



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

Nuevas terapias con células madre para trasplante de órganos

Autor: M^a Isabel Relano Navarro

D.N.I.: 02738329 - H

Tutor: Rafaela Raposo

Convocatoria: Junio 2016

1. RESUMEN

Actualmente el problema de escasez de órganos para trasplantes es un hecho que no podemos olvidar. En la última década se están produciendo numerosos avances en el ámbito de la terapia celular con células madre (*SC*) y la ingeniería de tejidos, con la esperanza de solventar este problema de falta de órganos que al año causa cuantiosas muertes. En la siguiente revisión se recogen las estrategias celulares más importantes surgidas en este campo, como son: la creación de órganos artificiales a partir de la descelerización y posterior recelularización, el bioprinting y otras como el organ-germ y el proceso de auto-ensamblaje celular. También destaca el mecanismo de regeneración tisular basado en la capacidad de las *SC* para diferenciarse en distintos tipos celulares. Pero sin duda alguna el salto revolucionario se produciría en el año 2006 con las células madre pluripotenciales inducidas (*iPSC*). Estas *iPSC* se mostraron como el futuro de la medicina regenerativa, abriendo una esperanzadora puerta que apunta especialmente a la terapia celular inmuno-compatible, como señalan recientes estudios basados en la técnica de complementación del blastocisto.

PALABRAS CLAVE: trasplante, célula madre, órgano, regenerativa, bioingeniería.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El trasplante se trata en muchas ocasiones de la única opción curativa para numerosos pacientes. Desafortunadamente el tratamiento está sujeto a la disponibilidad de donantes, que sigue siendo muy limitada.¹ España es un referente internacional, al tratarse del país con la tasa de donación de órganos más alta del mundo. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los receptores fallecen mientras esperan recibir un órgano,² razón por la que hoy en día existe una urgente necesidad de buscar alternativas terapéuticas. En los últimos años se han realizado increíbles progresos en el campo de la medicina regenerativa con la ingeniería de tejidos y la terapia celular con células madre.³ Estos avances hacen plantearnos si nos encontramos en lo que podría ser la nueva era de la biotecnología médica para trasplante de órganos.

Ingeniería de tejidos y terapia celular

El término “ingeniería de tejidos” fue introducido en 1985 por Y.C. Fung y popularizado en 1993 por Langer y Vacanti ⁴, y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. Su objetivo es el de conseguir restaurar daños tisulares u órganos completos. En muchas ocasiones, la estrategia más adecuada para reparar los daños tisulares es la de restituir directamente con células madre las células perdidas, procedimiento denominado terapia celular. Uno de los pioneros en este campo fue el Dr. Edward Donnall Thomas, que llevó a cabo primer trasplante alogénico (entre individuos de la misma especie) de médula ósea en el año 1956 ⁵. Actualmente, a los trasplantes de células madre hematopoyéticas se les conoce como *trasplantes de progenitores hematopoyéticos (THP)*.

Células madre (SC)

Una célula madre o también denominada célula troncal, es aquella capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos celulares morfológica y funcionalmente. Las podemos clasificar en función de su capacidad de diferenciación a distintos tejidos, es decir, según su potencialidad: ⁶ las SC totipotenciales son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario (solamente los estadios iniciales del cigoto constituirían SC totipotenciales); las pluripotenciales tienen la capacidad de diferenciarse a tejidos existentes en un organismo adulto, (aquellos que procedan de cualquiera de las tres capas embrionarias) y, por último, las SC multipotenciales, son capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares originarios de la misma capa embrionaria, es decir, tejidos derivados del mesodermo, ectodermo o endodermo. ⁷

Del mismo modo, podemos dividir las SC en función de su origen:

Las *SC embrionarias humanas (hESCs)* se obtienen de la masa interna del blastocisto (embrión de entre 5 y 7 días) y de las gónadas en desarrollo (células germinales obtenidas del embrión de entre 6 y 8 semanas), son células pluripotentes que pueden cultivarse *in vitro* y diferenciarse. Estas líneas celulares suponen una excelente fuente de estudio de la genética humana, biología del desarrollo, así como para terapia celular. ⁸ Sin embargo, su uso presenta limitaciones: la primera es la capacidad tumorogénica que presentan las

SC no diferenciadas, pudiendo dar lugar a teratomas al implantarse en individuos adultos. Otro inconveniente es el hecho de tener que recurrir a embriones alogénicos (al no contar el individuo adulto con *hESCs* propias), pudiéndose originar problemas de histocompatibilidad; además de los problemas éticos derivados del uso de embriones humanos.⁹ Es importante destacar que para que una SC pueda considerarse pluripotencial tiene que demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se ha diferenciado y además, producirse un asentamiento eficaz y duradero de estas células en el tejido diana, tanto en presencia o ausencia de daño en los tejidos en los cuales se injerta.¹⁰

Las *SC adultas* se encuentran en una gran cantidad de tejidos y órganos (córnea, retina, piel...), siendo más conocidas las localizadas en médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical. Actualmente una de las aplicaciones de uso rutinario que presentan es el *trasplante de progenitores hematopoyéticos (THP)* o *trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC)*.

