

ENCUENTROS CON LA
CIENCIA
Del macrocosmos al microcosmos



Los contenidos de este libro se publican bajo la licencia
Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas 3.0
de **Creative Commons**
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>)

www.encuentrosconlaciencia.es

Fabricación de tejidos humanos en el laboratorio: una alternativa al trasplante de órganos

Miguel Alaminos Mingorance, *investigador de la Fundación Hospital Clínico y Departamento de Histología. Universidad de Granada.*

La ingeniería tisular constituye una nueva área de la biotecnología cuyo objetivo es la fabricación de tejidos humanos en el laboratorio. Los tejidos generados mediante estas técnicas, denominados *equivalentes* o *constructos tisulares*, presentan una enorme utilidad clínica para la sustitución de tejidos y órganos humanos dañados por diferentes enfermedades y patologías (Langer y Vacanti, 1993; Nerem y Sambanis, 1995).

Durante los últimos años, la ingeniería tisular ha experimentado un desarrollo espectacular. Las razones que justifican este hecho son diversas. En primer lugar, la escasez de donantes de órganos y el aumento del número de enfermedades que requieren de un trasplante, han generado un aumento continuo de las listas de espera en la cirugía de todo tipo de trasplantes. La posibilidad de fabricar tejidos y órganos en el laboratorio constituye, en principio, una fuente inagotable de este tipo de estructuras. En segundo lugar, la fabricación de tejidos en el laboratorio mediante ingeniería tisular permitiría diseñar tejidos y órganos *a la carta*, es decir, estructuras biológicas cuyas características inmunológicas serían idénticas a las de una persona necesitada de estos tejidos. De este modo, frente a los trasplantes de órganos procedentes de donantes vivos o cadáveres, la implantación de constructos tisulares y orgánicos en un paciente no estaría sujeta a ningún tipo de rechazo o incompatibilidad inmunológica. Por este mismo motivo, el receptor de estos tejidos desarrollados en el laboratorio no estaría sometido a la necesidad de recibir tratamiento inmunosupresor de por vida para evitar el rechazo del órgano trasplantado (Sher *et al*, 1983).

Por otro lado, los tejidos generados en el laboratorio mediante ingeniería tisular deben cumplir unos criterios mínimos de viabilidad y funcionalidad. Para ello, el constructo debe ser biocompatible, lo cual significa que el órgano implantado debe adaptarse a la zona receptora y llevar a cabo las funciones específicas de ese tejido sin generar ningún tipo de respuesta inflamatoria local. En ocasiones, una respuesta inflamatoria independiente de la respuesta inmune puede hacer fracasar el implante. Esto es especialmente importante, por ejemplo, en el caso de sustitutos de vasos sanguíneos que produzcan fenómenos de trombosis por no ser biocompatibles.

Fabricación de tejidos en el laboratorio mediante ingeniería tisular

La fabricación de sustitutos tisulares mediante ingeniería tisular se basa en dos pilares fundamentales (Bell, 1995):

a) Obtención de una población de células humanas viables

a.1. Selección de una fuente de células. A la hora de fabricar un equivalente tisular, lo primero que se necesita es seleccionar una adecuada fuente de células humanas viables. Para la elaboración de los tejidos y órganos deseados, estas células deben tener una adecuada capacidad de proliferación, y estar libres de contaminación por agentes patógenos.

Existen dos tipos de fuentes celulares humanas que se pueden utilizar en ingeniería tisular. Por un lado, las células autólogas son aquellas que proceden del propio paciente, por lo que no producen respuesta de rechazo inmunológico cuando se implantan en el organismo. Por otro lado, las células alogénicas o heterólogas pertenecen a otro individuo diferente, por lo que su implantación en el paciente puede producir una respuesta inmunológica de rechazo. En realidad, cuando se implantan en un individuo, estas células heterólogas se comportan como un trasplante de órganos entre dos personas diferentes. Ya sean de origen autólogo o heterólogo, la mayoría de las células que se obtienen para la construcción de órganos y tejidos mediante ingeniería tisular son células madre, como veremos más adelante.

a.2. Función celular. Una vez obtenidas las células humanas, es importante comprobar que estas células mantienen las características funcionales deseadas, es decir, que funcionan como el investigador quiere que funcionen. De nada serviría obtener una población de células de un tipo determinado si esas células no funcionan correctamente. Para inducir el funcionamiento normal de las células cultivadas, el investigador puede recurrir a la manipulación del medio en el que se cultivan las células o bien a la manipulación genética de las mismas. Este último punto es el más controvertido, puesto que la actual legislación limita enormemente la utilización clínica de células modificadas genéticamente.

a.3. Tecnología de células madre. Las células madre son la principal fuente de células para la ingeniería tisular y la terapia regenerativa (Solter and Gearhart, 1999). Atendiendo a su origen, las células madre se clasifican en *embrionarias* (aisladas a partir de la masa celular interna de embriones humanos en fases tempranas del desarrollo) y *adultas* (aisladas a partir de células indiferenciadas de tejidos adultos, no de embriones).

