

Desarrollo de cartílago fetal "in vivo" utilizando técnicas de ingeniería tisular

Dres. G. Falke, M. Siminovich, M. Bogliione, D. Aguilar

Area Trasplante de Pulmón, Anatomía Patológica y Cirugía Experimental.
Hospital de Pediatría J.P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina

Resumen

La Ingeniería Tisular es el área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de sustitutos biológicos y su consecuente implante en el cuerpo. El objetivo del presente estudio es desarrollar cartilago fetal en un modelo "in vivo" con el propósito de evaluar e interpretar el comportamiento celular fetal y su capacidad de formación de un tejido determinado. Mediante fetoscopia se obtuvieron células del pabellón auricular de fetos de ovejas de 90 a 95 días de gestación; el tejido obtenido fue disecado hasta obtener tejido cartilaginoso puro, luego fue tratado y sembrado en platos de cultivo y las células fueron expandidas cada 72 horas hasta obtener la cantidad necesaria para realizar el experimento. Las células expandidas fueron sembradas en un polímero de ácido poliglicólico de 1 cm x 1 cm de lado y luego implantadas en ratones atímicos (sin capacidad de respuesta inmune) en el tejido celular subcutáneo en 4 diferentes concentraciones celulares. En otro grupo de animales se implantó el polímero sin células a modo de grupo control. Los animales fueron sacrificados a las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas del implante. Los tejidos obtenidos evaluados histológicamente utilizando hematoxilina-eosina, azul de alcian, azul de toluidina, tricrómico de Masson y safranina "o". Todos los animales toleraron el procedimiento quirúrgico y sobrevivieron hasta el momento estipulado de sacrificio. Al examen microscópico todos los polímeros sembrados desarrollaron tejido con estructura cartilaginosa que mostró mayor consistencia en los especímenes sacrificados más tardíamente. El tamaño del cartilago fetal tuvo una relación directa con el volumen de células implantadas. El polímero fue degradándose paulatinamente con el correr de las semanas no quedando restos del mismo hacia el final de la sexta semana. Ningún polímero solo, es decir sin células, fue capaz de formar tejido. Concluimos que el mayor volumen de células sembradas, el tiempo más prolongado y un apoyo nutricional adecuado son factores que mejoran la formación "in vivo" de cartilago fetal.

Palabras clave: Ingeniería Tisular – Cartilago fetal – Ovejas – Fetoscopia

Summary

Essentials of tissue engineering consist in using living cells, extracellular medium manipulation and biological substitutes creation for body implantation. Aim of this study is to develop fetal cartilage in an "in vivo" model to evaluate fetal cell behavior and its ability for targeted tissue development. Ear cells from 90-95-gestational days-aged fetal sheeps were obtained through fetoscopy. This tissue was dissected free to get pure cartilage, then treated and cultivated in culture plates and cells expanded every 72 hours. Expanded cells were cultivated in a poliglicolic acid polymer of 1 square centimeter and then were implanted in athymic mice (without immune response ability) in subcutaneous tissue in 4 different concentrations. In other group polymer alone without cells was implanted as a control group. Animals were sacrificed at 2, 4, 6, 8 and 12 weeks after implantation. Specimens were studied using hematoxylin-eosin, alcian blue, toluidin blue, Masson trichromic and safranin "o" coloureates. There were no deaths before scheduled time. On microscopic examination all cultivated polymers developed cartilaginous structure tissue, specially those that were sacrificed the later. Fetal cartilage size was proportional to implanted cells volume. Polymer was degraded as time passed by, leaving no remainders by the sixth week. No polymer

alone (without cells) developed tissue. We conclude that bigger volume implanted, longest time and adequate nutritional support improves "in vivo" fetal cartilage formation.