Las *células madre mesenquimales (MSC)* son definidas como un tipo de SC adultas pluripotenciales, con condiciones de cultivo poco exigentes, gran plasticidad y capaces de dar lugar a los diferentes tipos de tejidos conectivos, pudiéndose diferenciar en condrocitos, osteoblastos o adipocitos.¹¹⁻¹² Las MSC pueden aislarse de tejido adiposo, médula ósea, cordón umbilical y placenta. Su gran capacidad de proliferación hace que sean a día de hoy una importante fuente de estudio y desarrollo de terapias celulares para enfermedades autoinmunes y trasplantes autólogos.

Por último se encontrarían las *células madre pluripotenciales inducidas (iPSC)*, células pluripotentes generadas a partir de células adultas mediante un proceso denominado reprogramación, que consiste en la expresión ectópica de cuatro factores de transcripción (Oct 4, Sox 2, Klf 4 y Myc).¹³ Las iPSC tienen las mismas propiedades que las hESCs, por lo que pueden autorenovarse y diferenciarse en todos los tipos celulares del cuerpo (excepto células de tejidos extraembrionarios como la placenta). Desde su descubrimiento por Shinya Yamanaka en el año 2006 han sido objeto de numerosos estudios debido al gran potencial que presentan.

3. OBJETIVOS

Todo esto plantea la posibilidad de emplear estas SC tanto embrionarias como adultas como una alternativa viable a la problemática del trasplante de órganos. ¿Son viables en un futuro próximo los órganos artificiales? ¿Suponen las *iPSC* la solución definitiva a las complicaciones surgidas por la histocompatibilidad? ¿Es realmente factible la extrapolación *in vivo*? En esta revisión bibliográfica se pretenden recoger estos avances en el campo de la terapia celular e ingeniería tisular con células madre aplicadas al trasplante de órganos así como las posibles ventajas e inconvenientes que pueda presentar su uso.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

Para la realización de esta revisión se han consultado numerosos artículos de distintas fuentes bibliográficas: bases de datos como Google Académico, PubMed y Science Direct y revistas científicas como *Nature*, *Nature biotechnology* o *Science*. Para ello se han empleado una serie de palabras clave: “organ transplantation”, “stem cells” y “chymera”, entre otras. Al tratarse de un tema de actualidad, la mayoría de los artículos analizados han sido de reciente publicación. La información se ha podido completar consultando páginas web relevantes como la de la Organización nacional de trasplantes (ONT).

5. RESULTADOS

5.1. Órganos artificiales:

5.1.1. Descelularización y recelularización

Una de las estrategias más revolucionarias de la ingeniería tisular es la construcción de órganos *ex vivo*. El primer gran éxito a largo plazo en este campo sucedió en la década de 1920, cuando el ganador del premio Nobel Alexis Carrel (en colaboración con el ingeniero Charles Lindbergh), creó el primer oxigenador de bomba de perfusión que funcionaría en órganos aislados, como demostraron en 1935 al mantener intacto el tiroides de un gato durante varias semanas. Esta bomba de perfusión sería la base sobre

la que se construirían más adelante los biorreactores que ahora son ampliamente utilizados para conservar órganos *ex vivo*.¹⁴

Para la construcción de un órgano artificial, en primer lugar es necesario un molde estructural parecido al estroma del órgano que se quiere reconstruir. Por norma general, son los grupos de células las que forman y secretan sus propias estructuras de soporte, la denominada matriz extracelular.¹⁵ La matriz debe proporcionar las condiciones y el ambiente adecuado para que pueda ocurrir la regulación celular. Se pueden emplear matrices celulares y acelulares. Estas últimas se preparan mediante la eliminación de todas las células del tejido parenquimatoso y no parenquimatoso del órgano donado en un proceso llamado **descelularización**,¹⁶ que se lleva a cabo mediante la combinación de varios métodos, tanto físicos y químicos como iónicos y enzimáticos.¹⁷ Una vez logrado este primer paso, las células del donante se sustituyen por células madre autólogas del individuo receptor; a este procedimiento se le denomina **recelularización**.¹⁸ Las SC autólogas se obtienen mediante clonación *ex vivo* en cultivos 3D mediante biorreactores.

El método de descclularización-perfusión ha estado ganando peso en la última década. Éste consiste en la utilización del lecho vascular como un medio eficaz para descclularizar el órgano intacto mediante una reducción de la distancia de difusión, facilitando la retirada del material celular. Así, corazones de roedores fueron perfundidos con SDS y Triton X-100 a través de la aorta ascendente y dieron lugar a andamios 3D acelulares capaces de soportar el crecimiento de las células del donante en un biorreactor de flujo.¹⁹

Este enfoque terapéutico de descclularización ha sido utilizado con éxito para la reparación y reconstrucción de varios tejidos complejos como la tráquea²⁰. En 2004, a una mujer de 30 años con una fase terminal de broncomalacia se le implantó una tráquea humana realizada totalmente por métodos de bioingeniería, construida a partir del órgano de un donante fallecido y sembrada con células autólogas derivadas de células madre mesenquimales y células epiteliales.²¹ Recientemente se han utilizado de manera experimental células madre obtenidas del líquido amniótico y el cordón umbilical para el tratamiento de padecimientos estenóticos traqueales congénitos. Walles, et al.²² descclularizaron una matriz conservando su estructura, y la sembraron con células autólogas progenitoras endoteliales (para permitir una revascularización adecuada), con

células de médula ósea, condrocitos y células epiteliales respiratorias. Los autores pudieron demostrar que era posible obtener todos los elementos celulares traqueales funcionales.

