



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO
TÍTULO: NUEVOS AVANCES EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

Autor: Carmen de Aguinaga Casals

Tutor: Paloma Marina ddee la Torre

Iglesias Convocatoria: Febrero 220018

INDÍCE

1.	RESUMEN	2
2.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	2
3.	OBJETIVOS.....	4
4.	METODOLOGÍA	4
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
5.1	Células utilizadas.....	6
5.2	Matrices.....	9
5.2.1	Naturales	10
5.2.2	Sintéticos.....	12
5.3	Biorreactores.....	16
6	CONCLUSIONES	17
7	BIBLIOGRAFIA.....	18

1. RESUMEN

La ingeniería de tejidos se trata de una estrategia terapéutica que supondrá un gran avance en el tratamiento de muchas enfermedades, ya que idealmente su objetivo es la reparación de los órganos dañados de manera artificial o incluso la generación de la totalidad del órgano. Este trabajo se centra en el desarrollo de nuevas técnicas y biomateriales aplicados al desarrollo de tejidos de las vías aéreas superiores, en concreto de la tráquea, haciendo una revisión de las diferentes estrategias con las que se ha desarrollado una tráquea hasta el momento. Utilizando diferentes tipos de soportes al igual que gran variedad de células y biomoléculas que facilitan la regeneración del órgano.

Palabras clave: ingeniería de tejidos, tráquea, biomateriales.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La ingeniería de tejidos o medicina regenerativa es una disciplina cuyo objetivo consiste en la creación de nuevos tejidos a partir de células y diferentes materiales.

Tabla 1, Etiología de las enfermedades de las vías aéreas superiores (2).

El desarrollo de esta disciplina significará un cambio en el futuro tratamiento de muchas patologías, ya que permitirá la creación de un nuevo tejido capaz de sustituir al autóctono, tanto estructuralmente, como en sus funciones fisiológicas; evitando así, la inmunosupresión de por vida y la dificultad de encontrar un donante de órganos

Etiología de la enfermedad de las vías aéreas superiores.		
Maligno		Carcinoma escamoso
		Carcinoma adenoide quístico
Benigno	Idiopático	Estenosis subglótica idiopática
		Estenosis traqueal postintubación
	Iatrogénico	Estenosis de las vías aéreas
		Traqueotomía
		Radioterapia
	Traumático	Fractura de laringe
		Quemadura de las vías aéreas
	Autoinmune	Granulomatosis de Wegener
Sarcoidosis		
Congénita		Estenosis subglótica congénita
		Laringomalacia

(1).

En esta memoria se recogen los últimos avances en Ingeniería Genética relacionados con la tráquea, ya que, en patologías como malformaciones congénitas, cáncer, traumas e infecciones (causadas por largos periodos de intubación), el tratamiento actual consiste en la resección del tejido dañado seguida de una reconstrucción con tejido sano

de ese órgano o incluso de un trasplante.

En muchas ocasiones la reconstrucción no es viable debido a que la extensión del tejido dañado es mayor del 50% en adultos o el 30% en el caso de niños (3). Esto hace imposible la regeneración del tejido de forma natural, ya que, se formarían depósitos de colágeno al tratar de reepitelizar el tejido formando cicatrices que impedirían el correcto funcionamiento de la tráquea (2). Entonces las únicas líneas de tratamiento serían, el trasplante, con la consiguiente inmunosupresión de por vida o los tratamientos paliativos. Se podría concluir que la ingeniería de tejidos ofrece una alternativa que, potencialmente, podría significar la curación de estos pacientes.

Para comenzar, es necesario entender la estructura anatómica de la tráquea si se desea desarrollar una correctamente. La tráquea es un órgano fibroelástico con forma cilíndrica cuyo interior se encuentra recubierto por un epitelio pseudoestratificado que esta sostenido por unos músculos longitudinales y unos anillos cartilagosos (cartílago hialino) en forma de C. Su función consiste en conectar la laringe con los pulmones permitiendo la respiración. El flujo sanguíneo de este órgano viene dado por las ramas inferiores de las arterias tiroidea y bronquial (4).

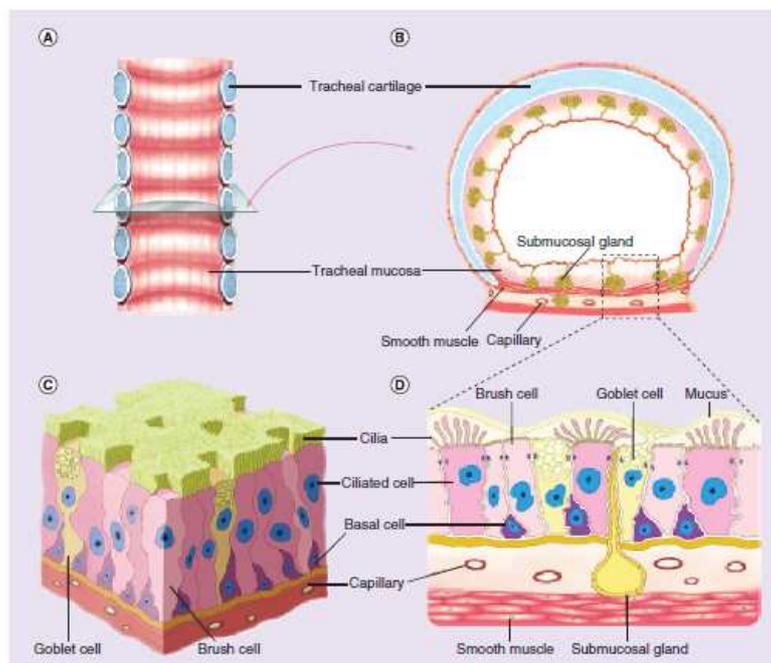


Figura 1. Vista anatómica del epitelio de la tráquea. (A y B) Representan la un corte longitudinal y trasversal, que consiste en cartílago y células epiteliales. (C y D) Esquemas de la organización del epitelio traqueal (4).

