

NANOTECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE TEJIDOS

Palabras clave: Nanotecnología, Ingeniería de tejidos, sustitutos biológicos, regeneración de órganos.
Key words: Nanotechnology, Tissue engineering, Biological substitutes, Organs recovery.

El presente trabajo introduce los conceptos básicos y la aplicación de la nanotecnología en la ingeniería de tejidos. Ésta es una actividad que requiere conocimientos multidisciplinarios y en ella la ciencia de materiales tiene la primordial tarea de hacer posible las ideas y necesidades de la biología o la medicina en su búsqueda de sustitutos biológicos que mantengan, mejoren o restauren la función de órganos y tejidos en el cuerpo humano. El desarrollo de innovadores materiales modernos para aplicaciones médicas permitió, específicamente en las últimas décadas, contribuir sustancialmente al actual adelanto de la ingeniería de tejidos. Se discuten algunos ejemplos y se incluyen aspectos vinculados con el crecimiento celular y los cambios que se producen como consecuencia de las dimensiones nanométricas.

This paper introduces the basic concepts and the application of nanotechnology in tissue engineering. It is a multidisciplinary activity and the science of materials has the primary task of making possible the ideas and needs of biology or medicine in finding biological substitutes that maintain, improve or restore the function of organs and tissues in the human body. The development of modern innovative materials for medical applications allowed and, specifically in the last decades, contributed substantially to the current progress of tissue engineering. Some examples are discussed and include aspects related to cell growth and the changes that occur as a result of nanometric dimensions.

Javier I. Amalvy

Investigador Científico de la CICPBA.
Docente-Investigador de la Facultad Regional La Plata (UTN) y de la Facultad de Ingeniería (UNLP). Grupo de (Nano) Materiales Poliméricos INIFTA (CCT La Plata CONICET - UNLP) y Área Materiales Poliméricos CIDEPIINT (CIC - CCT CONICET La Plata).
E-mail: jamalvy@gmail.com

INTRODUCCIÓN

INGENIERÍA DE TEJIDOS

La ingeniería de tejidos y órganos o también llamada medicina regenerativa es una rama de la biomedicina relativamente nueva que involucra tanto a la biología, a la medicina, a la química, a la ciencia de los materiales y a la informática.

El objetivo de esta disciplina es la reparación de tejidos reproduciendo los mecanismos intervinientes en la renovación celular del organismo.

La ingeniería de tejidos se basa en el uso, de forma conjunta o separada, de tres elementos:

- Cultivo de células.

- Moléculas o grupos bioactivos (compuestos químicos que tienen un efecto o causan una reacción en el tejido vivo) que actúan enviando señales químicas (factores de crecimiento celular por ejemplo).
 - Estructuras soportes o andamios (*scaffolds en inglés*) que imitan la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés, Extra Cellular Matrix) del tejido.
- La figura 1 muestra el circuito

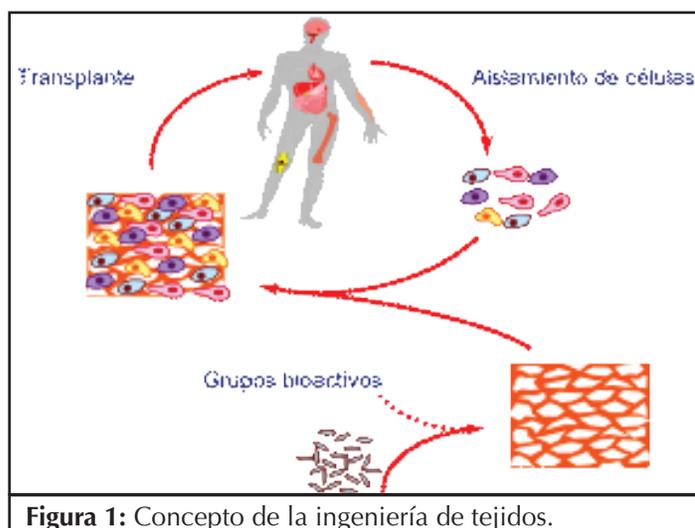


Figura 1: Concepto de la ingeniería de tejidos.

que acompaña al proceso de la ingeniería de tejidos. A partir de células aisladas del organismo se realiza un cultivo empleando un soporte o andamio y agregando moléculas activas. Luego del crecimiento celular se procede al implante.

