

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	11	105-120	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	---------	---	-------------------	----------------

## Regeneración vesical: Células, Andamiajes y Biorreactores

### Bladder Regeneration: Cells, Scaffolds and Bioreactors

Fecha de recepción y aceptación: 16 de febrero de 2019, 25 de febrero de 2019

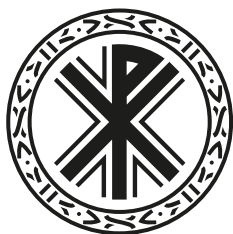
**Ángel Serrano-Aroca<sup>1\*</sup>, Francisco Delgado-Oliva<sup>2</sup>, César David Vera-Donoso<sup>1,2</sup>, Victoria Moreno-Manzano<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup> Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

<sup>2</sup> Departamento de Urología. Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Hospital La Fe. Valencia.

<sup>3</sup> Laboratorio de Regeneración Neuronal. Centro de Investigación Príncipe Felipe. Valencia.

\* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. *E-mail*: angel.serrano@ucv.es



#### RESUMEN

Diversas patologías o sus tratamientos quirúrgicos pueden alterar la función de la vejiga urinaria o requerir su extirpación. La vejiga tiene la capacidad de realizar contracciones repetidas y coordinadas para vaciar la orina sin comprometer su capacidad de almacenamiento. Por lo tanto, cuando este órgano está afectado de tal modo que requiere ser extirpado y reemplazado con un órgano completo artificial (o parte de él) producido mediante ingeniería tisular, todas estas propiedades deben ser consideradas con el objetivo de poder reproducirlas. La cistectomía radical y la enterocistoplastia son, hoy en día, los procedimientos estándar para el tratamiento del cáncer músculo-invasivo vesical. Sin embargo, no resuelven la carencia funcional, están asociados a un número no despreciable de complicaciones y generan además un alto coste económico. Por estos motivos, diversos grupos de investigadores en todo el mundo trabajan en estrategias alternativas que permitan conseguir el método ideal de regeneración total o parcial de este órgano. En esta publicación realizamos una profunda revisión del estado del arte de los componentes de este proceso, desde las células hasta la ingeniería tisular y los biorreactores como factores fundamentales en la terapia avanzada de regeneración vesical. La baja producción científica de impacto observada en este campo puede atribuirse a una pérdida de motivación, que se debe a la gran dificultad de conseguir un órgano con una correcta funcionalidad.

**PALABRAS CLAVE:** *biorreactores, ingeniería tisular, regeneración de vejiga, andamiajes.*

#### ABSTRACT

Various pathologies or their surgical treatments can alter the function of the urinary bladder or require its removal. The bladder has the ability to perform repeated and coordinated contractions to empty urine without compromising its storage capacity. Therefore, when this organ is affected in such a way that it needs to be excised and replaced with an artificial complete organ (or part of it) produced by tissue engineering, all these properties must be considered in order to be able to reproduce them. Radical cystectomy and enterocystoplasty are, nowadays, the standard procedures for the treatment of muscle-invasive bladder cancer. However, they do not solve the functional

problem; they are associated with a non-negligible amount of complications and generate a high economic cost. For these reasons, various groups of researchers around the world are working on alternative strategies to achieve the ideal method of total or partial regeneration of this organ. In this publication, we carry out a thorough review of the state of the art of the components of this process, from cells to tissue engineering and bioreactors as fundamental factors in advanced therapy of bladder regeneration. The low impact that that scientific production observed in this field can be attributed to the loss of motivation, due to the great difficulty of obtaining an organ with correct functionality.

**KEYWORDS:** *bioreactors, tissue engineering, bladder regeneration, scaffolds.*

## INTRODUCCIÓN

Diversas enfermedades como la cistitis intersticial, anomalías congénitas, traumatismos e infecciones pueden conducir a la necesidad de una reconstrucción total o parcial de la vejiga. Esta víscera hueca tiene la capacidad de realizar contracciones repetidas y coordinadas para vaciar la orina sin comprometer su capacidad de almacenamiento ni la protección del tracto superior debido a las características especializadas de las fibras del músculo liso de la vejiga, los vasos sanguíneos, la innervación del sistema nervioso periférico y el urotelio estratificado. Por lo tanto, cuando este órgano pierde su función y nos planteamos la hipótesis de reemplazarlo por un órgano artificial completo (o parte de él) creado mediante bioingeniería, todas estas propiedades deben tenerse en cuenta con el objetivo de poder restaurarlas [1]. La causa más dramática en la pérdida de función vesical es aquella asociada a la cistectomía radical debida al cáncer de vejiga, que es la sexta causa de cáncer en la Unión Europea y una incidencia creciente [2]. Esta técnica, que incluye la extirpación de la vejiga, es hoy en día el tratamiento estándar para el cáncer de vejiga músculo-invasivo [3]. El tipo de derivación urinaria que realizar varía según el cirujano y cada caso, pues requiere una selección individual [4]. La derivación urinaria más frecuente después de la cistectomía es el conducto ileal, aunque también se suele construir una neovejiga a partir de intestino. Sin embargo, estas técnicas están asociadas a un número importante de complicaciones, por lo que se han promovido tratamientos alternativos con radio y/o quimioterapia, cuyo objetivo es, además de conseguir la curación, preservar la calidad de vida de los pacientes [11].

Para las patologías funcionales benignas se suelen utilizar tratamientos farmacológicos para maximizar la seguridad del paciente y la calidad de vida, siempre y cuando la disfunción de la vejiga sea leve o moderada [12]. En los pacientes con disfunción grave como cistitis intersticial, vejiga neurógena y retracción vesical inflamatoria, actualmente se realiza una ampliación vesical o enterocistoplastia utilizando el tracto gastrointestinal, que tiene por objetivo crear un reservorio de baja presión y alta capacidad, permitiendo una continencia y vaciado adecuados, para preservar el tracto urinario superior [13]. Sin embargo, este procedimiento clínico no soluciona el problema funcional del vaciado y está asociado a complicaciones como incontinencia urinaria, acidosis metabólica, necesidad de autocateterismos, litiasis vesicales, infecciones urinarias febriles y estenosis de la boca anastomótica [5,9,14,15].