La estructura del epitelio pseudoestratificado es compleja (mostrado en la figura 1) ya que no todas las células que lo forman llegan a la cara luminal del tejido, además contiene diferentes tipos de células entre los que encontramos; las células caliciformes, encargadas de la producción de moco; y las células ciliadas cuyos movimientos en

forma de olas coordinadas con cruciales para la renovación del moco. Ambas poseen un papel crucial en la defensa del sistema respiratorio ya que se trata de la primera barrera protectora frente a agentes patógenos externos (5).

Otros tipos celulares que se pueden encontrar en el tejido pseudoestratificado son las células basales, que no llegan a alcanzar la luz de la tráquea, pero se encargan de la homeostasia del tejido, es decir de la regeneración del mismo ante cualquier daño. Y por último se deben nombrar las células de cepillo que actúan como un sensor químico (5).

Este órgano se fijó como uno de los primeros objetivos de la ingeniería de tejidos ya que aparentemente es un tejido fácil de reproducir, pero su desarrollo se complicó, pues realiza una función protectora muy importante para nuestro organismo. Además de necesitar una consistencia característica, ya que debe de ser flexible longitudinalmente para permitir realizar movimientos de cabeza pero manteniendo una rigidez lateral para soportar las presiones que se crean durante la respiración (6). La medicina regenerativa trata de cumplir todos estos requisitos para crear un órgano perfectamente funcional. Esto se consigue gracias a los pilares básicos de la ingeniería de tejidos, las células, la matriz o soporte de las células, los birreactores y por último las moléculas activas o factores. Todos en conjunto tratan de crear un ambiente que favorezca la proliferación celular y por lo tanto el desarrollo del nuevo tejido.

3. OBJETIVOS

Este trabajo pretende analizar las nuevas técnicas desarrolladas en medicina regenerativa. Se trata de un estudio descriptivo de los nuevos avances hasta la actualidad, en las técnicas utilizadas en el desarrollo de una nueva tráquea mediante la ingeniería de tejidos, realizando una revisión de los materiales estudiados hasta el momento.

4. METODOLOGÍA

Se ha realizado una revisión bibliográfica de artículos de libre acceso publicados en las bases de datos: PubMed, ScienceDirect y Google Scholar. Para la búsqueda sistemática se utilizaron las palabras clave: “tissue”, “engineering”, “trachea”, “transplantation”, “biomaterials”, “scaffold”, “regenerative medicine”, “cellularization strategies”. Como criterios de inclusión se estableció la selección de publicaciones tipo revisión, textos completos y con menos de 5 años de antigüedad. A través de la página de la Biblioteca

de la Universidad Complutense (BUCEa) se pudo acceder a los artículos de no libre acceso y se hizo una búsqueda exhaustiva revisando la bibliografía incluida en los artículos seleccionados con el fin de localizar estudios adicionales.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen tres formas teóricas de ingeniería de tejidos, una basada en el uso únicamente de células, otra basada en la inducción de la formación de tejidos mediante biomoléculas y por último la utilización de matrices. Se ha demostrado que al usar únicamente células estas no son capaces de reproducir adecuadamente la función del órgano autóctono, puesto que, proliferan sin seguir el orden adecuado. En cuanto al uso exclusivo de biomoléculas para estimular la regeneración del tejido natural podría teóricamente obtener buenos resultados, pero debido a la gran cantidad de moléculas necesarias todavía no se han estudiado en profundidad (4).

Actualmente la última técnica de elección para el reemplazo de un segmento largo de una tráquea defectuosa consiste en una fusión de las formas teóricas anteriormente nombradas, puesto que, tanto la elección de las células sembradas como el material de soporte utilizado determinan el desarrollo del órgano. Además todo debe estar apoyado por las biomoléculas responsables de crear un nicho de crecimiento similar al autóctono.

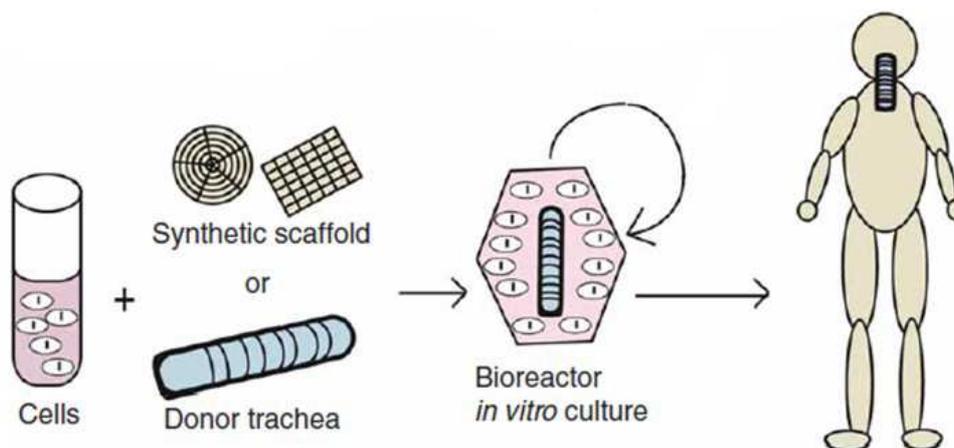


Figura 2, Esquema de la última estrategia de fusión utilizada en ingeniería de tejidos (4).

La medicina regenerativa tiene como objetivo crear una tráquea ideal con las siguientes características (3):

- Lateralmente rígida.
- Longitudinalmente elástica.
- Una luz hermética.
- Un tejido ciliar interrumpido tapizando la luz de la tráquea que proteja de

infecciones.

- Tejido exterior formado por cartílago que beneficia las funciones mecánicas y la biocompatibilidad del tejido.
- No inmunogénica. De manera que no sea necesaria la inmunosupresión.
- Con las características mecánicas adecuadas para evitar la estenosis.