Index words: Tissue engineering – Fetal cartilage – Sheeps – Fetoscopy

Resumo

A Engenharia Tissular é a área científica interdisciplinar cujo fundamento essencial é o uso de células vivas, manipulação do extracelular, criação de substitutos biológicos e seu conseqüente implante no corpo. O objetivo do presente estudo é desenvolver cartilagem fetal em um modelo "in vivo" com o propósito de avaliar e interpretar o comportamento celular fetal e sua capacidade de formação de um determinado tecido. Mediante fetoscopia obteve-se células do pavilhão auricular de fetos de ovelhas de 90 a 95 dias de gestação; o tecido obtido foi dissecado até obter-se tecido cartilaginoso puro, imediatamente foi tratado e semeado em placas de cultivo e as células foram repicadas a cada 72 horas até obter-se a quantidade necessária para realização da experiência. As células repicadas foram semeadas em um polímero de ácido poliglicólico de 1 cm x 1 cm e logo implantadas em ratos atímicos (sem capacidade de resposta imunológica) no tecido celular subcutâneo em 4 diferentes concentrações celulares. Em outro grupo de animais implantou-se o polímero sem células - grupo controle. Os animais foram sacrificados na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª e 12ª semanas após o implante. Os tecidos obtidos avaliados histologicamente utilizando-se hematoxilina-eosina, azul alcian, azul toluidina, tricrômico de Masson e safranina "o". "Todos os animais toleraram procedimento cirúrgico e sobreviveram até o momento estabelecido para o sacrifício. Ao exame microscópico todos os polímeros semeados desenvolveram tecido com estrutura cartilaginosa que mostrou maior consistência nos espécimes sacrificados mais tardiamente. O tamanho da cartilagem fetal teve uma relação direta com o volume de células implantadas. O polímero foi degradado paulatinamente com o correr das semanas não sobrando restos do mesmo até o final da sexta semana. Nenhum polímero isolado, isto é sem células, foi capaz de formar tecido. Concluímos que maior volume de células semeadas, tempo mais prolongado e um apoio nutricional adequado são fatores que melhoram a formação "in vivo" de cartilagem fetal.

Palavras chave: Engenharia Tissular – Cartilagem Fetal – Ovelhas – Fetoscopia

Introducción

Se conoce como "Ingeniería Tissular" al área científica interdisciplinaria cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de substitutos biológicos y su conseqüente implante en el cuerpo¹.

Es la intención de esta ciencia reparar, reemplazar, mantener, o mejorar la función particular de un órgano o tejido¹.

La idea de la "Ingeniería Tissular" se forja con la unión de la experiencia ganada en diversos campos, como la biología celular, bioquímica y la biología molecular y su posterior aplicación a la ingeniería de nuevos tejidos y órganos¹.

Grandes avances en el campo de la trasplantología se han realizado en los últimos años. La falta de órganos, aptos para implantes, especialmente en la población pediátrica, se ha convertido en el límite más importante de esta nueva terapéutica.

La reconstrucción quirúrgica en el periodo neonatal, de ciertas malformaciones, es a menudo impracticable por la falta de tejido adecuado. El objetivo central de la "Ingeniería Tissular Fetal" es aplicar los principios antes expuestos para tratar, en periodo neonatal, diversas malformaciones congénitas, con tejido fetal autólogo cultivado y expandido. Este procedimiento consiste en la obtención de tejido fetal mediante la utilización de técnicas de fetoscopia y otros procedimientos mínimamente invasivos tal como se expresa en el gráfico 1²⁻³.

La Ingeniería Tissular permitió que condrocitos aislados de tejidos adultos y luego de ser sembrados en transportadores celulares adecuados pudieran ser capaces de desarrollar tejido para su utilización con diversos fines terapéuticos⁴.

A fin de interpretar en una forma directa la biología de la gestación, el presente estudio experimental tiene por objetivo el desarrollo de cartilago fetal en



Gráfico 1: desarrollo del concepto de ingeniería Tisular Fetal



Gráfico 2: desarrollo del concepto del presente estudio experimental

un modelo "in vivo" con el propósito de investigar, evaluar e interpretar el comportamiento celular fetal y su capacidad de formación de un tejido determinado (Gráfico 2).