Todos los abordajes terapéuticos actuales conllevan un alto impacto económico, sobre todo debido al procedimiento de derivación urinaria, que requiere un segmento intestinal, y sus complicaciones, así como el deterioro de la calidad de vida del paciente. La necesidad de encontrar el método ideal para construir una nueva vejiga urinaria es perentoria para la urología moderna. La medicina regenerativa sigue siendo la gran esperanza para superar este reto. La ingeniería de tejidos es una tecnología de vanguardia en salud y aglutina los principios de trasplante, ciencia de materiales y bioingeniería para crear *de novo* el reemplazo de un tejido enfermo. Durante décadas, por las razones clínicas arriba expuestas, los esfuerzos de la ingeniería tisular se han centrado intensamente en la construcción de una neovejiga. Por este motivo, muchas universidades y centros de investigación de todo el mundo están buscando mejores alternativas a estos procedimientos actuales mediante terapias avanzadas de bioingeniería. Una variante de esta, la bioimpresión, se presenta como una herramienta eficaz para conseguir este fin con la ventaja de ser un proceso totalmente reproducible. Centros de investigación tan importantes como el Wake Forest Institute for Regenerative Medicine dirigido por el Dr. Anthony Atala destinan grandes cantidades de su presupuesto a la puesta a punto de esta alternativa de urología regenerativa. Sin embargo, reproducir la funcionalidad de un órgano completo se complica más cuanto más complejo es el órgano que reproducir [16] y, a pesar de que se han conseguido grandes avances en este campo, el éxito de la bioimpresión de vejiga ha sido limitado hasta la fecha [17,18]. Por consiguiente, la utilización de biorreactores en ingeniería tisular se presenta como una nueva opción muy prometedora en este campo de investigación. En el presente trabajo realizamos una profunda revisión de todos los logros conseguidos en las últimas décadas.

## INGENIERÍA TISULAR EN LA REGENERACIÓN DE VEJIGA

La ingeniería tisular o de tejidos se presenta como una gran alternativa interdisciplinar para regenerar tejido de vejiga y en la que colaboran profesionales de diversas áreas de conocimiento: ingenieros, médicos, químicos, biólogos y farmacéuticos [19]. El progreso en este campo científico durante los últimos setenta años ha sido muy significativo. La ingeniería tisular hace uso de matrices porosas (*scaffolds* en inglés) con o sin células sembradas, aprovechando la capacidad de regeneración natural del cuerpo. Las construcciones de vejiga diseñadas por ingeniería tisular presentan una gran complejidad: necesitan integrarse en el cuerpo, almacenar la orina y poseer propiedades contráctiles que hagan posible la micción fisiológica. Por este motivo, a pesar del gran progreso alcanzado con estas tecnologías avanzadas, las neovejigas regeneradas no están lo suficientemente desarrolladas todavía para su aplicación clínica.

### Biomateriales

La elección del biomaterial para generar el *scaffold* que simulará los tejidos de la vejiga es clave para apoyar la función vesical. La nueva vejiga no especializada estará sometida a un estímulo hidromecánico durante el llenado y vaciado de la orina. El material que constituye parte del microambiente influirá muy significativamente en la regeneración, migración, invasión, proliferación, super-



vivencia y diferenciación celular. Los biomateriales utilizados en la regeneración de vejiga deben de ser biocompatibles, poseer propiedades mecánicas y químicas adecuadas que sean consistentes con el tejido vesical normal [20], ya que deben proporcionar soporte estructural para las diferentes capas e impedir el colapso prematuro de este órgano hueco. Además, han de proporcionar una superficie adecuada para la integración en un epitelio estratificado y compactado de células uroteliales que sirva de barrera para evitar la fuga de orina al tejido circundante y albergar las células musculares, que deben formar tejido muscular unidireccional en capas definidas, y permitir una innervación y vascularización rápidas [21].

Muchos tipos de biomateriales de diversa naturaleza como los polímeros naturales, tejidos acelulares, polímeros sintéticos y materiales compuestos se han utilizado como sustitutos del tejido de la vejiga. Pero su desarrollo sigue siendo línea principal de investigación de muchos centros de prestigio, lo que demuestra que no se ha llegado a buen término aún. Dentro de los biomateriales naturales, los *scaffolds* de tejido acelular natural han demostrado ser muy prometedores para la regeneración de órganos y tejidos completos [22], ya que presentan propiedades mecánicas, entre otras, muy similares a las del tejido nativo. Estos biomateriales porosos pueden prepararse por procesos de descelularización mecánica o química, mediante la eliminación de todos los componentes celulares de vejiga que suele ser de origen porcino, comúnmente [23] debido a la similitud que presenta este órgano animal con el humano. Las matrices acelulares normalmente empleadas en la sustitución de la vejiga son típicamente derivadas de matriz acelular de vejiga (BAM) [24] o de submucosa intestinal pequeña (SIS). Estos biomateriales se han utilizado solos o previamente sembrados de células uroteliales (UC) y células musculares lisas (SMC) [25,26] en varios modelos animales [27,28], mostrando resultados con significativo éxito en cistectomías parciales. Sin embargo, los *scaffolds* constituidos de biomaterial acelular similar fallaron en modelos animales mayores, como cerdos y perros, cuando el tejido que reemplazar es mayor, como en las cistectomías totales o subtotaes [25,29].

Los reactivos más comúnmente empleados para la descelularización de órganos incluyen agentes ácido-base, detergentes, agentes hipotónicos o hipertónicos, agentes enzimáticos, alcoholes y agentes quelantes. Otra amplia gama de agentes químicos son utilizados para su esterilización, como ácido peracético, antibióticos, radiación y anticoagulantes, como el sulfato de heparina. Sin embargo, la elección ideal de agentes químicos y la técnica para aplicar estos agentes depende del tipo de órgano que descelularizar [23,30].

Después de la descelularización, se debe abordar el paso complejo de la repoblación celular. Este proceso generalmente se realiza dentro de un biorreactor, que es capaz de simular el entorno in vivo para un crecimiento celular, nutrición y metabolismo óptimos [16].

Otros biomateriales naturales que han sido propuestos para regenerar vejiga son los derivados de la matriz extracelular, tales como el colágeno [31], aprobado por la Administración FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos para muchos tipos de aplicaciones médicas [32]. Algunos biopolímeros naturales importantes son el ácido hialurónico, que se ha utilizado en la cicatrización de heridas y liberación de factores de crecimiento entre otras aplicaciones [33] y el alginato modificado con péptidos adherentes [34], que también está aprobado por la FDA para la cicatrización de heridas humanas [35].



Hoy en día se dispone de muchos métodos diferentes para producir *scaffolds*, como son la técnica del porógeno, *electrospinning*, impresión 3D, liofilización, etc., con una amplia diversidad de morfologías porosas interconectadas [19]. Abajo, la figura 1 muestra un *scaffold* de biomaterial de colágeno natural tipo I fabricado recientemente mediante liofilización para ingeniería tisular de vejiga [36].