Otro ejemplo lo constituye la producción de corazones de forma bioartificial. Las primeras experiencias se realizaron por el equipo de Doris Taylor et al.¹⁹, quienes en el año 2008 consiguieron realizar la descelularización en 40 corazones de rata que fueron perfundidos con el detergente sulfato sódico. Tras esto, la matriz descelularizada fue recelularizada con células madre cardíacas y endoteliales, obteniéndose así estructuras cardíacas completas que tras 8 días podían funcionar como bombas cardíacas. Utilizando la misma técnica desarrollada por estos autores, en el año 2010 se publicó la producción de un pulmón artificial de rata que posteriormente pudo ser trasplantado a otros animales.²³

Además, una fuente importante de órganos humanos donados que no son utilizables para el trasplante, podrían ser "rehabilitados" usando esta descelularización. En EE.UU. aproximadamente el 40% de los órganos de donantes son descartados debido a la mala calidad del parénquima²⁴. En teoría, todos los órganos que sean cosechados dentro de un tiempo razonable después de la muerte (de 4 a 6 horas)²⁵ podrían servir como donantes potenciales para este proceso de descelularización. El empleo de esta técnica permitiría aumentar el número de órganos disponibles para la donación.

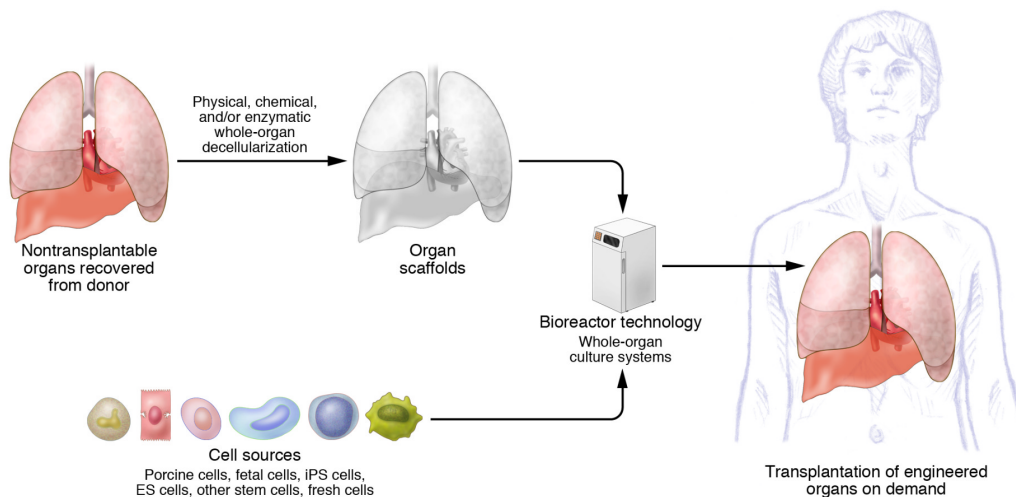


Fig. 1 Representación esquemática de un ejemplo de medicina regenerativa que muestra la descelularización de todo el órgano mediante la biología del desarrollo celular y la ingeniería biomédica.

5.1.2. Bioprinting:

El bioprinting es un prometedor método para crear andamios que no dependan del órgano de un donante para suministrar la matriz extracelular nativa. Implica el uso de un dispositivo de impresión con depósitos celulares y biomateriales para generar armazones en un plano predeterminado. La estructura puede entonces madurarse *in vitro* o *in vivo* ²⁶⁻²⁷. Se ha demostrado en un modelo de ratón que el bioprinting con células madre derivadas de líquido amniótico acelera la cicatrización de heridas. ²⁸ La principal ventaja que otorga el bioprinting, aparte de su composición controlada, es el hecho de que tanto las células y la matriz se pueden superponer de forma simultánea. Los retos que supone su aplicación incluyen la limitada estabilidad mecánica de las construcciones, la restringida resolución espacial de los dispositivos actuales, y la incapacidad para crear estructuras de fibras tridimensionales a través de técnicas de estratificación. ²¹

5.1.3. Auto ensamblaje:

A pesar de la revolución que ha supuesto la obtención de órganos artificiales a partir de andamios, ya sea por medio de descelularización o bioprinting, la creación de células tridimensionales obtenidas sin ningún andamiaje artificial previo es uno de los retos que presenta la terapia tisular. El suprimir su uso podría acabar con los problemas de inmunogenicidad e infecciones derivados. Sin embargo, los sistemas de cultivos celulares convencionales no han sido completamente eficaces a la hora de obtener estos esferoides en 3D de manera rápida y a gran escala sin que se produzca una generación celular citotóxica descontrolada. ²⁹ Recientemente, se han desarrollado métodos para fabricar construcciones celulares 3D a partir de monocapas de células confluentes en placas de cultivo. Así lo demostraron Ando et al. ³⁰ cuando consiguieron reproducir construcciones tisulares para la regeneración de cartílago mediante monocapas confluentes obtenidas de *MSC* cultivadas en placas de cultivo convencionales.