5.1 Células utilizadas

Las fuentes celulares utilizadas en ingeniería de tejidos incluyen: células madre pluripotentes, células madre adultas, células progenitoras y células de tejido adulto ya diferenciadas. La elección depende de su disponibilidad, accesibilidad, su capacidad de expansión, y si existe potencial de generación de nuevos tumores durante la diferenciación (7). Idealmente estas células deben ser estables y funcionales (con capacidad de renovación), además no deben generar respuesta inmune para evitar el rechazo del nuevo órgano (4).

Tanto las células madre pluripotentes como las células embrionarias humanas son las que poseen el mayor potencial de diferenciación a distintas líneas celulares. Estas células se obtienen del cordón umbilical o de la placenta, Aunque su uso en ingeniería de tejidos se ve coartado por la alta capacidad de proliferación que las caracteriza, lo que hace que tengan tendencia a convertirse en cancerígenas. Además existen también regulaciones éticas que hacen más difícil su utilización (7, 8)

Las células pluripotentes inducidas (iPSCs) generadas a partir de células adultas son una alternativa muy atractiva para su uso en la medicina regenerativa pues se caracterizan por tener la misma morfología, y las mismas propiedades de expansión y diferenciación que las células embrionarias. Estas células se consiguen a partir de células somáticas adultas que mediante factores de transcripción se reprograman para diferenciarse en otro tipo celular. Sin embargo estas técnicas no están totalmente asentadas ya que han demostrado cierto potencial tumorogénico. Se espera que en el futuro se desarrollen ya que sería una fuente de células de gran valor (7).

Las células madre adultas son células somáticas con capacidad de renovarse. Estas pueden obtenerse de cualquier tejido desde tejido adiposo, medula ósea o sangre periférica. Aunque algunas células madre adultas no han tenido éxito al proliferar, las que se obtuvieron de la medula ósea se usan de manera regular en ingeniería de tejidos. Esto se debió a que un trasplante autólogo de células adultas tipo MSCs (células madre mesenquimales) no solo no causará respuesta inmunitaria sino que además de poseen

buena capacidad de expansión sin que esta sea descontrolada. Las MSCs son de fácil acceso y también son capaces de diferenciarse “in vitro” en varios tipos de tejidos lo que las hace perfectas candidatas a la hora de crear nuevos tejidos (9).

Los fibroblastos son unas células que forman parte del tejido conectivo, son muy usadas medicina regenerativa pues sintetizan una matriz extracelular formando una red de colágeno que da lugar a la estructura básica del tejido. Su función es clave ya que además de favorecer las interacciones celulares, también favorece la migración, la proliferación y la diferenciación. La fuente de obtención de los fibroblastos todavía está por determinar (7).

Anatómicamente existen dos tipos celulares necesarios para sembrar los materiales de soporte a la hora de crear una tráquea, estos son los condrocitos, necesarios para la formación del cartílago, y las células epiteliales que tapizan el interior del órgano (4).

Las células epiteliales son fáciles de conseguir ya que se encuentran tanto en la mucosa nasal como en la bucal o incluso de la piel. En el caso de las células epiteliales nasales se han realizado estudios que demuestran que son capaces de diferenciarse “in vitro”(10). Estudios como el de *Kalathur et al.*, 2010 (5) que han conseguido llegar al 4 pasaje de células in vitro creando un tejido pseudoestratificado similar al que tapiza la tráquea, pero al tratar de reproducir estos resultados “in vivo” las células nasales no fueron capaces de recrear estos tejidos dando lugar a problemas en el aclaramiento muco-ciliar lo que dio lugar a infecciones (5). Por lo que, las células madre progenitoras son las que están en estudio ya que también han mostrado cierto potencial a la hora de reparar los daños en la tráquea, estas células se pueden obtener de el tracto respiratorio o también derivadas de otros tejidos como la medula ósea. Algunos estudios han demostrado que el cultivo conjunto de células epiteliales y fibroblastos favorece el crecimiento celular además de la diferenciación y reconstitución de la membrana. Acelerando todo el proceso (*Kobayashi et al.*, 2006) (3).

Los condrocitos forman parte del cartílago junto con una matriz extracelular que consiste en una mezcla de colágeno, fibronectina, elastina, glucosaminoglicanos y agua (3). Estos condrocitos son más complejos de obtener y de cultivar “in vitro”. Se trata del mayor reto en la reconstrucción de la tráquea.

Actualmente la fuente de cartílago más eficiente todavía no se conoce (11). Existen tres tipos principales de cartílago: cartílago elástico, hialino y fibrocartílago. Los anillos con forma de C de la tráquea están formados por cartílago hialino principalmente y a diferencia de otros tejidos conectivos el cartílago recibe sus nutrientes por difusión, lo

que hace que su capacidad regenerativa sea mínima y sean más difíciles de cultivar (3).

