



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**TÍTULO: LA BIOINGENIERÍA TISULAR**  
**HEPÁTICA:**  
**¿UNA ALTERNATIVA REAL AL**  
**TRASPLANTE HEPÁTICO?**

Autor: Aránzazu Jiménez Martín

Fecha: Junio 2019

Tutor: Aránzazu Sánchez Muñoz

## RESUMEN

El trasplante hepático es la única alternativa terapéutica válida actualmente para múltiples patologías hepáticas. Eso hace que exista una gran necesidad de órganos aptos para trasplante y largas listas de espera.

En ocasiones estas patologías hepáticas están desencadenadas incluso por toxicidades farmacológicas que no se detectaron en los ensayos toxicológicos. Estas toxicidades impredecibles a veces se deben a la falta de correspondencia entre los modelos animales en los que se realizan los ensayos y la especie humana.

La bioingeniería tisular hepática trata de dar solución a estos dos problemas gracias a sus dos campos de investigación más desarrollados y prometedores: la generación de órganos bioartificiales completos y la generación de organoides. Estas dos técnicas permiten realizar los ensayos farmacológicos con modelos que asemejan mejor las condiciones fisiológicas humanas y podrían utilizarse como sustitutos de los órganos de trasplante en un futuro.

## INTRODUCCIÓN

### I. El hígado y su función en el metabolismo de fármacos y xenobióticos

La complejidad del hígado se refleja desde un primer momento en la gran diversidad de tipos celulares presentes en él. En un hígado adulto hay aproximadamente 300 billones de células. La mayoría de estas células se encuentran en el compartimento parenquimático, como los hepatocitos, que suponen dos tercios del total de células y ocupan un 70-85% del volumen hepático. También hay células no parenquimáticas, como los colangiocitos, que contribuyen a la integridad de los conductos biliares que drenan la bilis desde el hígado hasta el duodeno; y las células endoteliales que forman el revestimiento interno de los vasos y sinusoides y constituyen la barrera entre la sangre y el parénquima. En menor medida se encuentran las células de Kupffer y células estrelladas que intervienen en la inmunidad y respuesta frente al daño hepático [1]. Algo que distingue al hígado del resto de órganos es que posee una capacidad única e innata de regeneración [2].

El hígado es un órgano esencial y que desempeña importantes funciones fisiológicas. Como funciones principales se encuentran la producción de bilis, el metabolismo de los hidratos de carbono, los lípidos y las proteínas; la homeostasis de la glucosa mediante su almacenamiento como glucógeno y la detoxificación de la sangre frente a sustancias como el alcohol, el amonio, la bilirrubina, diversas toxinas y moléculas exógenas [2].

Dentro de estas moléculas exógenas que el hígado detoxifica se encuentran los fármacos. El hígado juega un papel clave en el metabolismo de los fármacos, y por lo tanto en su actividad y en su eliminación. La actividad y la eliminación de un fármaco son características determinantes de su toxicidad, y es imprescindible estudiarlas a fondo en los estudios previos a la comercialización de un fármaco [2, 3].

La metabolización de los fármacos se lleva a cabo principalmente en el hígado. Aunque la mayoría se desactivan tras su metabolización, algunos de los metabolitos originados presentan actividad farmacológica, y esta actividad farmacológica puede ser incluso mayor que la de la molécula de fármaco original. El metabolismo hepático también es clave en la activación de los profármacos.

En el hígado se producen principalmente reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, que son las denominadas reacciones de fase I; e hidratación, conjugación, condensación o isomerización que son las denominadas reacciones de fase II. El sistema enzimático hepático de fase I más importante es el citocromo P-450, que es una superfamilia de isoenzimas microsomales implicadas en la oxidación de muchos fármacos.

Es esencial tener todas las características metabólicas en cuenta a la hora de realizar los ensayos previos a la comercialización de un nuevo fármaco. También hay que tener presente que la metabolización del mismo fármaco por distintos individuos puede diferir debido a situaciones fisiológicas o fisiopatológicas previas o concomitantes como trastornos y/o tratamientos instaurados [2].

