

Ingeniería de tejidos y producción de piel humana *in vitro*.

Francisco Arvelo.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 47114, Caracas 1041A, Venezuela.
Correo electrónico: franarvelo@yahoo.es

Palabras clave: *In vitro*, queratinocito, ingeniería de tejidos, equivalente epidérmico.

Resumen. La ingeniería de tejidos es la nueva ciencia que con sus técnicas innovadoras están haciendo posible fabricar nuevos tejidos a partir de pequeños fragmentos de tejidos sanos, logrando restaurar la funcionalidad parcial o total de tejidos u órganos dañados, como lo ejemplifican los logros alcanzados con los cultivos de piel, córnea o cartílago. Por ahora esta nueva ciencia es capaz de asegurar la recuperación de la función perdida y sin duda, en un futuro no lejano, será capaz de desarrollar tejidos y órganos que sean similares a los naturales. En nuestro laboratorio hemos iniciado el desarrollo de las técnicas de ingeniería de tejidos para la elaboración de piel *in vitro*, teniendo como objetivo, a mediano plazo, la producción de córnea y cartílago. En un primer ensayo clínico se aplicaron estas técnicas para el tratamiento de pacientes con lesiones crónicas de la piel, demostrado las bondades y el alcance de estas nuevas herramientas para la solución efectiva de problemas de difícil abordaje terapéutico por medio de los tratamientos convencionales.

Tissue engineering and construction of human skin *in vitro*.
Invest Clín 2007; 48(2): 367 - 375

Key words: *In vitro*, keratinocyte, tissue engineering, epidermal equivalent.

Abstract. Tissue engineering is the new science that has come to make possible the growth of new organ tissue from small fragments of healthy tissue, thus partially or totally restoring the lost functions of ill tissues or organs, as shown by the achievements made with the culture of skin, cornea or cartilage. Thus far, this new science is able to ensure the recovery of lost func-

tions and, doubtlessly, in a near future will be capable of developing tissues and organs not unlike natural ones. In our laboratory we have began the development of tissue engineering techniques for the successful construction of in vitro skin with the aim at mid term of producing cornea and cartilage. In a first clinical trial, these techniques were applied in the treatment of chronic skin lesions and the advantages and reach of these new tools were demonstrated for the effective solution of problems with would otherwise not be easily solved through the use of conventional treatments.

Recibido: 24-04-2006. Aceptado: 14-09-2006.

INTRODUCCIÓN

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.

Dentro de este amplio campo de investigación y desarrollo biomédico, destaca por sus logros e importancia primordial la Ingeniería de Tejidos, por lo que, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la UCV se ha interesado en este nuevo campo, y ha desarrollado con éxito las técnicas para el cultivo de piel humana y su aplicación terapéutica. Así mismo, en un futuro inmediato también se ha propuesto

desarrollar las técnicas que nos permitan obtener córnea, cartílago y hueso con los mismos fines. Esto nos ha conducido a presentar un proyecto que nos permita crear, dentro del actual laboratorio de Cultivo de Tejidos, la Unidad de Ingeniería de Tejidos con el fin de producir los tejidos para satisfacer las demandas del sistema nacional de salud tanto público como privado.

INGENIERÍA DE TEJIDOS

Durante los últimos 50 años uno de los principales logros de la medicina moderna ha sido poder restaurar o mejorar la función de algunos tejidos y órganos lesionados por enfermedades o traumatismos con la cirugía de transplante a partir de órganos y tejidos extraídos de donantes. En la actualidad estas técnicas han comenzado a ser no solo complementadas, sino incluso sustituidas exitosamente mediante la ingeniería de tejidos, nueva ciencia que con sus técnicas basadas en el cultivo de células in vitro están haciendo posible la producción de tejidos que sustituyan a los lesionados, abriendo también la posibilidad de fabricar nuevos órganos. A partir de un pequeño fragmento de tejido se puede lograr restaurar la funcionalidad parcial o total de los tejidos u órganos dañados, como lo ejemplifican los logros alcanzados con los cultivos de piel, córnea, cartílago, hueso, músculo, tejido nervioso y tejido glandular, entre otros.