De igual forma, Dube et al. ³¹ desarrollaron un proyecto para conseguir obtener una válvula cardíaca mediante ingeniería de tejidos a partir de monocapas confluentes de fibroblastos de la piel. En este estudio, los fibroblastos humanos se cultivaron en presencia de ascorbato de sodio para producir láminas de tejido. Estas láminas se superpusieron para crear una construcción de mayor densidad que más tarde se cortó y

reconstruyó en un stent (cánula con forma de muelle empleada en cirugía cardíaca). El análisis de los resultados del experimento consiguió demostrar que los fibroblastos fueron embebidos en la matriz extracelular densa producida *in vitro*. A este proceso se le denominó auto-ensamblaje. El próximo paso es el probar esta válvula en un biorreactor y en una fecha posterior, en un modelo animal grande con el fin de evaluar la permeabilidad *in vivo* del injerto. Sin embargo, la desventaja del procedimiento es que requiere un cultivo celular de más de dos semanas, por lo que no se trata de un método eficiente en cuanto a tiempo. Además, un período de cultivo largo aumenta el riesgo de contaminación. A pesar de estos inconvenientes, de esta manera se puede desarrollar órganos artificiales mediante bioingeniería sin partir de ninguna estructura previa, únicamente con el proceso de auto-ensamblaje que sufren las células.

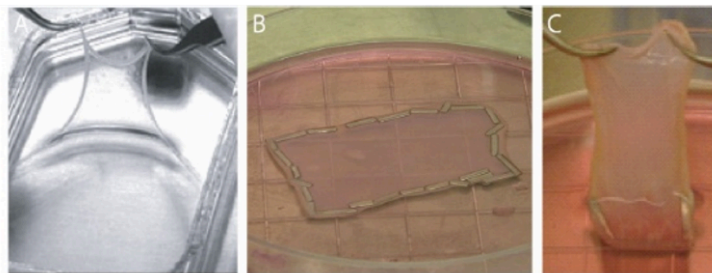


Fig. 2. Fabricación de tejidos humanos mediante el método de auto-ensamblaje. (A) Láminas de fibroblastos son cultivadas (B) y superpuestas para formar una construcción multicapa. (C) Tras un período de maduración de 7 semanas, el tejido obtenido se puede cortar para suturar un stent.

5.1.4. Método del organ-germ:

En los últimos años se ha propuesto un nuevo concepto para la creación de órganos mediante bioingeniería: el método del “organ-germ”. Casi todos los órganos surgen de sus respectivos gérmenes (células primarias no diferenciadas) a través de interacciones recíprocas entre el epitelio y el mesénquima en el embrión en desarrollo. Se prevé que un órgano de bioingeniería funcional puede producirse mediante la reconstitución de este ambiente entre las células epiteliales y mesenquimales *in vitro* empleando gérmenes celulares.³² Así, este proceso se basa en la reproducción de los

procesos de desarrollo durante la organogénesis.³³ Recientes proyectos han empleado este proceso para el desarrollo de diferentes órganos como dientes, pelo y piel como se indica a continuación:

En 2009 se desarrolló un estudio³² para la creación de un germen dental 3D que puede emplearse para la obtención de dientes. En este estudio se describió el reemplazo de dientes en pleno funcionamiento alcanzado a través de un germen de diente en el hueso alveolar de un ratón adulto. De igual forma, se ha podido emplear este método para la obtención de glándulas salivales completamente funcionales³⁴ así como glándula lacrimal³⁵ y folículos pilosos³⁶.

5.2. Reparación tisular:

Las células se clasifican como *MSC* en base a su capacidad de diferenciarse en hueso, grasa y cartílago, y un análisis de citometría de flujo positivo para CD44, CD29, CD73, HLA-ABC, CD90, CD105 y negativo para CD14, CD34, CD45 y HLA-DR según los criterios definidos la Sociedad Internacional de la terapia celular.³⁷ Las propiedades inmunomoduladoras únicas de las *MSC* las convierten en un tipo de células de un valor incalculable para la reparación de daños en los tejidos u órganos de origen inflamatorio o autoinmune. Son muy prometedoras en el tratamiento de la enfermedad del injerto contra huésped (EICH),³⁸ rechazo que se produce por ejemplo tras un xenotrasplante. El Sistema de Salud de Canadá aprobó el uso de células madre mesenquimales alogénicas (Prochymal) para el tratamiento de pacientes con EICH cuando no exista respuesta al tratamiento con corticoesteroides.³⁹

De particular interés es un estudio realizado por N. Perico et al.⁴⁰ donde se mostró que la infusión de *MSC* antes del trasplante autólogo puede proteger el riñón trasplantado de que se produzca una disfunción de injerto. De igual forma, se han postulado diferentes efectos de las *MSC* en la reparación de miocardio como: diferenciación *in situ* de estas células en cardiomiocitos, liberación de factores solubles paracrinos que promueven la proliferación de células residentes de tejido y/o la fusión de las *MSC* con células cardíacas.⁴¹ En el corazón porcino, se ha observado una reducción importante del tamaño del tejido lesionado, neovascularización y reducción de los niveles de apoptosis.⁴²

Otro ejemplo de reparación tisular lo ofrecen las células madre adultas corneales tomadas del limbo. En condiciones fisiológicas, las células madre del limbo corneal son las encargadas de cubrir la necesidad de regeneración de la córnea.⁴³ Sin embargo, en algunas patologías esto deja de ser posible y la capacidad de regeneración disminuye (insuficiencia límbica parcial) o cesa por completo (insuficiencia límbica completa), dependiendo del número de células madre afectadas. El trasplante de córnea se trata de una opción terapéutica muy empleada pero no es eficaz en los casos donde es necesaria una restauración epitelial de la córnea. En 1989 fue descrita por primera vez la técnica de autotrasplante de limbo conjuntival para el tratamiento de una insuficiencia límbica total unilateral. Este proceso se basa en el concepto de que el epitelio límbico posee una población de células madre epiteliales corneales con capacidad de proliferación y diferenciación.⁴⁴ Actualmente el trasplante de limbo corneal es una práctica reconocida, empleándose células del ojo contralateral cuando el daño se localiza únicamente en un ojo, y células de un donante cuando el daño es bilateral. La posibilidad de expandir *ex vivo* estas células puede ayudar a disminuir el riesgo de encontrarnos ante un número demasiado reducido de células sanas. En España al menos 2 grupos de investigación han implantado células madre limbocorneales con éxito en pacientes con insuficiencia limbocorneal completa, consiguiendo una mejoría de la agudeza visual de los pacientes.⁶