## **II. La importancia del metabolismo hepático en los ensayos farmacológicos**

Hay daños hepáticos que son debidos a toxicidades desencadenadas por fármacos. Se trata de toxicidades que se han podido predecir o no en los ensayos clínicos de la comercialización de un fármaco. La no detección de una toxicidad a dosis terapéuticas puede venir dada por la falta de correspondencia del organismo humano con los modelos animales en los que se ensaya; las técnicas del ensayo o la muestra empleada. La toxicidad puede no aparecer a estos niveles de estudio, pero sí manifestarse tras la comercialización, cuando el fármaco está disponible para una población mucho mayor y más diversa.

Una de las mayores limitaciones en los ensayos farmacológicos es la dificultad en la extrapolación de los resultados obtenidos y su aplicación a la clínica, ya que las pruebas son llevadas a cabo en cultivos celulares in vitro o en modelos animales in vivo que no se corresponden con las condiciones fisiológicas reales a las que va a ser destinado el fármaco [4]. Durante la fase preclínica del desarrollo de un fármaco solo se es capaz de identificar un 50% de los daños hepáticos que puede inducir ese fármaco, debido a las diferencias interespecíficas en las vías metabólicas, las diferencias genéticas y la diferencia en los daños provocados [5].

Al inicio del desarrollo de un nuevo fármaco, cuando muchos compuestos deben ser probados, las plataformas de cultivo son muy útiles porque son relativamente baratas y proporcionan muchos resultados rápidos, en 24-48 horas permiten realizar múltiples análisis. En ellas también se pueden estudiar múltiples señales del microambiente hepático y su influencia en el desarrollo celular en un tiempo relativamente muy rápido [5].

Prácticamente miles de fármacos comercializados pueden causar necrosis celular, hepatitis, colestasis, fibrosis o una mezcla de estos daños. Además, estos daños pueden ser acentuados por estados de estrés (inflamación), pacientes con factores de riesgo (genética, edad, sexo, dieta, etc.) y trastornos subyacentes (hepatitis, colestasis y fibrosis) [5].

## **III. Enfermedades hepáticas. El trasplante como única opción terapéutica en la enfermedad hepática**

Algo que distingue al hígado del resto de órganos es que posee una capacidad única e innata de regeneración. Sin embargo, cuando el daño causado supera a la capacidad de regeneración, la única alternativa terapéutica válida actualmente sigue siendo el trasplante [2].

El trasplante ortotópico de hígado es de elección frente a cualquier enfermedad hepática no curable con otros tratamientos y que ponga en riesgo la vida del paciente o induzca un importante deterioro de su calidad de vida. Este procedimiento es necesario en patologías como la cirrosis, en la que el tejido cicatricial impide el normal funcionamiento del hígado y se instaura una insuficiencia hepática. Las causas más comunes de la cirrosis son la hepatitis B o C, alcoholismo crónico y esteatohepatitis no alcohólica; aunque también puede desencadenarse por causas inmunitarias, trombosis, intoxicación medicamentosa o envenenamiento, colangitis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y trastornos metabólicos del cobre o del hierro [6]. Los pacientes de hepatocarcinoma y aquellos en situación de hepatitis fulminante sin contraindicaciones también son candidatos para el trasplante hepático como opción terapéutica. En general, la supervivencia al año del trasplante hepático ronda el 90%, y a los 5 años se mantiene en el 70% de los trasplantados [2].

A pesar de los avances en las técnicas de inmunosupresión y las técnicas quirúrgicas, la demanda de órganos para trasplante es muy superior a la oferta disponible ya que además, el trasplante hepático es la opción terapéutica cada vez más indicada para muchas patologías. Así, el gran obstáculo para los trasplantes sigue siendo la baja disponibilidad de órganos viables [4]. Las técnicas puestas en marcha para intentar paliar el déficit de órganos para trasplante no son eficaces. Entre ellas se encuentra la donación a niños por parte de donantes vivos, que suelen ser los progenitores. Se utilizan para ello resecciones parciales de los hígados de los donantes vivos, normalmente los segmentos II y III. Para adultos es necesario una resección de la mitad del hígado, normalmente el segmento derecho, que permita regenerar el resto de la masa hepática tanto al donante como al receptor. Uno de los mayores riesgos de esta técnica es que para minimizar el riesgo para los donantes vivos, los cirujanos intentan obtener el menor volumen de hígado necesario, lo que puede conducir a injertos potencialmente pequeños que no puedan satisfacer las demandas funcionales y los receptores pueden desarrollar el llamado síndrome de “small-for-size” (SFSS) [4].