Cuando una enfermedad o lesión daña tejidos enteros, se pueden aislar, cultivar, y amplificar suficientemente células sanas en el laboratorio, y luego ser transplantadas a las zonas afectadas para reparar las partes lesionadas. Con una muestra del tamaño de una estampilla postal se puede cultivar suficiente piel de repuesto para recubrir todo el cuerpo de una víctima de quemaduras graves; así mismo podemos tomar una pequeña muestra de la cornea sana de un paciente con una lesión de este órgano, cultivarla y así obtener una nueva cornea, incluso ahora pueden aislarse células madre, cultivarse y hacer los transplantes exitosamente con ellas. Por tanto, para “construir” un tejido es importante tener las células que constituyen el tejido y el sustrato sobre el cual se desarrollen. Así, para obtener un tejido *in vitro* es importante manejar un número elevado de células, lo cual constituye un reto, ya que usualmente una muestra de tejido es muy pequeña y el número inicial de funcionales muy reducido, por lo que el problema fundamental es expandir las células en cultivo para obtener un número considerable y suficiente de las mismas. En cuanto al segundo requerimiento, también será un reto la “construcción” de una matriz extracelular idónea para el tejido que se quiere restaurar, la cual es una estructura necesaria para que las células tengan una disposición tridimensional que les permita tanto crecer como desarrollar las funciones fisiológicas que le son propias.

LA PIEL HUMANA *IN VITRO*

La piel constituye el órgano más grande del cuerpo humano, protegiéndolo del medio ambiente (contra fuerzas mecánicas, factores químicos, radiaciones, cambios de temperatura, microorganismos, y manifiesta signos y síntomas de enfermedades sisté-

micas) y jugando además un papel importante en otras funciones vitales tales como metabólicas (síntesis de vitamina D, reserva de grasas, eliminación de desechos, equilibrio hidroelectrolítico, secuestro de tóxicos), nervioso (asiento de receptores nerviosos: tacto, temperatura, presión, dolor) y psicológica (expresión de emociones, contacto afectivo, autoimagen, cosmética) (1). Esto ha hecho que se haya generado la necesidad de crear un sustituto para la misma ante las lesiones y daños que pueden producirse por enfermedades, accidentes, traumatismos o cirugías extensas. Por ello, a lo largo de la historia, se hicieron múltiples intentos de obtener un medio natural o artificial capaz de sustituir la piel dañada o perdida, pero solo los grandes avances hechos en biología celular en el siglo XX permitieron, a partir de la década de los años 50, que se iniciaran y se desarrollaran diversas técnicas que permitieran alcanzar ese objetivo. Dentro de todas las técnicas ensayadas destacan las desarrolladas a partir de las técnicas para el cultivo de células *in vitro*, haciendo posible que las células aisladas de un organismo puedan sobrevivir y multiplicarse por largo tiempo o por tiempo indefinido.

Las referencias iniciales para el cultivo de piel hacen alusión al cultivo celular en forma de explantes celulares (2). Aun cuando este tipo de técnica no permitía una proliferación epitelial suficiente, se pudo demostrar que los cultivos celulares obtenidos eran válidos y transplantables a animales, y el rápido desarrollo de nuevas técnicas hicieron posible realizar los cultivos a partir de células disgregadas, estableciéndose diversos modelos (3), pero en líneas generales, las colonias obtenidas por estos métodos no permitían la realización de subcultivos celulares por sobrecrecimiento de los fibroblastos o paradójicamente por ausencia de los mismos.

