

# Generación de una placa uretral humana utilizando fuentes alternativas de células madre mesenquimales y matrices derivadas de células madre mediante ingeniería de tejidos

## Propuesta de investigación

Gabriel David merchán Chia  
Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud  
gmerchan@unab.edu.co

Angie Tatiana Pacheco Cuartas  
Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud  
apacheco67@unab.edu.co

Juan Pablo Rodríguez Noriega  
Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud  
Jrodriguez418@unab.edu.co

Kathalina Angarita Parra  
Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud  
kangarita425@unab.edu.co

Universidad Autónoma de Bucaramanga

## RESUMEN

El actual tratamiento de las hipospadias es, en ocasiones, complicado y requiere la realización de técnicas de alta complejidad para la reconstrucción quirúrgica de la estructura uretral, las cuales están basadas principalmente en la aplicación de injertos de piel, vejiga urinaria y mucosa bucal. Todos estos sustitutos, presentan diversas limitaciones y complicaciones, entre las más comunes encontramos las infecciones, rechazos de los injertos, dolor, hemorragia y deformidades, entre otros. En este contexto, la generación de una uretra artificial en el laboratorio mediante técnicas de ingeniería de tejidos supone un gran avance en este campo, disminuyendo el número de complicaciones y permitiendo la restauración funcional de la uretra. En el presente proyecto, se generarán y compararán modelos de placa uretral artificial, utilizando matrices extracelulares derivadas de células (CDM), células epiteliales de placa uretral y células madre mesenquimales con el objetivo de determinar su posible utilidad potencial.

Este material es presentado al XIII Encuentro de Semilleros de Investigación. Una actividad de carácter formativo. La Universidad Autónoma de Bucaramanga se reserva los derechos de divulgación con fines académicos, respetando en todo caso los derechos morales de los autores y bajo discrecionalidad del grupo de investigación que respalda cada trabajo para definir los derechos de autor.

## ABSTRACT

The current treatment of hypospadias is sometimes complicated and requires the performance of highly complex techniques for surgical reconstruction of the urethral structure, which are mainly based on the application of skin grafts, urinary bladder and oral mucosa. All these substitutes have various limitations and complications, among the most common are infections, graft rejections, pain, bleeding and deformities, among others. In this context, the generation of an artificial urethra in the laboratory through tissue engineering techniques represents a great advance in this field, reducing the number of complications and allowing the functional restoration of the urethra. In this project, models of artificial urethral plaque will be generated and compared, using extracellular matrices derived from cells (CDM), epithelial cells

from urethral plaque and mesenchymal stem cells in order to determine their potential utility.

## Área de Conocimiento

Medicina regenerativa, Ingeniería de Tejidos.

## Palabras Clave

Ingeniería de tejidos, células madre, mucosa uretral, matrices derivadas de células.

## Introducción

En los últimos años, el diagnóstico y tratamiento de patologías urológicas en pacientes pediátricos ha cobrado gran relevancia en medicina. Como consecuencia de esta creciente demanda de atención en salud, es que ha cobrado gran relevancia la urología pediátrica, la cual, es una subespecialidad surgida de la cirugía pediátrica y de la urología general, que abarca el reconocimiento clínico, la prevención, el tratamiento (quirúrgico y no quirúrgico) y la rehabilitación de las enfermedades congénitas y adquiridas, malformaciones y problemas funcionales, así como la promoción de la salud del sistema genitourinario en los niños y adolescentes[1]. En la actualidad, a pesar de los avances de la urología la reconstrucción uretral continúa siendo un gran limitante para los urólogos pediatras modernos, siendo las hipospadias su indicación más frecuente [2].

La utilización de estas neouretras construidas utilizando injertos de piel o injertos de mucosa oral, han presentado múltiples complicaciones, no solo en el sitio de obtención del tejido a injertar, sino en la zona del injerto, a nivel del periodo puberal, estas neouretras construidas quirúrgicamente, pueden presentar ausencia de su desarrollo, alterando el crecimiento del pene a medida que la persona afectada madura hasta la etapa postpuberal, desencadenando además el desarrollo de graves estenosis uretrales recurrentes [3], [4]. Eventualmente, cualquier forma de sustitución de uretroplastia parece empeorar con el tiempo, ya que las tasas de complicaciones parecen aumentar con la duración del seguimiento [3]–[5].