Otras de las técnicas que intentan combatir la falta de órganos son la división de órganos para trasplante, el uso de órganos de los llamados donantes marginales (mayores de 50 años, con diabetes, hipertensión y/o enfermedades infecciosas), y en algunos países el uso de órganos de donantes tras la muerte cardiaca, sin latido cardiaco [4]. También ha habido cambios en las técnicas de conservación de los órganos para donación, pasando de un almacenamiento estático en frío a la experimentación con máquinas de perfusión en hipotermia (4-10°C) y normotermia (37°C) que beneficia sobre todo la donación de órganos tras la muerte circulatoria [1].

La incidencia y prevalencia de la enfermedad hepática crónica manifestada con la presencia de cirrosis o fibrosis y el estadio hepático terminal está alcanzando proporciones epidémicas en todo el mundo, con 50 millones de personas afectadas [6]. En países desarrollados como Estados Unidos, Reino Unido, España y Francia se ha puesto a la cabeza como una de las principales causas de muerte. En los Estados Unidos, más de 5 millones de americanos viven con enfermedad crónica hepática y se prevé que en 2020 la cirrosis sea la duodécima causa de muerte [6]. El Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos afirma que la escasez de donantes elegibles da como resultado 18 muertes al día y unas 2000 muertes al año [2, 6]. Según los datos oficiales del Instituto Nacional de Estadística, durante el año 2018 en España el número de hígados donados ha caído un 6,8% respecto al año anterior [7].

#### **IV. Otras alternativas: la bioingeniería tisular hepática**

La ingeniería de tejidos evolucionó del campo de desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas para crear tejidos funcionales. En la bioingeniería tisular o ingeniería de órganos se emplean conocimientos de diversas ramas. Están implicadas principalmente la biología celular, la ingeniería de materiales y la bioingeniería.

Su principal objetivo es desarrollar sustitutos biológicos que puedan ser usados para restaurar y/o mantener la función normal de los órganos o tejidos dañados a los que reemplazan [2]. En esta disciplina, los elementos necesarios para generar estos sustitutos bioactivos se manejan in vitro, para que después puedan ser implantados en el organismo vivo. En estas condiciones in vivo deben conseguir su integración estructural y funcional completa. Como elementos de trabajo se emplean principalmente células, de diversa índole y sometidas o no a distintas técnicas de laboratorio; moléculas bioactivas y matrices biocompatibles que puedan generar mediante su correcta combinación una estructura tridimensional que imita la función del órgano a reemplazar.

Actualmente, uno de los campos de estudio más importante para la bioingeniería tisular es la bioingeniería tisular hepática, tanto por su relevancia clínica y epidemiológica como por los últimos avances logrados.

Los órganos y organoides obtenidos por bioingeniería permitirían examinar los efectos de los nuevos fármacos, su toxicidad y mecanismos celulares de una manera más fiel a la realidad. Es importante para la clínica conseguir cultivos celulares humanizados u órganos bioartificiales que reproduzcan fielmente las condiciones fisiológicas humanas y permitan una detección más cercana a la realidad de las toxicidades [4].

El sueño de la bioingeniería tisular hepática es lograr acabar con las interminables listas de espera para trasplantes, y conseguirlo con órganos obtenidos por bioingeniería y a la carta, idóneos en su tamaño, genética e inmunidad, que permitan incluso evitar la inmunosupresión de por vida a la que están condenados los receptores de trasplantes [2]. Con las terapias celulares pretenden evitar el avance de un daño a un fallo hepático que requiera trasplante. Actualmente aún es un objetivo lejano, pero los ensayos de fármacos con cultivos celulares y órganos obtenidos por bioingeniería están mucho más cerca y supondrán un gran avance clínico en esta dirección [2].

