

Generación *in vitro* de un sustituto de pared vesical humana obtenido mediante ingeniería tisular

M. García Gómez¹, F. Valle Díaz de la Guardia², E. Díaz Moreno¹, M.A. Muñoz Miguel Sanz¹, I. Garzón³, R. Fernández Valadés^{1,3}, A.M. Ruiz Montes¹, P.V. Crespo²

¹Servicio de Cirugía Pediátrica. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. ²Servicio de Urología. Hospital San Juan de la Cruz, Úbeda, Jaén. ³Grupo de Ingeniería Tisular, Departamento de Histología, Universidad de Granada

RESUMEN

Objetivos. Numerosas patologías que afectan a la vejiga, de origen congénito (extrofia) o adquirido (traumatismos, tumores), requieren la reconstrucción de la pared vesical utilizando intestino delgado, sigma o estómago, los cuales no están exentos de complicaciones. Por ese motivo, en el presente trabajo pretendemos desarrollar un nuevo modelo de pared vesical humana mediante ingeniería tisular que pudiese tener una utilidad clínica.

Material y métodos. En primer lugar, se procedió a generar cultivos primarios de células epiteliales y estromales de la mucosa vesical a partir de pequeñas biopsias de la pared vesical humana, utilizando para ello técnicas de digestión enzimática mediante tripsina-EDTA y colagenasa. Posteriormente, se generó un sustituto tridimensional de la mucosa vesical utilizando como soporte biomateriales de fibrina-agarosa. El análisis de las muestras se realizó a los 14 días mediante examen histológico de muestras teñidas con hematoxilina-eosina.

Resultados. La aplicación de los métodos de digestión enzimática permitió generar eficientemente cultivos primarios de células epiteliales y estromales de la mucosa vesical humana, comprobándose que la tasa de proliferación de las células estromales era superior a la de las células epiteliales. Una vez generados los sustitutos de la pared vesical, se comprobó el adecuado nivel de biocompatibilidad del biomaterial y las células estromales y epiteliales. La estructura histológica de los sustitutos de pared vesical presentaba una gran analogía con la mucosa vesical humana nativa.

Conclusiones. El tejido vesical generado por ingeniería tisular muestra importantes similitudes estructurales e histológicas con el tejido vesical nativo. Estos resultados sugieren que los tejidos generados mediante ingeniería tisular podrían tener utilidad terapéutica en el futuro.

PALABRAS CLAVE: Constructos; Ingeniería tisular; Vejiga; Urología; Histología.

Correspondencia: Dra. Miriam García Gómez. C/ Nápoles, 56. Polg. Santa Ana. 30319 Cartagena, Murcia
E-mail: garcia.miriam82@gmail.com

Financiado por los proyectos FIS PI07-331 y 07/619 del Instituto de Salud Carlos III.

Presentado en el 52 Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Pediátrica.

Recibido: Mayo 2013

Aceptado: Diciembre 2013

IN VITRO GENERATION OF A HUMAN BLADDER WALL SUBSTITUTE BY TISSUE ENGINEERING

ABSTRACT

Introduction. Certain urological congenital conditions, such as bladder exstrophy and acquired conditions such as trauma and tumors may require the use of different tissues like small bowel, sigmoid colon or stomach for bladder reconstruction. However, these tissues are often associated to important complications. The aim of this study is to develop a novel substitute of the human bladder wall by tissue engineering.

Material and methods. We first generated primary cell cultures of epithelial and stromal bladder mucosa cells from small tissue biopsies of human bladder by using enzymatic methods based on trypsin-EDTA and collagenase I. Then, a three-dimensional substitute of the bladder mucosa was generated using fibrin-agarose biomaterials. The analysis of the tissue substitutes was carried out at day 14th of development by histological examination of samples stained with hematoxylin-eosin.

Results. The use of enzymatic digestion methods allowed us to efficiently generate primary cell cultures of the human bladder epithelial and stromal cells. The proliferation rate was higher in stromal cells as compared to epithelial cells. Once the bladder mucosa substitutes were generated, a good biocompatibility of the stromal and epithelial cells into the biomaterial was found. The histological structure of the bladder wall substitutes was analogue to that of the native human bladder mucosa.

