dekker encyclopedia of*

nanoscience and nanotechnology. Nueva York: Marcel Dekker, Inc.; 2004. p. 247-261.

Hotges SJ, Atala A. La medicina regenerativa y la vejiga neurógena. *Current Urology Reports*; Edición en Español. 2008; 7:43-50.

Humes HD. Renal replacement devices. En: Lanza RP, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering*. 2ª ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 647-653.

Humes HD, Buffington DA, Lou L, Abrishami S, Wang M, Xia J, et al. Cell therapy with a tissue-engineered kidney reduces the multiple-organ consequences of septic shock. *Crit. Care Med*. 2003; 31(10):2421-8.

Humes HD, Buffington DA, MacKay SM, Funke AJ, Weitzel WF. Replacement of renal function in uremic animals with a tissue-engineered kidney. *Nature biotechnology*. 1999; 17:451-455.

Humes HD, Fissell WH, Weitzel WF. The bioartificial kidney in the treatment of acute renal failure. *Kidney International*. 2002; 61(80):121-125.

Hutton KA, Trejdosiewicz L, Thomas DF, Southgate J. Urothelial tissue culture for bladder reconstruction: an experimental study. *J Urol*. 1993; 150:721.

Ikada Y. *Tissue Engineering. Fundamentals and applications*. 1ª ed. Oxford: Elsevier; 2006.

Jayo MJ, Jain D, Wagner BJ, Bertram TA. Early cellular and stromal responses in regeneration versus repair of a mammalian bladder using autologous cell and biodegradable scaffold technologies. *J Urol*. 2008; 180:392-7.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histología básica*. 6ª ed. Barcelona: Masson; 2005.

Kershen RT, Atala A. New advances in injectable therapies for the treatment of incontinence and vesicoureteral reflux. *Urol Clin North Am.* 1999; 26(1):81-94.

Kim Bs, Mooney DJ, Atala A. Genitourinary system. En: Lanza RP, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering.* 2ª ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 655-666.

Khünel W. *Color Atlas of Cytology, Histology, and Microscopic Anatomy.* 4ª ed. Nueva York: Thieme Medical; 2003.

Koh CJ, Atala A. Tissue engineering for urinary incontinence applications. *Minerva Ginecol.* 2004; 56:371-378.

Kropp BP, Cheng EY, Lin HK, Zhang Y. Reliable and reproducible bladder regeneration using unseeded distal small intestinal submucosa. *J. Urol.* 2004; 172:1710-1713.

Kundu AK, Gelman J, Tyson DR. Composite thin film and electrospun biomaterials for urologic tissue reconstruction. *Biotechnology and bioengineering.* 2011; 108(1):207-215.

Lai JY, Atala A. Epithelial cell culture: Urothelium. En: Atala A, Lanza RP. *Methods of Tissue Engineering.* 1ª ed. San Diego: Academic Press; 2002. p. 243-246.

Landa HM, Moorhead JD. Detrusorectomy. *Probl Pediatr Urol.* 1994; 8:204-209.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering: the challenges ahead. *Sci Am.* 1999;280(4):86-89.

Lanza RP, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering.* 2ª ed. San Diego: Academic Press; 2002.

Lauer G, Schimming R, Frankenschmidt A. Intraoral wound closure with tissue-engineered mucosa: new perspectives for urethra reconstruction with buccal mucosa grafts. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 107(1):25-33.

Liebert M, Wedemeyer G, Chang JH, Stein JA, Mckeever PE, Carey TE, et al. Comparison of antigen expression on normal urothelial cells in tissue section and tissue culture. *J Urol*. 1990; 144(5): 1288-1292.

López-Sánchez C, Climent S, García-Martínez V. Anatomía del aparato génitourinario. En: Jiménez Cruz JF, Rioja Sanz LA. *Tratado de Urología*. 2ª ed. Barcelona: Prous Science; 2006. p. 21-46.

Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004;77(3):350-5.

Mansbridge J. Commercial considerations in tissue engineering. *J Anat*. 2006; 209:527–532.

Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 2004; 22(2):80-86.