En una forma más general el implante puede prepararse en otro organismo diferente del de origen de las células pudiendo emplearse células tanto de origen animal como humanas.

■ ANDAMIOS

Uno de los puntos clave en la regeneración de órganos o para la regeneración de parte de un tejido dañado es el de desarrollar estructuras 3D que sustituyan parte del órgano total o parcialmente o actúen como vehículo para transportar células y moléculas a lugares concretos del organismo. Estos soportes se construyen con materiales distintos en función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar. Se pueden fabricar implantes (o estructuras) de diferentes materiales como metales, cerámicos, polímeros naturales o sintéticos y de compuestos formados por combinación de ellos. Los materiales más empleados son los polímeros por las características y versatilidad de los mismos.

De cualquier manera es necesario que esas estructuras cumplan con varios requisitos como:

1. Ser compatibles con el organismo, es decir, no generar rechazo ni daños.

2. Tener una determinada vida media para desarrollar su tarea. Esta duración puede ser más o menos larga. En el caso de las prótesis que reemplazan parte de un órgano tiene que ser permanente mientras que en otros casos puede tener una

duración limitada al tiempo necesario para realizar su función. En este último caso se suelen construir con materiales biodegradables que poco a poco se van "disolviendo" y van desapareciendo del organismo.

3. Aportar las prestaciones necesarias para realizar correctamente la función a la que van a ser destinados.

Esos andamios o soportes pueden fabricarse de diferentes formas con dimensiones micro o nanométricas (Bettinger et al.).

La nanotecnología permite, desde sus dos formas constructivas de nanomateriales (o materiales nanoestructurados), producir andamios adecuados para la ingeniería de tejidos "desde arriba" y "desde abajo" (figura 2). En el primer caso los mecanismos y las estructuras se miniaturizan a escala nanométrica. En el segundo caso se comienza con una estructura nanométrica como una molécula y mediante un proceso de montaje o auto ensamblado se crea una estructura mayor.

El gran impacto que tiene la nanotecnología en la ingeniería de tejidos se debe a que la matriz extracelular (ECM) es una red nanofibrilar (fibras con diámetros con tamaños nanométricos) compuesta de biomacromoléculas (moléculas con acción sobre los tejidos vivos) que rodean y soportan las células en los

tejidos. Desde el punto de vista estructural, la matriz extracelular tiene dimensiones características de una nanoestructura, que en este caso va de los 50 a 500 nm. Esa matriz posee características funcionales que permiten un mejor crecimiento celular.

En el campo de la ingeniería de tejidos se aplican varios métodos de fabricación también usados en otras áreas de la nanotecnología (los que no explicaremos en detalle en este trabajo ya que puede verse con amplitud en las referencias) como el autoensamblado de moléculas, la segregación de polímeros en nanofases, la litografía, el ataque químico selectivo y el electrohilado o "electrospinning" en inglés entre otros (Laurencin et al., 2008).

De las nanoestructuras posibles, las nanofibras son tal vez las más empleadas y pueden prepararse por autoensamblado, separación de fases o electrohilado. La figura 3 muestra algunos ejemplos de nanofibras preparadas por dos técnicas diferentes (Chen et al., 2004; Venugopal et al., 2008).

La más promisoría de las técnicas mencionadas es la de electrohilado. Esta técnica consiste en utilizar un gradiente de potencial para dirigir una solución de un polímero (figura 4) y permite obtener andamios de fibras al azar o alineadas (figura 5) (Zhang et al., 2009).

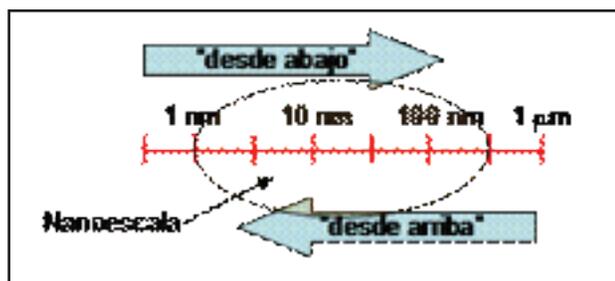


Figura 2: Diagrama esquemático de las formas desde abajo y desde arriba para alcanzar la nanoescala.