Conclusions. The bladder mucosa substitute generated by tissue engineering showed structural and histological similarities with the native human bladder tissues and open the door to the future therapeutic use of these bioengineered tissues.

KEY WORDS: Constructos; Tissue engineering; Bladder; Urology; Histology.

INTRODUCCIÓN

Existen enfermedades que afectan a la vejiga que precisan en ocasiones la sustitución tisular, incluyendo patologías urológicas congénitas (extrofia, vejiga neurógena con baja capacidad de llenado)⁽¹⁾ y adquiridas (tumores, traumatismos). Para realizar la cistoplastia, existen técnicas quirúrgicas que utilizan segmentos de intestino delgado, sigma o estómago^(2,3). Este tipo de intervenciones no están exentas

de complicaciones, pudiendo provocar problemas a nivel del tejido donante, como isquemia, estenosis, tejido limitado, etc. Por otro lado, estos tejidos no suelen presentar las características y el fenotipo del urotelio ni de la musculatura vesical, por lo que la función y contractilidad de los mismos suele ser diferente a la de la pared vesical⁽⁴⁾. Aunque en la mayoría de los casos se consigue fabricar un reservorio capaz de reemplazar la vejiga, la ausencia de función contráctil requiere sondajes intermitentes a lo largo del día, pudiendo provocar infecciones y sangrado. Junto a ello, algunos órganos, como el sigma, pueden presentar características propias del tejido como la presencia de secreción mucosa, que predispone a la formación de cálculos e infecciones, además de alteraciones hidroelectrolíticas y otras^(2,3). Por todo ello, se hace necesario buscar alternativas basadas en el uso de tejidos de estirpe urológica para la reparación quirúrgica de estas patologías.

En este contexto, la ingeniería tisular constituye un conjunto de técnicas y métodos de base biotecnológica que permiten diseñar y generar en laboratorio sustitutos tisulares, tejidos artificiales o constructos a partir de células madre y biomateriales, evitando la posibilidad de rechazo inmunológico cuando se utilizan células autólogas. Hasta el momento, se han generado numerosos tejidos y órganos humanos mediante estas técnicas, habiendo obtenido resultados esperanzadores en el caso de la córnea^(5,6), la piel⁽⁷⁾, la mucosa oral^(8,9), la uretra⁽¹⁰⁾ y la vejiga urinaria⁽¹¹⁻¹³⁾, entre otros. Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún modelo de vejiga artificial capaz de reproducir con exactitud la estructura de la vejiga nativa y de llevar a cabo las funciones de ésta. Aunque actualmente se han descrito varios modelos de vejiga artificial basados en diferentes biomateriales, la mayoría de estos modelos presentan problemas de biocompatibilidad, resultando finalmente en fibrosis, contractura, calcificación y fracaso del implante). Por este motivo, la búsqueda de un nuevo biomaterial plenamente compatible con el cultivo de células de la vejiga urinaria humana es un reto de la investigación actual en este campo.

El presente trabajo tiene como objetivo generar un nuevo modelo de pared vesical mediante ingeniería tisular utilizando células estromales y epiteliales de la mucosa vesical y biomateriales biocompatibles de fibrina-agarosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Generación de cultivos primarios de células estromales y epiteliales de la pared vesical

En este estudio se obtuvieron 15 biopsias de pared vesical de alrededor de 1 x 0,5 cm procedentes de individuos sometidos a cirugía urológica abierta. Todos los pacientes fueron varones, descartándose aquellos pacientes que presentaban patología tumoral urotelial, litiasis vesical o sospecha de infección bacteriana. Todas las muestras correspondían a tejido sano e incluían epitelio y tejido conjuntivo subyacente. De