Material y método

Obtención de células: Los procedimientos realizados siguieron los principios de la ARCH (Animal Resource Children's Hospital, Boston, MA) avalado por la "Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto de Salud de EE.UU.". Se utilizaron para la obtención de células fetales ovejitas de 90-95 días de preñez. Bajo anestesia general con una inducción inicial de ketamina intramuscular, intubación endotraqueal y manejo de la vía aérea con anestésicos inhalatorios (isoflurane al 2%) se mantuvo la anestesia durante el acto operatorio. Ba-

jo estrictas condiciones de asepsia se procedió a la realización de una laparotomía mediana supraumbilical con la exposición del útero. Una vez hallada la placenta se procedió a la localización del feto. Mediante fetoscopia se accedió al mismo colocando 3 trócares de 5 mm: uno para la cámara y los restantes para la colocación de pinzas apropiadas para la extracción de tejido fetal. Se localizó la cabeza del feto y se tomó un segmento de 2,5 cm x 2,5 cm del pabellón auricular. Una vez obtenido el tejido, los trócares fueron cuidadosamente extraídos y las membranas herméticamente cerradas. Se reintrodujo el útero y se procedió al cierre de la laparotomía para permitir una adecuada sobrevida fetal.

Cultivo celular: El tejido previamente obtenido fue procesado siguiendo una cuidadosa microdissección donde se retira la piel y el tejido celular subcutáneo, hasta obtener tejido cartilaginoso puro. El mismo es triturado y procesado mediante un tratamiento enzimático con una suspensión de colagenasa 20% por 6 horas a 37 grados en un sistema de agitación continua a 120 ciclos por minuto. El material obtenido fue centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos y una vez extraído el sobrenadante fue resuspendido en medio Hamms F-12 y sembrado en platos de cultivo con el mismo medio y suplementado con 10% de suero bovino fetal, 5 mg de ácido ascórbico, 100 mg de estreptomycin y 100 unidades por ml de penicilina, todo esto mantenido a una temperatura de 37 grados con CO₂ al 5% en una estufa para cultivo celular. Las células fueron expandidas cada 72 horas aproximadamente. Los condrocitos fetales fueron expandidos hasta obtener una suficiente cantidad de células para realizar el experimento.

Transporte celular: Las células obtenidas y expandidas en los platos de cultivo fueron cuidadosamente removidas con tripsina durante 1 a 3 minutos y colectadas en un tubo de ensayo. El material obtenido fue centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos y una vez extraído el sobrenadante, las células obtenidas fueron contadas y sembradas en un polímero biodegradable del tipo de ácido poliglicólico con una forma predeterminada de 1 cm x 1 cm. Estos polímeros presentan un diámetro de las fibras de 15 micras con una porosidad de 95% y una distancia interfibra que va de 0 a 200 micras. Los polímeros fueron sembrados a una concentración celular creciente: 25, 50, 75 y 100

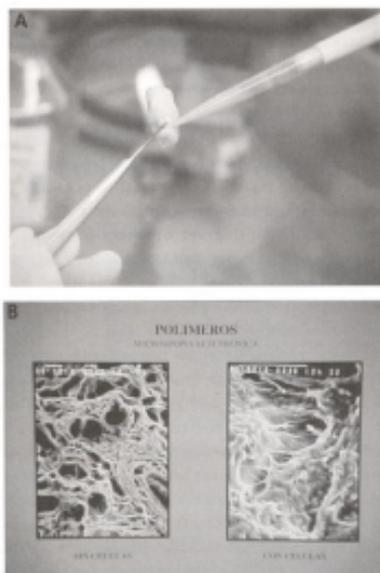


Fig. 1: A-Sembrado del polímero. B-Microscopia electrónica para confirmar la adhesión celular fetal al polímero.

millones de células por centímetro cuadrado con una técnica de inyección celular o introducción directa bajo presión constante como se visualiza en la figura 1 A. Los polímeros sembrados fueron mantenidos en el medio F-12 por 48 horas a una temperatura de 37 grados con CO₂ al 5% en una estufa para cultivo celular, previa a su implantación para certificar una adecuada adhesión celular. Se realizó microscopia electrónica para confirmar la correcta adhesión de los condrocitos fetales al polímero transportador como se ve en la figura 1 B.