Debido a todas estas limitaciones, la ingeniería de tejidos en los últimos años surge como una rama de la medicina, con un gran potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos, lo que ha permitido disponer de sustitutos artificiales de distinta naturaleza

y eficacia [6] [7], los cuales, pueden sustituir las complejas técnicas de urología reconstructiva pediátrica basadas en injertos y trasplantes. La elaboración de estos nuevos sustitutos artificiales a partir de biomateriales y matrices derivadas de células, intenta superar las limitaciones de los existentes en la actualidad, a la vez que mejorar los indicadores de coste-eficacia en este tipo de terapéutica, especialmente aplicadas en los servicios públicos de salud [8] [9].

En este proyecto, desarrollaremos una placa uretral humana utilizando células madre mesenquimales y matrices derivadas de células que permitan el desarrollo de un nuevo modeloterapéutico y una nueva alternativa para pacientes con patologías uretrales, cuyos tratamientos tradicionales no les den solución a sus problemas de salud.

### **Objetivos**

1. Construir un modelo placa uretral humana artificial mediante ingeniería de tejidos.
2. Construir sustitutos de placa uretral tridimensionales.
3. Evaluar in vitro los sustitutos de placa uretral humana artificial mediante análisis histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos.

### **Materiales y métodos**

#### **Diseño**

Estudio de experimentación básica en el que se compararan y evaluarán in vitro nuevos modelos de placa uretral artificial fabricados mediante ingeniería de tejidos.

### Generación de tejidos artificiales

#### Generación de placa uretral humana artificial mediante ingeniería tisular.

##### 1. Cultivos primarios.

Para la generación de cultivos primarios de células epiteliales y estromales (fibroblastos) de placa uretral, se utilizarán pequeños fragmentos de placa uretral. Cabe destacar, que los fragmentos de placa uretral humana se obtendrán de donantes pediátricos con hipospadía. En ambos casos, los pacientes deben expresar previamente su consentimiento de forma escrita para ser incluidos en este estudio, en el caso de ser menores de edad, el consentimiento deberá ser dado por los tutores legales. Todos los fragmentos de placa uretral serán extraídos por el equipo de urología pediátrica bajo anestesia general durante procedimientos de cirugía mayor en pacientes con hipospadía proximal. El procedimiento realizado para la extracción de estos fragmentos es conocido como técnica de Snodgrass.

##### 1.1. Cultivo de células epiteliales de la placa uretral humana

La obtención de los cultivos primarios de células epiteliales de la placa uretral humana se realizará mediante la técnica de explante [10] [11] [12]. Para lo cual, las muestras de placa uretral humana serán fragmentadas en múltiples porciones de aproximadamente 0,5 por 0,5 cm de diámetro. Posteriormente, serán cultivadas en frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup>; utilizando medio de cultivo para células epiteliales denominado (QC) constituido por HAM-F12: 150 ml; DMEM: 300 ml; suero bovino fetal: 50 ml; penicilina/estreptomicina: 50 UI/ml; adenina: 24 µg/ml; insulina: 5 µg/ml; hidrocortisona: 0.4 µg/ml y factor de crecimiento epidérmico: 10 ng/ml, se mantendrán los cultivos a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 1.2. Cultivo de células estromales de la placa uretral humana

La obtención de células estromales de la placa uretral humana (fibroblastos) se realizará mediante técnica enzimática con colagenasa tipo I. Posteriormente, las muestras serán centrifugadas y el pellet celular será resuspendido en 5 mililitros de medio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Sigma-Aldrich) y solución antibiótica / antimicótica al 1% (Sigma-Aldrich). Todas las células se incubarán en condiciones de cultivo celular estándar. El medio será cambiado cada 3 días y las células se tripsinizarán usando 0.5 g / l de tripsina, cuando lleguen a una 70 % de confluencia con el objetivo de expandir los cultivos celulares.

##### 1.3. Cultivo de células madre mesenquimales

Las WHJSC serán obtenidas a partir de pequeñas biopsias de cordón umbilical de recién nacidos por cesárea los cuales se encontraban a término. En primer lugar, se eliminará quirúrgicamente las arterias y venas. A continuación, se procederá a cortar las biopsias en fragmentos de aproximadamente 0,5 por 0,5 cm de diámetro. Posteriormente, los fragmentos serán digeridos mediante colagenasa tipo I (Gibco BRL Life Technologies) y Tripsina-EDTA (Gibco BRL Life technologies). Permitiendo el aislamiento y cultivo de las WHJSC, las cuales serán cultivadas en frascos de 25cm<sup>2</sup> y mantenidas en medio de cultivo Amniomax-C100 [13].