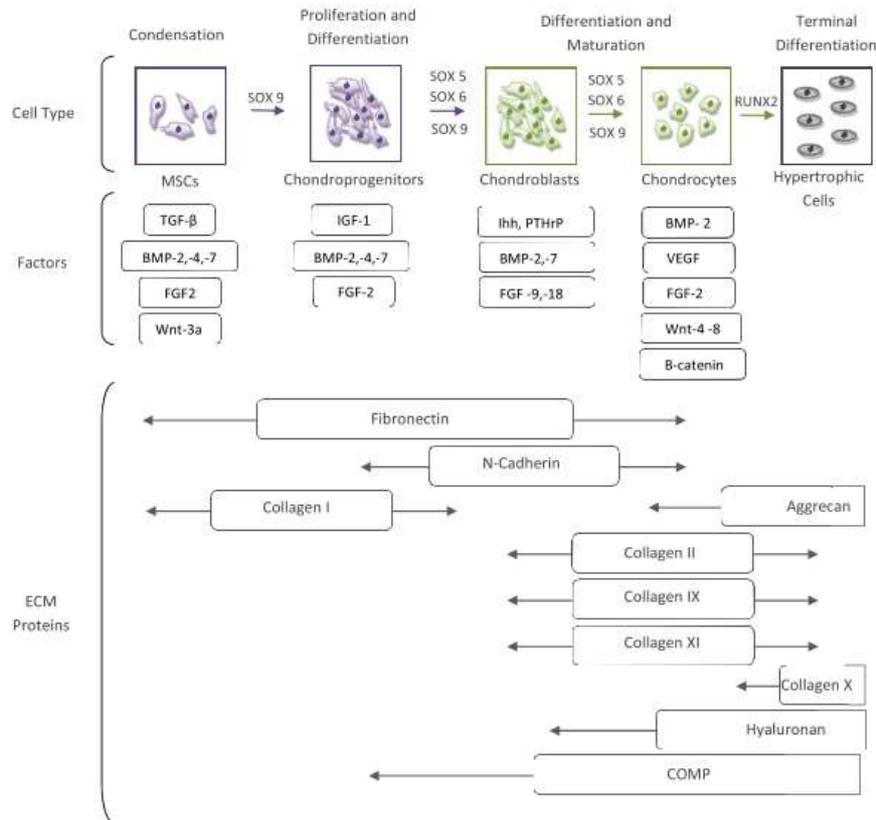


Figura 3. Proceso de diferenciación de las células madre mesenquimales a condrocitos.

Asociado con las biomoléculas o factores necesarias en cada etapa (3).

El método de obtención de este tipo de células todavía no está definido, ya que preferentemente debe de ser lo menos invasivo posible consiguiendo un rendimiento celular adecuado. En la actualidad para la formación de la tráquea se ha utilizado como fuente el septum nasal, la rodilla y las costillas, pues son zonas en las que se puede encontrar cartílago hialino. También se ha utilizado cartílago procedente de las orejas, pero en esta zona se encuentra cartílago elástico, diferente al necesario en la tráquea, aunque por su fácil obtención se ha usado para la síntesis de cartílago hialino. Este método de obtención no ha sido muy bien aceptado. Por otro lado, se obtuvieron condrocitos a partir del septum nasal, cuyo cartílago posee unas características más similares a las del cartílago presente en la tráquea (11). Aun así, nuevas fuentes deben de ser exploradas.

Las células madre pueden ser una buena fuente de condrocitos ya que poseen una alta capacidad de replicación y con las biomoléculas apropiadas serian capaces de diferenciarse a condrocitos (3). Se ha estudiado recientemente el uso de MSCs ya que pueden ser recogidas mediante técnicas menos invasivas que las utilizadas en las biopsias nasales, tan solo se necesita realizar una aspiración con una fina aguja. Sin

embargo, el uso de estas células mesenquimales está limitado ya que necesitan la presencia de los factores de crecimiento como TGF- β , IGF, factor de crecimiento de fibroblastos... para diferenciarse a condrocitos (11). Los factores de crecimiento utilizados suelen ser de origen animal, ya que desde el punto de vista del precio son más baratos, aunque pueden inducir una respuesta inmune (4).

5.2 Matrices

La matriz extracelular es un componente esencial para conseguir el microambiente necesario para el crecimiento celular y desarrollo de un tejido. No solo aporta un soporte, además también juega un papel muy importante en la proliferación, adhesión, diferenciación y muerte celular. La medicina regenerativa se centra en el desarrollo de matrices 3D que favorezcan la creación del nuevo tejido, ya que se trata de una red que imita al tejido original. Las funciones de una matriz extracelular ideal son (12, 13):

- Favorecer la adhesión celular.
- Favorecer las interacciones tanto entre células como las células con el medio.
- Facilitar el movimiento de los nutrientes y las sustancias de desecho a través de su estructura.
- Biocompatibles.
- No carcinogénicos y no inmunogénicos.
- Con las características mecánicas adecuadas.
- Que sea capaz de degradarse en un periodo de tiempo adecuado que permita la regeneración del tejido.
- Más específicamente, si se trata de un órgano para un paciente pediátrico, la matriz extracelular debe de ser capaz de acomodarse al crecimiento del paciente y sus futuras necesidades (13).

Al aplicar estos principios al desarrollo de una matriz para la formación de una tráquea se concluye que los materiales deben ser flexibles y a su vez rígidos para evitar el colapso de las vías aéreas, y que el aire pueda fluir a través de la tráquea. Como ya vimos anteriormente, desarrollar este tejido es más complejo ya que al estar continuamente expuesto al ambiente externo es más susceptible de infecciones tanto bacterianas como virales. En el órgano original son las células ciliadas las encargadas de evitar estas infecciones, por lo que la medicina regenerativa trata de imitar este proceso utilizando matrices porosas que permiten interacciones entre las células formando el tejido conectivo que posee este tipo de células (14). Además también debe de ser

compatible en términos celulares, funcionales e inmunogénicos, para evitar así el riesgo de rechazo y que no sea necesaria la inmunosupresión de por vida. La cual, no es una opción en pacientes con cáncer, lo que supondría un gran avance en este tipo de terapias. No debemos olvidar que los materiales que formen la matriz extracelular (ECM) no pueden ser tóxicos ya que, durante el proceso de degradación de la misma van a ser liberados y eliminados del organismo dejando permitiendo que las células sembradas puedan formar el nuevo tejido.

El tipo de ECM necesario para el reemplazo de la tráquea todavía está por decidir, pero existen dos áreas de especial interés para la ingeniería de tejidos de las vías aéreas. El uso de tejido alogénico descelularizado o el uso de materiales sintéticos. Ambos pueden ser y biodegradables o no (7).

5.2.1 Naturales

Los soportes basados en matrices extracelulares naturales pueden ser desde órganos o tejidos criopreservados, estructuras de colágeno o tejidos descelularizados (15).