CULTIVO DE QUERATINOCITOS HUMANOS

Rheinwald y col. en 1975 (4), a partir de los trabajos con una línea celular epitelial cutánea o queratinocitos originada de un teratoma de ratón, establecieron las condiciones necesarias y fundamentales para cultivar, de forma indefinida, este tipo de células. En el mismo año, estos autores aplicaron sus técnicas a los queratinocitos humanos normales, obteniéndose cultivos que podían ser transferidos seriamente. Ellos demostraron que las deficiencias encontradas para el cultivo de las células epiteliales no se debían a limitaciones intrínsecas de ellas, sino a las complejas relaciones con las células del parénquima. Era por tanto, posible, obtener en cultivo un tejido epitelial diferenciado, si se empleaba la técnica apropiada que no obviara tal relación.

El desarrollo *in vivo* de las células epiteliales, así como su diferenciación y multiplicación, dependen de complejas interacciones con la matriz extracelular, así como de diferentes estímulos procedentes de los fibroblastos y sus productos (5). Basándose en este principio, Rheinwald y col. introducen en su técnica de cultivo una capa celular adicional llamada *feeder layer* para que estimule la proliferación y maduración de los queratinocitos. Para este fin utilizaron fibroblastos de ratón, la línea celular 3T3, previamente irradiada con 6000 rads o tratadas con Mitomicin C durante 2 horas, ello con el fin de inhibir su multiplicación (6). Este tratamiento previo con los fibroblastos permite que se adquieran las siguientes características: a) promueven el crecimiento, diferenciación y adhesión de los queratinocitos; b) secretan proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento; c) inhiben la proliferación de los fibroblastos humanos (2). La adición de las células 3T3 a los cultivos de los queratinoci-

tos sirven de soporte y estimula al desarrollo de los mismos, promoviendo su crecimiento, diferenciación y adhesión e impidiendo el crecimiento de los fibroblastos humanos. La *feeder layer* permite expresar a los queratinocitos características diferenciales, y también se demostró que las deficiencias encontradas inicialmente para el cultivo de las células epiteliales no se deben en realidad a limitaciones intrínsecas de dicho tipo celular, sino más bien a las complejas relaciones entre los queratinocitos y los fibroblastos (7).

Los queratinocitos disgregados, con una concentración adecuada de células 3T3, forman una monocapa en la superficie de la placa de cultivo de forma tal que en las etapas finales del cultivo se suele observar una capa continua de queratinocitos y una ausencia total de fibroblastos (8). Southgate y col. en 1987 (9), realizaron estudios microscópicos de estos cultivos y demostraron la presencia de estratificación e incluso evidenciaron fenómenos de queratinización en las capas más superficiales.

APLICACIÓN CLÍNICA

En 1980 Banks-Schelegel y col. demuestran la viabilidad del epitelio cutáneo obtenido *in vitro* empleándolo como injerto en animales de experimentación, lo cual llevó al perfeccionamiento de estas técnicas haciendo posible la utilización de estos tejidos, obtenidos en el laboratorio, en la práctica clínica (10, 11).

Esta nueva metodología, que permite obtener a partir de una pequeña biopsia y en un tiempo relativamente corto, una gran cantidad de tejido autólogo ha revolucionado el tratamiento de los pacientes quemados, curación de úlceras crónicas, lesiones extensas de la piel y la corrección de defectos cutáneos, brindando ventajas con respecto a otros tipos de tratamientos, como los que usan piel de cadáveres o los auto in-

jertos, hasta hace muy poco tiempo ampliamente usados.

Si bien el perfeccionamiento del sistema de cultivo de células epiteliales iniciado por Rheinwald y col. abrió la posibilidad de poder expandir otros epitelios distintos al cutáneo, una de las principales utilidades en la práctica clínica ha sido el cultivo de queratinocitos para el tratamiento de personas seriamente quemadas (4). Los grandes problemas clínicos que acarrearán estos pacientes son muchos y complejos, por lo que a lo largo del tiempo se crearon numerosos sustitutos cutáneos biológicos y sintéticos para aportar una cobertura al tejido lesionado y profundamente dañado. Pese a ello el paciente con una superficie ampliamente quemada presentaba un pronóstico vital, funcional y estético pésimo, pero los avances logrados con la aplicación de las nuevas técnicas empleando células cultivadas ha sido crucial.

