

Reseña histórica de la urología (mundial y local) 12va Parte

Dr. Juan A. Hinostraza F.

Ingeniería tisular (Cultivo de tejidos y órganos)

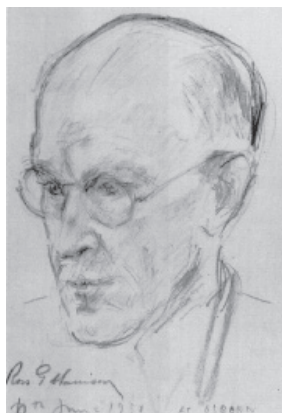
En la década de los 80 surge un nuevo campo de la medicina que aplica los principios del cultivo celular a polímeros sintéticos biodegradables de soporte con el fin de crear sustitutos biológicos autólogos que puedan mejorar, mantener o restaurar la función de órganos o tejidos dañados. El desarrollo de la biología celular y molecular, con sus grandes logros técnicos y científicos, han hecho posible que comience una nueva era de la medicina moderna. Uno de los retos de esta medicina ha sido el hecho de poder restaurar o mejorar la función de órganos y tejidos lesionados por enfermedades o traumatismos. La cirugía de transplantes a partir de órganos y tejidos extraídos de donantes es parte de esta medicina reparadora. La Ingeniería Tisular como se denomina actualmente a la tecnología de la futura medicina es la que nos acerca a ese objetivo, ya que nos permite, a partir de un pequeño fragmento de tejido recuperar la funcionalidad global del tejido u órgano dañado. Por otra parte, es importante señalar que la posibilidad actual de la ingeniería tisular es la recuperación de la función perdida, ya que la formación de órganos y tejidos similares a los naturales es todavía una ciencia ficción.

La Urología no es ajena al interés suscitado por esta emergente disciplina, habiendo presentado en unos pocos años un importante avance experimental en varios campos— con incluso puntuales aplicaciones clínicas, consolidando a su vez las numerosas indicaciones de estas técnicas en nuestra especialidad.

A pesar de su “juventud”, la Ingeniería Tisular abre un esperanzador abanico de posibilidades en la cirugía reconstructiva urológica, que sin duda contribuirá, en un futuro próximo, a evitar las frecuentes y no deseadas complicaciones que el uso de tejidos heterólogos o sintéticos origina en el aparato urinario.

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano **R.G. Harrison** (1870-1959) es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907. Harrison fue el primer autor que empleó técnicas in vitro para el estudio de fenómenos in vivo, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Harrison logró cul-



ROSS GRANVILLE HARRISON

tivar con éxito neuroblastos de rana en un medio linfático, dando el primer paso hacia la investigación moderna sobre las células madre.

Fue propuesto al premio Nobel por su trabajo sobre el crecimiento de células nerviosas, fundamental para la comprensión actual del sistema nervioso, y contribuyó de un modo fundamental al desarrollo de la técnica quirúrgica de trasplante de tejidos.

En 1910, Burrows empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

En 1916, Rous y Jones emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.

En 1913 **Alexis Carrel** demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un período de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años (Sharp, 1977). Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel. **(f1)** En 1938 publicó junto con Lindbergh el libro *The cultur of organs* (New York, Paul B. Hoeber, Inc.). Aunque algunos de sus experimentos fracasaron, sus aportaciones para comprender el fenómeno de la regeneración, el crecimiento, la nutrición y el funcionamiento de las secreciones internas fueron decisivas. En este sentido fue un fiel seguidor de las investigaciones de Claude Bernard. Una de las intenciones de Carrel era la de sustituir tejidos u órganos enfermos por otros sanos. Esto le llevó a trabajar intensamente en la fisiología de los órganos.

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que podemos destacar:

1948 | Sanford, Earle y Likely, aislaron células de la línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos.

1952 | Grey, Coffman y Kubicek, establecen la primera línea



ALEXIS CARREL



(f1) Conferencia del doctor Alexis Carrel en el Hospital Broca (París)

celular continúa, las actualmente bien conocidas células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

1955 Eagle realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas (sueros,...) pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares, ...)

1961 | Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.

1965 | Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente.

1969 | Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables. Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

Georges Köhler y César Milstein (ver págs. anteriores) establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales. Milstein y Köhler debieron ingeniárselas entre 1973 y 1975 para lograr configurar los llamados anticuerpos monoclonales, de una pureza máxima, y por lo tanto mayor eficacia en cuanto a la detección y posible curación de enfermedades.