Las células madre mesenquimales de pulpa dental (hDPSC) serán obtenidas de terceros molares. Los cuáles serán lavados y cortados a nivel de la unión cemento-esmalte. Con la cámara de la pulpa dental expuesta, se procederá a separar suavemente la pulpa de la corona y la raíz dental, que será digerida en una solución de colagenasa tipo colagenasa tipo I (Gibco BRL Life Technologies) durante seis horas. Transcurrido este tiempo, la solución será centrifugada a 1000 RPM durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Las hDPSC obtenidas serán resuspendidas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% suero bovino fetal y solución antibiótica y antimicótica al 1% (Sigma-Aldrich).

Todos los cultivos celulares se mantendrán bajo condiciones estándares a 37°C en incubadora humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 2. Generación de un sustituto estromal de placa uretral.

Para la generación de sustituto estromal de placa uretral humana, se utilizarán los cultivos primarios de fibroblastos de placa uretral humana, los cuales serán expandidos hasta el pasaje número dos. Una vez obtenido dicho pasaje se expandirán nuevamente las células, las cuales, serán cultivadas en una proporción de 5x10<sup>4</sup> células por cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de termo-respuesta (Nunc, Thermo Scientific, Denmark) de 35 mm y serán mantenidos en medio de cultivo DMEM más medio de cultivo Ham's-F12 (Sigma Aldrich) en una proporción 3:1, suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% antibiótico/antimicótico y 50 µg/ml de ácido ascórbico. Todos los medios serán cambiados cada tres días y los cultivos serán mantenidos a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de catorce a veintidós días y bajo el estímulo del ácido ascórbico, los fibroblastos secretarán y depositarán su propia matriz extracelular, formando láminas gruesas de matriz extracelular sobre la superficie de las placas de cultivo. Las cuales, serán posteriormente colocadas durante 10 minutos a temperatura ambiente, lo que va a permitir el desprendimiento de las láminas de matriz extracelular de las placas de cultivo. Una vez obtenidas y separadas, se tomarán

cuatro láminas las cuales serán superpuestas una sobre otra formando de esta manera el sustituto estromal. [14], [15] [16] [17]

### 3. Generación del sustituto epitelial de placa uretral.

Con los sustitutos estromales de la placa uretral humana formados, tal y como se describió en el apartado anterior, se procederá a formar el equivalente epitelial ortotípico y heterotípico de la placa uretral humana sobre la superficie estromal. Para esto, se utilizarán sistemas de cultivo transwell con membranas porosas de 0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro (Costar, Corning Inc, New York, EEUU). Cada placa de este sistema de cultivo tiene 6 pocillos, los cuales poseen a su vez una membrana de policarbonato sobre la cual será depositado el sustituto estromal. El cual estará inmerso en medio de cultivo DMEM suplementado con antibióticos, antimicóticos y suero bovino fetal.

Veinticuatro horas después de depositar los sustitutos estromales en los pocillos del sistema de cultivo transwell, se procederá a generar los sustitutos ortotípicos y heterotípicos. En el primer caso, se tripsinizarán los frascos de cultivos primarios de queratinocitos, posteriormente, Las células serán cultivadas (250.000 células en cada caso) sobre la superficie de los sustitutos estromales. En el segundo caso, se cultivarán HWJSC y hDPSC (250.000 células en cada caso) como fuente alternativa celular para la generación del sustituto epitelial. Todos los sustitutos se mantendrán en medio de cultivo QC durante diez días, posteriormente, se utilizará la técnica aire-líquido durante diez a quince días para favorecer la estratificación y la maduración epitelial

#### Grupos de estudio

Se obtendrán en total tres grupos de tejidos artificiales: el primero, estará compuesto por tejidos artificiales ortotípicos de placa uretral, el segundo, por tejidos artificiales de placa uretral heterotípicos con HWJSC y el tercero, por tejidos artificiales de placa uretral heterotípicos con hDPSC. Por cada grupo generaremos veinticuatro sustitutos artificiales, que serán distribuidos en cuatro placas de cultivo tipo transwell de seis pocillos. Cabe destacar que se mantendrá un tejido artificial por cada uno de los seis pocillos. Finalmente, cada una de las cuatro placas de los tres grupos será seleccionada, procesadas y analizadas a los 4, 7, 12 y 18 días

#### Análisis

A los 4, 7, 12 y 18 días se evaluarán los tejidos artificiales heterotípicos y ortotípicos mediante análisis histológicos de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Además, se procederá a evaluar las muestras mediante técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica, permitiendo la caracterización, el análisis y la comparación detallado de la estructura y ultraestructura de los tejidos artificiales y de los grupos generados en el presente estudio.