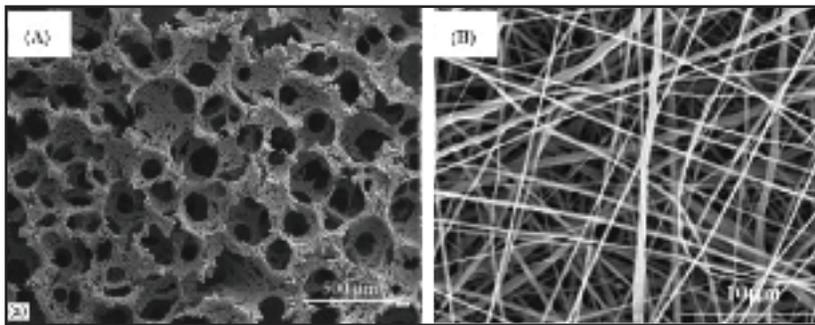


Figura 3: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de (A) nanofibras interconectadas con macroporos esféricos preparadas por técnica de separación de fases y (B) nanofibras preparadas por "electrospinning".

El hueso natural es un material compuesto formado por aproximadamente 30% de una matriz y 70% de un mineral rígido de tamaño nanométrico (figura 6). La matriz consiste de colágeno y de otros

compuestos orgánicos y la fase mineral está formada por cristales nanométricos de hidroxiapatita en forma de placas depositadas alrededor de las fibras proteicas (formadas por proteínas) (Zhang et al., 2009).

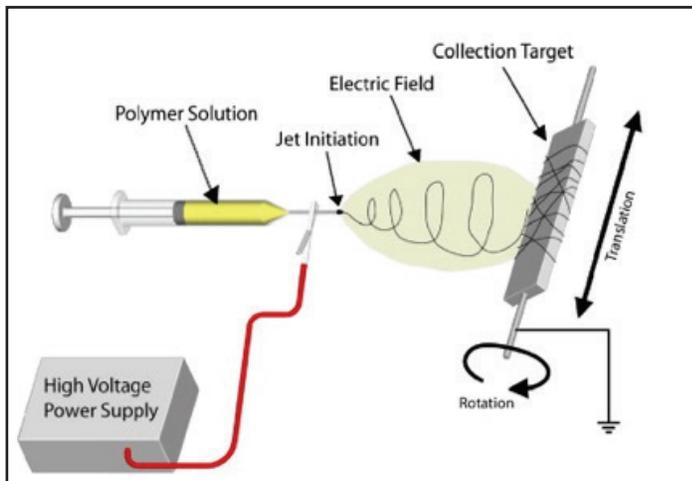


Figura 4: Esquema del método de "electrospinning" (Zhang et al., 2009).

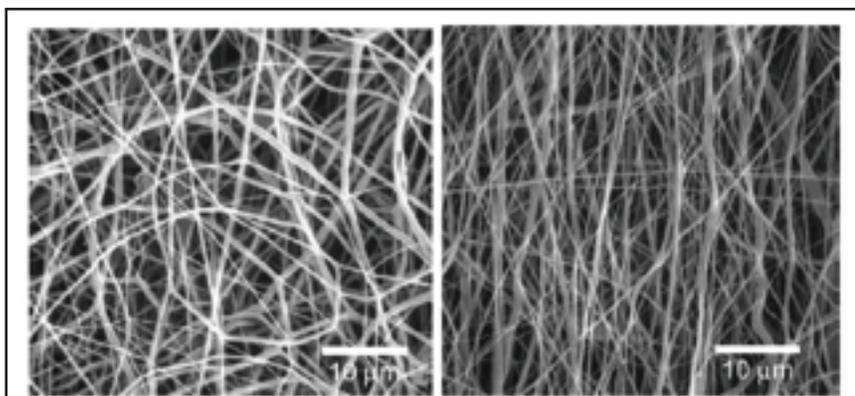


Figura 5: Fibras de poli(ácido glicólico) preparadas por el método de "electrospinning" orientadas al azar (izquierda) y alineadas (derecha) (Zhang et al., 2009).