Hasta la actualidad se han estudiado gran número de matrices naturales para su posible uso en el reemplazo de las vías aéreas, entre los cuales encontramos el alginato, agarosa, gelatina, chitosan, ácido hialurónico. Estos materiales favorecen la formación de proteoglicano por parte de los condrocitos y además también facilitan el mantenimiento de su fenotipo. Se ha estudiado que en ausencia de los mismos los condrocitos pierden su fenotipo en pocas semanas. Además, se observó que al encapsular los condrocitos en este tipo de materiales la síntesis de colágeno tipo II y de proteoglicano se ve favorecida (3)

Una de las matrices más prometedoras consiste en un tejido descelularizado, se obtiene utilizando la tráquea de un donante a la cual se le elimina todo su contenido celular natural mediante una serie de ciclos de lavado. Para seguidamente repoblar el tejido con células propias del paciente a tratar y así evitar la respuesta inmune (3). Actualmente un alotransplante de una tráquea humana descelularizada es la estrategia de elección o al menos, la menos inmunogénica, aunque también se han utilizado tejidos porcinos con el mismo objetivo obteniendo buenos resultados. Sin embargo, este proceso es un muy laborioso ya que, si aparece la mínima respuesta inmune por parte del paciente puede significar el rechazo del órgano. Es importante señalar que los métodos de eliminación de las células pueden provocar una inestabilidad mecánica en la matriz extracelular, pues se produce una pérdida de glicosaminoglicanos (GAGs). Esta pérdida también se

produce in vivo, por lo que es necesario el uso de otros materiales que contribuyan a la estabilidad (4,16). En cuanto a la adhesión celular y la vascularización estas no se ven afectadas.

Se ha propuesto un nuevo método para la eliminación de las células por Gilles *et al.* (17) demostrando la mejora en la eliminación de ADN y proteínas intracelulares utilizando Latrunculín B, soluciones hiper e hipotónicas junto con desoxirribonucleasa. Sin embargo las propiedades mecánicas de la tráquea no mejoraron significativamente. Por lo que tratamientos menos agresivos, como la deshidratación química, liofilización, congelación y descongelación son más recomendables para el mantenimiento de los condrocitos, aunque estas técnicas todavía no han tenido trascendencia clínica (17).

Mediante la descelularización, se eliminan las células del tejido original utilizando fuerzas mecánicas, procesos químicos como detergentes, nucleasas en ciclos repetidos. Resultando un producto libre de células de base extracelular derivado del tejido original. Este proceso permite eliminar los epítomos inmunogénicos de las células (13).

Para que la matriz extracelular se integre en el tejido del paciente, es necesario que esta se componga de proteínas, colágeno, proteoglicanos, y glicoproteínas. Todos ellos se mantienen durante el proceso de descelularización, y así se mantiene la capacidad del tejido para regenerarse y crecer. Pero sin que se produzca una respuesta inmune. Aunque se ha observado buena reepiteliación con estas matrices, la mayoría de ellas resultaron ser inestables terminando en obstrucción de las vías aéreas (7).

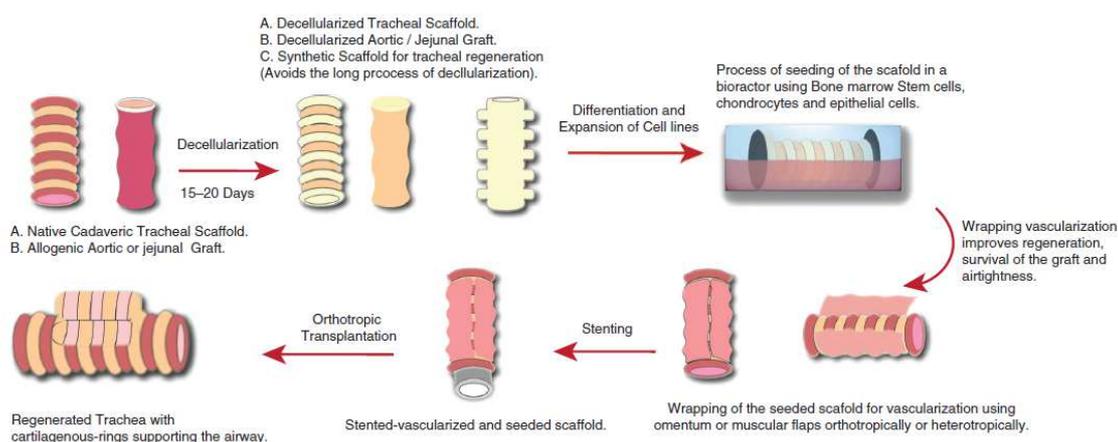


Figura 4. Protocolo de actuación seguido al utilizar materiales de soporte naturales (18).

En el último año se ha sugerido una nueva estrategia para la formación de un tejido a partir del órgano descelularizado, que seguidamente se sembrara con células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea en un biorreactor. A continuación se procederá a envolver la matriz con un tejido autólogo como el omentum o la aleta muscular para mejorar la vascularización, la regeneración y la firmeza del trasplante.

Después del transparente se inyectara TGF- β para favorecer la condrogénesis y vascularización. En este método es necesario el uso de sujeción externa (stent) de manera temporal hasta que se el trasplante gane suficiente consistencia. Esta técnica se puede utilizar con gran variedad de marices de distintos materiales (18).

Aunque estas matrices extracelulares presentan buenos resultados clínicos, todavía se ven limitadas por la necesidad de encontrar un órgano donante adecuado además de las largas y tediosa técnicas de descelularización (7).

5.2.2 Sintéticos

Las matrices sintéticas tienen algunas ventajas sobre las naturales ya que (3):

- Poseen un menor tiempo de producción que las naturales.
- No dependen de la disponibilidad de órganos de donantes.
- Son de fácil control y fácilmente modificables.
- Se diseñan según los requerimientos y dimensiones especiales de cada paciente.
- Pueden ser esterilizadas con facilidad y de manera eficaz.
- Se diseñan con buenas características mecánicas imitando las del órgano nativo, en nuestro caso la tráquea, así se evita el riesgo de colapso de las vías aéreas.