Implante celular: Una vez sembrados los polímeros con las diferentes concentraciones celulares fueron implantados en el dorso de ratones atímicos (sin capacidad de respuesta inmunológica) por debajo de la piel en el tejido celular subcutáneo como se ve en la figura 2 A y B. Se utilizaron 5 ratones a los que se sembró 4 diferentes concentraciones celulares en distintos sectores del dorso. Otro grupo de animales fue utilizado para la im-

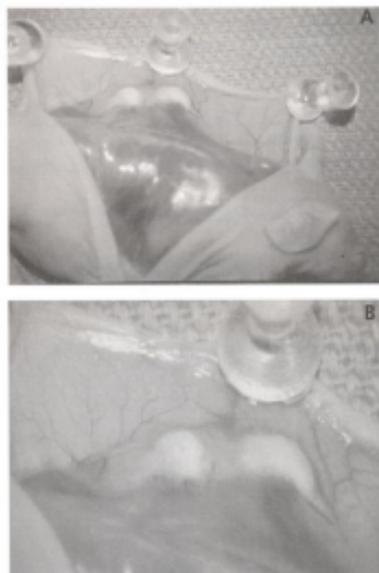


Fig. 2: A-implantación de polímeros sembrados a concentraciones crecientes de condrocitos fetales 25, 50, 75, 100 millones de células por centímetro cuadrado. B-mótese el aumento de vascularización local que genera el huésped para lograr la adecuada nutrición del implante fetal.

plantación del polímero sin células; este sirvió de grupo control. Los animales fueron sacrificados a las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas del implante. Los tejidos obtenidos fueron fijados en formol, procesados e incluidos en parafina. Se realizaron secciones de 5 micras y luego fueron teñidos con 5 diferentes técnicas para evaluar la formación de tejido: hematoxilina eosina, azul de alcian, azul de toulidina, tricrómico de Massón y safranina "o".

Resultados

Todos los animales toleraron el procedimiento quirúrgico y sobrevivieron hasta el final del estudio. Los animales de ambos grupos (control y experimento) fueron sacrificados a las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas del implante.

Al examen microscópico todos los polímeros sembrados fueron capaces de desarrollar tejido al mo-

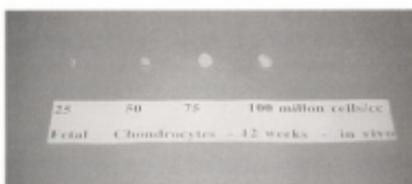


Fig. 3: al final del estudio, 12 semanas se puede observar la formación de tejido cartilaginoso "in vivo" una vez extraídos los tejidos del dorso de los ratones atímicos.



Fig. 4: A-B-C diferentes momentos del estudio donde se puede observar como el cartilago fetal va creciendo y organizándose hasta desarrollar tejido: A-2 semanas, B-4semanas, C-6 semanas. Nótese como para el final de la sexta semana el polímero se ha degradado en forma completa.

mento en que fueron extraídos formando una estructura cartilaginosa de color blanquecino y de una consistencia semejante al cartilago hialino, que con el paso de las semanas aumentó en consistencia. El tamaño del cartilago fetal tuvo una relación directa con el volumen de células implantadas siendo los de mayor densidad de sembrado (75 y 100 millones de células por centímetro cuadrado) los que mantuvieron la mejor forma con el paso de las semanas como se demuestra en la figura 3. No se encontraron signos de erosión ni de infección de los tejidos aledaños. Si se evidenció el importante aporte vascular del tejido peri-implante que favoreció el crecimiento celular como se pone de manifiesto en la figura 2 B.

El análisis histológico de las piezas coloreadas con hematoxilina eosina, expresó la diferencia de concentración de sembrado celular. Se observaron características de tejido cartilaginoso en los preparados tratados con las tinciones específicas de azul de alcian y azul de toluidina que expresan los mucopolisacáridos, producto este formando por los condrocitos. (figura 4: A, B, C)

El polímero fue degradándose paulatinamente con el paso del tiempo y hacia el final de la sexta se-

mana ya no quedaron restos del mismo en los cortes histológicos, siendo reemplazado por la matriz extracelular secretada por los condrocitos implantados. (figura 4: A, B, C)

Ningún polímero solo, del grupo control, es decir sin células, fue capaz de formar tejido.