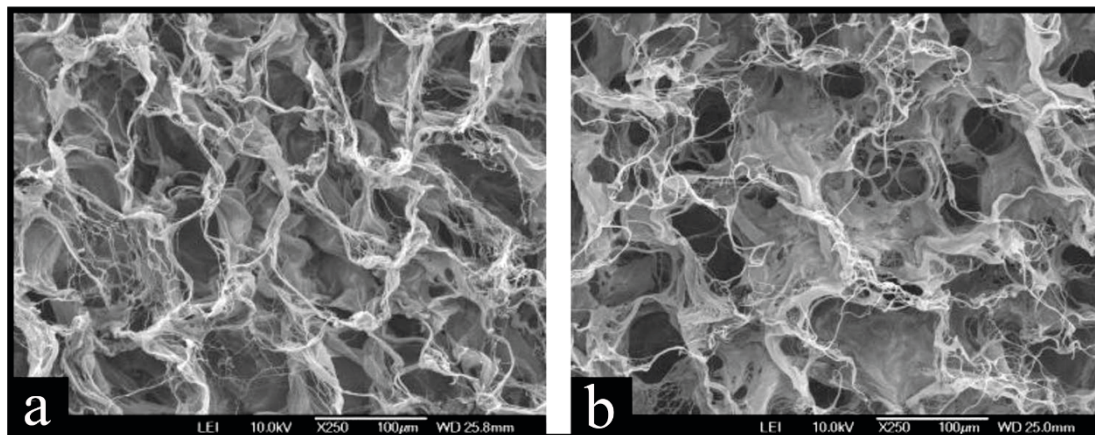


Figura 1. *Scaffold* natural de colágeno tipo I preparado mediante la técnica de liofilización. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) ( $\times 250$ ). *Scaffold* utilizado en biorreactor Bose Electroforce Bio-Dynamic para estudiar el efecto mecánico de deformación cíclica uniaxial en células urinarias: zona al aire (a) y zona en la sujeción (b). Las barras de escala indican 100  $\mu\text{m}$ . Modificado con permiso de Tiemessen *et al.* [36]

También se ha utilizado el tejido pericárdico como biomaterial natural alternativo [37]. Sin embargo, los polímeros sintéticos como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico o co-polímeros de estos presentan la gran ventaja de poderse producir a escala industrial y permiten el control de sus propiedades físicas, químicas y biológicas mediante su proceso de preparación. Además, estos biomateriales están también aprobados por la FDA para diversas aplicaciones clínicas, como suturas [38], son biodegradables, biocompatibles, no tóxicos y ampliamente utilizados en muchas aplicaciones biomédicas [39]. Actualmente existen ya muchos métodos para fabricar *scaffolds* de estos biomateriales con la morfología porosa deseada [39,40]. Biomateriales interesantes también son la policaprolactona, que en forma de espuma porosa ha mostrado ser muy adecuada para ingeniería tisular en regeneración de vejiga [41], los polianhídridos y poli (orto ésteres) [42] y la fibroína de seda [43]. No obstante, debido a que la vejiga está compuesta de diferentes capas, la utilización de materiales compuestos [44-46] por biomateriales diferentes puede constituir una óptima estrategia para conseguir la regeneración tisular de cada una de las capas.

La estrategia de regeneración de la vejiga está en pleno desarrollo y todos estos resultados demuestran el rápido progreso en este campo durante las últimas décadas.



## Células madre

El empleo de células madre ha sido extensamente aplicado a los procesos de regeneración de órganos completos, aprovechando la propiedad de las células madre pluri o multipotenciales, con capacidad replicativa en cultivo, de diferenciarse en diversos tipos de células para lograr la regeneración de los diferentes tejidos. Las células madre adultas se han probado con éxito en diversas estrategias de terapia celular en el rescate de la función vesical, por trasplante en la vejiga y otros segmentos del tracto urinario [47,48]. Las células madre mesenquimales adultas son células multipotentes, capaces de diferenciarse en varios tipos de células como fibroblastos, mioblastos, endoteliales y de músculo liso e incluso precursores de células uroteliales [49,50]. Las células mesenquimales pueden aislarse de diferentes fuentes, incluyendo médula ósea y tejido adiposo, lo que permite realizar trasplantes de células autólogas. La reprogramación de células somáticas adultas en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) [51] ofrece una alternativa muy prometedora para la generación *in vitro* de todos los tipos celulares requeridos para la regeneración vesical.

## Funcionalidad

Aunque ya se ha demostrado que es posible regenerar tejido de bioingeniería con una morfología similar a la del tejido vesical nativo, todavía no se ha conseguido restaurar la micción fisiológica [21]. Para resolver esta compleja limitación es necesario el desarrollo de la alineación muscular correcta, la inervación y la vascularización adecuadas. La neovascularización rápida es crítica en construcciones de bioingeniería de tejidos para asegurar un suministro adecuado de oxígeno y nutrientes para la supervivencia celular, la proliferación [52] y la eliminación adecuada de metabolitos dañinos [53,54].

Este déficit funcional no superado todavía mediante la ingeniería tisular puede ser la causa de la baja producción científica de alto impacto en esta área científica. Sin embargo, la ingeniería tisular ha demostrado en varios estudios preclínicos en roedores [55,56] que *scaffolds* con una morfología y capacidad perfectamente controladas para administrar múltiples factores neuronales y angiogénicos pueden constituir una opción real para la regeneración de vejiga con funcionamiento fisiológico en el futuro. Aunque todavía es necesario aumentar la investigación preclínica en modelos animales más grandes para optimizar los métodos de bioingeniería de reconstrucción de la vejiga en humanos [57].

## BIORREACTORES

Los biorreactores son sistemas de simulación que pueden utilizarse para mejorar la regeneración sometiendo un tejido en crecimiento a diversos tipos de fuerza o estímulo: tensión-deformación, compresión, flujo pulsátil, tensiones de corte y estimulación eléctrica. Además, permiten simular las condiciones fisiológicas normales del ciclo de la vejiga de llenado y vaciado similar al del cuerpo humano [58,59].



En la última década, se han realizado enormes progresos en el diseño de nuevos biorreactores que puedan hacer construcciones vasculares de ingeniería tisular con mejores propiedades mecánicas. En estos estudios se ha demostrado que las tensiones mecánicas crean un efecto beneficioso. Sin embargo, esta área de conocimiento plantea muchos problemas que deben abordarse sin demora. La ventaja principal de estos sistemas de bioingeniería es su alta reproducibilidad, basada en el control y la regulación de los parámetros de cultivo celular [60]. Los biorreactores proporcionan capacidad para controlar factores ambientales como el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto, manteniendo un entorno aséptico [20].