5.3. Reprogramación:

En el año 2006 Shinya Yamanaka dio inicio a una revolución en el campo de las células madre: las células madre pluripotenciales inducidas (*iPSC*). Consiguió insertar 4 genes (OCT3/4, SOX2, KLF4 y c- MYC) en un retrovirus modificado, inyectando este a su vez en fibroblastos de ratón. El resultado fue la transferencia genética al ADN del ratón. Tras esto, los genes comenzaron a reprogramar las células cutáneas surgiendo así las células madre pluripotenciales inducidas (*iPSC*).⁴⁵ Estas *iPSC* se parecían altamente a las células embrionarias humanas, (*hESCs*) tanto en morfología, proliferación, expresión génica y patrones de metilación del DNA, pero evitando los problemas éticos del uso de las mismas. Desde entonces, las *iPSC* se han generado con éxito a partir de diferentes tipos de células somáticas con distintas combinaciones de factores de reprogramación y diversos métodos de inducción.⁴⁶

Las *iPSC* son una gran promesa en el campo de la medicina regenerativa, especialmente en la terapia celular inmuno-compatibile, incluyendo su uso en el reemplazo de tejidos y la terapia génica. Sin embargo, existen una serie de desafíos que deben ser solventados: tres de los factores de reprogramación han sido relacionados con la oncogénesis.⁴⁷ De hecho, la reversión de los fibroblastos a colonias de *iPSC* es similar al proceso de transición mesenquimal a epitelial de la transformación maligna que se produce en algunos tejidos, lo que sugiere que la reprogramación y la tumorigénesis pueden implicar un proceso de desdiferenciación similar.

En los últimos años se han producido notables avances en las técnicas de reprogramación, facilitando la generación de *iPSC* libres de virus y/o vectores, lo que suprime el riesgo potencial de formación de tumores inducidos por virus.^{48-49,21} Así en un reciente estudio⁵⁰, se ha logrado demostrar la generación de un sistema tegumentario funcional por medio de la técnica anteriormente explicada del organ-germ. Para la formación del tejido epitelial completo, se partió de tres capas germinales de células *iPS* que fueron cultivadas *in vitro* y que más tarde se trasladaron a un modelo *in vivo*. La optimización de esta técnica contribuiría al desarrollo de sistemas de órganos para trasplante.

Asimismo, la enfermedad hepática es una de la principales causas de muerte en el mundo y la única opción terapéutica empleada hasta el momento para la enfermedad hepática en fase terminal era el trasplante hepático ortotópico. El trasplante de hepatocitos se ha propuesto y utilizado como una alternativa eficaz al trasplante de órgano entero para prolongar la vida de estos pacientes en algunos casos clínicos.⁵¹ Por tanto, la generación de hepatocitos a partir de *iPSC* es un objetivo particularmente atractivo. La introducción de hepatocitos exógenos en el parénquima hepático es una tarea simple ya que el hígado es altamente susceptible a la terapia tisular. Aunque se pueden obtener hepatocitos primarios por purificación a partir de órganos de donantes, son necesarios de 1 a 5 x10⁹ células para un trasplante, por lo que este gran número lleva a la necesidad de ampliar los hepatocitos primarios en cultivo. El problema de ello, es que tienen tendencia a perder función hepática rápidamente tras realizar el cultivo *in vitro*. Esto se pudo evitar mediante el uso de las *iPSC* para obtener hepatocitos que posteriormente fueron injertados en el parénquima del hígado de mamíferos.⁵²

5.4. Complementación del blastocisto: El paso de *in vitro* a *in vivo*.

El objetivo último de la medicina regenerativa es el lograr generar órganos *in vitro* derivados de células pluripotenciales de un paciente. Sin embargo, las interacciones entre las células y los tejidos durante el desarrollo y la organogénesis son tan complejos que el tratar de imitar estas interacciones para generar órganos *in vitro* es una tarea complicada. Hoy en día se ha logrado este objetivo *in vivo* mediante el empleo de la biología de complementación de blastocisto.⁵³

Esta técnica fue reportada por primera vez en el año 1993 por Chen et al.⁵⁴ quienes demostraron que la deficiencia en los linajes linfocitarios en ratones Rag2 deficientes se pudo complementar con la inyección de células madre embrionarias de ratones normales (no deficientes para Rag2) en blastocistos de ratón. La complementación del blastocisto es una técnica basada en el empleo de células madre pluripotenciales tanto embrionarias (Thomson et al. 1998) como las obtenidas por reprogramación, que son inoculadas en el blastocisto de otro mamífero, obteniéndose una quimera de dos especies. Además de la mezcla celular que se produce, se elimina del blastocisto huésped un determinado tipo celular que va a dar lugar al órgano que estamos interesados en trasplantar (ej. Gen Pdx para el páncreas). La edición del genoma del cigoto se lleva a cabo con una nucleasa programable. El animal durante el desarrollo embrionario proporciona las señales necesarias para la especialización, eliminándose de esta forma el problema que existía *in vitro*.⁵⁵