#### **Cronograma**

Durante el primer año, se establecerán y expandirán los cultivos primarios de células de la placa uretral humana, HWJSC y hDPSC. Posteriormente, durante el segundo año, se elaborarán los sustitutos de placa uretral humana artificial ortotípica y heterotípica utilizando las técnicas de ingeniería tisular expuestas previamente. Además, se iniciarán los estudios histológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y los análisis mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido. Finalmente, durante el tercer año se iniciará el análisis de los resultados obtenidos comparando las características estructurales

y ultraestructurales de los tejidos artificiales de placa uretral desarrollados. Además, si los resultados son positivos, se elaborarán los trabajos relacionados con dichos resultados para su posible publicación en revistas científicas especializadas.

#### **Resultados esperados**

Se espera obtener un nuevo modelo de placa uretral artificial humana, utilizando HWJSC y hDPSC junto con matrices derivadas de células, la cual posea un alto grado de biomimetismo con la placa uretral humana nativa a nivel estructural y ultraestructural. Brindando una nueva alternativa terapéutica para patologías uretrales como las hipospadias cuyos tratamientos tradicionales son complejos y con grandes contraindicaciones.

#### **Referencias**

- [1] E. U. Rop, E. A. N. Un, I. O. N. Of, y M. Sp, «Training Requirements for the Subspecialty Paediatric Urology under both Urology and Paediatric Surgery».
- [2] H. J. R. Van Der Horst y L. L. De Wall, «Hypospadias , all there is to know», pp. 435-441, 2017.
- [3] A. S. Mao y D. J. Mooney, «Regenerative medicine: Current therapies and future directions», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n.º 47, pp. 14452-14459, nov. 2015.
- [4] T. O. Abbas, E. Mahdi, A. Hasan, A. AlAnsari, y C. P. Pennisi, «Current Status of Tissue Engineering in the Management of Severe Hypospadias.», *Front. Pediatr.*, vol. 5, p. 283, 2017.
- [5] S. A. Mousavi y M. Aarabi, «Tubularized incised plate urethroplasty for hypospadias reoperation : a review and meta-analysis», vol. 40, n.º 5, pp. 588-595, 2014.
- [6] Y. J. Teng *et al.*, «Bioengineered skin in diabetic foot ulcers», *Diabetes, Obes. Metab.*, vol. 12, n.º 4, pp. 307-315, 2010.
- [7] C. Paquet *et al.*, «Tissue engineering of skin and cornea: Development of new models for in vitro studies», en *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, vol. 1197, pp. 166-177.
- [8] S. G. Priya, H. Jungvid, y A. Kumar, «Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration», *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 14, n.º 1, pp. 105-118, 2008.
- [9] L. E. Fitzpatrick y T. C. McDevitt, «Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications», *Biomater. Sci.*, vol. 3, n.º 1, pp. 12-24, 2015.
- [10] J. I. Kreisberg y P. D. Wilson, «Renal cell culture.», *J. Electron Microsc. Tech.*, vol. 9, n.º 3, pp. 235-263, 1988.
- [11] D. J. Merchant, «Primary explant culture of human prostate tissue: a model for the study of prostate physiology and pathology», *Prostate*, vol. 16, n.º 2, pp. 103-126, 1990.

- [12] A. Nakamura, T. Kumazawa, D. J. Lim, T. F. Demaria, y C. A. V. Blitterswijk, «Culture of middle ear epithelium: A review», *Acta Otolaryngol.*, vol. 113, n.º S500, pp. 75-79, 1993.
- [13] I. Garzón *et al.*, «Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration», *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 2, n.º 8, pp. 625-632, ago. 2013.
- [14] M. T. Cerqueira, R. P. Pirraco, A. R. Martins, T. C. Santos, R. L. Reis, y A. P. Marques, «Cell sheet technology-driven re-epithelialization and neovascularization of skin wounds», *Acta Biomater.*, vol. 10, n.º 7, pp. 3145-3155, 2014.
- [15] M. T. Cerqueira *et al.*, «Human adipose stem cells cell sheet constructs impact epidermal morphogenesis in full-thickness excisional wounds», *Biomacromolecules*, vol. 14, n.º 11, pp. 3997-4008, 2013.
- [16] S. Proulx *et al.*, «Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types», *Mol Vis*, vol. 16, n.º October, pp. 2192-2201, 2010.
- [17] J. M. Bourget *et al.*, «Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering», *Biomaterials*, vol. 33, n.º 36, pp. 9205-9213, 2012.

#### Identificación del proyecto

Nombre del Semillero	Semillero de Ingeniería de Tejidos
Tutor del Proyecto	Dr. Boris Damian Jaimes Parra PhD Biomedicina, M.Sc Ing. Tisular, Medico.
Grupo de Investigación	Grupo de investigación en ciencias y educación en salud
Línea de Investigación	
Fecha de Presentación	20 de octubre del 2019