Martínez Agulló E, Gómez Pérez L, Jiménez Cruz JF. Fisiología vésicouretral. En: Jiménez Cruz JF, Rioja Sanz LA. *Tratado de Urología*. 2ª ed. Barcelona: Prous Science; 2006. p. 79-95.

Matthews JL, Martin JH. *Atlas de Histología y ultraestructura humanas*. 1ª ed. Barcelona: Salvat editores; 1974.

Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 1998; 24(7):621-30.

Miranda B, Matersanz R, Fernández-Represa JA. Historia del trasplante renal en España. *Clínicas urológicas de la Complutense*. 1999; 7:15-29.

Moll R, Achtstätter T, Becht E, Balcarova-Ständer J, Ittensohn M, Franke WW. Cytokeratins in normal and malignant transitional epithelium. *American Journal of Pathology*. 1988; 132:123-144.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytoqueratin: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982; 31(1):11-24.

Montenegro MA, Ibarra GC, Rojas M. Expresión de citoqueratinas en el epitelio oral de la mucosa gingival humana y de ratón. *Rev Chil Anat*. 1998; 16(2):211-217.

Monti PR, Lara RC, Dutra MA. New techniques for construction of efferent conduits based on the Mitrofanoff principle. *Urology*. 1997; 49:112.

Mora S. Células troncales embrionarias y terapia celular en diabetes mellitus y en enfermedades urológicas. En: *Proyecto Genoma Humano. Terapia con células madre. Aplicación en Urología*. 1ª ed. Málaga: Imprenta Montes; 2009. p. 27-46.

Moriya K, Kakizaki H, Murakumo M, Watanabe S, Chen Q, Nonomura K, et al. Creation of luminal tissue covered with urothelium by implantation of cultured urothelial cells into the peritoneal cavity. *The Journal of Urology*. 2003;170(6):2480-2485.

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Kidney transplantation between 7 pairs of identical twins. *Ann Surg*. 1958; 3(1):3.

Nagele U, Maurer S, Feil G, Bock C, Krug J, Sievert KD, et al. In vitro investigations of tissue-engineered multilayered urothelium established from bladder washings. *European Urology*. 2008; 54:1414-1422.

Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ., Atala A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 1999; 17(2):149-155.

Ottamasathien S, Williams K, Franco OE, Thomas JC, Saba K, Bhowmick NA, et al. Bladder tissue formation from cultured bladder urothelium. *Developmental Dynamics.* 2006; 235:2795-2801.

Orwin EJ, Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 2000; 6(4):307-19.

Osman Y, Shokeir A, Gabr M, El-Tabey N, Mohsen T, El-Baz M. Canine ureteral replacement with long acellular matrix tube: is it clinically applicable?. *J Urol.* 2004; 172(3):1151-1154.

Pariente JL, Bordenave L, Bareille R. First use of cultured human urothelial cells for biocompatibility assessment: application to urinary catheters. *J Biomed mater Res.* 1998; 40(1):31-39.

Pariente JL, Bordenave L, Bareille R, Baquey C, Le Guillou M. Cultured differentiated human urothelial cells in the biomaterials field. *Biomaterials.* 2000; 21(8):835-839.

Pariente JL, Kim BS, Atala A. In vitro biocompatibility assessment of naturally-derived and synthetic biomaterials using normal human urothelial cells. *J Biomed Mater Res.* 2001; 55:33–39.

Pariente JL, Kim BS, Atala A. In vitro biocompatibility evaluation of naturally derived and synthetic biomaterials using normal human bladder smooth muscle. *J Urol.* 2002; 167:1867–1871.

Pastor-Navarro T, Beamud-Cortés M, Fornas-Buil E, Moratalla-Charcos LM, Osca-García JM, Gil-Salom M. Células madre y medicina regenerativa en urología, 2ª parte: urotelio, vejiga, uretra y próstata. *Actas Urol Esp.* 2010; 34(7):592-597.

Petzoldt JL, Leigh IM, Duffy PG, Masters JR. Culture and characterisation of human urothelium in vivo and in vitro. *Urol Res.* 1994; 22:67-74.