Esta nanoestructura autoensamblada de la ECM en el hueso afecta favorablemente la adhesión, proliferación y diferenciación de las células. Los materiales nanoestructurados presentan por lo tanto una mejor biocompatibilidad, mejores propiedades mecánicas y eléctricas que los materiales convencionales. Esto se debe a las características únicas de los nanomateriales y en particular de las propiedades superficiales (topografía, naturaleza química, movilidad y energía superficial) debido al significativo incremento del área superficial comparada con los materiales convencionales. Existen diversas teorías sobre el mecanismo pero básicamente la mayor rugosidad, que permite un mayor anclaje, es responsable de la mejor regeneración ósea en nanomateriales (Zhang et al., 2009).

En el área de tejido vascular también se presentan características nanoestructurales debido a la presencia de colágeno y elastina en la ECM y los nanomateriales prometen ser útiles para mejorar funciones de las células vasculares y específicamente las endoteliales y células musculares lisas (células uninucleadas, delgadas y aguzadas en los extremos) para inhibir trombosis e inflamaciones severas.

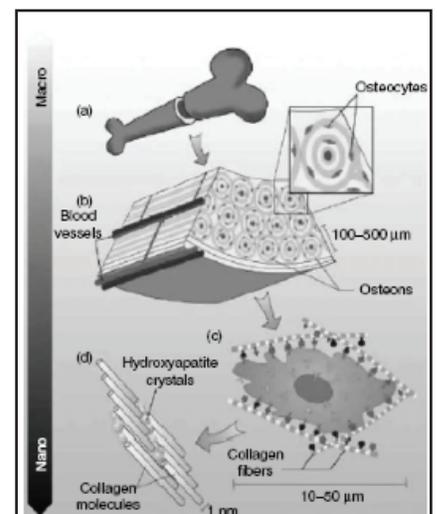


Figura 6: Nanoestructura jerárquica del hueso.

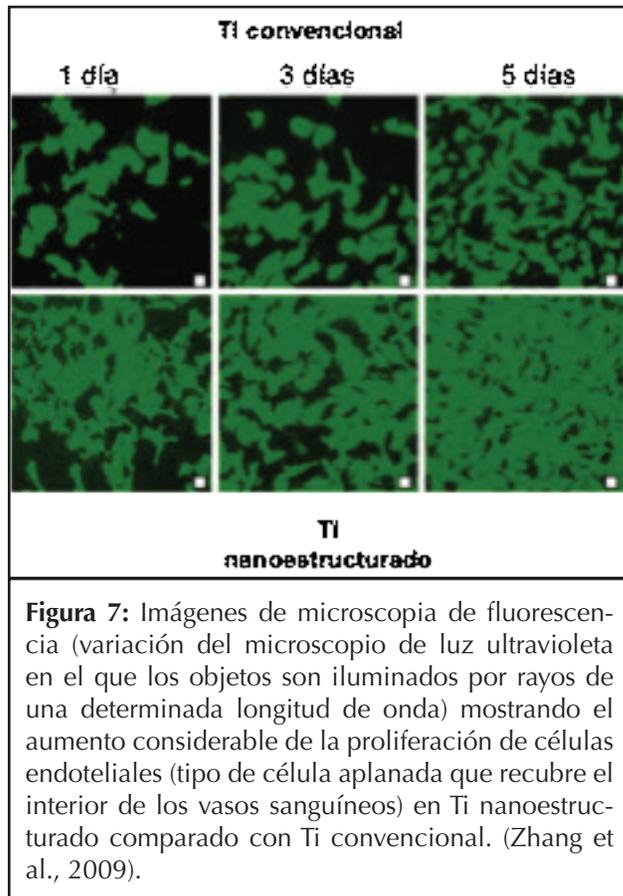


Figura 7: Imágenes de microscopía de fluorescencia (variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda) mostrando el aumento considerable de la proliferación de células endoteliales (tipo de célula aplanada que recubre el interior de los vasos sanguíneos) en Ti nanoestructurado comparado con Ti convencional. (Zhang et al., 2009).

Choudhary y colaboradores (2007) han reportado que la adhesión y proliferación celular se ven mejoradas en nanoestructuras de Ti cuando se compara con Ti convencional (figura 7).