Discusión

La ingeniería tisular es un campo relativamente nuevo cuyo objetivo es restaurar el tejido funcionalmente dañado o ausente utilizando sustitutos biológicos prediseñados. En las últimas dos décadas, investigadores de los más diversos campos han comenzado a restaurar diversos tejidos humanos^{3,5}. Actualmente estamos en condiciones de utilizar esta tecnología para el desarrollo de tejidos fetales^{2,6-8}. Una vez diagnosticado el defecto congénito, el tejido fetal puede ser extraído por diferentes métodos, obteniendo así células fetales capaces de ser cultivadas en sistemas apropiados y expandidas *in vitro*⁹. Este crecimiento celular controlado permite sembrar las células en transportadores celulares específicos, para que una vez implantados sean capaces de reproducir el tejido fetal originario. La aplicación de este principio permitirá originar tejidos fetales para luego emplearlos para la reconstrucción tisular neonatal.

El trasplante de condrocitos es una técnica utilizada para la conformación de tejido cartilaginoso. El primer reporte del aislamiento de condrocitos fue realizado por Smith en 1965¹⁰. El implante de condrocitos adultos en diversos sistemas de transporte celular inicialmente mostró baja sobrevida celular. La experiencia evolutiva mostró que la alta densidad celular favorece la condrogénesis, optimizando la interacción entre la célula y el sustrato. El trasplante de condrocitos ha sido realizado de dos formas: la inyección directa o la implantación de matrices sembradas por células.

En 1977 Green reportó experimentos iniciales donde sembró condrocitos adultos sobre una matriz ósea estéril, y luego de ser implantados en ratones atímicos formó tejido cartilaginoso¹¹. Tiempo después, áreas cartilaginosas de diversas articulaciones fueron experimentalmente reparadas con la utilización de condrocitos autólogos, la proliferación de condrocitos fue comprobada 48 horas luego del im-

plante y a las 8 semanas el defecto estaba completamente reparado¹². Similares experimentos mostraron que condrocitos alogénicos e isogénicos cultivados en un gel de colágeno permitieron reparar defectos osteocondrales en ratas. A las 12 semanas este estudio comparativo demostró que todos los 8 defectos tratados con cartilago isogénico fueron reparados, contra cuatro de los ocho reparados con cartilago alogénico¹³. Distintos sistemas de transporte de condrocitos se han utilizado: polímeros sintéticos como el ácido poliglicólico o PGA, ácido poli-láctico o PLA, gel de agarosa y otros¹³⁻¹⁵. Polímeros con PGA sembrados con condrocitos adultos lograron formar tejido luego de 8 semanas *in vitro*¹⁵. Estos polímeros permiten la diferenciación, respetando la morfología y manteniendo el fenotipo celular. El polímero de PLA sembrado con condrocitos ha sido utilizado como neo tejido para el reemplazo de defectos cartilagosos articulares creados en conejos¹⁶. Similares estudios realizados en conejos pero con una alta densidad de sembrado celular lograron resultados muy significativos activando la potencial capacidad reparativa articular que presenta este tejido con alta disponibilidad celular para la formación de tejido¹⁷.

A partir de estos interesantes estudios se evolucionó a una etapa clínica de aplicación de la ingeniería tisular utilizando esta terapéutica en 23 pacientes para defectos articulares en la articulación de la rodilla. La mayoría mostró una mejoría clínica y 14 de ellos evidenciaron una mejoría radiológica luego de 2 años del implante¹⁸.

La ingeniería tisular fetal es una nueva y fascinante área de la ingeniería tisular que tiene por objeto reparar defectos congénitos ya sea intra-útero o en el post-parto inmediato con la utilización de tejidos autólogos (gráfico 1) En esta línea de investigación se han reportado en forma experimental la corrección de defectos congénitos como la extrofia vesical, defectos de piel, más recientemente hernias diafragmáticas y existen comunicaciones sobre reparación de defectos traqueales⁶⁻⁸.