## **OBJETIVOS**

Este trabajo de fin de grado tiene como objetivo principal realizar una revisión bibliográfica y recopilación de información sobre el estado actual, últimos avances y tendencias de la bioingeniería tisular hepática, así como de sus aplicaciones clínicas y experimentales.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

La redacción de este trabajo se ha apoyado en revisiones bibliográficas, artículos y publicaciones científicas reconocidas sobre la bioingeniería tisular hepática. Se realizó una búsqueda en bases de datos como ScienceDirect y PubMed de las palabras clave “liver”, “tissue-engineered liver grafts”, “organoids”, “organ replacement”, “transplant”, “liver regeneration”, “organogenesis”, “artificial organs”, “bioengineered”, “drug testing” y “liver-on-a-chip”. Se seleccionaron aquellas fuentes que datasen del año 2016 en adelante con el fin de presentar la información más actualizada.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el frente de investigación actual de la bioingeniería tisular hepática hay 5 técnicas que merecen mención por sus aplicaciones clínicas y experimentales y su estado de desarrollo. Se trata del dispositivo bioartificial hepático (BAL), las terapias celulares, la generación de órganos completos bioartificiales, los organoides y el hígado en un chip (“liver-on-a-chip”). Dentro de estas, las técnicas más destacadas, por su desarrollo más avanzado y por ser las más prometedoras en la fecha actual son la generación de órganos completos bioartificiales y los organoides.

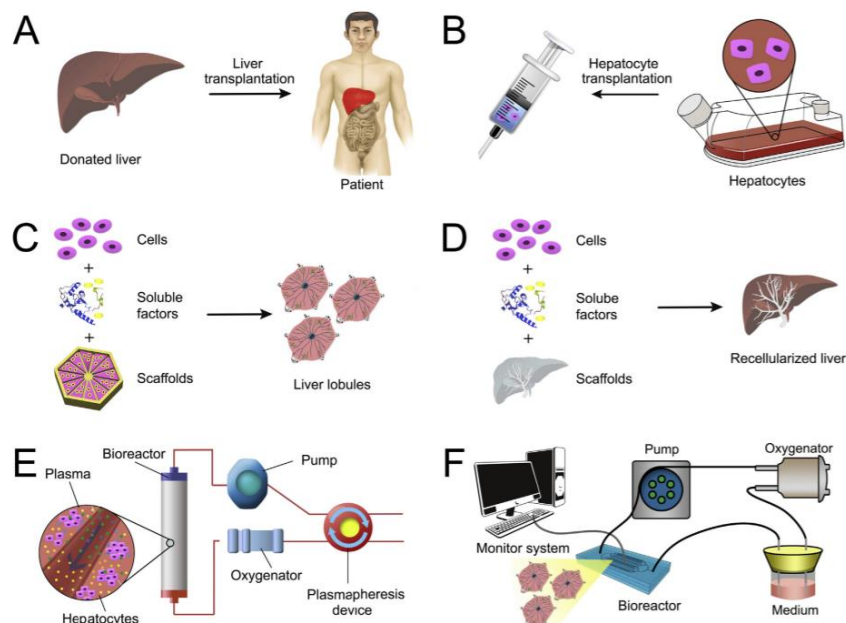


Figura 1. Esquema de las principales técnicas de bioingeniería tisular hepática. (A) Trasplante hepático. (B) Terapia celular. (C) Regeneración de organoides o microtejidos. (D) Generación de órganos bioartificiales completos. (E) BAL. (F) Liver-on-a-chip. Obtenido de “A decade of progress in liver regenerative medicine. Biomaterials. Jingwei Zhang, Xin Zhao, Liguang Liang A., Jun Li, Utkan Demirci”, 2018 [11].

### Dispositivo bioartificial hepático (BAL)

El BAL es un dispositivo hepático bioartificial y externo que se ha desarrollado como apoyo temporal para los pacientes con daño hepático durante la espera hasta el trasplante. [8].