Además, se observó una mayor síntesis de elastina y colágeno comparada con células musculares lisas. Uno de los eventuales problemas en el uso de *stents* vasculares es el crecimiento excesivo de células musculares lisas comparado con el de células endoteliales por lo que el uso de *stents* nanoestructurados podría aumentar la probabilidad de endotelización. Se especula que la nano-rugosidad y por ende el incremento de la superficie contribuye a esta situación favorable.

También en el área de tejido nervioso la nanotecnología puede ayudar a reparar nervios dañados. Los nanocompuestos formados por

nanofibras y nanotubos de carbono (tubos con diámetros en escala nanométrica) permiten desarrollar andamios con citocompatibilidad y conductividad excepcionales propiedades de suma importancia en tejidos nerviosos. Se ha reportado que el uso de nanotubos de multipared purificados (tubos formados por más de una pared que han sido sometidos a un proceso de purificación) aumenta la transferencia de señales eléctricas (Lovat et al., 2005).

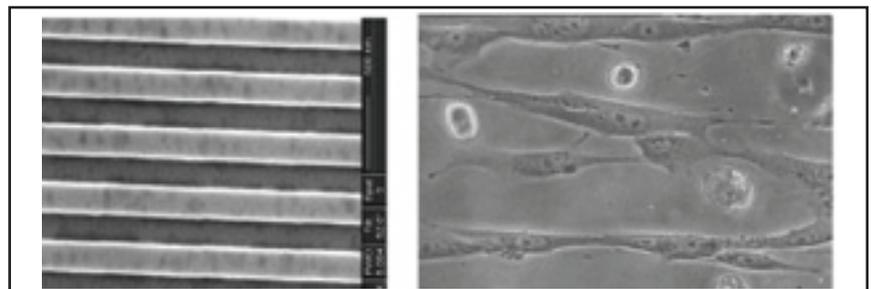


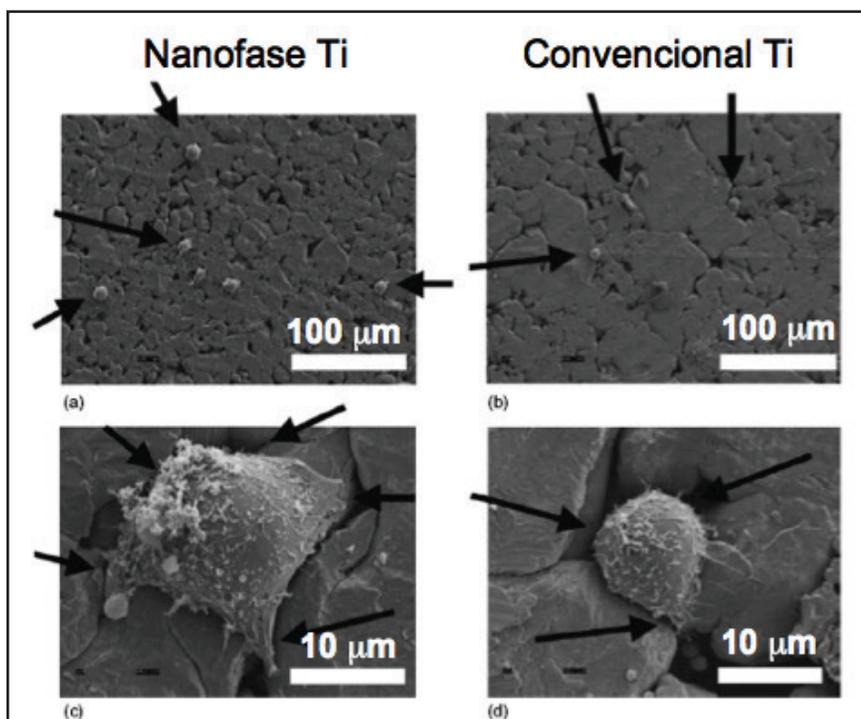
Figura 8: Efecto de la nanoestructura superficial ("nanopatrones") en el crecimiento de células (PMMA, 48 h) (200x). Adaptado de referencia Engel et al. (2008).

En ingeniería de tejidos blandos como la vejiga, la nanotecnología es promisoría para lograr una más eficiente regeneración del tejido debido a una rugosidad similar a las superficies biológicas, a una alta energía superficial y a una adsorción selectiva de proteínas (Harrington et al., 2008).