Puelacher WC, Kim SW, Vacanti JP, Schloo B, Mooney D, Vacanti CA. Tissue-engineered growth of cartilage: the effect of varying the concentration of chondrocytes seeded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994;23(1):49-53.

Ram-Liebig G, Meye A, Hakenberg OW, Haase M, Baretton G, Wirth MP. Induction of proliferation and differentiation of cultured urothelial cells on acellular biomaterials. *BJU International.* 2004; 94:922-927.

Raul U, Sawant S, Dange P, Kalraiva R, Ingle A, Vaidya M. Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype. *Int J Cancer.* 2004; 111(5):662-668.

Retik AB, Borer JG. Hipospadias. En: Walsh, P. Campbell: *Urología.* 8ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2004. p. 2489-2540.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinising colonies from single cells. *Cell.* 1975; 6:331-334.

Riedela I, Liang FX, Deng FM, Liyu T, Kreibich G, Wu XR, et al. Urothelial umbrella cells of human ureter are heterogeneous with respect to their uroplakin composition: different degrees of urothelial maturity in ureter and bladder?. *European journal of cell biology.* 2005; 84: 393-405.

Rietze RL, Valcanis H, Brooke GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*. 2001; 412:736-9.

Rodríguez A, González A, Suárez G, Bonelli C, Lorenzo J, Cuerpo MA. Sustitución parcial del uréter por un segmento de íleon tratado según el procedimiento de Monti. *Actas Urol Esp*. 2005; 29(6):607-610.

Rodríguez-Pardo VM. Células madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. *Universitas Scientiarum*. 2005; 10(1):5-14.

Rojas M, Martínez-García F, Cobo P, Palacios J, Nistal M, Regadera J. Keratins: Biología Celular y Significado Funcional Normal y Patológico. *Rev Chil Anat*. 1998; 16:15-31.

Romagnoli G, De Luca M, Faranda F, Franzi A, Cancedda R. One-step treatment of proximal hypospadias by the autologous graft of cultured urethral epithelium. *J Urol*. 1993; 150:1204-1207.

Roth CC, Kropp BP. Avances recientes en la ingeniería tisular urológica. *Current Urology Reports*. Edición en Español. 2009; 8:47-53.

Sánchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol*. 2007; 22(6):631-640.

Schaafsma HE, Ramaekers FC, Van Muijen GN, Ooms EC, Ruitter DJ. Distribution of cytokeratin polypeptides in epithelia of the adult human urinary tract. *Histochemistry*. 1989; 91:151-159.

Schultheiss D, Gabouev A, Cebotari S, Tudorache I, Walles T, Schlote N, et al. Biological vascularized matrix for bladder tissue engineering: matrix

preparation, reseeded technique and short-term implantation in a porcine model. *J Urol.* 2005; 173(1):276-280.

Scriven SD, Booth C, Thomas DF, Trejdosiewicz LK, Southgate J. Reconstitution of human urothelium from monolayer cultures. *The Journal of Urology.* 1997; 158(3):1147-1152.

Skalak R, Fox F. *Tissue Engineering.* New York: Liss; 1988.

Snow BW, Cartwright PC, Unger K. Tunica vaginalis blanket wrap to prevent urethrocutaneous fistula: an 8-year experience. *J Urol.* 1995; 153:472-473.

Southgate J, Harden P, Trejdosiewicz LK. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol.* 1999; 14(2):657-654.

Southgate J, Hutton KA, Thomas DF, Trejdosiewicz LK. Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab Invest.* 1994;71(4):583-594.

Southgate J, Kennedy W, Hutton KA, et al. Expression and in vitro regulation of integrins by normal human urothelial cells. *Cell Adhes Commun.* 1995; 3:231.

Southgate J, Masters J, Trejdosiewicz LK. Culture of human urothelium. En: Freshney RI, Freshney MG. *Culture of epithelial cells.* 2^a ed. Nueva York: Wiley-Liss; 2002. p. 381-400.

Stanasel I, Mirzazadeh M, Smith JJ. Bladder tissue engineering. *Urol Clin N Am.* 2010; 37:593-599.