La generación de animales quiméricos también podría facilitar además, la producción de tejido endodérmico. En un estudio reciente⁵⁶, se inyectaron *iPSC* en blastocistos de ratones incapaces de formar un páncreas normal (mutantes Pdx1) dando como resultado ratones quiméricos con páncreas compuestos enteramente de las *iPSC* introducidas. Aunque no está claro si estas interespecies quiméricas serían éticas o factibles con *iPSC* humanas y si las células resultantes serían seguras para su aplicación, (dada la posibilidad de reactivación de virus derivados del huésped), el uso de tales ensayos para generar derivados diferenciados y funcionales de células *iPS* pueden abrir un nuevo enfoque para el modelado de la enfermedad *in vivo*.

Actualmente, el equipo de Juan Carlos Izpisua ⁵⁷ está llevando a cabo una investigación con el fin de desarrollar estos órganos en otra especie, que sea capaz de reproducir los órganos y tejidos humanos con un tamaño similar o parecido. Para ello emplean el cerdo como especie de elección. De esta forma, partiendo de un blastocisto de cerdo, se introducen en él las células humanas pluripotentes para, a continuación, implantarlo en el útero de la cerda. La idea es la obtención de lechones que tengan en su organismo células humanas que puedan ser empleadas para trasplante. Las células pluripotentes humanas se incorporan en el desarrollo embrionario del cerdo, diferenciándose correctamente. Al llegar a la cuarta semana de gestación se observa su integración total y adecuada. Aunque este experimento se encuentra en una fase temprana de investigación, este planteamiento podría suponer una alternativa muy eficiente para el problema del trasplante de órganos.

6. DISCUSIÓN

La terapia celular representa un esperanzador futuro en el campo de la medicina regenerativa y en el trasplante de órganos. A través del desarrollo de numerosos procesos, hemos conseguido generar una alternativa viable a la gran problemática actual de la escasez de órganos para trasplante.

La obtención de órganos artificiales a partir de bioingeniería es, sin duda, un éxito rotundo a día de hoy. Estos órganos habitualmente se consiguen mediante el empleo de un molde estructural denominado matriz extracelular. El proceso de descelularización y posterior recelularización de tejidos supone un increíble logro en este campo ya que permite la obtención de matrices acelulares. El primer paso, la descelularización, ha sido perfeccionada mediante varios estudios ¹⁹⁻²³, hasta lograr la estrategia de descelularización por perfusión, que permite optimizar la técnica obteniendo una descelularización eficaz y manteniendo el órgano intacto. La posterior recelularización exitosa con células madre autólogas da lugar a numerosos tejidos complejos como tráquea ^{20,22}, corazón¹⁹, o pulmón²³. Además, este proceso facilita la “rehabilitación” de órganos humanos donados que no son utilizables para trasplante. Por ello, el emplear un mayor número de recursos y estudios en pulir esta técnica es crucial para llegar a la meta final buscada, solventar la falta de órganos trasplantables.

Otras alternativas a la descelularización que van a dar lugar a esos órganos artificiales, son los procesos de bioprinting y el método del organ-germ. El primero tiene como ventaja que produce andamios independientes de órganos, esto es, evitamos depender del órgano de un donante para suministrar la matriz nativa. Sin embargo, la limitada estabilidad mecánica de las construcciones y la incapacidad para crear estructuras tridimensionales mediante estratificación¹⁹ son sus dos grandes retos pendientes, por lo que es necesario profundizar en ellos. El segundo, el método del organ-germ, se muestra revolucionario en el desarrollo de órganos como dientes, pelo y piel. No obstante, también presenta problemas críticos como son el hecho de si por ejemplo, en el caso de los dientes, éstos son capaces de simular funciones como la masticación y el potencial de respuesta a la tensión mecánica.

El auto-ensamblaje representa la última de las técnicas recogidas en esta revisión para el desarrollo de órganos bioartificiales. Este descubrimiento supone la superación de uno de los desafíos de la obtención de órganos bioartificiales: la creación de estructuras celulares tridimensionales sin ningún andamiaje artificial previo. El suprimir su uso puede acabar con problemas de inmunogenicidad e infecciones que pudieran surgir. El principal inconveniente hasta la fecha lo suponía la incapacidad de crear un método eficaz de obtener estas estructuras 3D sin que se produjera una generación citotóxica celular, algo que en recientes estudios³⁰⁻³¹ se ha conseguido solventar basándose en el proceso de auto-ensamblaje celular, con el cual se han logrado crear construcciones a partir de monocapas de células. Sin embargo, este procedimiento no es eficiente en cuanto a tiempo, ya que precisa de cultivos celulares con una duración mínima de dos semanas. Además su viabilidad aún debe ser probada en biorreactores para su posterior prueba *in vivo* por lo que aún queda mucho que investigar en este campo.

En cuanto a la reparación tisular, la capacidad de diferenciación de las células madre abre un abanico de posibilidades para la regeneración de daños en diferentes tejidos. Así, se ha demostrado que su empleo es altamente ventajoso en el tratamiento de la enfermedad del injerto contra huésped (EICH). También son útiles en la reparación del miocardio o en el trasplante de córnea. Una de las grandes facilidades que presenta su uso, es la posibilidad de expandir *ex vivo* las células sanas para aumentar su número.