Uno de los primeros biorreactores para regeneración de vejiga fue desarrollado en 2007 y consistió en dos cámaras de policarbonato separadas por dos anillos entrelazados que sujetaban el constructo entre las cámaras [58]. En este biorreactor puede simularse el llenado de la vejiga aumentando gradualmente la presión del fluido de 0 a 10 cmH<sub>2</sub>O durante un tiempo preestablecido por el usuario y el vaciado de la vejiga al disminuir la presión de 10 a 0 cmH<sub>2</sub>O durante un intervalo de diez segundos.

En este estudio, en condiciones estáticas se produce una regulación descendente significativa en la expresión de los marcadores fenotípicos de las células UC y SMC, así como en los componentes de la ECM. Por el contrario, el cultivo en este entorno dinámico en biorreactor con estimulación mecánica fue capaz de mantener la expresión de genes clave relevantes para la función de la vejiga y permitió mejorar las interacciones entre células y andamios requeridas para la reconstitución del tejido urinario.

En el año 2008, se realizaron estudios del efecto de la fuerza sobre la vejiga urinaria mediante máquinas Flexcell ([www.flexcellint.com](http://www.flexcellint.com)) que proporcionaron un punto de partida para comprender el impacto de la estimulación mecánica a nivel celular y molecular en el tejido de la vejiga [59,61-63]. Además, la incorporación de *softwares* como el UDS de Laborie Medical Technologies (<http://www.laborie.com>) a un biorreactor permite realizar estudios urodinámicos de uroflujometría, citometrograma, perfiles de presión uretral, micción, video de urodinámica, estudios de manometría anorrectal, etc., permitiendo el monitoreo continuo y el control de los parámetros fundamentales.

Otro biorreactor desarrollado capaz de simular la dinámica normal de la vejiga urinaria es el biorreactor de presión hidrostática pulsátil [64], que se muestra en la figura 2 y que se ha utilizado con una membrana porosa con fibroblastos L929.



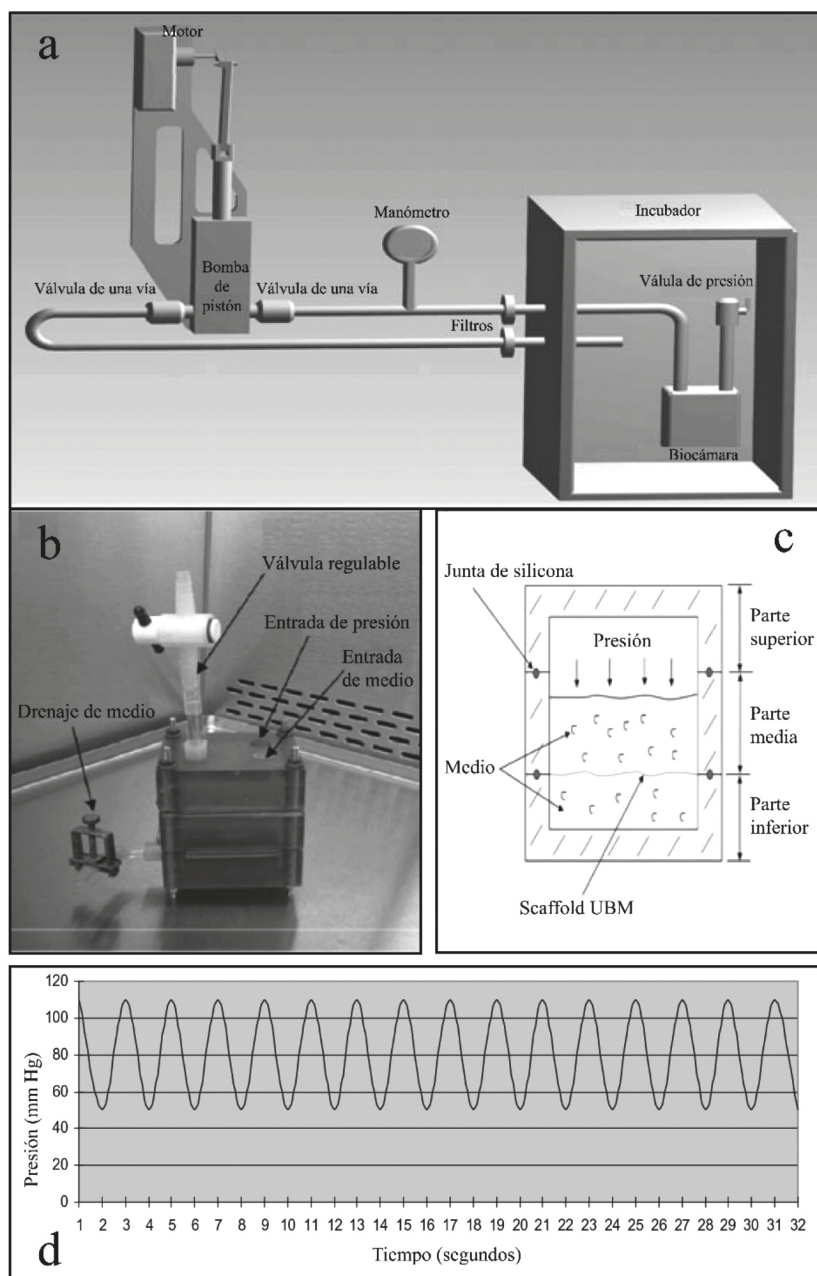


Figura 2. Biorreactor de presión hidrostática pulsátil: (a) Diagrama esquemático de las diferentes partes del biorreactor; (b) Cuerpo del biorreactor y la válvula regulable para controlar la presión dentro del biorreactor; (c) Sección en el biorreactor mostrando las diferentes partes del biorreactor y la localización del *scaffold* de membrana urinaria de vejiga (UBM) dentro del biorreactor; (d) Número de ciclos y presión aplicada dentro del biorreactor. Modificado con permiso de Shaikh *et al.* [64].

En este biorreactor, los autores intentaron imitar únicamente la presión hidrostática sobre las construcciones desarrolladas en lugar de aplicar todas las tensiones mecánicas presentes en el entorno de los vasos sanguíneos.