Mediante el cultivo de células, a partir de una biopsia mínima de piel sana, se puede obtener en un período relativamente corto una gran cantidad de piel autóloga, útil para transplantar, no existe morbilidad por complicaciones de la zona donante y al tratarse de un injerto autólogo se obvia el problema de rechazo inmunológico. La consolidación de las técnicas de cultivo de queratinocitos ha generado la publicación de innumerables trabajos motivados por la aplicación clínica de las mismas (12, 13). Por otra parte, es importante el desarrollo de una base dérmica (compuesta por una matriz extracelular conteniendo fibroblastos dérmicos) sobre la que el cultivo clásico de queratinocitos consiga gran expansión, diferenciación completa, y posibilidades de éxito tras el trasplante. Hasta la presente están descritas distintas superficies sobre las que los queratinocitos podrán desarrollarse, aunque con ninguna de ellas se ha logrado obtener un área de piel suficiente para las necesidades de un paciente con

gran superficie de quemaduras (14). La fibrina, proteína derivada del fibrinógeno sanguíneo, aunque no es un compuesto natural de la dermis, es la base para la reparación de heridas (15), ya que actúa como hemostático, y en un primer momento es la matriz extracelular provisional necesaria para que las células inicien el proceso reparador. El plasma humano puede ser utilizado como fuente de matriz dérmica para el crecimiento de los queratinocitos, y la obtención de la lámina de piel artificial (16). Para poder solucionar el período de tiempo crítico que transcurre desde el momento de la toma de la muestra hasta obtener el epitelio transplantable, se utilizan actualmente productos comerciales derivados de las investigaciones de la ingeniería de tejidos, como lo son el Dermagraft, y Transcyte, que son polímeros de diferente composición (ácido poliglicólico, colágeno tipo I) mezclados con fibroblastos los cuales funcionan como sustitutos cutáneos temporales que proporcionan una cobertura al lecho de la quemadura evitando tanto la pérdida de fluidos y electrolitos como una barrera para impedir la contaminación (17, 18). También se utilizan como cobertura temporal la piel de cadáver (homoinjerto), ya que se considera como una de las mejores coberturas, y que pueden utilizarse bien sea frescos o conservados (19). Existen otros productos de origen natural como son xenoinjertos de piel (cerdo) o membrana amniótica (20, 21). El epitelio cutáneo obtenido *in vitro*, aparte de ser usado para el tratamiento de quemados, también se ha empleado con éxito para el tratamiento estético de enfermedades cutáneas crónicas o extensas que requieran una amplia sustitución de tejido para su corrección. Así, se han utilizado en el tratamiento de úlceras cutáneas crónicas (22, 23), *nevus gigantes* (24, 25) epidermolisis bullosa (26, 27), lesiones en la mucosa oral y uretral (28, 29) y la hipomelanosis extensa (30, 31). El campo abierto por es-

tas investigaciones y su uso cada vez mayor en la práctica médica apenas está comenzando, cada vez más su uso es exigido y generalizado, siendo un área en expansión, sin olvidar que la experiencia obtenida con la aplicación clínica de los tejidos obtenidos *in vitro* han servido a la vez para poner de manifiesto las dificultades todavía existentes que se plantean a la hora de generalizar el uso de los mismos.