Atendiendo a su potencialidad (capacidad de generar unos tipos de tejidos u otros), las células madre pueden ser *totipotenciales*, *multipotenciales*, *pluripotenciales* o *unipotenciales*. Las células *totipotenciales* son aquellas que son capaces de generar cualquier tipo de tejido e incluso un organismo completo. Por otro lado, aquellas células destinadas a la generación de cualquier tipo de tejido, pero no de un organismo completo, se denominan *pluripotenciales*, mientras que las células *multipotenciales* ya están dirigidas hacia un tipo de tejido específico (por ej. la médula ósea). Finalmente, las células *unipotenciales* sólo pueden diferenciarse hacia un tipo específico de células. La mayoría de las células madre adultas son *unipotenciales* o *multipotenciales*, mientras que las *totipotenciales* y las *pluripotenciales* son de origen embrionario.

Desde un punto de vista clínico, las células madre adultas (unipotenciales o multipotenciales) son las que presentan mayores posibilidades, puesto que, como ya hemos mencionado, se pueden extraer del propio paciente y no estarían sometidas a rechazo inmunológico. Estas células madre existen en todos los tejidos del organismo adulto y son las encargadas de regenerar estos tejidos y de reparar los posibles daños que se producen en los mismos. Por otro lado, la utilización de

células madre embrionarias (totipotenciales o pluripotenciales) presenta un enorme interés clínico, puesto que, en el futuro, es posible que podamos fabricar cualquier tipo de órgano (corazón, riñón, hígado, etc.) a partir de estas células. En tal caso, el problema fundamental seguirá siendo su origen heterólogo: los tejidos fabricados a partir de células de un embrión, no son idénticos a los de ningún paciente adulto y, por tanto, su implantación clínica en el paciente conllevaría el riesgo de rechazo inmunológico. Además, el uso de este tipo de células embrionarias está sujeto a una serie importante de limitaciones éticas y legales.

Una limitación importante para el uso de células madre en ingeniería tisular es nuestro desconocimiento de gran parte de los mecanismos íntimos que regulan la diferenciación celular. Aunque gran parte de las funciones celulares ya se conocen, aún estamos lejos de conocer cómo una célula madre se transforma en una célula adulta de un tipo específico, adquiriendo las características morfológicas y funcionales de ese tipo celular. Sin embargo, para obtener el máximo potencial de las células madre, deberíamos comprender cómo una célula madre se diferencia y se transforma en una célula específica. De este modo, podríamos inducir la diferenciación de una célula madre hacia un tipo celular concreto y, por ejemplo, canalizar una célula madre hacia una célula del corazón.

a.4. Aislamiento de las células. Una vez seleccionada una fuente de células, es necesario aislar y cultivar esas células en condiciones adecuadas. En la mayoría de los casos, la construcción de tejidos mediante ingeniería tisular se basa en la extracción inicial de un pequeño fragmento de tejido sano (*biopsia*) procedente de un paciente. A partir de ese fragmento tisular, y utilizando diferentes sustancias (*enzimas*) que permiten fragmentar y disgregar el tejido, el investigador puede aislar y obtener las células madre adultas que existen en ese tejido, mantenerlas en condiciones específicas de cultivo e inducir su multiplicación en el laboratorio. La utilización de células madre adultas aporta una indudable ventaja: las células madre presentan una gran capacidad de proliferación, lo cual permite obtener un gran número de células a partir de un pequeño fragmento de tejido original (Figura 1).