El siguiente ejemplo de biorreactor de vejiga desarrollado en 2011 se construyó para simular la dinámica fisiológica de la vejiga con un regulador de presión cíclico que imitaba las presiones de llenado de la vejiga humana [65]. El objetivo de este estudio fue comparar la viabilidad y actividad proliferativa de los *scaffolds* con células cultivadas en el biorreactor en condiciones de crecimiento estáticas.

En este estudio, las presiones de llenado cíclicas de la vejiga humana se reprodujeron con un regulador de baja presión de descarga conectando a una botella de gas (95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub>) para aumentar la presión de fluido dentro el biorreactor de 0 a 10 cmH<sub>2</sub>O en el constructo UBM sembrado. Los resultados de estos ensayos mostraron que mediante este tipo de cultivo en biorreactor se consiguió un crecimiento significativamente mayor de células uroteliales humanas (UC) en los *scaffolds* de ECM porcina que cuando se cultiva en condiciones convencionales de laboratorio estático.

Otro biorreactor de simulación de la dinámica de llenado y vaciado de la vejiga fue aquel diseñado con un aumento de la presión cíclica de hasta 15 cmH<sub>2</sub>O utilizando fibroblastos y células uroteliales [66]. Por otro lado, el primer informe de presión hidrodinámica cíclica que estimula la proliferación de células del músculo liso de la vejiga humana cultivadas en *scaffolds* se realizó en el año 2012 en un biorreactor BioDynamic® en el que se aplicaron cuatro presiones diferentes desde 0 hasta 300 cmH<sub>2</sub>O en el constructo con células sembradas [67]. Sin embargo, en un estudio mucho más reciente se utilizó un biorreactor BioDynamic BOSE modificado (figura 3) que demostró que un estiramiento fisiológico óptimo durante el ciclo vesical puede ser muy beneficioso para las células del músculo liso de la vejiga humana (HBSMC) [68].

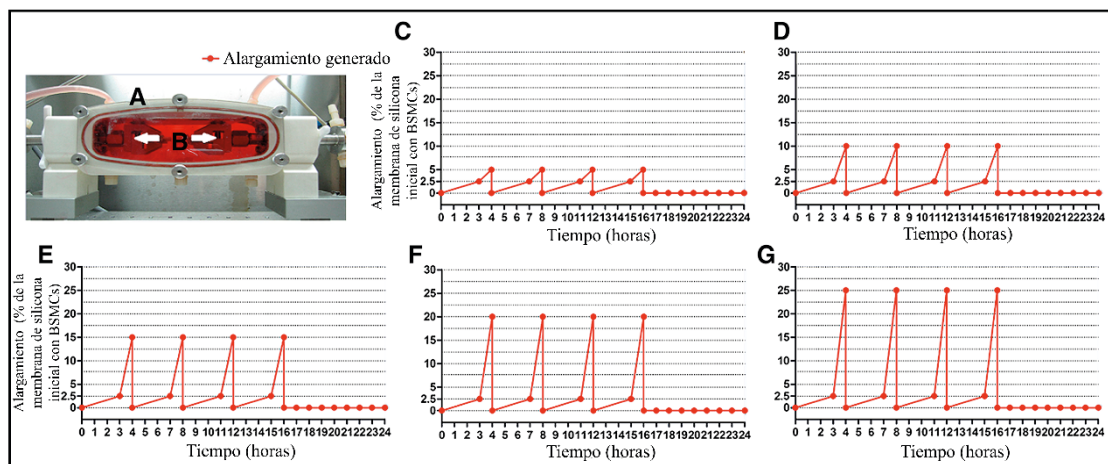


Figura 3. Biorreactor para crecimiento *in vitro* de células HBSMC funcionales: Biorreactor controlado por computadora (A); Las flechas indican las direcciones del estiramiento uniaxial (B); Células HBSMC en el biorreactor estimuladas con diversos grados de elongación o ciclos de estiramiento. Durante 24 h, las células se expusieron a 4 × 4 h de estimulación cíclica a 0,1 Hz, seguido de 8 h de reposo. Cada estimulación cíclica constaba de dos fases: inicial (0-3 h con un aumento progresivo de 0 a 2,5 %) y una segunda (1 h) fase de estiramiento, diferente en distintos grupos: 5 % (C), 10 % (D), 15 % (E), 20 % (F) y 25 % (G). Modificado con permiso de Luo *et al.* [68].



En un esfuerzo por identificar los efectos del estiramiento mecánico en células BSMC, varios investigadores importantes han empleado previamente una variedad de experimentos efectivos sometiendo a las células a un estiramiento uniforme [69]. Sin embargo, estas cargas simples generadas a partir de estos estiramientos no pudieron simular bien las condiciones de estiramiento en las que la vejiga está habitualmente funcionando. Por esta razón, en los últimos años, la investigación en este campo se ha centrado principalmente en el diseño de un patrón de estiramiento mecánico fisiológico controlable para poder aplicarlo en células BSMC, y, así, proporcionar una mejor reproducción de las condiciones in vivo.

El efecto del estiramiento mecánico uniaxial sobre sustratos elásticos sembrados con células se publicó en 1976 por primera vez [70], y dispositivos posteriores desarrollados de estiramiento biaxial, como el aparato comercial Flexercell [71], se han introducido en muchos laboratorios de investigación que trabajan en esta área. Sin embargo, el estiramiento producido por estos sistemas no es fisiológicamente relevante, ya que varios estudios han demostrado que un sistema mecánico impuesto durante el ciclo de llenado-vaciado de la vejiga puede mejorar las funciones biológicas de la célula [66,72].

Las células de músculo liso se orientan perpendicularmente a la dirección de la tensión o estiramiento máximo [73,74]. No obstante, se ha demostrado que en un ambiente tridimensional las células responden en paralelo a la dirección de la fuerza mecánica [75]. Además de la dirección de estiramiento, la respuesta de la reorientación celular depende de la magnitud de estiramiento y la frecuencia de estiramiento en la respuesta fisiológica de las células [73]. Las células HBSMC cultivadas bajo condiciones de estiramiento muestran un índice de proliferación más alto que aquellos bajo condiciones estáticas. Varios estudios previos han demostrado respuestas hiperplásicas de BSMC al estiramiento cíclico [76-78] y existe un estiramiento óptimo para la proliferación celular que depende de la magnitud del estiramiento [79]. Estos últimos hallazgos también han mostrado que el estiramiento mecánico puede promover una morfología dependiente de la magnitud, la proliferación celular y la modulación de la contractilidad de los HBSMC *in vitro*. En un estudio muy reciente se ha estudiado el efecto de deformación cíclica uniaxial en un cultivo de células de vejiga urinaria que se sembraron en un *scaffold* de colágeno tipo I [36] en un biorreactor Bose Electroforce Bio-Dynamic (figura 4).