Actualmente en nuestro país existen diversos grupos de investigación que emplean células madre para la regeneración tisular obteniendo asombrosos resultados ⁶.

Por otro lado, se encuentra el amplio campo de las *iPSC*. La base del uso de estas células radica en la reprogramación celular, proceso revolucionario desde su descubrimiento en el año 2006. Desde entonces, la obtención de *iPSC* se ha ido mejorando hasta el día de hoy, pudiéndose generar con éxito a partir de distintos tipos de células somáticas con diferentes factores de reprogramación. Los notables avances en estas técnicas de reprogramación han facilitado la generación de *iPSC* libres de virus, lo cual permite eliminar el principal riesgo derivado de su utilización: la formación de tumores inducidos por virus. Estas células son el futuro de la medicina regenerativa, empleándose para diversas patologías funcionales como la enfermedad hepática.

Sin embargo, el objetivo último de la medicina regenerativa es el generar órganos *in vitro*. Esta es una tarea complicada, ya que las interacciones celulares y la organogénesis son altamente complejos de imitar *in vitro*. El equipo de Juan Carlos Izpisua Belmonte ^{55,57} está logrando este objetivo *in vivo* mediante la técnica de complementación del blastocisto. Ésta permite la obtención de órganos humanos en animales quiméricos, evitando de este modo los problemas éticos que pudieran surgir de la utilización de células embrionarias humanas, así como el posible rechazo por parte del receptor (ya que se emplean *iPSC* autólogas). Sin embargo, es importante señalar que existen dificultades pendientes de solventar, tanto éticas como científicas, antes de que la obtención de estos órganos humanos funcionales, se convierta en una realidad. Por ejemplo, aún se desconoce con exactitud qué consecuencias cerebrales tendrá sobre el animal huésped la introducción de esas *iPSC* humanas. La información es a día de hoy muy limitada debido a que este experimento se encuentra en una fase temprana de desarrollo y no existen antecedentes al respecto. Por ello, de cara al futuro es imprescindible seguir realizando investigaciones ya que esta alternativa supone una atractiva solución para superar el problema de escasez de órganos.

7. CONCLUSIONES

La obtención de órganos de manera artificial es un éxito rotundo logrado en el campo de la ingeniería de órganos. Existen numerosos métodos, algunos de ellos empleados de forma habitual en la actualidad, además de otros muchos que están ganando peso en los últimos años y suponen un gran avance en la construcción de órganos bioartificiales.

A pesar de los avances realizados, es importante destacar que aún queda mucha investigación por delante. El futuro de las *iPSC* como terapia inmuno-compatible y el uso de quimeras para cultivo *in vivo* de órganos es una realidad lejana que tiene muchas contrapartidas que solventar, siendo necesarios un mayor número de estudios y ensayos clínicos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Welman T, Michel S, Segaren N, Shanmugarajah K. Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges. *Bioengineered*. 2015; 6(5): 257-61.
2. Organización nacional de trasplantes. Información al ciudadano. Trasplantes. Disponible en: <http://www.ont.es/informacion/Paginas/Trasplante.aspx>
3. Orlando G, Baptista P, Birhall M, De Coppi P, Farney A, Guimaraes-Souza NK et al. Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: current status and future challenges. *Transpl Int*. 2011 Mar; 24 (3): 223-32.
4. Langer R, Vacanti JP. *Tissue Eng. Science*. 1993; 260 (5110):920–926.
5. Ruiz-Arguelles GJ, Gómez-Almaguer D. El trasplante de médula ósea, el premio Nobel y la muerte del Dr. Edward Donnall Thomas. *Rev Hematol Mex*. 2013; 14: 1-2.
6. Prósper F, Gavira J.J, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J. et al. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. *An Sist Sanit Navar*. 2006; 29 Supl. 2: 219-234.
7. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001; 17: 387-403.
8. Aran B, Sole M, Rodriguez-Pizà I, Parriego M, Muñón Y, Boada M et al. Vitrified blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as a source for human Embryonic Stem Cell (hESC) derivation. *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29: 1013-1020.
9. Barquinero J, Pellcer M, Pétriz J. Aplicaciones terapéuticas de las células madre. *Med Clin*. 2005; 124 (13): 504-11.