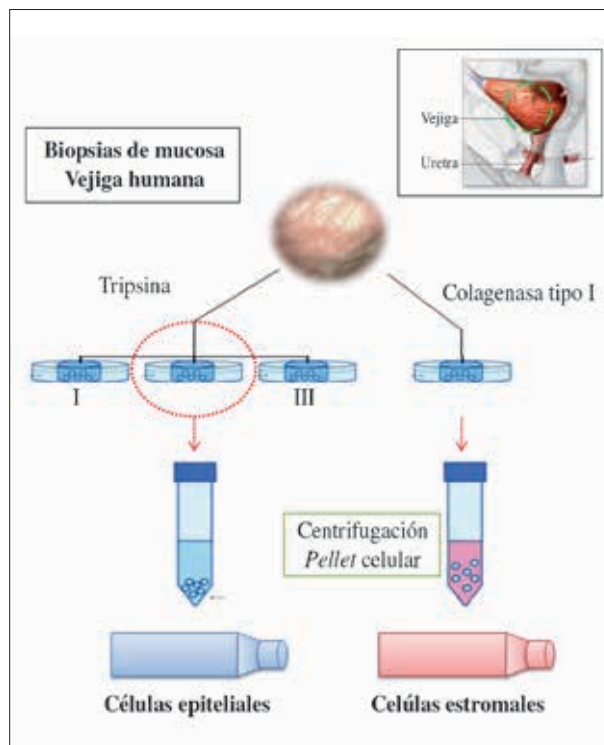


Figura 1. Esquema representativo del procesamiento de las muestras de mucosa vesical humana para la obtención de células epiteliales y células estromales.

todos los pacientes se obtuvo el consentimiento informado para su inclusión en el estudio.

Una vez obtenidas, todas las muestras se introdujeron en un medio de transporte estéril constituido por medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con antibióticos (600 U/ml de penicilina G, 600 µg/ml de estreptomicina y 1,5 µg/ml de anfotericina B) para evitar la contaminación de las muestras, y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su procesamiento durante las siguientes 6 horas. Tras lavar las muestras en solución salina PBS, se procedió a su digestión enzimática para liberar las células y destruir la matriz extracelular. En primer lugar, se realizaron tres ciclos de digestión con tripsina-EDTA para liberar y obtener las células epiteliales del urotelio vesical. En segundo lugar, el tejido remanente se trató con colagenasa tipo I durante 5-6 horas para individualizar las células estromales. Todas las células se recogieron mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 10 minutos. Todo el proceso se muestra de manera esquemática en la figura 1.

Una vez individualizadas las células, cada estirpe celular se mantuvo en su medio de cultivo correspondiente. En el caso de las células uroteliales, se utilizó medio de cultivo de queratinocitos rico en hormonas y factores de crecimiento, el cual fue previamente descrito para el cultivo de células epiteliales humanas⁽⁷⁾, mientras que las células estromales se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con suero bovino fetal y antibióticos.

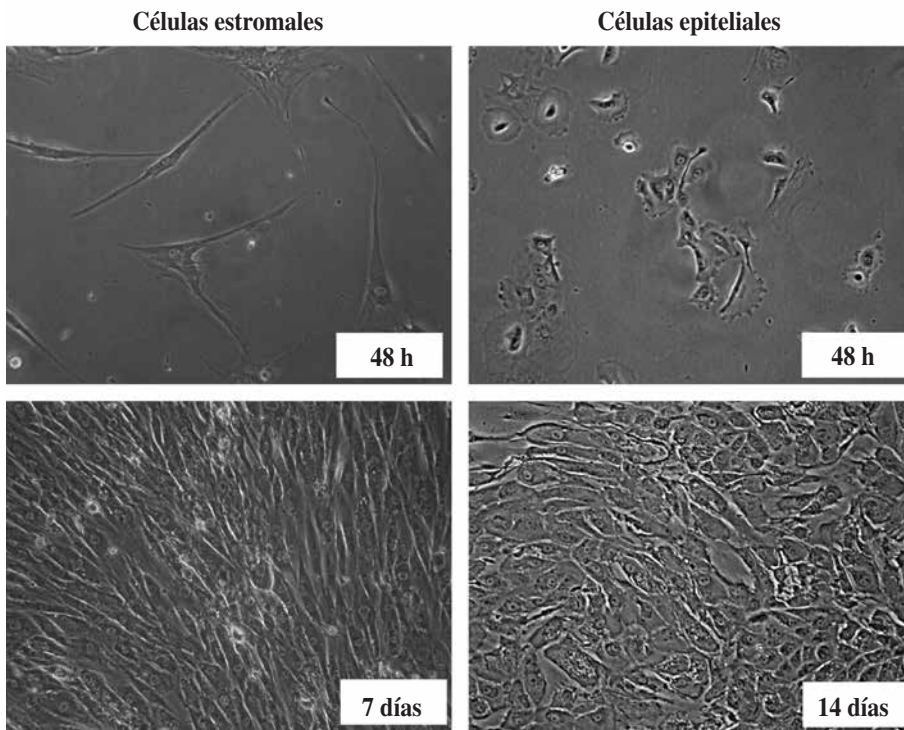


Figura 2. Cultivos celulares correspondientes a las células estromales y epiteliales de la mucosa vesical a los 2, 7 y 14 días de su aislamiento mediante digestión enzimática. Microscopía óptica de contraste de fases, células en cultivo sin ningún tipo de tinción.