CIENCIA EN EXPANSIÓN

Teniendo en cuenta el gran interés que representa este tipo de técnica en cuanto a su aplicabilidad clínica y a las ventajas que supone sobre otros tratamientos, tenemos que considerar que es dentro del campo de los cultivos epidérmicos donde las investigaciones han tenido más éxito, poniéndose de manifiesto sus ventajas, pero también sus inconvenientes. No podemos obviar que con su desarrollo se abrió la posibilidad de poder aplicar estas técnicas a otros tipos celulares, fundamentalmente a otros epitelios. Esta nueva metodología propone también la aplicación de las técnicas de cultivo celular ya conocidas sobre matrices biodegradables que sirvan de soporte para su injerto en el huésped (32). Con los éxitos alcanzados en el manejo de las células epiteliales se iniciaron los estudios para obtener las condiciones óptimas para el crecimiento, desarrollo y diferenciación en cultivo de diferentes tejidos especializados y tipos celulares, así como su aplicación en clínica. Ejemplo de estos adelantos, ensayos y aplicaciones en clínica, se ha trabajado con cartílago (33, 34), tendón (35, 36), hueso (37, 38), urotelio (39, 40), intestino (41, 42), válvulas cardíacas (43, 44), córnea (45). Por nuestra parte, nuestro laboratorio ha iniciado el camino con el cultivo de piel y su aplicación en clínica, habiéndose generado una gran expectativa, y ha planteado la necesidad de crear la unidad de ingeniería de tejidos (46).

Es importante destacar, que en nuestro país no existe un laboratorio especializado que haya desarrollado esta técnica de la obtención de piel artificial, y que su creación podrá suministrar material a bajo costo, y con la urgencia requerida. Además, mejorará las alternativas terapéuticas de los pacientes con lesiones en la piel, siendo una de éstas el autoinjerto obtenidos a partir del cultivo de queratinocitos derivados de un pequeño fragmento de su propia piel. El desarrollo y aplicación clínica de estos autoinjertos es lo más conveniente para el paciente por las siguientes razones: a) disminución del riesgo de rechazo del injerto, b) disminución del riesgo de infecciones, c) disminución del número de intervenciones quirúrgicas a que son sometidos los pacientes a ser injertados con su propia piel, aumentando la agresión tanto física como psicológica, d) disminución de probabilidades de reintervenciones posteriores por formación de cicatrices y contracturas indeseables, e) disminución de costos tanto por estadía hospitalaria como por ausencia laboral, f) una mejor calidad de recuperación del paciente y g) rápida incorporación del paciente a la vida normal.

No hacemos mal cuando nos detenemos un momento en este camino que nos brinda tantas posibilidades para reflexionar y maravillarnos de lo lejos que hemos avanzado. Es también importante no olvidar que las tecnologías y tratamientos que salvan vidas pueden hacerse muy costosos, y que en ocasiones pueden producir preocupantes efectos secundarios, aunado a que en el futuro, también tendremos que enfrentarnos con decisiones muy difíciles. Las terapias más avanzadas, como las que se han reseñado al inicio de esta revisión no son estrictamente curativas, y que de no usarse llevarían a la muerte inminente del paciente. Independientemente de estas consideraciones necesarias, hay que decir que a pesar de lo que acabamos de mencio-

nar, los avances son asombrosos al aplicar las nuevas terapias, y que las técnicas introducidas en años recientes han revolucionado la cirugía plástica y estética. Hoy, se puede considerar que se pueden reparar, regenerar y sustituir algunos tejidos de órganos muy importantes.