Las células fetales presentan un amplio potencial reproductivo que se expresa en una mayor capacidad de crecimiento celular. Específicos receptores de membrana obtenidos en células fetales serían los responsables de este fenómeno. El receptor en cuestión es el factor de crecimiento insulínico subtipo A (IGF-

II que se una al IR-A) que presenta efectos mitogénicos en células fetales. Es curioso mencionar, que este receptor también se expresa en diferentes líneas celulares tumorales, favoreciendo el crecimiento celular tumoral¹⁹⁻²¹.

El uso de tejidos fetales para trasplante de tejidos tiene varias ventajas teóricas. La más importante es el potencial inmunológico de "inmadurez" que presenta el tejido fetal. El reconocimiento de dicho tejido como propio se realiza durante los primeros meses de la gestación, y el tejido obtenido en etapa fetal temprana tendría una mayor capacidad de "adaptación inmunológica". Esto es un fenómeno conocido y se debe a que las células fetales en edad temprana no expresan el antígeno de superficie H por lo que no pueden generar rechazo²².

La utilización de células fetales humanas, obtenidas de fetos humanos abortados naturalmente, para el tratamiento de distintas patologías neurológicas tales como la enfermedad de Parkinson y otras afecciones neurológicas, abrió un amplio debate ético en Estados Unidos²³⁻²⁴.

Ciertos aspectos sobre nuestro trabajo experimental que hacen a la formación de tejido fetal deben ser considerados; durante las primeras semanas del experimento (cortes histológicos de la segunda y cuarta semana)(figura 4 A) se observa una abundante cantidad de restos del polímero y algunas células de aparente respuesta inflamatoria local. En forma lenta y progresiva el polímero experimenta una progresiva degradación y los espacios intercelulares se van ocupando en forma paulatina con elementos de la matriz extracelular que favorecerán el sostén y adhesión celular que luego serán vitales para la supervivencia celular. Una vez alcanzada la sexta semana del estudio, el polímero está degradado casi en su totalidad y son los condrocitos fetales los que comienzan una adecuada organización celular, la cual se asemeja a la composición de cartilago maduro como se ve en la figura 4 B y C. Esta histoarquitectura persiste hasta el final del estudio.

Es evidente que las diferentes concentraciones de sembrado celular tienen un impacto directo sobre la formación de tejido, pero más directamente sobre la calidad del tejido formado. Este fenómeno también se ha visto en el desarrollo de cartilago adulto a través de la ingeniería tisular⁸. Podemos certificar que a

mayor concentración de sembrado celular se logra una mejor histoarquitectura asemejando al cartilago nativo. Sobre la base de los datos obtenidos de nuestro experimento para el desarrollo de cartilago fetal sostenemos que sería conveniente utilizar una densidad de sembrado de 75 a 100 millones de células por centímetro cuadrado. Esta concentración de sembrado nos permitiría inferir que el tejido fetal que desarrollamos tendría características similares a cartilago nativo.

Otro aspecto a tener en cuenta para la conformación de un tejido de alta calidad es el tiempo. A medida que transcurren las semanas, más específicamente a partir de la sexta semana, el tejido formado adquiere una mayor solidez y resistencia. Este tejido presenta aspecto de cartilago con una coloración blanquecina que persiste hasta el final del estudio en la semana doce, como se ve en la figura 3. Es evidente que con el transcurso del tiempo los condrocitos fetales adquieren una organización superior capaz de generar características histológicas similares a las del tejido fetal, manteniendo la vitalidad celular.

Otro aspecto no menos importante es el apoyo nutricional que genera el huésped sobre el injerto favoreciendo una rica vascularización local y ofreciendo los sustratos necesarios y adecuados para que estas células crezcan de una manera armónica, se desarrollen y sean capaces de formar neocartilago fetal (figura 2B).

Para la formación "in vivo" de cartilago fetal resulta de suma importancia, la concentración del sembrado celular, dado que los tejidos con concentraciones entre 75 y 100 millones de células por centímetro cuadrado, fueron capaces de desarrollar tejido con características histológicas adecuadas.