Generación de sustitutos tridimensionales de la pared vesical humana

Una vez establecidos los cultivos celulares, y tras obtener un número adecuado de células, se procedió a generar un estroma vesical artificial utilizando biomateriales biocompatibles de fibrina y agarosa previamente descritos para su utilización en ingeniería tisular⁽⁵⁻⁹⁾. Para ello, en primer lugar, se obtuvo plasma humano congelado (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada y Almería), añadiéndose las células estromales previamente cultivadas (fundamentalmente, fibroblastos), ácido tranexámico (como agente antifibrinolítico) y agarosa hasta una concentración final del 0,1%. Los geles de fibrina-agarosa con células estromales se dejaron reposar en un incubador a 37°C durante 2 horas para favorecer la reacción de polimerización del biomaterial de fibrina-agarosa, añadiéndose medio de cultivo a continuación. Tras 24 horas de su generación, se procedió a tripsinizar las células de los cultivos de urotelio humano, subcultivándose estas células en la superficie del sustituto estromal, generando de este modo un epitelio de tipo urotelial sobre la superficie de este.

Todas las muestras se analizaron a los 14 días de evolución, fijándose en formaldehído al 4% e incluyéndose en parafina para su análisis histológico mediante tinción de hematoxilina-eosina. Mediante el análisis histológico se determinó la estructura del sustituto de mucosa vesical a nivel del estroma (fibras y células estromales) y del epitelio (células uroteliales). La biocompatibilidad *in vitro* del biomaterial utilizado se determinó mediante el análisis estructural de las células inmersas en dicho biomaterial y la comprobación de

la adecuada adaptación de las células al estroma artificial formado por este material.

RESULTADOS

En primer lugar, la utilización de los métodos y técnicas descritos en este trabajo permitió generar cultivos primarios de células epiteliales (uroteliales) y estromales (fundamentalmente, fibroblastos) a partir de pequeñas muestras de mucosa vesical. Como se muestra en la figura 2, las células epiteliales presentaban morfología poligonal o redondeada y alcanzaron confluencia alrededor del día 14 del cultivo, mientras que las células estromales, de morfología elongada, fusiforme o estrellada, alcanzaron confluencia en el frasco del cultivo celular alrededor del 7º día de cultivo.

En segundo lugar, el análisis histológico de las muestras de mucosa vesical humana control y teñidas con hematoxilina-eosina reveló la presencia de un epitelio transicional bien configurado y un tejido conjuntivo subyacente rico en fibras de colágeno y fibroblastos, existiendo nervios y vasos sanguíneos en su espesor (Fig. 3A). Finalmente, los sustitutos de pared vesical humana mostraron un estroma artificial constituido por fibras del biomaterial de fibrina-agarosa entre las cuales se disponía la población estromal (fibroblastos cultivados e inmersos en el biomaterial). La tinción mediante hematoxilina-eosina mostró gran homogeneidad en el estroma, el cual estaba formado exclusivamente por el biomaterial de fibrina-agarosa con células en su interior, no existiendo vasos, nervios ni estructuras asociadas. A nivel del epitelio, se observó una

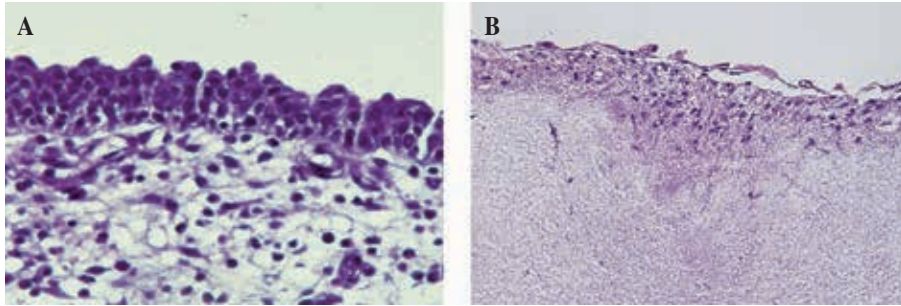


Figura 3. Análisis histológico de las muestras de mucosa vesical nativa utilizadas como control (A) y de los sustitutos de pared vesical generados en este estudio (B). Tinción con hematoxilina-eosina. Magnificación 200X.