En un enfoque diferente se han empleado nanopartículas para modificar propiedades de tejidos naturales. Mondalek et al. (2008) han empleado nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) para modificar las propiedades de la submucosa de intestino delgado (membrana que se encuentra entre la mucosa y la capa muscular del intestino) de cerdo. Mediante la elección adecuada de las nanopartículas se reduce la permeabilidad, lo que puede mejorar el proceso de regeneración del tejido en la vejiga.

■ RESPUESTA CELULAR A LA NANOESTRUCTURA

Cabe preguntarse ahora cuál es la respuesta de la célula a la nanoestructura. Engel y colaboradores (2008) han reportado el efecto de la nanoestructura sobre la orientación de la célula que permitiría controlar el crecimiento celular. La figura 8 muestra cómo las células se orientan según el patrón de líneas de poli-metacrilato de metilo de 200 nm de ancho.



por regiones discretas denominadas granos y los límites físicos se denominan bordes) en la superficie de la nanofase de Ti comparado con el Ti convencional y que los osteoblastos se adhieren en los límites de las partículas metálicas podría explicar el mayor crecimiento sobre nanometales. También se ha comprobado que el aumento de la rugosidad (y por ende la superficie expuesta) juega un papel importante en la adhesión (Ejiofor et al., 2004).

Se ha reportado también efectos sobre la morfología celular. Así Gutwein y Webster (2002) han estudiado el efecto de la presencia de nanopartículas de alúmina sobre el crecimiento de osteoblastos (figura 10).

■ **PERSPECTIVAS FUTURAS**

La ingeniería de tejidos ha mostrado un gran interés en aplicar la nanotecnología por la capacidad de producir (mejores, más rápidamente etc). nanoestructuras similares a los tejidos naturales y el uso de nanopartículas para liberación de fármacos. Las estrategias en medicina regenerativa tienen hoy un enfoque

Figura 9: Imágenes de microscopía electrónica de barrido mostrando la adhesión de osteoblastos sobre fases de Ti de tamaño nanométrico. Las flechas indican células (imágenes superiores) y áreas de protrusión (desplazamiento anormal) de células en bordes de grano (imágenes inferiores) (Webster et al, 2004).

Por su parte se ha reportado cambios en la bioactividad. En este sentido Webster y colaboradores (2004) han estudiado la adhesión y actividad de osteoblastos (células del hueso) en Ti nanoestructurado y convencional (figura 9). El hecho de que haya más bordes de grano (los metales están formados