Se han estudiado gran variedad de materiales de manera individual y en combinación, los primeros intentos en ingeniería de tejidos de la tráquea utilizaban un material sintético sólido como el acero inoxidable, teflón y silicona. Sin embargo, debido a su rigidez y ausente porosidad los injertos no tuvieron éxito, dando lugar a infecciones y obstrucción (19). Estos estudios reseñaron que la porosidad de la matriz es un factor vital para el crecimiento celular ya que permite la vascularización del nuevo tejido. Como ya hemos visto la vascularización, representa un de los mayores obstáculos de la ingeniería de tejidos. Además de ser esencial para el correcto funcionamiento del órgano facilitando el oxígeno y nutrientes necesarios. Tras este descubrimiento la investigación se centro en el desarrollo de redes porosas con una combinación de materiales sintéticos y naturales (3).

Uno formado por una malla de propileno en forma de tubo que se recubre con una esponja de colágeno, en el cual la epitelización, desarrollo de capilares, tenía lugar llegado el día 14 “in vitro”. Sin embargo, el nuevo cartílago formado no se asemejaba al original de la tráquea. La matriz fue sembrada con vasos sanguíneos autólogos y trasplantada en cuatro pacientes con estenosis o cáncer traqueal. Pasados tres años de la operación, no se observo ningún rechazo. Aun así hoy en día la similitud de esta

estructura con una tráquea original se desconoce (4).

El grupo de *Crowley C et al.* (3) Ha desarrollado una familia de nuevos polímeros sintéticos se está comprobando su uso potencial como materiales para la medicina regenerativa. Estos polímeros nanocompuestos de POSS-PCU están basados en policarbonato (urea), un segmento blando de uretano (PCU) y un poliedro polimérico de silsesquioxano (POSS). Es un polímero no biodegradable pero biocompatible no toxigénico y no inmunogénico, estas propiedades se han establecido en varios estudios “in vivo” realizados en ovejas (20). POSS-PCU ha demostrado su habilidad para permitir la adhesión celular de gran variedad de tipos celulares, condrocitos, células epiteliales, células de Schwann y mesenquimales.

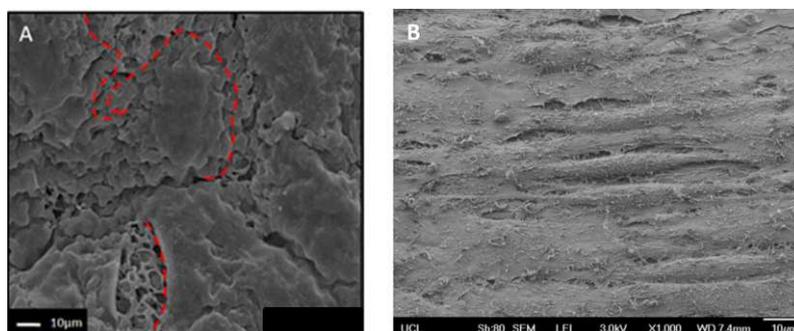


Figura 5, Imágenes SEM que muestran condrocitos (a) y células mesenquimales (b) creciendo en una matriz de POSS-PCU (3).

Se trata de un polímero versátil que permite su manipulación para asemejarse lo máximo posible a una tráquea original. Por ejemplo, puede fabricarse con el porcentaje de porosidad deseado que facilite el crecimiento y la vascularización. Además las características mecánicas del polímero pueden ser controladas para imitar las del tejido original o incluso mejorarlas. En junio 2011 se realizó un reemplazo traqueal en una paciente con cáncer utilizando este polímero con buenos resultados, ya que no se dieron signos de rechazo (3). (Figura 6).



Figura 6, Prótesis de tráquea desarrollada con POSS-PCU (2).

La matriz bioartificial POSS-PCU se sembró con células madre de la médula ósea y fue trasplantada a la paciente que recibió un tratamiento con G-CSF y epoetina- β durante 14 días para favorecer

la formación de cartílago y la neovascularización respectivamente. Inicialmente aparecieron algunos signos infección fúngica y tejido necrótico, pero la paciente seguía asintomática y libre de tumores a los 5 meses. La matriz extracelular o soporte presentaba anastomosis y una mucosa vascularizada que parcialmente estaba recubierta con epitelio. Concluyendo que, la ventaja de este polímero es que se puede diseñar siguiendo las propiedades de cada paciente (4).

El soporte ideal debe imitar en la mayor medida de lo posible la estructura del órgano original, sin embargo la tráquea se trata de una estructura que es difícil de reproducir debido a los anillos cartilagosos y las membranas, que si no se tienen en cuenta a la hora de desarrollar los soportes afectarían a la función del órgano. Naturalmente el desarrollo de una estructura 3D similar a la del órgano original tan solo soluciona la mitad del problema ya que la ECM es una mezcla de proteínas estructurales y funcionales dispuestas creando un único y dinámico microambiente, que ofrece una cascada de factores de señalización además del soporte. Los polímeros sintéticos hasta la actualidad no son capaces de cumplir todos estos requisitos por lo que una modificación en su superficie está siendo evaluada para promover la respuesta celular (21). Actualmente usar una fusión tanto de matrices naturales (colágeno) como sintéticas (polímeros) a la hora de fabricar los soportes parece una estrategia bastante acertada que deberá ser revisada en el futuro (6).

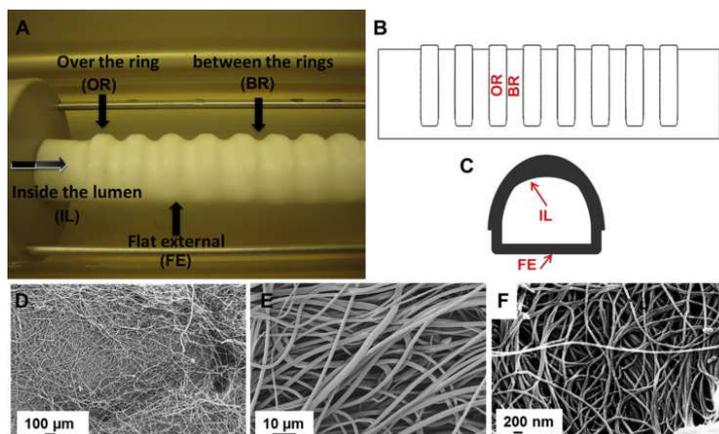


Figura 7, (A) Imagen del soporte (B) Esquema de la matriz vista frontal, (C) vista lateral, (D) imágenes de la matriz a diferentes ampliaciones 100x (E) 3000x (F) imagen de una tráquea de ratón autóctona (22).