10. Prósper F, Verfaillie CM. Células madre adultas. *An Sist Sanit Navar*. 2003; 26 (3): 345-356.
11. Can A. Searching for in vivo traces of mesenchymal stem cells and their ancestors. En: Turksen K, editor. *volumenAdult and Embryonic Stem Cells*. Ankara: Springer; 2012. p.11-24
12. Stojko R, Bojdys-Szyndlar M, Drosdzol-Cop A, Madej A, Wilk K. Comparison of signaling pathways gene expression in CD34⁺ umbilical cord blood and bone marrow stem cells. *Stem Cells Int*. 2016; (2016):5395261. [Epub ahead of print].
13. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*. 2008 Jan 10; 451(7175): 141-6.
14. Lopez MJ, Jarazo J. State of the art: stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Vet J*. 2015 Mar; 47 (2): 145-54.
15. Instituto Nacional de Bioingeniería e Imágenes Biomédicas. *Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa*. NIH...Transformación de descubrimientos en salud; 2013.
16. Fabres C. Técnicas del futuro: Ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva. *Rev. Med. Clin. Condes*. 2010; 21(3) 488 – 493.
17. Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, Macchiarini P. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*. 2012; 379 (9819):943-952.
18. Valdespino-Gómez VM, Valdespino-Castillo PM, Valdespino-Castillo VE. Estrategias para la regeneración de tejidos: células, inductores bioquímicos, bionanomateriales y bioconstrucciones. *Alcances clínicoquirúrgicos*. *Cir Cir*. 2014; 82 (5): 578-589.
19. Ott HC, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14(2):213–221.
20. Baiguera S, Del Gaudio C, Jaus MO, Polizzi L, Gonfiotti A, Comin CE et al. Long-term changes to in vitro preserved bioengineered human trachea and their implications for decellularized tissues. *Biomaterials*. 2012;33(14):3662–3672.
21. Madariaga ML, Ott HC. Bioengineering kidneys for transplantation. *Semin Nephrol*. 2014 Jul; 34 (4): 384-93.
22. Walles T, Giere B, Hofmann M, Schanz J, Hofmann F, Mertsching H et al. Experimental generation of a tissue-engineered functional and vascularized trachea. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Dec;128(6):900-6.
23. Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, et al. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med*. 2010 Aug; 16(8):927-33.
24. Klein AS, Messersmith EE, Ratner LE, Kochik R, Baliga PK, Ojo AO. Organ donation and utilization in the United States, 1999–2008. *Am J Transplant*. 2010;10(4 pt 2):973–986.
25. Tomita Y, Nihira M, Ohno Y, Sato S. Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. *Leg Med (Tokyo)*. 2004;6(1):25–31.
26. Xu T, Zhao W, Zhu JM, Albanna MZ, Yoo JJ, Atala A. Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*. 2013 Jan; 34 (1): 130-9.
27. Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2003 Apr; 21 (4): 157-61.

28. Skardal A, Mack D, Kapetanovic E, Atala A, Jackson JD, Yoo J, et al. Bioprinted Amniotic fluid-derived stem cells accelerate healing of large skin wounds. *Stem Cells Transl Med.* 2012 Nov; 1 (11): 792-802.
29. Iwai R, Nemoto Y, Nakayama Y. Preparation and characterization of directed, one-day-self-assembled millimeter-size spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A.* 2016 Jan; 104 (1): 305-12.
30. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2007;(28):5462–5470.
31. Dubé J, Bourget JM, Gauvin R, Lafrance H, Roberge CJ, Auger FA, Germain L. Progress in developing a living human tissue-engineered tri-leaflet heart valve assembled from tissue produced by the self-assembly approach. *Acta Biomater.* 2014;(10): 3563–3570.
32. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T. et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Sci USA.* 2009 Aug 11; 106 (32): 12475-80.
33. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M. et al. The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods* 2007 Mar; 4 (3): 227-30.
34. Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K. et al. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun.* 2013; 4:2498.
35. Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K. et al. Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun* 2013; 4: 2497.
36. Toyoshima K, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Hasegawa T. et al. Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. *Nat Commun* 2012 Apr 17; 3:784.
37. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8: 315.
38. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 2016 Jan 21; 7: e2062. [Epub ahead of print].
39. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:534-541.
40. Perico N, Casiraghi F, Gotti E, Inrona M, Todeschini M, Cavinato RA et al. Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation. *Transpl Int* 2013; 26: 867–878.
41. Arévalo JA, Páez DM, Rodríguez VM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova.* 2007; 5 (8): 177-184.
42. Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4:S21-S26.
43. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I. Tratamiento de la insuficiencia limbal grave mediante cirugía combinada de trasplante de limbo y trasplante de membrana amniótica. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2005 Jul; 80 (7): 405-412.

44. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Canccheda R, De Luca M. Long- term restoration of damaged corneal surface with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 2007; 349(9057):990-3.
45. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 Mar; 17(3): 183-93.
46. Hong X, Le Bras A, Margariti A, Xu Q. Reprogramming towards endothelial cells for vascular regeneration. *Genes & diseases.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2016.02.003>
47. Grabel L. Prospects for pluripotent stem cell therapies: into the clinic and back to the bench. *J Cell Biochem,* 2012; (113): 381–387.
48. Yu J, Hu K, Smuga-otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin I.I. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 2009 May 8; 324 (5928): 797-801.
49. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induces pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008 Nov 7; 322 (5903): 949-53.
50. Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, Toyoshima K, Ishida K, Ogawa M. et al. Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an in vivo transplantation model. *Sci Adv.* 2016 Apr; 2 (4): e1500887. [Epub ahead of print].
51. Hansel MC, Davila JC, Vosough M, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K. et al. The use of induced pluripotent stem cells for the study and treatment of liver diseases. *Curr Protoc Toxicol.* 2016 Feb 1; 67: 14.13.1-14.13.27.
52. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C. et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology.* 2010 Jan; 51(1): 297-305.
53. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell.* 2010 Sep 3; 142(5): 787-99.
54. Chen J, Lansford R, Stewart V, Young F, Alt FW. RAG-2 deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 May 15; 90(10): 4528-32.
55. Wu J, Izpisua JC. Interspecies chimeric complementation for the generation of functional human tissues and organs in large animal hosts. *Transgenic Res.* 2016 Jan 28. [Epub ahead of print].
56. Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 2011 May; 13 (5): 497-505.
57. Izpisua JC. Presente y futuro de la medicina regenerativa. [mesa redonda] Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia (RANF); 2015.