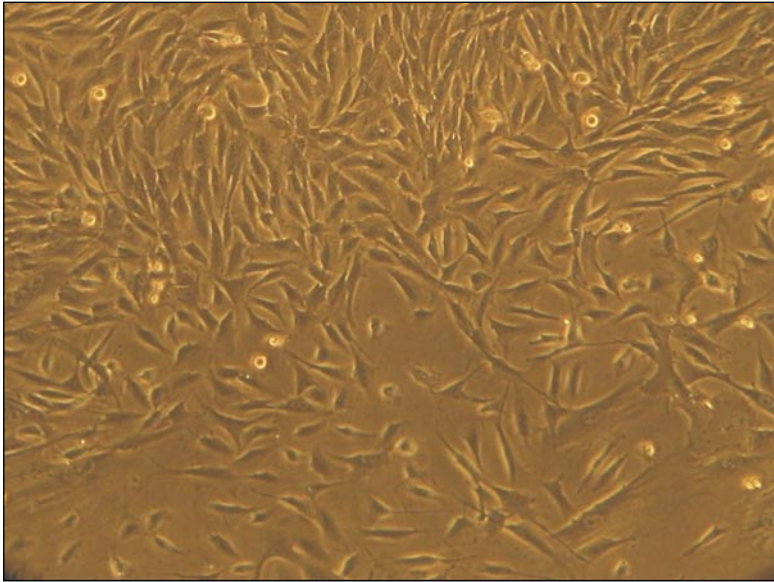


Figura 1. **Células humanas extraídas a partir de un pequeño fragmento de biopsia de mucosa oral.** Estas células muestran una elevada capacidad de crecimiento y proliferación en cultivo y permiten obtener una gran cantidad de células a partir de una población celular inicial muy reducida.

b) Tecnología de constructos

Una vez obtenida una población de células viables, el siguiente paso es desarrollar un modelo tridimensional (*constructo tisular*), en el cual esas células se organicen en una arquitectura espacial con características funcionales similares a las del tejido que queremos sustituir. Desde antiguo, es bien sabido que todos los tejidos y órganos que conforman el cuerpo humano están constituidos por una estructura de sostén denominada *estroma*, que funcionaría como un soporte o andamio para las células existentes en dichos tejidos y órganos. Aunque la población celular es muy importante, también lo es el estroma, pues las células no pueden vivir y desarrollarse en ausencia de éste. Por este motivo, la construcción de tejidos artificiales en el laboratorio debe reproducir este tipo de arquitectura tridimensional en la que las células estarían inmersas en un estroma equivalente al estroma del tejido nativo o natural que se quiere sustituir.

Los materiales más utilizados para formar este modelo tridimensional en el laboratorio son, fundamentalmente, las mallas o los geles de materiales biológicos como el colágeno o la fibrina, así como las esponjas de compuestos sintéticos como el ácido poliláctico o poliglicólico. Utilizando estas sustancias, es posible cultivar las células previamente aisladas en el seno de estos soportes o andamios para, de este modo, fabricar tejidos y órganos artificiales muy similares a los naturales.

Para fabricar un constructo tisular, se utiliza una mezcla de estos compuestos, en especial colágeno o fibrina, con un número determinado de células vivas obtenidas a partir de un fragmento de biopsia de un tejido. A continuación, se provoca la solidificación de la mezcla (fenómeno denominado *polimerización*) para generar un tejido consistente en un estroma artificial con células vivas en su interior. Posteriormente, y puesto que la mayor parte de los tejidos y órganos presentan estructuras tridimensionales complejas, con varias capas de células en su interior y en su superficie, en la mayoría de los casos es necesario crear varias capas de células en la superficie y sobre la base del tejido creado para reproducir la estructura del tejido original en el constructo tisular.

La ingeniería tisular de la córnea como modelo

La córnea constituye la capa protectora externa del ojo. A pesar de ser una estructura fundamental para el funcionamiento de la visión, la córnea es el asiento de un gran número de patologías y enfermedades que, en muchas ocasiones, requieren la sustitución de la córnea dañada por otra sana. Sin embargo, el trasplante de córnea, como cualquier otro trasplante, depende de la disponibilidad de donantes y está sujeto a la posibilidad de rechazo, transmisión de enfermedades, etc.

Una de las características esenciales de la córnea es su transparencia, la cual depende muy estrechamente de la ausencia de vasos sanguíneos en esta estructura. Como órgano avascular, la córnea es un excelente candidato para la ingeniería tisular. Un constructo corneal debe llevar a cabo de forma eficiente todas las funciones de la córnea,

incluyendo la de la barrera frente a agentes externos y la refracción de la luz. Además, debe tener una forma y curvatura adecuadas y debe poder ser implantado quirúrgicamente.