única capa de células de aspecto aplanado compatible con un epitelio de tipo transicional similar al de la vejiga urinaria normal, aunque no se observaron signos histológicos de diferenciación celular terminal (Fig. 3B). Todas las muestras analizadas en este trabajo mostraron idénticos resultados en el análisis histológico y de biocompatibilidad.

DISCUSIÓN

La generación de tejidos y órganos artificiales mediante ingeniería tisular supone un gran avance y un cambio de paradigma en el tratamiento de numerosas patologías congénitas y adquiridas. En lo que respecta a la vejiga urinaria, se han descrito diferentes modelos basados en biomateriales naturales y sintéticos. Por un lado, la utilización de biomateriales sintéticos escasamente reabsorbibles tales como el teflón o la silicona normalmente han ofrecido escasos resultados a nivel estructural, funcional y biológico, presentando escasa biocompatibilidad⁽¹⁴⁾. Por otro lado, el grupo de investigación de A. Atala y cols. diseñó diversos modelos de sustitutos vesicales basados en biomateriales obtenidos a partir de la submucosa vesical⁽¹⁵⁾, polímeros de ácido poliglicólico⁽¹⁶⁾ e hidrogeles de colágeno mezclados con otros biomateriales⁽¹²⁾, demostrando buena biocompatibilidad e integración en la vejiga receptora en la mayoría de los casos. Estos resultados sugieren que los materiales de origen natural y altamente biodegradables son los que muestran mayor biocompatibilidad y, por tanto, mejores resultados funcionales⁽¹⁷⁾. Sin embargo, aún no se ha conseguido fabricar un modelo de vejiga humana artificial basado en un biomaterial plenamente biocompatible al cual se adapten las células sin perder capacidad de proliferación y diferenciación *in vivo*. Además, es importante incidir en la búsqueda de biomateriales de origen natural, fáciles de obtener e implantar y libres de efectos secundarios.

Para que este pueda ser utilizado en ingeniería tisular, un biomaterial debe cumplir diversos requisitos, destacando su biocompatibilidad, la ausencia de toxicidad o efectos secundarios, su carácter estable e inerte, adecuadas propiedades físicas y su facilidad de producción y procesamiento. Junto a esto, un adecuado biomaterial debe permitir el cultivo de células en su interior sin alterar su viabilidad, capacidad de proliferación y diferenciación celular. A este respecto, trabajos previos de nuestro grupo de investigación demostraron

que los biomateriales de fibrina-agarosa podrían cumplir los requerimientos del material ideal para su utilización en ingeniería tisular. Por un lado, la fibrina se obtiene a partir de plasma humano procedente de donante, lo cual constituye una fuente de fácil obtención que incluso puede tener origen autólogo. Por otro lado, la agarosa es un polímero natural procedente de la pared de ciertas algas marinas y se utiliza ampliamente en aplicaciones médicas y en alimentación, siendo un material de elevada biocompatibilidad. De hecho, hasta el momento se han generado diversos órganos y tejidos humanos utilizando células inmersas en este tipo de material, con resultados esperanzadores tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales^(5-9,18). Por ese motivo, en el presente trabajo se evaluó la utilidad de este biomaterial para el desarrollo de un sustituto de la mucosa vesical generado mediante ingeniería tisular, encontrando una adecuada biointegración de las células estromales y epiteliales puestas en contacto con este material.