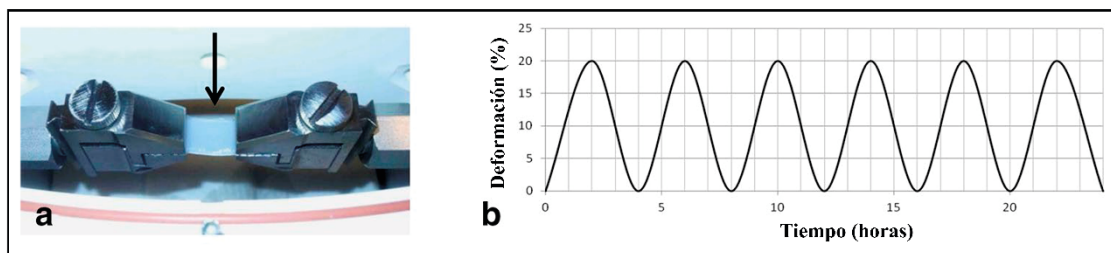


Figura 4. Biorreactor Bose Electroforce Bio-Dynamic: descripción general de la configuración experimental con una tira de *scaffold* sujeta en el biorreactor (flecha) (a); Programa general de biorreactor con una deformación cíclica continua de  $0,3 \mu\text{m/s}$  (20 % de estiramiento completo y pliegue en 4 h). Modificado con permiso de Tiemessen *et al.* [36].

En estos ensayos, las tiras de *scaffolds* de colágeno se situaron en una placa de 6 pocillos y se sembraron estáticamente con SMC o UC. Después de la siembra, se colocaron las tiras con células en el biorreactor para realizar un cultivo de seis días. Durante este tiempo se aplicó deformación cíclica continua de 0,3  $\mu\text{m/s}$  (estiramiento completo al 20 % seguido de plegado en 4 h) (figura 4b). Los resultados de este estudio demostraron que la estimulación dinámica en células de músculo liso sembradas en *scaffolds* de colágeno produce alineación celular y mejora en la tasa de proliferación. Además, la expresión de  $\alpha$  actina muscular y calponina-1 se incrementó sugiriendo la diferenciación de las células del músculo liso a un fenotipo más maduro. Sin embargo, el estímulo mecánico no consiguió la mejora de proliferación y diferenciación esperada de las células uroteliales.

Por otro lado, los biorreactores in vivo, que consisten en la colocación in vivo y ex situ de la construcción de bioingeniería antes de la implantación en la ubicación diana, constituyen otro enfoque de bioingeniería muy aplicable en el campo de la regeneración de la vejiga debido a su ventaja de inducir una rica vascularización. Se añade que el *scaffold* puede transferirse al sitio de reemplazo de la vejiga sin comprometer el suministro de sangre. Este preacondicionamiento in vivo puede favorecer aún más el desarrollo del tejido, mejorar la vascularización del tejido modificado con bioingeniería y prevenir la fibrosis y pérdida de contractilidad [21]. Por ejemplo, con la utilización de epiplón como biorreactor in vivo, que tiene una vasculatura muy rica, consiguió excelentes resultados, ya que los *scaffolds* exhibieron un urotelio multicapa y capas externas organizadas compuestas de SMC y fibroblastos con áreas densas de vascularización [80].

Por tanto, todos estos avances en el campo de biorreactores para regeneración de vejiga ponen de manifiesto la gran importancia de seguir trabajando en esta línea para poder conseguir en el futuro una vejiga funcional perfecta de bioingeniería.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] McCloskey KD. Bladder interstitial cells: An updated review of current knowledge. *Acta Physiologica*. 2013;207:7-15.
- [2] GLOBOCAN 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 v1.0. International Agency for Research on Cancer; 2012. Available at: <http://globocan.iarc.fr>.
- [3] Hautmann RE, Abol-Enein H, Hafez K, Haro I, Mansson W, *et al*. Urinary diversion. World Health Organization (WHO) Consensus Conference on Bladder Cancer. *Urology*. 2007;69(1 Suppl):17-49.
- [4] Miller DC, Taub DA, Dunn RL, Montie JE, Wei JT. The Impact Of Co-morbid Disease on Cancer Control and Survival Following Radical Cystectomy. *J Urol*. 2003;169(1):105-9.
- [5] Atala A, Bauer SB, Hendren WH, Retik AB. The effect of gastric augmentation on bladder function. *J Urol*. 1993;149(5):1099-102.
- [6] Kaefer M, Hendren WH, Bauer SB, Goldenblatt P, Peters CA, Atala A, *et al*. Reservoir calculi: a comparison of reservoirs constructed from stomach and other enteric segments. *J Urol*. 1998;160(6 Pt 1):2187-90.
- [7] Kaefer M, Tobin MS, Hendren WH, Bauer SB, Peters CA, Atala A, *et al*. Continent urinary diversion: the Children's Hospital experience. *J Urol*. 1997;157(4):1394-9.