REFERENCIAS

1. **Gartner LP, Hiatt JL.** Texto Atlas de Histología. 2da Ed. Mc Graw Hill. Interamericana, México; 2002. p:311-327.
2. **Navsaria HA, Sexton C, Bouvard V, Leigh IM.** Growth of keratinocytes with a 3T3 feeder layer: basic techniques. En Leigh IM., Watt FM Ed. Keratinocyte Methods. Cambridge University Press 1994. pp: 2-12.
3. **Karasek MA.** Growth and Differentiation of transplanted epithelial cell cultures. *J Invest Dermatol* 1968; 51:247-252.
4. **Reinwald JG, Green H.** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinising colonies from single cell. *Cell* 1975; 6: 331-334.
5. **Luker J, Crane IJ, Scully C, Prime SS.** The effect of 3T3 fibroblast on the expression of anchorage independence and cornification of oral keratinocytes. *Virch Arch Cell Pathol* 1989; 57:19-26.
6. **Sugimura YJ, Hata K, Torii S, Ueda M.** Transplantation of cultured mucosal epithelium: an experimental study. *J Cranio-maxillofac* 1997; 24: 352-359.
7. **Staack A, Alexander T, Merguerian P, Terris MK.** Organ and species specificity in the stimulation of transitional epithelial cell growth by fibroblasts. *Eur Urol* 2001; 39:471-477.
8. **Raghoobar GM, Tomson AM, Scholma J, Blauw EH, Witjes MJ, Vissink A.** Use of cultured mucosal grafts to cover defects caused by vestibulopasty: an in vivo study. *J Oral Maxillofac Surg* 1995; 53: 872-878.
9. **Southgate J, Williams HK, Tredjosiewicz LK, Hodges GM.** Primary culture of human oral epithelial cells: growth requirements and expression of differentiated characteristics. *Lab Invest* 1987; 56: 211-233.
10. **Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H.** Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-451.
11. **Compton CC, Gill JM, Bradford DA, Regauer S, Gallico GG, O'Connor NE.** Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. *Lab Invest* 1989; 60: 600-612.
12. **Rose JK, Herndon DN.** Advances in the treatment of burn patients. *Burns* 1997; 23: S19-S26.
13. **Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF.** Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on a lived fibroblast containing fibrin gels. *Burns* 1998; 24: 621-630.
14. **Braye FM, Stefani A, Venet E, Pieptu D, Tissot E, Damour O.** Grafting of large pieces of human reconstructed skin in a porcine model. *Br J Plast Surg* 2001; 54: 532-538.
15. **Singer AJ, Clark RA.** Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
16. **Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A.** Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation* 2004; 77: 350-355.
17. **Kremer M, Lang E, Berger AC.** Evaluation of dermal-epidermal skin equivalent ("composite skin") of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (integra artificial skin) *Br J Plast Surg* 2000; 53:459-465.
18. **Rennekampff HO, Hansbrough JF, Woods V, Kiessing V.** Integrin and matrix molecule expression in cultured skin replacements. *J Burn Care Rehabil* 1996; 17: 213-221.
19. **Vloemans AF, Middelkoop E, Kreis RW.** A historical appraisal of the use of cryopreserved and glycerol-preserved allograft skin in the treatment of partial thickness burns. *Burns* 2002; 28: S16-S20.