El gran hallazgo que le valió a Milstein el Premio Nobel produjo una revolución en el proceso de reconocimiento y lectura de las células y de moléculas extrañas al sistema inmunológico. Los anticuerpos monoclonales pueden dirigirse contra un blanco específico y tienen por lo tanto una enorme diversidad de aplicaciones en diagnósticos, tratamientos oncológicos, en la producción de vacunas y en campos de la industria y la biotecnología.

1976 - 1982 | Sato y col. publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero.

1975 | Reinwald, J.G. y Green, H. establecen las condiciones idóneas para expandir en cultivo indefinidamente de células epiteliales a partir de una línea de queratinocitos derivados de un teratoma de ratón; a su vez introducen la teórica posibilidad de poder aplicar dichas técnicas de igual manera a otros epitelios diferentes al cutáneo.

1979 | Rita Levi-Montalcini y Calissano, establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo. Este trabajo supuso el Premio Nobel para Levi-Montalcini en 1986.

1980 | Banks-Schelegel demuestra la viabilidad del epitelio obtenido in vitro como injerto libre en el animal de experimentación.

1985 | Russell introduce el concepto de trasplante celular selectivo, Burke diseña una piel bioartificial sobre una ma-



CÉSAR MILSTEIN Y GEORGES
KÖHLER



RITA LEVI-MONTALCINI

triz bidimensional de colágeno y Vacanti, recogiendo las experiencias previas, aplica estos principios a sistemas biodegradables tridimensionales para la obtención de órganos y tejidos; surge así en 1985 el Laboratorio de Ingeniería de tejidos y trasplantes del Children's Hospital de Boston en colaboración con el Laboratorio de Polímeros biodegradables del Instituto Tecnológico de Massachussets.

1987 | Shouthgate describe un método basado en las técnicas de Reinwald y Green para el cultivo in vitro de células epiteliales de la cavidad bucal. De Luca y Langdon aplicarán clínicamente estos tejidos obtenidos in vitro.

1990 | Romagnoli y después en 1993 aporta las primeras referencias sobre la aplicación de las técnicas de cultivo de epitelios al urotelio, aplicando los principios introducidos por Reinwald y Green al epitelio uretral; el autor obtiene láminas de células uroteliales que aplica clínicamente para la corrección de 10 casos de hipospadias con resultados excelentes, si bien los periodos de seguimiento fueron cortos y sin detallar el difícil manejo de los tejidos obtenidos in vitro. Se asistía, no obstante, a un hecho sin precedentes en la Urología pues a partir de una biopsia mínima obtenida con anestesia local, mediante la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos se lograba obtener una cantidad importante de urotelio autólogo como para obviar las importantes limitaciones que las uretroplastías plantean en no pocas ocasiones como consecuencia de la falta de tejidos nativos viables.

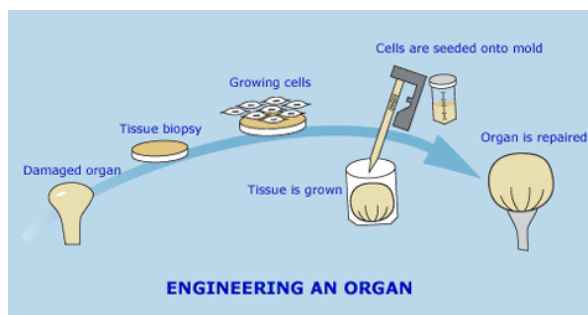
En 1993 Anthony Atala introduce un nuevo biomaterial para el tratamiento endoscópico del reflujo vésicoureteral; el autor propone el uso de un gel de alginato (copolímero de ácido glucurónico y manurónico) sembrado de condrocitos autólogos, diseñando un modelo experimental en 4 cerdos donde reproduce quirúrgicamente un reflujo unilateral en cada animal, seguidamente inyecta vía endoscópica 2-3 ml de gel de alginato en la región submeática del uréter refluente. El estudio radiológico posterior evidenció la corrección del reflujo así como la ausencia de hidronefrosis; el estudio histológico puso de manifiesto la presencia de cartílago subureteral bien conformado, sin evidenciarse rechazo ni migración del material a otros órganos o tejidos. **(f2)**

Crear órganos a medida de los pacientes -de modo tal de evitar la casi siempre larga y a veces infructuosa espera de un trasplante- era el sueño de Anthony Atala, un cirujano experto en ingeniería de tejidos que anunció en 2006 que fabricó en su laboratorio vejigas a partir de las células de sus mismos pacientes. ("trasplante sin donante") **(f3)**

Al implantarlas, este investigador de la Universidad Bautista Wake Forest, de Estados Unidos, fue capaz de proveer tratamiento eficaz para la incontinencia urinaria que padecían quienes participaron de la experiencia, además de prevenir complicaciones renales asociadas a sus problemas de vejiga.