Los sistemas BAL son extracorpóreos, tienen un componente artificial (biorreactor) y un componente biológico (los hepatocitos) [8]. Realizan una diálisis de la albúmina y detoxificación del plasma [1]. Cubren la brecha entre el fallo hepático y el trasplante, aunque solo durante un corto periodo de tiempo.

En estudios preclínicos y clínicos con animales se ha visto una prolongación de la tasa de supervivencia, pero no hay evidencias claras de los beneficios y supervivencia de los pacientes humanos. La falta de estudios exhaustivos y la dificultad para obtener y conservar las células adecuadas junto a la limitada funcionalidad de los hepatocitos ha hecho que sus aplicaciones clínicas se hayan visto limitadas y la bioingeniería tisular hepática se ha desviado hacia otros campos de actuación, dejando este sistema apartado de la investigación actual [8].

### Terapias celulares

Se ha investigado el trasplante de hepatocitos o células madre para intentar restaurar la actividad hepática dañada.

Se prefieren los hepatocitos primarios ya que pueden llevar a cabo la mayoría de las funciones del hígado, pero el problema radica en la dificultad para obtener un número suficiente de hepatocitos y de un donante sano. En distintos estudios se ha visto una mejoría clínica cuando un 10% de la masa hepática es implantada, tanto en modelos murinos como humanos. A pesar de ser solo un 10%, suponen billones de células y además son difíciles de mantener y expandir *in vitro* ya que necesitan contacto célula-célula y célula-matriz para sobrevivir y mantener su fenotipo. Los hepatocitos en cultivos convencionales *in vitro* tienden a desdiferenciarse rápidamente y perder su funcionalidad [1]. También hay que considerar la posibilidad de rechazo inmunitario hacia los hepatocitos alogénicos del donante sano [9].

El uso de células madre adultas y pluripotentes son alternativas potenciales. Las células pluripotentes inducidas (iPSC) tienen la capacidad de diferenciarse a células similares a

hepatocitos en su morfología y función, las llamadas células similares a hepatocitos derivadas de células pluripotentes inducidas (iHEPs). Es necesario profundizar más en esta línea de investigación ya que los iHEPs aún no mimetizan perfectamente todas las características de los hepatocitos. Las células madre mesenquimales (MSC) son otro tipo de células madre usadas que además reducen o previenen la lesión por isquemia o reperfusión de los donantes. Pueden llegar a diferenciarse a estas células similares a hepatocitos [1]. Las células madre tienen la ventaja de que con terapia génica pueden ser corregidas en sus deficiencias metabólicas en aquellos casos en los que éste sea el problema, resultando más útiles en estos trastornos enzimáticos y metabólicos [9].

Las terapias celulares presentan varias limitaciones, entre ellas se encuentra la necesidad de definir mejor las condiciones de diferenciación de las células madre, ya que aún no se consiguen células completamente idénticas a los hepatocitos [1]. Además, la tasa de injerto de las células es baja y no constituyen una solución duradera ante el problema hepático [1]. Sería recomendable proporcionar a estas células un soporte para aumentar su proliferación y diferenciación recreando su nicho óptimo, lo que es la base de la tecnología de hígados bioartificiales y organoides [1].

Aunque la terapia de infusión y regeneración celular no es una de las técnicas más destacadas de la bioingeniería tisular hepática, su estudio ha sido imprescindible para conocer a fondo las células empleadas en otras técnicas más prometedoras como la generación de órganos bioartificiales completos y organoides.

### Órganos bioartificiales completos

Este campo de investigación, junto a los organoides, es el principal para la bioingeniería tisular hepática y el más prometedor para alcanzar sus objetivos. Se trata de generar órganos bioartificiales completos u organoides que sirvan para el cultivo de células de terapia celular, trasplantes y ensayo de fármacos.