20. Wang HJ, Chou TD, Tsou TL, Chen TM, Chen SL, Chen SG, Wei LG, Yeh KJ, Ko YH, Wang CS, Lee WH. The application of new biosynthetic artificial skin for long-term temporary wound coverage. *Burns* 2005; 31:991-997.
21. Ley-Chavez E, Martinez-Pardo ME, Roman R, Oliveros-Lozano J, Canchola-Martinez E. Application of biological dressing from radiosterilized amnios with cobalt 60 and serologic studies on the handling of burns in pediatric patients. *Ann Transplant* 2003; 8:6-9.
22. Saap LJ, Falanga V. Debridement performance index its correlation with complete closure of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 10:354-359.
23. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 2005; 366: 1734-1736.
24. Gallico G, O'Connor EN, Compton CC, Kehinde O, Green H. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *J Plast Reconstr JAMA* 1989; 262: 2125-2130.
25. Earle SA, Marshall DM. Management of giant congenital nevi with artificial skin substitutes in children. *J Craniofac Sur* 2005; 16: 904-907.
26. Carter DM, Lin AN, Varghese MC, Cadlwell D, Prat LA, Eisinger M. Treatment of junctional epidermolysis bullosa with epidermal autografts. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17:246-250.
27. Wollina U, Konrad H, Fischer T. Recessive epidermolysis bullosa dystrophicans (Hallopeau-Simens) grafts on an esterified hyaluronic acid membrane. *J Dermatol* 2001; 28:217-220.
28. De Luca M, Albanese E, Megna M, Cancedda R. Evidence that human oral epithelium reconstituted in vitro and transplanted onto patients with in the oral mucosa retains properties of the original donor site. *Transplantation* 1990; 50:454-459.
29. Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: Applications in urology. *Contemporary Urology* 2002; 1:42-45.
30. Kumagai N, Uchikoshi T. Treatment of extensive hypomelanosis with autologous cultured epithelium. *Ann Plast Surg* 1997; 39:68-73.
31. Chen YF, Yang PY, Hu DN, Kuo FS, Hung CS, Hung CM. Treatment of vitiligo by transplantation of cultured pure melanocyte suspension: analysis of 120 cases. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 68-74.
32. Vacanti JP. Beyond transplantation. *Ann Surg* 1988; 123: 545-549.
33. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med* 1994; 331: 889-895.
34. Gillingly SD, Myers TH. Treatment of full-thickness chondral defects with autologous chondrocyte implantation. *Orthop Clin North Am* 2005; 36:433-446.
35. Cao Y, Vacanti JP, Ma PX, Paige KT, Upton J, Chowanski Z, Schloo B, Langer R, Vacanti CA. Generation of neo-tendon using synthetic polymers seeded with tenocytes. *Transplant* 1994; 26: 3390-3392.
36. Noth U, Schupp K, Heymer A, Kall S, Jacob F, Schutze N, Baumann B, Barthel T, Eulert J, Hendrich C. Anterior cruciate ligament construct fabricated from human mesenchymal stem cell in a collagen type I hydrogel. *Cytherapy* 2005; 7:447-455.
37. Mooney DJ, Vacanti JP. Tissue engineering using cells and synthetic polymers. *Transplant Rev* 1993; 7:153-162.
38. Kao SY, Lui MT, Fong J, Wu DC, Wu CH, Tu HF, Hung KF, Yeung TC. A method using vestibulo-sulcoplasty combining a split-thickness skin graft and a palatal keratinized mucosa graft for peri-implant tissue secondary to oral cancer surgery. *J Oral Implant* 2005; 31:186-191.
39. Atala AJ, Freeman MR, Vacanti JP, Shepard J, Retik AB. Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle. *J Urol* 1993; 150:608-612.
40. De Diego Rodríguez E, Villanueva PA, Roca E, Martín G, Meana A, Llamas S, Gómez R. Experimental study about viability of autologous free graft in vitro culti-

- vated urinary epithelium. *Acta Urol Esp* 2004; 28:714-731.
41. **Organ GM, Mooney D, Hansen LK, Schloo B, Vacanti JP.** Enterocyte transplantation using cell-polymer devices to create intestinal epithelial-lines tube. *Transplant Proc* 1993; 25:998-1001.
42. **Wang ZQ, Watanabe Y, Noda T, Yoshida A, Oyama T, Toki A.** Morphologic evaluation of regenerated small bowel by small intestinal submucosa. *J Pediatr Surg* 2005; 40:1898-1902.
43. **Kim SS, Vacanti JP.** The current status of tissue engineering as potential therapy. *Semin Pediatr Surg* 1999; 8:119-123.
44. **Knight RL, Booth C, Wilcox HE, Fisher J, Ingham E.** Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells. *J Heart Valve Dis* 2005; 14:806-813.
45. **Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Ifthekar G, Fatima A, Singh S, Rao GN.** Early results of penetrating keratoplasty after cultivated limbal epithelium transplantation. *Arch Ophthalmol* 2005; 123: 334-340.
46. **Arvelo F, Pérez P, Cotte C.** Obtención de laminas de piel humana mediante ingeniería de tejidos. *Acta Cient Venez* 2004; 55:74-82.