DR. ANTHONY ATALA



(f2) Ingeniería de un órgano

El avance -calificado de "histórico" por la revista médica The Lancet, que publicó el trabajo de Atala- constituye el primer trasplante de órganos humanos desarrollados en laboratorio. La experiencia da cuenta además de su efectividad a largo plazo, ya que los trasplantes (siete, en total) se realizaron a partir de 1999 y siete años de seguimiento demostraron que los órganos se mantuvieron en funcionamiento durante ese período.

Así, Atala busca aliviar la escasez de órganos que afecta a su país (y también al resto del planeta) y al mismo tiempo evitar la necesidad de que los pacientes trasplantados deban tomar de por vida medicamentos inmunosupresores. Es que al ser desarrollados a partir de las células de los mismos pacientes no hay posibilidad de rechazo.

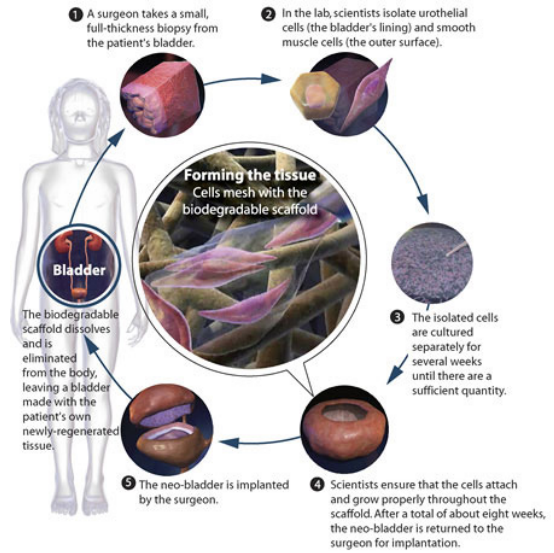
En 1998 y después de intensos trabajos de experimentación, un grupo de investigadores de la Universidad de Wisconsin (EEUU) consiguió el primer cultivo de células madre embrionarias humanas. A partir de este momento, las progenitoras celulares han sido presentadas como la gran esperanza terapéutica del nuevo siglo. Extrayendo las células madre de la sangre del cordón umbilical, y guardándolas luego de forma conveniente, estas células pueden constituir la salvación para enfermedades que de otro modo son incurables. Una célula madre es una célula que tiene capacidad de autorrenovarse mediante divisiones mitóticas o bien de continuar la vía de diferenciación para la que está programada y, por lo tanto, producir uno o más tejidos maduros, funcionales y plenamente diferenciados en función de su grado de multipotencialidad. (f4) (f5)

Científicos de Estados Unidos aseguran que han encontrado una nueva fuente de células madre que no requiere el uso de embriones humanos, ya que recoge las células del líquido amniótico que rodea al embrión. (f6)

En Urología se ha utilizado por el momento en Incontinencia urinaria de esfuerzo; también en el cáncer de próstata, se debate si la célula madre que le da origen podría ser un objetivo importante para el tratamiento de esta neoplasia. En agosto de 2001, el ex presidente George W. Bush, prohibió el uso de dinero de los contribuyentes para investigar usando nuevas líneas de células embrionarias humanas.

Después de casi 8 años de inactividad, el presidente Barack Obama firmó el 09 de marzo de 2009 una orden ejecutiva para levantar las restricciones impuestas por su predecesor respecto al uso de fondos federales para investigaciones médicas usando células madres embrionarias.

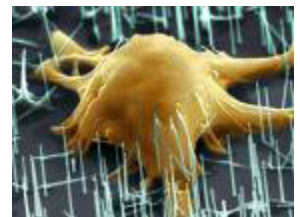
Obama dijo que los científicos creen que las células pueden tener el potencial de ayudar a la comunidad