#### I. Fuentes de matriz extracelular

Se emplea para producirlos un andamio, soporte o matriz funcional; es decir, una estructura generada a partir de órganos extirpados de los que se eliminan las células presentes con detergentes iónicos o no iónicos. Después esta estructura se recelulariza con células específicas de ese órgano para conseguir un nuevo un órgano funcional [4]. Esta estructura tridimensional incrementa la densidad celular y facilita las interacciones célula-célula que son necesarias para el cultivo [8].

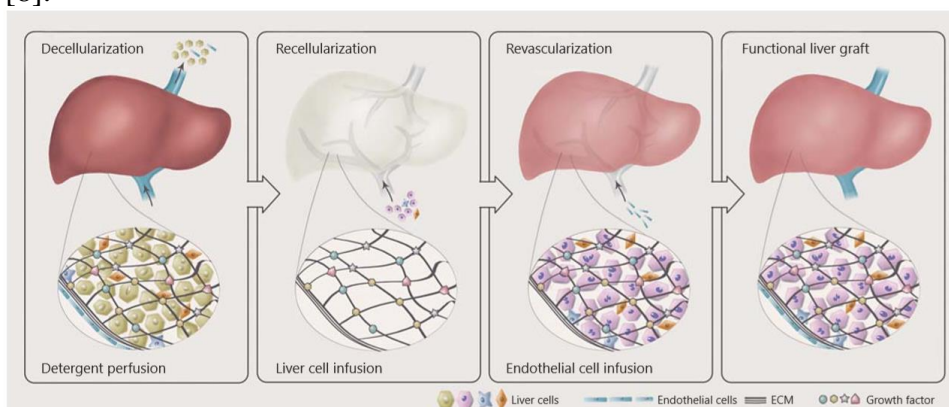


Figura 2. Esquema de la generación de órganos bioartificiales completos. Obtenido de “Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts. Cells Tissues Organs. Yujia Wang, Clara T Nicolas, Harvey S Chen, Jeffery J Ross, Silvana B de Lorenzo”. 2017 [10].

Es una técnica clave para el cultivo de células destinadas a estudios farmacológicos y toxicológicos. Su uso como injertos alogénicos o xenogénicos aún está en desarrollo, aunque ya se evalúa su biocompatibilidad como órganos de trasplante. De momento los resultados son mucho más prometedores en su uso para estudio de fármacos, ya que no hay estudios suficientemente prolongados en el tiempo y exhaustivos sobre su uso como injertos [4].

Para generar la matriz o soporte se están investigando dos técnicas principalmente: su construcción a partir de polímeros o a partir de verdaderos órganos biológicos. Dentro de los polímeros existen los sintéticos como el ácido poliglicólico, policaprolactona y ácido poliláctico y los biológicos como el colágeno, la fibrina y los glicosaminoglicanos [4]. Estos polímeros deben ser completamente biocompatibles, es decir, no desencadenar ningún efecto adverso en el organismo una vez implantados aunque interaccionen con el cuerpo. Se busca esta interacción ya que es positiva para las células que se siembran en ellos, pero no se busca una reacción adversa. Deben proporcionar soporte, puntos de anclaje, permitir el crecimiento, proliferación, migración y bioactividad requeridos por las células [1]. La función de la matriz es proporcionar soporte físico y estímulo biológico a las células sembradas en ella para asegurar su crecimiento y su funcionalidad.

Sin embargo, el uso de polímeros para la generación del andamio biológico está limitado a los órganos con función mecánica o estructural como la piel, cartílago o la vejiga. Para los órganos complejos es necesario usar otros métodos de generación de la matriz [4]. Una de las principales complicaciones de usar polímeros en la generación de órganos complejos como el hígado es que es necesario incorporar canales en el diseño de la estructura que imiten el sistema vascular, lo que entraña una gran dificultad en el diseño [8].