El tiempo fue otro factor muy trascendente para la organización celular orientada a la formación de tejido, dado que la mejor calidad de tejido se observó hacia el final del estudio.

Bibliografía

- Falke G y Atala A: Reconstrucción de órganos y tejidos utilizando Ingeniería Tisular. Revista Archivos Argentinos de Pediatría 98 (2) 132-138, 2000
- Falke G and Atala A: Fetal Tissue: Chapter 22. Methods of Tissue Engineering (in press) R. Langer & A. Atala
- Fauza DO and Vacanti J.: Fetal Tissue Engineering. The fetus as a Patient: Dr Michael Harrison. Chapter 56. Saunders 2001
- L. E. Freed, J. C. Marquis, A. Nohria, J. Emmanuel, A. G. Mikos, R. Langer: Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. Journal of Biomedical Materials Research, Vol. 27, 11-23, 1993.
- Pollok J. and Vacanti J.: Tissue Engineering. Seminars in Ped Surg Vol. 5, 3: pp191-196, 1996.
- Fauza DO, Fishman SJ, Mehegan K, Atala A.: Videofotoscopically assisted fetal tissue engineering: skin replacement. J Pediatr Surg Feb; 33 (2): 357-61, 1998.
- Fauza DO., Fishman SJ., et. al.: Videofotoscopically assisted Fetal Tissue Engineering: Bladder Augmentation. J Pediatr Surg Vol 33, 1: 7-12, 1998.
- Fauza DO, et al: Fetal Tissue Engineering: Diafragma replacement. J. Pediatr Surg 2001.
- Machluf M., Atala A.: Tissue engineering: Emerging Concepts. Graf. Vol 1- No1-March/April 1998.
- Smith AU: Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. Nature 205: 783-784, 1965.
- Green WT: Basic Science and pathology. Orthopaedic and related research 124: 237-250, 1977.
- Italy S, Abramovici D and Nevo Z: Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. Clinical Orthopaedics and Related Research 226: 284-303, 1987.
- Takashi N, Masanori OKA, madoka F, et al: Cultured chondrocytes-compression of allograft and xenograft. Clinical Orthopaedics Research 302: 351-258, 1994.
- Grande DA, Halberstad C, Naughton G et al: Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering. J Biomedical Materials Research 34: 111-120, 1997.
- Vacanti C, Langer R, School B et al: Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation in vivo. Plas Reconstr Surg 88: 753-759, 1991.
- Watanai S, Kimura T Hirooka T et al: Repair of rabbit articular surfaces with allogenic chondrocytes embedded in collagen gels. J Bone Joint Surg 753-759, 1989.
- Fred LE, Grande DA, Lingbin Z et al: Joint resurfacing using allograft chondrocytes and sythetic biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res 28:891-899, 1994.
- Brittberg M, Lindhl A, Nilsson A et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. New Engl J Med 331:889-895, 1994.
- Frasca F, Pandini G, Scallia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R.: Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. Mol Cell

- Biol 19(5): 3278-88, 1999.
20. Falke G., Caffaratti J., Atala A.: Tissue Engineering of the Bladder. *World J Urol* 18 (1), 36-43, 2000.
 21. Baserga R.: The insulin-like growth factor I receptor: Key to tumor growth? *Cancer Res* 55(2): 249-52, 1995
 22. Foglia RP, Dipreta J., et al: Fetal allograft survival in immunocompetent recipients is age dependant and organ specific. *Ann Surg* 204: 402, 1986.
 23. Clarkson ED, Freed CR.: Development of fetal neural transplantation as a treatment for Parkinson's disease. *Life Sci* 65 (23): 2427-37, 1999
 24. Garry DJ., Caplan AL., et al.: Are there really alternatives to the use of fetal tissue from elective abortions in transplantation research? *N Engl J Med* 327 (22): 1592-1595, 1992.

Trabajo presentado en el IV Congreso del CIPESUR, Noviembre de 2001, Montevideo, Uruguay.

Dr. G. Falke
Hospital de Pediatría J.P. Garrahan
Combate de los Pozos 1881
(1245) Buenos Aires
Argentina
germanfalke@yahoo.com