Para la construcción del sustituto de pared vesical propuesto en este trabajo, en primer lugar se procedió a obtener cultivos celulares a partir de pequeñas biopsias de vejiga urinaria humana. Como se puede deducir de los resultados obtenidos, las técnicas basadas en digestión enzimática permitieron de forma muy eficiente generar cultivos de los dos principales tipos celulares de la mucosa vesical. Los cultivos celulares así obtenidos podrían tener numerosas utilidades y aplicaciones, no sólo en ingeniería tisular sino, también, para el diagnóstico, para la realización de pruebas funcionales o para la evaluación de fármacos a nivel de la vía urinaria en laboratorio previamente a su aplicación en el paciente⁽¹⁹⁾. Aunque ambos tipos celulares pudieron obtenerse y cultivarse con eficacia utilizando los medios de cultivo que se describen en la metodología del presente trabajo, nuestros resultados demuestran un crecimiento más acelerado de las células estromales en comparación con las células epiteliales. Estos resultados coinciden con trabajos previos en los que se comprueba que las células epiteliales presentan un crecimiento mucho más lento que las células estromales⁽⁵⁾, probablemente debido al hecho de que las células epiteliales han de crecer y expandirse por contigüidad a partir de las células vecinas, existiendo uniones intercelulares entre todas las células del cultivo, mientras que las células estromales tienden a crecer individualmente, sin que existan uniones entre sí.

Una vez introducidas las células estromales en el biomaterial de fibrina-agarosa para generar un sustituto del estroma

vesical, se observó un adecuado nivel de integración celular en dicho material, no observándose ningún signo de necrosis, apoptosis o mortalidad celular debida a otro mecanismo, estando las células bien adaptadas al estroma del sustituto vesical. Estos resultados demuestran la elevada biocompatibilidad *in vitro* de este biomaterial y la adecuada funcionalidad celular en los geles de fibrina-agarosa. Probablemente, el origen natural de ambos materiales y el hecho de que los fibroblastos humanos sean los encargados de colonizar los coágulos de fibrina que se forman como primera barrera a la presencia de una herida, podrían explicar la excelente tolerancia de las células estromales a estos biomateriales. Sin embargo, el sustituto de estroma vesical generado en este trabajo estaba formado por una red de fibras correspondientes al biomaterial de fibrina-agarosa en la cual se integraban los fibroblastos, no existiendo estructuras fundamentales para el funcionamiento *in vivo* del tejido como son los vasos sanguíneos o las terminaciones nerviosas. Probablemente, los tejidos adquieran estas estructuras a partir de tejidos del receptor una vez implantada esta vejiga artificial *in vivo*, tal como ocurre con otros tejidos artificiales generados mediante ingeniería tisular⁽¹⁸⁾.

Finalmente, nuestros resultados revelan la existencia de un epitelio con una única capa de células en la superficie del biomaterial, tal como ocurre en la vejiga urinaria humana nativa. La generación de esta capa epitelial refuerza la idea de que el biomaterial de fibrina-agarosa es altamente biocompatible, siendo capaz de generar uniones con el polo basal del epitelio que mantendrían unidas las células uroteliales puestas en contacto con este biomaterial. Aunque aún son necesarios futuros trabajos para determinar la funcionalidad *in vivo* de este epitelio, los resultados de este trabajo sugieren que el epitelio artificial que se forma en la superficie del sustituto vesical podría ser análogo al de la mucosa vesical normal y, por tanto, podría desarrollar las funciones de este una vez implantado *in vivo*.

Aunque serán necesarios nuevos estudios para determinar las ventajas del modelo de vejiga artificial aquí presentado frente a otros modelos previamente descritos, el carácter natural del biomaterial utilizado, así como la plena adaptación de las células a esta matriz nos permite afirmar que el biomaterial de fibrina-agarosa podría presentar utilidad en ingeniería tisular. En comparación con otros biomateriales, la fibrina-agarosa es plenamente biocompatible y puede ser obtenida a partir del plasma del propio paciente siendo, por tanto, posible mejorar el resultado obtenido con otros biomateriales. Sin embargo, sus limitadas propiedades biomecánicas podrían ser un obstáculo a su utilización clínica. Futuros estudios realizados *in vivo* en animales de experimentación deberán determinar la utilidad clínica de estos sustitutos de pared vesical basados en biomateriales de fibrina-agarosa.