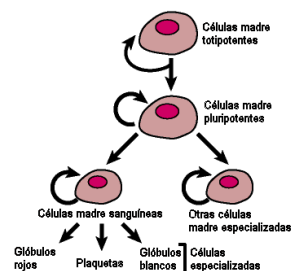
(f3) Formando el tejido



OBAMA LEVANTANDO LA PROHIBICIÓN



(f4) Célula madre de ratón



(f5) Célula madre totipotentes

científica a comprender y posiblemente curar algunas de las enfermedades y condiciones más devastadoras. Agregó que la mayoría de los estadounidenses apoyan la investigación de células madre y añadió que habrá lineamientos estrictos que serán vigilados rigurosamente. El primer banco público de células madres comenzó a funcionar en Chile en 2007 y su objetivo es la investigación y búsqueda de terapias para patologías de extrema gravedad utilizando células madres obtenidas de cordón umbilical. Para ello, trabajará en la recolección, preservación y en su futura aplicación en Chile para la cura de enfermedades. Su nombre es "Banco de Vida". Por ahora no están definidos los costos que deberá pagar algún paciente que requiera estas muestras, ya que no está cubierto por el sistema de salud pública ni tampoco por las Isapres, por lo cual en un primer momento, está en el período de recolección de muestras y en el futuro se verá la forma en que las personas podrán acceder a este importante trozo de vida.

MEDICINA NUCLEAR

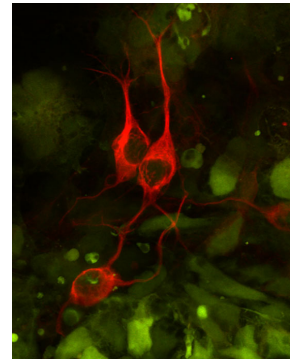
Se define como la rama de la medicina que emplea los isótopos radiactivos, las radiaciones nucleares, las variaciones electromagnéticas de los componentes del núcleo atómico y técnicas biofísicas afines, para la prevención, diagnóstico, terapéutica e investigación médica.

Sus principales campos de acción son la prevención (radiológica), la investigación (utilizando isótopos radioactivos y técnicas biofísica afines: Cintigrafía, etc), el diagnóstico mediante pruebas funcionales, morfológicas, dinámicas y analíticas para una mejor comprensión del cuerpo humano en salud y enfermedad tales como TAC, Resonancia nuclear magnética y próximamente la PET (tomografía por emisión de positrones, cuya información es de carácter molecular) y la función terapéutica (radiofármacos, terapia metabólica, endolinfática, cavitaria, etc).

Las técnicas de medicina nuclear son no invasivas ya que para su realización, únicamente precisan de la administración previa al paciente, generalmente por vía intravenosa, de un medicamento radiofármaco. Desde el punto de vista terapéutico, la medicina nuclear tiene sus principales aplicaciones urológicas en el tratamiento paliativo del dolor óseo de origen metastásico del cáncer prostático. Actualmente se hallan en fase de investigación radiofármacos para el tratamiento de múltiples enfermedades y se espera que la mayoría de estos fármacos estén próximamente en el mercado.

CRONOLOGÍA HISTÓRICA:

- En **1896 H.Beckerel** descubre la radioactividad del uranio (f7)
Descubrió la radioactividad en 1896
- En **1923 von Hevesy** se introduce técnicas de trazadores en la investigación biológica.
- En **1934 Irène Curie y Jean Frédéric Joliot** obtienen los primeros radionucleidos artificiales.
- En **1958 H. Anger** desarrolla la gammacámara.



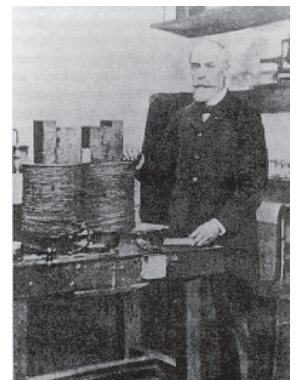
(f6) Una neurona funcional con el axón teñido de rojo que crece sobre el núcleo celular y las tres dendritas, también en rojo, por debajo. Las células precursoras de neuronal que aún no se han diferenciado aparecen en azul y las de la glía, en verde.



IRÈNE CURIE



JEAN FRÉDÉRIC JOLIOT



(f7) H.Becquerel en su laboratorio.



ROSALYN S. YALOW

La "Gammacámara de Anger" ha sido y es el detector más ampliamente utilizado en medicina nuclear. **(f8)** Permite obtener imágenes en dos dimensiones, que representan la proyección de la distribución de la actividad (radiofármaco) existente en órganos o estructuras corporales. Los rayos gamma emitidos por el radiofármaco que se encuentra distribuido en el interior del paciente, atraviesan el colimador e interaccionan con el cristal de centelleo, produciéndose los destellos luminosos.