Studer UE, Danuser H, Hochreiter W, Springer JP, Turner WH, Zingg EJ. Summary of ten years experience with an ileal low pressure bladder substitute combined with an afferent tubular isoperistaltic segment. *World J Urol.* 1996; 14:29.

Studer UE, Zingg EJ. Ileal orthotopic bladder substitutes: What we have learned from 12 years? Experience with 200 patients. *Urol Clin North Am.* 1997; 24:781-793.

Sugasi S, Lesbros Y, Bisson I, Zhang YY, Kucera P, Frey P. In vitro engineering of huma stratified urothelium: Analysis of its morphology and function. *J Urol.* 2000; 164:951-957.

Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, Cunha G. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *The Journal of Urology.* 1996; 156(1):571-577.

Talbot M, Carrier P, Giasson CJ, Deschambeault A, Guérin SL, Auger FA, et al. Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis.* 2006; 12:65-75.

Tanaka ST, Thangappan R, Eandi JA, Leung KN, Kurzrock EA. Bladder wall transplantation long-term survival of cells: implications for bioengineering and clinical application. *Tissue Eng.* 2010; 16(6):2121-7.

Tarrado X, Rodó J, Sepúlveda JA, García Aparicio L, Morales L. Derivación urinaria continente: principio de Mitrofanoff. *Cir Pediatr.* 2005; 18:32-35.

Trias I, Orsola A, Español I, Vidal N, Raventós CX, Bucar S. Carcinoma urotelial de vejiga estadio T1: subestadiaje, patrones morfológicos de invasión y su significado pronóstico. *Actas Urol Esp.* 2007; 31(9):1002-1008.

Truschel ST, Ruiz WG, Shulman T, Pilewski J, Suni T, Zeidel ML, et al. Primary uroepithelial cultures. A model system to analyze umbrella cell barrier function. *The journal o f biological chemistry.* 1999; 274(21):15020–15029.

Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006; 10(3):569-576.

Vacanti CA, Kim W, Upton J, Vacanti MP, Mooney D, Schloo B. Tissue-engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc.* 1993;25(1):1019-21.
Vacanti CA, Mikos AG. Letter from the editors. *Tissue Eng.* 1995;1(1):1-2.

Van der Velden LA, Manni J, Ramaekers FC, Kuijpers W. Expression of intermediate filament proteins in benign lesions of the oral mucosa. *Eur Arch Otolaryngol.* 1999; 256(10):514-519.

Veranic P, Romih R, Jezernik K. What determines differentiation of urothelial umbrella cells?. *European journal of Cell Biology.* 2004; 83(1): 27-34.

Walsh, P. Campbell: *Urología.* 8ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana; 2004.

Walters AE, Said J, Siegel MB, Banks-Schlegel S. Involucrin, a marker of squamous and urothelial differentiation. An immunohistochemical study on its distribution in normal and neoplastic tissues. *J Pathol.* 1985; 145(4):329-340.

Welsch U. *Histología Sobotta.* 5ª ed. Madrid: Marbán Libros;1999.

White SJ, Masters J, Woolf A. Renal and bladder epithelial cells. En: Harris A. *Epithelial cell culture.* 1ª ed. New York: Cambridge University Press; 1996. p. 58-78.

Wilkinson CD. Making structures for cell engineering. *European Cells and Materials.* 2004; 8:21-26.

Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology.* 1998; 51(2):221-225.

Zhang Y, Frey P. Growth of cultured human urothelial cells. En: Atala A, Slade D. *Bladder disease.* 1ª ed. New York: Kluwer Academic; 2003. p. 907-919.

Zhang Y, Ludwikowski B, Hurst R, Frey P. Expansion and long-term culture of differentiated normal rat urothelial cells in vitro. *In vitro cellular & developmental biology. Animal.* 2001; 37(7):419-429.

Zhang Y, Ludwikowski B, Hurst R, Frey P, Zhang Y, McNeill E, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J Urol.* 2008; 180(5):2226-2233.

Zhu WD, Xu YM, Feng C, Fu Q, Song LJ, Cui L. Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. *World J Urol.* 2010; 28(4):493-8.