Por otro lado, la vejiga urinaria humana debe llevar a cabo importantes funciones urodinámicas, siendo fundamental que estas funciones se lleven a cabo de forma coordinada con el complejo sensorial y esfintérico del paciente. Por este motivo, y para que el sustituto vesical no actúe como un mero reservo-

rio, será necesario desarrollar nuevos modelos de pared vesical que incluyan una capa muscular plenamente funcional⁽²⁰⁾.

En resumen, los resultados de este trabajo sugieren que la generación de un modelo de vejiga urinaria humana artificial basado en biomateriales de fibrina-agarosa es una técnica factible y relativamente sencilla. La analogía estructural de este modelo con la mucosa vesical humana nos lleva a concluir que la mucosa vesical generada mediante ingeniería tisular podría ser útil para el tratamiento de patologías que afectan a la integridad de la vejiga. Futuros trabajos *in vivo* deberán confirmar estos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams M. Reconstrucción del tracto urinario en los niños. En: Cambell P, ed. Urología. Buenos Aires: Panamericana; 2004. p. 2731-90.
2. Escudero RM, Patino GE, Fernández ER, Gil MJ, García EL, Alonso AH, et al. Bladder augmentation using the gastrointestinal tract. Indication, follow up and complications. Arch Esp Urol. 2011; 64: 953-9.
3. Schaefer M, Kaiser A, Stehr M, Beyer HJ. Bladder augmentation with small intestinal submucosa leads to unsatisfactory long-term results. J Pediatr Urol. 2013; 9: 878-83.
4. Studer UE, Danuser H, Hochreiter W, Springer JP, Turner WH, Zingg EJ. Summary of 10 years' experience with an ileal low-pressure bladder substitute combined with an afferent tubular isoperistaltic segment. World J Urol. 1996; 14: 29-39.
5. Alaminos M, Del Carmen Sánchez-Quevedo M, Muñoz-Ávila JJ, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006; 47: 3311-7.
6. González-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, Del Mar Pérez M, Alaminos M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52: 215-22.
7. Carriel V, Garzón I, Jiménez JM, Oliveira AC, Arias-Santiago S, Campos A, et al. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. Cells Tissues Organs. 2012; 196: 1-12.
8. Maraños Gálvez C, Liceras Liceras E, Alaminos M, Fernández Valades R, Ruiz Montes AM, Garzon I, et al. Generación de un sustituto de mucosa oral humana y comprobación de su viabilidad mediante ingeniería tisular. Cir Pediatr. 2011; 24: 13-8.
9. San Martín S, Alaminos M, Zorn TM, Sánchez-Quevedo MC, Garzón I, Rodríguez IA, et al. The effects of fibrin and fibrin-agarose on the extracellular matrix profile of bioengineered oral mucosa. J Tissue Eng Regen Med. 2013; 7: 10-9.
10. Simaioforidis V, de Jonge P, Sloff M, Oosterwijk E, Geutjes P, Feitz WF. Ureteral Tissue Engineering: Where Are We and How to Proceed? Tissue Eng Part B Rev. 2013; 19: 413-9.
11. Atala A. Tissue engineering of human bladder. Br Med Bull. 2011; 97: 81-104.
12. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. Lancet. 2006; 367: 1241-6.
13. Stanasel I, Mirzazadeh M, Smith JJ, 3rd. Bladder tissue engineering. Urol Clin North Am. 2010; 37: 593-9.

14. Petrovic V, Stankovic J, Stefanovic V. Tissue engineering of the urinary bladder: current concepts and future perspectives. *Scientific World Journal*. 2011; 11: 1479-88.
15. Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology*. 1998; 51: 221-5.
16. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 1999; 17: 149-55.
17. Matoka DJ, Cheng EY. Tissue engineering in urology. *Can Urol Assoc J*. 2009; 3: 403-8.
18. Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, et al. In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontol Res*. 2009; 44: 588-97.
19. Knuchel R, Hofstadter F, Jenkins WE, Masters JR. Sensitivities of monolayers and spheroids of the human bladder cancer cell line MGH-U1 to the drugs used for intravesical chemotherapy. *Cancer Res*. 1989; 49: 1397-401.
20. Yoo JJ, Olson J, Atala A, Kim B. Regenerative medicine strategies for treating neurogenic bladder. *Int Neurourol J*. 2011; 15: 109-19.