**(f8)** Gamma cámara

-En **1959 Solomon A. Berson y Rosalyn Sussman Yalow** efectúan el primer radioinmunoensayo. El radioinmunoensayo (o abreviado RIA del inglés Radioimmunoassay) es un método radioinmunométrico que se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) fue desarrollado por Berson y Yalow en 1960 para determinar la concentración de insulina en el plasma sanguíneo; para ello se cuantifica la radiactividad combinada con el anticuerpo. Por ese motivo, R. Yalow recibió el Premio Nobel de Medicina en 1977 (Berson murió en 1972). Hoy en día, esta técnica se utiliza para detectar y cuantificar sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas y mezcladas con muchas otras. Es por tanto una técnica muy sensible y muy específica. Utilizando anticuerpos de gran afinidad se pueden detectar hasta picogramos de antígeno. (1 pg = 10-12 g).

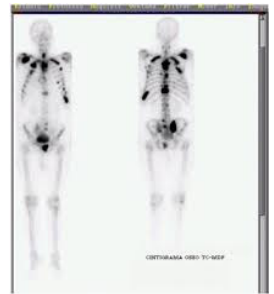
-En **1962 P.Harper y K.Latrop** introducen el ^{99m}Tc (pertecnato de Na), tal como se eluye del generador, es un radiofármaco que puede ser inyectado via intravenosa ó unirse a moléculas para ser administrado en forma oral, o puede ser utilizado para la marcación de células sanguíneas. Casi el 80% de los compuestos radiofarmacéuticos utilizados con fines diagnósticos son marcados con ^{99m}Tc .

La cintigrafía ósea es el estudio de medicina nuclear más realizado en prácticamente todos los centros a nivel mundial, con frecuencia variable cercana al 40% al 60%, de todos los exámenes.

Utiliza como molécula trazadora el Metilendifosfonato, MDP, unido a Tc-^{99m} , que por su estructura de difosfonato, se incorpora en el metabolismo óseo, siendo dependiente de la presencia de calcio y del flujo sanguíneo local, lo que determina su ubicación especialmente en focos osteoblásticos. **(f9)** El riñón es el órgano fundamental para el mantenimiento del volumen de agua corporal, el equilibrio osmótico y ácido-base del organismo, siendo además el encargado de eliminar las sustancias tóxicas, productos del metabolismo. Por ello, el sistema renal puede ser estudiado desde dos puntos de vista, uno dinámico que valora la vascularización parenquimatosa y la funcionalidad y otro estático que proporciona información acerca de la morfología.

En la actualidad se utilizan los siguientes ligandos para realizar estudios estáticos: ^{99m}Tc -DMSA (2,3-dimercaptosuccínico), ^{99m}Tc -GCa (gluconato de calcio), ^{99m}Tc -GHCa (glucoheptanato de calcio), ^{99m}Tc -DTPA (Ac. dietilen-triamino-pentacético), ^{99m}Tc -MAG3 (mercapto-acetil-triglicina).

El estado funcional del riñón se determina con el radiorenograma (renograma isotópico), que es simplemente una curva de actividad en función del tiempo y este estudio está

**(f9)** Cintigrafía ósea: Metástasis en el esqueleto axial en Ca. de Próstata

bajo la influencia de la corriente sanguínea renal, excreción renal, velocidad de corriente de orina. **(f10)**

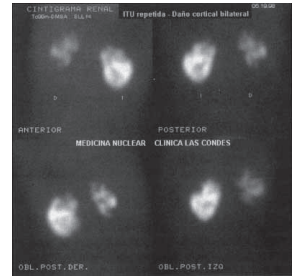
Otra indicación de la medicina nuclear es la citigrafía dinámica y estática para diagnóstico pre-natal de patología nefrourológica y malformaciones.

-En **1963 D.E.Kuhl** desarrolla la técnica de SPECT ("Single Photon Emission Computed Tomography"), que corresponde a la denominación castellana "Tomografía computarizada por emisión de fotón único" que determina la distribución de un marcador (trazador) radioactivo (inyectado en la sangre) mediante imagen molecular. Con PET y SPECT se detectan diferencias funcionales entre el funcionamiento normal y anormal de neurobiología y neuroquímica.

-En **1975 MM.Ter Pogossian**, (1925-1996) M.E. Phelps y **J. Hoffman** desarrollan la técnica de PET ("tomografía por emisión de positrones"), la primera tecnología de imagen funcional del cerebro. El scanner PET es una de las técnicas más prometedoras para la detección del cáncer y tiene aplicaciones en la vigilancia de patología cardíaca. Se están estudiando utilizar la tomografía por emisión de positrones para otras áreas de la medicina.



J.HOFFMAN



(f10) Cintigrama renal (DMSA) en pielonefritis bilateral