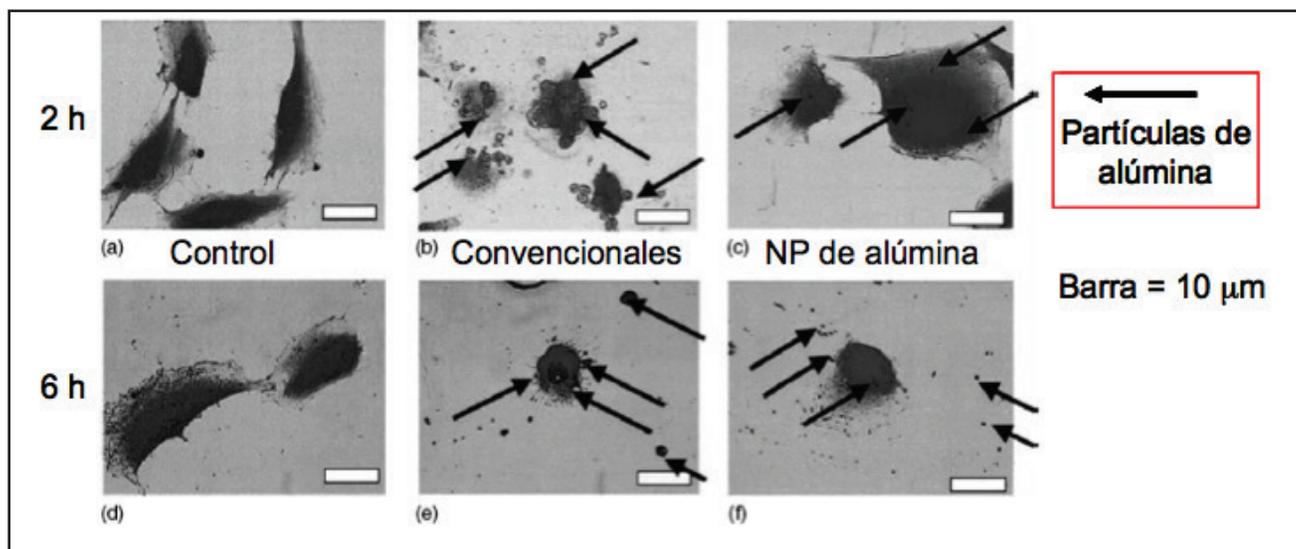


Figura 10: Efecto de la presencia de nanopartículas de alúmina sobre el crecimiento de osteoblastos. Morfología de osteoblastos sin partículas (a, d) en presencia de partículas convencionales (b, e) y en presencia de nanopartículas (c, f) a 2 y 6 horas de crecimiento (Gutwein et al., 2002).

convencional: el de cultivar células del paciente en andamios en un reactor y luego implantarlo en el paciente junto con factores de crecimiento. Sin embargo, esta forma tiene problemas de eficiencia. Una forma más efectiva sería desarrollar materiales inteligentes capaces de enviar señales para estimular el crecimiento celular. La nanotecnología es una herramienta poderosa en el camino de crear esos materiales inteligentes pero aún estamos lejos de alcanzar ese objetivo.

Un aspecto que aún queda por dilucidar es sobre la seguridad de esos nanomateriales en medicina regenerativa que aún está en discusión y se requieren estudios de inocuidad y/o toxicidad tanto durante la elaboración como durante la implantación. Las nanopartículas pueden entrar en el cuerpo a través de poros y los efectos son aún desconocidos.

■ REFERENCIAS Y LECTURAS COMPLEMENTARIAS

- Bettinger C.J., Borenstein J.T., Langer R. Micro- and Nanofabricated Scaffolds en *Principles of Tissue Engineering*, 3era Edición. (2007) Ed. Lanza R., Langer R., Vacanti J.P.
- Boland E.D., Wnek G. E., Simpson D., Pawlowski K. J., Bowlin G. L. (2001) *Journal of Macromolecular Science Pure & Applied Chemistry* 38, 1231.
- Chen V.J., Ma P.X. (2004) Nano-fibrous poly(l-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials* 25, 2065.
- Choudhary S., Haberstroh K.M., Webster T.J. (2007) Enhanced Functions of Vascular Cells on Nanostructured Ti for Improved Stent Applications. *Tissue Engineering* 13, 1421.
- Ejiofor J.U., Webster T.J. (2004) Bone cell adhesion on titanium implants with nanoscale surface features. *International Journal of Powder Metallurgy* 40, 43.
- Engel E., Michiardi A., Navarro M., Lacroix D., Planell J.A. (2008) Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends in Biotechnologies* 26, 39.
- Gutwein L.G., Webster T.J. (2002) Osteoblast and Chondrocyte Proliferation in the Presence of Alumina and Titania Nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 4, 231.
- Harrington D.A., Sharma A.K., Erickson B.A., Cheng E.Y. (2008) Bladder tissue engineering through nanotechnology. *World Journal of Urology* 26, 315.
- Laurencin C.T., Nair L.S. (2008) *Nanotechnology and Tissue Engineering. The Scaffold*. CRC Press.
- Lovat V., Pantarotto D., Lagostena L., Cacciari B., Grandolfo M., Righi M., Spalluto G., Prato M., Ballerini L. (2005) Carbon Nanotube Substrates Boost Neuronal Electrical Signaling. *Nano Letters* 5, 1107.
- Mondalek F.G., Lawrence B.J., Kropp B.P., Grady B.P., Fung K-M, Madhally S.V., Lin H-K (2008) The incorporation of poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles into porcine small intestinal submucosa biomaterials. *Biomaterials* 29, 1159.
- Venugopal J.R., Low S., Choon A.T., Kumar A.B., Ramakrishna S. (2008) Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration. *Artif. Organs* 32, 388.
- Webster T.J., Ejiofor J.U. (2004) Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V, and CoCrMo. *Biomaterials* 25, 4731.
- Zhang L., Webster T.J. (2009) Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today* 4, 66.