La necesidad de crear soportes que imiten estas condiciones ha dado lugar a la fabricación de la siguiente generación de matrices entre los cuales se incluyen polímeros aprobados por la FDA como polietileno tereftalato (PET) y poliuretano (PU), en los cuales electrospinning fue la técnica de fabricación. Esta técnica es simple y rápida además de que permite generar distintos tipos de redes similares a las características de

una tráquea original (22)

La mejor opción para conseguir este objetivo consiste en la combinación de células autólogas con un biomaterial de soporte basado en la estructura del órgano original. De los polímeros existentes PET y PU fueron seleccionados. Pues además de estar aprobados por la FDA poseen un tiempo de degradación rápido y ofrecen la posibilidad de modificar las características mecánicas para imitar a la tráquea, en 2011 la primera versión de estos polímeros se aplicó a la clínica, consistía en una mezcla al 50% de PET y PU denominada “polyblend”, estos soportes tenían una alta porosidad y además se consiguieron unas propiedades mecánicas bastante similares a las originales, con suficiente fuerza y extensibilidad. Ya que se desarrollaron también los anillos en forma de C encargados de soportar las fuerzas del entorno (22).

Sin embargo tras el implante de estas matrices se notificó un colapso parcial al año de la cirugía, lo que se debe a la velocidad de degradación del PU. Aunque esta degradación puede considerarse positiva pues disminuye la posibilidad de generar rechazos y facilita el crecimiento del tejido nativo, si ocurre de manera muy rápida puede suponer un riesgo para los pacientes. Por lo que es importante tener en cuenta la capacidad de regeneración del tejido autóctono a la hora de decidir la estabilidad mecánica de los soportes (22).

Este equilibrio es especialmente importante en casos pediátricos, ya que los materiales de soporte deben adaptarse al crecimiento del paciente para poder evitar futuras cirugías debido a que estos han quedado obsoletos (13). Los polímeros pueden degradarse de dos maneras distintas, de manera superficial o degradación a granel. En la degradación superficial el material es erosionado capa por capa manteniendo su estructura original, sin embargo, en la degradación a granel el polímero se pierde por desintegración debilitando la estructura de soporte. Lo que si se produce sin dejar el tiempo necesario para que el tejido autóctono proliferase se producirá el colapso de las vías. Idealmente las células del tejido autóctono deben de ir repoblando el material de soporte a la vez que este se va degradando en productos que deben de ser no toxigénico y no inmunogénicos. El tiempo de degradación es modificable mediante cambios en el pH del ambiente y en las uniones químicas del polímero (7).

Al obtener este resultado el siguiente paso consistió en formular una matriz reduciendo la concentración de PU, de manera que así se alarga el tiempo de degradación permitiendo la regeneración del tejido autóctono. Se desarrollaron dos matrices una que consistía en una mezcla de PET70/PU30 y otra formada tan solo por PET, con

características similares a una tráquea original exceptuando que el grosor de la pared del soporte es un 50% menor al de la pared del órgano. Tras un exhaustivo proceso de evaluación, se determinó que los soportes formulados tan solo con PET son biológicamente superiores a los formulados con la mezcla de PET y PU debido a que poseían una mayor proliferación celular y mayor número de células viables. De la misma manera, un modelo animal aprobó las biocompatibilidades de ambos materiales además de su función como trasplante ortotópico.

Se concluyó que ambos materiales son mecánicamente fuertes, poseen una red fibrosa uniforme y además favorecen la viabilidad y la adhesión celular. Los experimentos “in vitro” demostraron una superioridad de los soportes creados únicamente con PET frente a los creados con PET/PU, aunque no se observaron diferencias en los resultados de los modelos “in vivo”(22).

5.3 Biorreactores

Son necesarios para facilitar la adhesión de las células y asegurar la correcta fabricación de las células, ya que mimetizan las condiciones de crecimiento del tejido autóctono (6).

Un biorreactor ideal para ingeniería de tejidos debería (3):

- Disponer de diferentes condiciones de cultivo para cada uno de los lados de la pared del órgano.
- Ofrecer un flujo de fluido apropiado para el crecimiento celular.
- De fácil esterilización (23).
- Permitir suficiente transporte de oxígeno y nutrientes entre las células y el medio de cultivo.
- Poseer indicadores de concentración de nutrientes y oxígeno además de las presiones internas.
- Permitir el reajustarse de las condiciones según lo observado por el operador.

Actualmente las mejoras en la tecnología de los biorreactores han facilitado el crecimiento adecuado, ya que las características de cultivo cada vez se asemejan más a las condiciones “in vivo”(4).

La figura 4 muestra un biorreactor desarrollado por Crowley C, Birchall M, Seifalian AM, et al, de vidrio que permite la fácil esterilización y la visualización de las células en crecimiento, además posee una doble cámara para el cultivo de diferentes tipos celulares con diferentes tipos de medio de cultivo. La importancia de las cámaras duales en los biorreactores se debe a que así permiten sembrar diferentes tipos de células en zonas

específicas del material de soporte (3), como por ejemplo las células epiteliales del interior de la tráquea y las células cartilagosas de soporte (24).



Figura 8. Biorreactor con dos cámaras de cultivo desarrollado por Crowley C, Birchall M, Seifalian AM (3).