- [8] Lane T, Shah J. Carcinoma following augmentation ileocystoplasty. *Urol Int.* 2000;64(1):31-2.
- [9] Atala A. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull.* [Accessed: 28th December 2017 Dec 28]. 2011;97(1):81-104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324973>.
- [10] Cano Megías M, Muñoz Delgado EG. Bone and metabolic complications of urinary diversions. *Endocrinol y Nutr órgano la Soc Española Endocrinol y Nutr.* 2015;62(2):100-5.
- [11] Martini T, Mayr R, Wehrberger C, Dechet C, Lodde M, Palermo S, *et al.* Comparison of radical cystectomy with conservative treatment in geriatric ( $\geq 80$ ) patients with muscle-invasive bladder cancer. *Int Braz J Urol.* 2013;39(5):622-30.
- [12] Dray EV, Clemens JQ. Recurrent urinary tract infections in patients with incomplete bladder emptying: is there a role for intravesical therapy? *Transl Androl Urol.* 2017;6(S2):S163-70.
- [13] Wu SY, Jiang YH, Kuo HC. Long-term outcomes of augmentation enterocystoplasty in patients with end-stage bladder diseases: A single-institute experience involving 102 patients. *Int Neurourol J.* 2017;21(2):133-8.
- [14] Gilbert S, Hensle T. Metabolic consequences and long-term complications of enterocystoplasty in children: a review. *J Urol.* 2005;173(4):1080-6.
- [15] Alberti C. Metabolic and histological complications in ileal urinary diversion: Challenges of tissue engineering technology to avoid them. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2007;11(4):257-64.
- [16] Wrenn SM, Weiss DJ. Whole-Organ Tissue Engineering: No Longer Just a Dream. *Curr Pathobiol Rep.* [Accessed: 18th July 2017]. 2016 Sep 29;4(3):87-98. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s40139-016-0110-x>.
- [17] Orabi H, Bouhout S, Morissette A, Rousseau A, Chabaud S, Bolduc S. Tissue engineering of urinary bladder and urethra: Advances from bench to patients. *The Scientific World Journal.* 2013; vol. 2013:1-13.
- [18] Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006;367(9518):1241-6.
- [19] Van Blitterswijk C, De Boer J. *Tissue engineering.* Oxford (UK): Academic Press; 2014.
- [20] Farhat WA, Yeger H. Does mechanical stimulation have any role in urinary bladder tissue engineering? *World J Urol.* 2008;26(4):301-5.
- [21] Horst M, Madduri S, Gobet R, Sulser T, Milleret V, Hall H, *et al.* Engineering functional bladder tissues. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2013;vol. 7:515-22.
- [22] Corona BT, Ward CL, Harrison BS, Christ GJ. Regenerative medicine: basic concepts, current status, and future applications. *J Investig Med.* 2010;58(7):849-58.
- [23] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;vol. 32:3233-43.
- [24] Sutherland RS, Baskin LS, Hayward SW, Cunha GR. Regeneration of bladder urothelium, smooth muscle, blood vessels and nerves into an acellular tissue matrix. *J Urol.* 1996;156(2):571-7.
- [25] Zhang Y, Frimberger D, Cheng EY, Lin HK, Kropp BP. Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model. *BJU Int.* 2006;98(5):1100-5.
- [26] Kropp BP, Rippy MK, Badylak SF, Adams MC, Keating MA, Rink RC, *et al.* Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: Urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J Urol.* 1996;155(6):2098-104.



- [27] Reddy PP, Barrieras DJ, Wilson G, Bägli DJ, McLorie GA, Khoury AE, *et al.* Regeneration of functional bladder substitutes using large segment acellular matrix allografts in a porcine model. *J Urol.* 2000;164(3 Pt 2):936-41.
- [28] Sievert KD, Amend B, Stenzl A. Tissue Engineering for the Lower Urinary Tract: A Review of a State of the Art Approach. *Eur Urol.* 2007;52(6):1580-9.
- [29] Brown AL, Farhat W, Merguerian PA, Wilson GJ, Khoury AE, Woodhouse KA. 22 Week assessment of bladder acellular matrix as a bladder augmentation material in a porcine model. *Biomaterials.* 2002;23(10):2179-90.
- [30] Arenas-Herrera JE, Ko IK, Atala A, Yoo JJ. Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomedical Materials (Bristol).* 2013;vol. 8:014106.
- [31] Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology.* 2003;vol. 14:551-8.
- [32] F.D.A. EVOLENCE Collagen Filler - P070013. 2008.
- [33] Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater.* 2011;23(12):H41-56.
- [34] Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012;37(1):106-26.
- [35] Godbey WT, Atala A. In vitro systems for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;961:10-26.
- [36] Tiemessen D, de Jonge P, Daamen W, Feitz W, Geutjes P, Oosterwijk E. The effect of a cyclic uniaxial strain on urinary bladder cells. *World J Urol.* [Accessed: 9th July 2017]. 2017 Feb 23;1-9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28229212>.
- [37] Kajbafzadeh AM, Esfahani SA, Talab SS, Elmi A, Monajemzadeh M. In-vivo autologous bladder muscular wall regeneration: Application of tissue-engineered pericardium in a model of bladder as a bioreactor. *J Pediatr Urol.* 2011;7(3):317-23.
- [38] Pillai CKS, Sharma CP. Review Paper: Absorbable Polymeric Surgical Sutures: Chemistry, Production, Properties, Biodegradability, and Performance. *J Biomater Appl.* 2010;25(4):291-366.
- [39] Patel H, Bonde M, Srinivasan G. Biodegradable polymer scaffold for tissue engineering. *Trends Biomater Artif Organs.* 2011;25(1):20-9.
- [40] Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly( $\epsilon$ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials.* [Accessed: 9th July 2017]. 2008 Jul;29(19):2899-906. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18400295>.
- [41] Baker SC, Rohman G, Southgate J, Cameron NR. The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. *Biomaterials.* 2009;30(7):1321-8.
- [42] Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials. *Science (80- ).* 1994;263(5154):1715-20.
- [43] Mauney JR, Cannon GM, Lovett ML, Gong EM, Di Vizio D, Gomez P, *et al.* Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. *Biomaterials.* 2011;32(3):808-18.



- [44] Nakanishi Y, Chen G, Komuro H, Ushida T, Kaneko S, Tateishi T, *et al.* Tissue-Engineered Urinary Bladder Wall Using PLGA Mesh-Collagen Hybrid Scaffolds: A Comparison Study of Collagen Sponge and Gel as a Scaffold. *Journal of Pediatric Surgery*. 2003;1781-4.
- [45] Eberli D, Filho LF, Atala A, Yoo JJ. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. *Methods*. 2009 Feb;47(2):109-15.
- [46] Zhang Y, McNeill E, Tian H, Soker S, Andersson KE, Yoo JJ, *et al.* Urine Derived Cells are a Potential Source for Urological Tissue Reconstruction. *J Urol*. 2008;180(5):2226-33.
- [47] Kim SO, Na HS, Kwon D, Joo SY, Kim HS, Ahn Y. Bone-Marrow-Derived mesenchymal stem cell transplantation enhances closing pressure and leak point pressure in a female urinary incontinence rat model. *Urol Int*. 2011;86(1):110-6.
- [48] Deng K, Lin DL, Hanzlicek B, Balog B, Penn MS, Kiedrowski MJ, *et al.* Mesenchymal stem cells and their secretome partially restore nerve and urethral function in a dual muscle and nerve injury stress urinary incontinence model. *AJP Ren Physiol*. 2015;308(2):F92-100.
- [49] Chung SY, Krivorov NP, Rausei V, Thomas L, Frantzen M, Landsittel D, *et al.* Bladder reconstitution with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition. *J Urol*. 2005;174(1):353-9.
- [50] Jack GS, Zhang R, Lee M, Xu Y, Wu BM, Rodríguez LV. Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite. *Biomaterials*. 2009;30(19):3259-70.
- [51] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
- [52] Zisch AH, Lutolf MP, Hubbell JA. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovascular Pathology*. 2003;vol. 12:295-310.
- [53] Jeyaraj R, Natasha G, Kirby G, Rajadas J, Mosahebi A, Seifalian AM, *et al.* Vascularisation in regenerative therapeutics and surgery. *Materials Science and Engineering C*. 2015;vol. 12:225-38.
- [54] Phelps EA, García AJ. Engineering more than a cell: Vascularization strategies in tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*. 2010;vol. 21:704-9.
- [55] Xiao D, Wang Q, Yan H, Lv X, Zhao Y, Zhou Z. Adipose-derived stem cells-seeded bladder acellular matrix graft-silk fibroin enhances bladder reconstruction in a rat model. *Oncotarget*. 2017;8(49):86471-87.
- [56] Chan Y, Sandlin S, Kurzrock E, Osborn S. The Current Use of Stem Cells in Bladder Tissue Regeneration and Bioengineering. *Biomedicines*. 2017;5(1):4.
- [57] Pokrywczynska M, Adamowicz J, Sharma AK, Drewa T. Human urinary bladder regeneration through tissue engineering - An analysis of 131 clinical cases. *Experimental Biology and Medicine*. 2014;vol. 239:264-71.
- [58] Wallis MC, Yeger H, Cartwright L, Shou Z, Radisic M, Haig J, *et al.* Feasibility study of a novel urinary bladder bioreactor. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(3):339-48.
- [59] Haberstroh KM, Kaefer M, Depaola N, Frommer SA, Bizios R. A Novel In-Vitro System for the Simultaneous Exposure of Bladder Smooth Muscle Cells to Mechanical Strain and Sustained Hydrostatic Pressure. *J Biomech Eng*. 2002;124(2):208-13.