Utilizando técnicas de ingeniería tisular, diferentes investigadores han intentado desarrollar un sustituto eficaz de la córnea que pudiera implantarse sin las desventajas del trasplante de córnea heterólogo (Nishida *et al*, 2003; Reichl *et al*, 2004). Con este objetivo, algunos investigadores han propuesto diferentes técnicas de ingeniería tisular para la construcción de una córnea de origen animal, como un primer paso en el desarrollo de un sustituto corneal humano (Minami *et al*, 1993; Schneider *et al*, 1999; Zieske *et al*, 1994). Sin embargo, aunque algunos científicos han desarrollado sustitutos que imitan parcialmente a la córnea humana (Griffith *et al*, 1999), hasta la fecha no se ha conseguido desarrollar un constructo corneal de espesor completo con las características histológicas y funcionales de la córnea humana.

En primer lugar, es necesario obtener los tres tipos de células que constituyen básicamente la córnea: células epiteliales (las más superficiales), queratocitos (las de la capa intermedia de la córnea) y células endoteliales corneales (las más internas). La obtención de los dos primeros tipos de células se puede realizar a partir de pequeñas biopsias procedentes de la zona periférica de un ojo sano (*limbo esclerocorneal*). El cultivo en laboratorio de las células endoteliales corneales humanas, sin embargo, es aún muy difícil de llevar a cabo, especialmente a partir de córneas de personas adultas.

La mayoría de los sustitutos corneales se fabrican a partir de cultivos tridimensionales de las tres estirpes celulares de la córnea, sobre estromas artificiales fabricados con diferentes tipos de biomateriales, sobre todo el colágeno tipo I y la fibrina (Nishida, 2003) (Figura 2). En este caso, es importante reproducir la estructura de la córnea normal y generar un sustituto tisular con una capa única de células endoteliales en su base, un estroma con queratocitos en su capa media y una capa estratificada de células epiteliales corneales en su superficie. Todo el conjunto, además, debe presentar un adecuado nivel de consistencia y una adecuada transparencia (Figura 3).

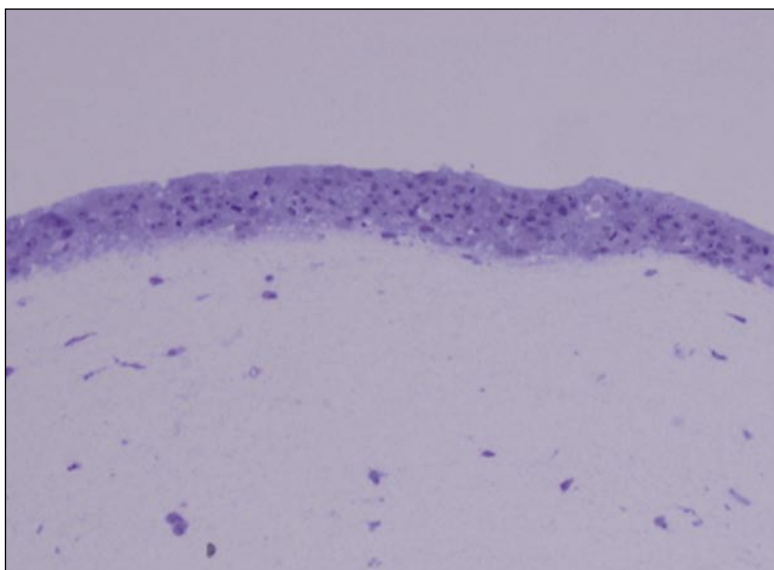


Figura 2. **Análisis microscópico de una córnea fabricada en el laboratorio mediante ingeniería tisular.** Al igual que las córneas normales, los sustitutos corneales constan de varias capas de células y de una matriz extracelular de sostén (estroma).