Niklason et al. (25) Demostró que el uso de un bioreactor capaz de someter a tensión pulsátil a las matrices sembradas con células musculares. Facilita el la organización y desarrollo de los vasos sanguíneos. Lo que aplicado a la tráquea es de gran interés, ya que se busca un biorreactor capaz de producir unas vibraciones a frecuencia sinusoidal que provoquen un mayor contacto célula a célula y de la célula con el medio (4).

6 CONCLUSIONES

El carcinoma de cabeza y cuello es la sexta causa de cáncer a nivel mundial. Y representa aproximadamente el 4% de los tumores malignos y un 5% de mortalidad. El tabaco aumenta el riesgo 10 veces comparado con los no fumadores y el alcohol es un factor independiente. Pero combinados el efecto dañino que producen sobre la tráquea es mucho mayor (26).

El tratamiento de estos pacientes depende de su estado clínico, del daño tisular y la presencia de metástasis. Hasta el momento se trataba de una cirugía seguida de quimioterapia o radioterapia, ya que no era posible eliminar todo el tejido dañado sin comprometer la función de la tráquea. Por lo que la medicina regenerativa supone un gran avance en estas terapias, permitiendo la sustitución completa de este órgano. Como ya hemos visto existen múltiples técnicas que han sido utilizadas con éxito pero aun es necesario perfeccionarlas para ponerlas al alcance de mayor número de pacientes. Por último también es necesario continuar con el desarrollo de nuevos materiales que se asemejen a la tráquea, como el último polímero mencionado de PU/PET, para así no depender de la necesidad de órganos donantes a la hora de realizar un trasplante.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Hendriks J, Riesle J, Blitterswijk CA van. Co-culture in cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010;4(7):524–31.
2. Hamilton N, Bullock AJ, Macneil S, Janes SM, Birchall M. Tissue engineering airway mucosa: A systematic review. *Laryngoscope*. 2014;124(4):961–8.
3. Crowley C, Birchall M, Seifalian AM. Trachea transplantation: from laboratory to patient. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014;4(7):524–31.
4. Fishman JM, Wiles K, Lowdell MW, De Coppi P, Elliott MJ, Atala A, et al. Airway tissue engineering: an update. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2014;14(10):1477–91. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2014.938631>
5. Zhang H, Fu W, Xu Z. Re-epithelialization: a key element in tracheal tissue engineering. *Regen Med* [Internet]. 2015;10(8):1005–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388452>
6. Haag JC, Jungebluth P, Macchiarini P. Tracheal replacement for primary tracheal cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2013;21(2):171–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23385784>
7. Bogan SL, Teoh GZ, Birchall MA. Tissue Engineered Airways: A Prospects Article. *J Cell Biochem*. 2016;117(7):1497–505.
8. Law JX, Liao LL, Aminuddin BS, Ruszymah BHI. Tissue-engineered trachea: A review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* [Internet]. 2016;91:55–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.10.012>
9. Scarrit ME. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2015;3(March):1–17. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00043/abstract>
10. Kim JH, Kong WH, Kim JG, Kim HJ, Seo SW. Possibility of Skin Epithelial Cell Transdifferentiation in Tracheal Reconstruction. *Artif Organs*. 2011;35(2):122–30.
11. Kojima K, Vacanti CA. Tissue engineering in the trachea. *Anat Rec*. 2014;297(1):44–50.
12. Hixon KR, Lu T, Sell SA. A comprehensive review of cryogels and their roles in tissue engineering applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2017;62:29–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.08.033>
13. Maughan E, Lesage F, Butler CR, Hynds RE, Hewitt R, Janes SM, et al. Airway tissue engineering for congenital laryngotracheal disease. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. 2016;25(3):186–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2016.02.012>
14. Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D. Tracheal Allotransplantation after Withdrawal of Immunosuppressive Therapy. *N Engl J Med* [Internet]. 2010;362(2):138–45. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0810653>
15. Walles T, Giere B, Hofmann M, Schanz J, Hofmann F, Mertsching H, et al. Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized

- trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;128(6):900–6.
16. Johnson C, Sheshadri P, Ketchum JM, Narayanan LK, Weinberger PM, Shirwaiker RA. In vitro characterization of design and compressive properties of 3D-biofabricated/decellularized hybrid grafts for tracheal tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2016;59:572–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.03.024>
 17. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* [Internet]. 2011;32(12):3233–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
 18. Abouarab AA, Elsayed HH, Elkhayat H, Mostafa A, Cleveland DC, Nori A El. Current solutions for long-segment tracheal reconstruction. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2017;23(2):66–75.
 19. Grillo HC. Tracheal replacement: A critical review. *Ann Thorac Surg.* 2002;73(6):1995–2004.
 20. Kannan RY, Salacinski HJ, Ghanavi JE, Narula A, Odlyha M, Peirovi H, et al. Silsesquioxane nanocomposites as tissue implants. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(6):1653–62.
 21. Del Gaudio C, Baiguera S, Ajalloueiian F, Bianco A, Macchiarini P. Are synthetic scaffolds suitable for the development of clinical tissue-engineered tubular organs? *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(7):2427–47.
 22. Ajalloueiian F, Lim ML, Lemon G, Haag JC, Gustafsson Y, Sjöqvist S, et al. Biomechanical and biocompatibility characteristics of electrospun polymeric tracheal scaffolds. *Biomaterials* [Internet]. 2014;35(20):5307–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.015>
 23. Bader A, Macchiarini P. Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach. *J Cell Mol Med.* 2010;14(7):1877–89.
 24. Asnaghi MA, Jungebluth P, Raimondi MT, Dickinson SC, Rees LEN, Go T, et al. A double-chamber rotating bioreactor for the development of tissue-engineered hollow organs: From concept to clinical trial. *Biomaterials* [Internet]. 2009;30(29):5260–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.018>
 25. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R LR. Functional arteries grown in vitro. *Science* (80-). 1999;(April):0–4.
 26. Barczak W, Golusiński P, Luczewski L, Suchorska WM, Masternak MM, Golusiński W. The importance of stem cell engineering in head and neck oncology. *Biotechnol Lett.* 2016;38(10):1665–72.