- [60] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 2004;vol. 22:80-6.
- [61] Adam RM, Eaton SH, Estrada C, Nimgaonkar A, Shih S-C, Smith LEH, *et al.* Mechanical stretch is a highly selective regulator of gene expression in human bladder smooth muscle cells. *Physiol Genomics*. 2004;20(1):36-44.
- [62] Park JM, Borer JG, Freeman MR, Peters CA. Stretch activates heparin-binding EGF-like growth factor expression in bladder smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998;275(5 Pt 1):C1247-54.
- [63] Baskin L, Howard PS, Macarak E. Effect of physical forces on bladder smooth muscle and urothelium. *J Urol*. 1993;150(2 Pt 2):601-7.
- [64] Shaikh FM, O'Brien TP, Callanan A, Kavanagh EG, Burke PE, Grace PA, *et al.* New pulsatile hydrostatic pressure bioreactor for vascular tissue-engineered constructs. *Artif Organs*. 2010;34(2):153-8.
- [65] Davis NF, Mooney R, Piterina AV, Callanan A, McGuire BB, Flood HD, *et al.* Construction and evaluation of urinary bladder bioreactor for urologic tissue-engineering purposes. *Urology*. 2011;78(4):954-60.
- [66] Bouhout S, Gauvin R, Gibot L, Aubé D, Bolduc S. Bladder substitute reconstructed in a physiological pressure environment. *J Pediatr Urol*. 2011;7(3):276-82.
- [67] Chen L, Wei T, Wang Y, Zhang J, Li H, Wang K. Simulated bladder pressure stimulates human bladder smooth muscle cell proliferation via the PI3K/SKG1 signaling pathway. *J Urol*. 2012;188(2):661-7.
- [68] Luo DY, Wazir R, Du C, Tian Y, Yue X, Wei TQ, *et al.* Magnitude-dependent proliferation and contractility modulation of human bladder smooth muscle cells under physiological stretch. *World J Urol*. 2015;33(11):1881-7.
- [69] Atala A. Tissue engineering of human bladder. *Br Med Bull*. 2011;97(1):81-104.
- [70] Leung DY, Glagov S, Mathews MB. Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science*. 1976;191(4226):475-7.
- [71] Vande Geest JP, Di Martino ES, Vorp DA. An analysis of the complete strain field within Flexercell™ membranes. *J Biomech*. 2004;37(12):1923-8.
- [72] Halachmi S, Aitken KJ, Szybowska M, Sabha N, Dessouki S, Lorenzo A, *et al.* Role of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in stretch injury to bladder smooth muscle cells. *Cell Tissue Res*. 2006;326(1):149-58.
- [73] Qu MJ, Liu B, Wang HQ, Yan ZQ, Shen BR, Jiang ZL. Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *J Vasc Res*. 2007;44(5):345-53.
- [74] Houtchens GR, Foster MD, Desai TA, Morgan EF, Wong JY. Combined effects of microtopography and cyclic strain on vascular smooth muscle cell orientation. *J Biomech*. 2008;41(4):762-9.
- [75] Pang Y, Wang X, Lee D, Greisler HP. Dynamic quantitative visualization of single cell alignment and migration and matrix remodeling in 3-D collagen hydrogels under mechanical force. *Biomaterials*. 2011;32(15):3776-83.
- [76] Adam RM, Roth JA, Cheng H-L, Rice DC, Khoury J, Bauer SB, *et al.* Signaling Through PI3K/Akt Mediates Stretch and PDGF-BB-Dependent DNA Synthesis in Bladder Smooth Muscle Cells. *J Urol*. 2003;169(6):2388-93.



- [77] Orsola A, Adam RM, Peters CA, Freeman MR. The decision to undergo DNA or protein synthesis is determined by the degree of mechanical deformation in human bladder muscle cells. *Urology*. 2002;59(5):779-83.
- [78] Upadhyay J, Aitken KJ, Damdar C, Bolduc S, Bägli DJ. Integrins expressed with bladder extracellular matrix after stretch injury in vivo mediate bladder smooth muscle cell growth in vitro. *J Urol*. 2003;169(2):750-5.
- [79] Baskin L, Meaney D, Landsman A, Zderic SA, Macarak E. Bovine bladder compliance increases with normal fetal development. *J Urol*. 1994;152(2 Pt 2):692-5; discussion 696-7.
- [80] Baumert H, Simon P, Hekmati M, Fromont G, Levy M, Balaton A, *et al*. Development of a Seeded Scaffold in the Great Omentum: Feasibility of an in vivo Bioreactor for Bladder Tissue Engineering. *Eur Urol*. 2007;52(3):884-92.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir mediante el proyecto de investigación 2018-231-001UCV y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) incluido en el Programa Operativo FEDER de la Comunidad Valenciana 2014-2020.