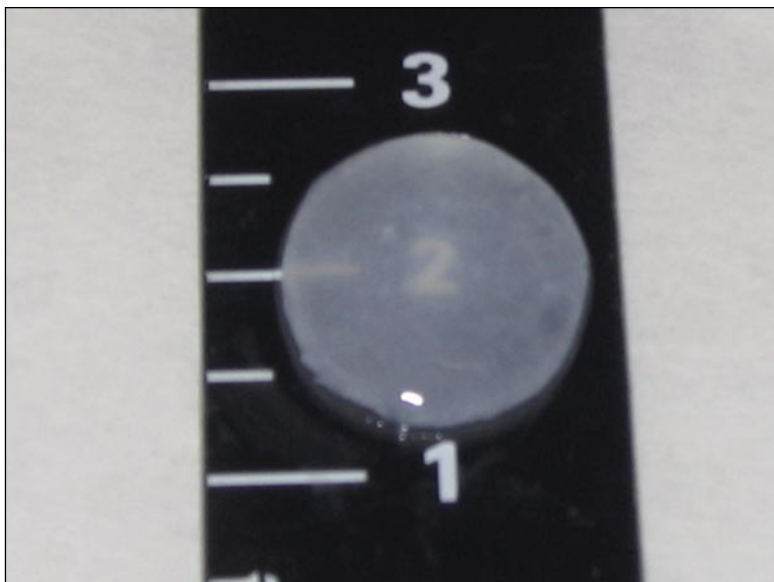
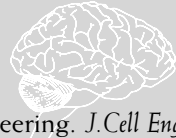


Figura 3. **Sustituto de la córnea generado en el laboratorio mediante ingeniería tisular.** Como puede apreciarse, la córnea fabricada presenta un grado aceptable de transparencia, permitiendo la observación de los números de la referencia situada bajo la córnea artificial.

En los últimos años, diversos investigadores han tratado de desarrollar modelos de cultivos celulares que tratan de reconstruir las diferentes barreras del ojo (Hornof, 2005). La fabricación de equivalentes corneales de espesor completo presentaría un enorme potencial médico y científico. En primer lugar, como ya se ha indicado, la obtención de córneas artificiales a partir de pequeñas biopsias procedentes de un paciente contribuiría a solucionar un gran número de patologías de la córnea sin los problemas derivados del trasplante heterólogo (rechazo, riesgo de infecciones, escasez de donantes, etc.). En segundo lugar, desde un punto de vista científico, la obtención de córneas artificiales en laboratorio constituiría una herramienta muy útil en la investigación médica y farmacológica ocular, permitiendo el estudio de los efectos de numerosos fármacos sobre los tejidos oculares (Reichl et al., 2004; Tegtmeier et al., 2001), la investigación de condiciones oculares patológicas, e incluso estudios de respuesta de materiales biológicos a la ultracongelación (Ebertz y McGann, 2004). Además, la fabricación de córneas en el laboratorio permitiría evaluar los posibles efectos tóxicos de multitud de productos cosméticos y farmacológicos sobre estos tejidos, sin necesidad de utilizar animales vivos de laboratorio para llevar a cabo estos ensayos. Hasta ahora, la falta de alternativas obliga a la experimentación sobre animales de laboratorio (especialmente conejos) y al posterior sacrificio de estos animales. Las actuales directrices de la Unión Europea, sin embargo, inciden en la necesidad de encontrar alternativas a esta clase de ensayos sobre animales vivos. La ingeniería tisular abre también una puerta para la solución de este tipo de problemas.

PARA SABER MÁS



Bell E. Deterministic models of tissue engineering. *J.Cell Eng* 1995; 1: 28-34.

Ebertz, SL, and McGann, LE. Cryoprotectant permeability parameters for cells used in a bioengineered human corneal equivalent and applications for cryopreservation. *Cryobiology* 2004; 49:169.

Griffith M, Osborne R, Munger R, Xiong X, Doillon CJ, Lacycock NLC, Hakim M, Song Y, and Watsk, MA. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 1999; 286: 2169.

Hornof M, Toropainen E, and Urtti A. Cell culture models of the ocular barriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60: 207.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.

Minami, Y, Sugihara, H, and Oono, S. Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34: 2316.

Nerem RM and Sambanis A. Tissue engineering: From biology to biological substitutes. *Tissue Eng* 1995; 1: 3-13.

Nishida, K. Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 2003; 22, S28.

Reichl S, Bednarz J, and Muller-Goymann, CC. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br. J. Ophthalmol.* 2004; 88: 5608.

Schneider AI, Maier-Reif K and Graeve T. Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 1999; 35: 515.

Sher S, Hull B, Rosen S, Church D, Friedman L and Bell E. Acceptance of allogenic fibroblast in skin equivalent transplants. *Transplantation* 1983; 36: 552-557.

Solter D and Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science* 1999; 283: 1468-1470.

Tegtmeyer, S, Papantoniou, I and Muller-Goymann CC. Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001; 51: 119.

Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, Meunier SF, Nolte CJ, Fukai N, Olsen BR, and Parenteau, NL. Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp. Cell Res.* 1994; 214: 621.