En el caso del hígado hay que usar matrices derivadas de órganos biológicos, como órganos extirpados no aptos para trasplante pero sí para la generación de estas matrices tridimensionales. Esta técnica fue usada por primera vez en 2008 con un corazón, posteriormente para riñones y pulmones. Las especies en las que se ha investigado son roedores, cerdos, primates y en menor medida humanos [4]. Las ventajas del empleo de matrices derivadas de órganos es que se conserva el tejido específico de la matriz extracelular en una estructura tridimensional que imita de forma muy fehaciente el tejido nativo y que el sistema vascular natural se conserva. La conservación de la vasculatura original es útil además para el proceso de descelularización y recelularización [8]. La rigidez característica de la matriz es otro factor clave que influye en el crecimiento y diferenciación de algunos tipos celulares, como las células madre mesenquimales que pueden diferenciarse a varios linajes celulares basándose puramente en la rigidez del sustrato en el que se encuentran [1]. Esta propiedad mecánica aporta otro argumento a favor de la obtención de la matriz a partir de verdaderos órganos.

Dependiendo del propósito para el que se vaya a emplear el órgano bioartificial hay que elegir la especie de la que obtenerlo. En los estudios más básicos se usan roedores, en estudios algo más avanzados se prefieren especies más grandes como cerdos u ovejas. El uso de cerdos es controvertido por la expresión de 1,3-alfagalactosa, que puede dar lugar a una reacción aguda de rechazo y supone una barrera inmunológica con la especie humana [4]. Los hígados humanos no aptos para trasplante, como aquellos que han pasado un largo tiempo en isquemia o aquellos en los que hay algún proceso maligno extrahepático u otra comorbilidad extrahepática importante, suponen una fuente muy interesante ya que se salvan los dilemas éticos de los órganos xenogénicos y ofrecen una mejor representación de la realidad. La mejora del protocolo para establecer si un órgano es apto para trasplante o bioingeniería, así como la posibilidad de comenzar con la descelularización inmediatamente tras la muerte cardiaca permitirían un gran avance en bioingeniería tisular hepática.

## II. Descelularización



El proceso de descelularización es el más estudiado de todo el proceso de generación de órganos bioartificiales. El método de descelularización que más eficaz parece es la perfusión pulsátil de detergentes iónicos como son el dodecilsulfato sódico (SDS), el desoxicolato de sodio, una solución altamente concentrada de cloruro de sodio y el ácido peracético; así como de detergentes no iónicos como el Tritón X-100. Sin embargo, el ácido peracético y la solución altamente concentrada de cloruro sódico parecen alterar la ultraestructura, apreciándose una contracción del órgano tras ser sometido a estos detergentes [4]. Aparte de los detergentes químicos también se usan métodos enzimáticos que implican a endonucleasas como la DNAasa I que corta el ADN residual en pequeños fragmentos [1].

La perfusión de los detergentes ha desplazado al método de suspensión y agitación del órgano en ellos, ya que está muy limitado en órganos sólidos, es más empleado en tejidos epiteliales, endoteliales y tejidos nerviosos periféricos. En el caso de que se quiera emplear esta técnica con el hígado hay que saber que no se han obtenido buenos resultados con fragmentos o discos superiores a 5 mm de grosor [8, 10].

El flujo de perfusión de los detergentes para la descelularización empleado en los estudios realizados varía de 0,5-50 mL/minuto y el tiempo desde menos de 3 horas hasta varios días de perfusión [4]. Un tiempo excesivo de descelularización puede conllevar mayor pérdida de componentes de la matriz extracelular, mientras que una presión excesiva puede reducir el grosor de las paredes vasculares y dañarlas, además de provocar una descelularización desigual [8, 10].

La principal vía usada es la vena portal; aunque la arteria hepática y la vena cava se usan también como alternativas. Para asegurar la salida de la solución perfundida se corta previamente la salida de la vena hepática y la vena cava inferior [4].

El mecanismo de acción del SDS se basa en su capacidad de disolución de las membranas nucleares y citoplasmáticas, eliminando el contenido celular de los órganos más densos. Sin embargo, es un detergente que puede dañar la ultraestructura de la matriz y desnaturalizar algunas proteínas, incluyendo los factores de crecimiento que están unidos a la membrana [4]. El Triton X-100 rompe las uniones del ADN con las proteínas, las uniones lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína. Supone la opción menos agresiva, la mejor si se busca mantener la composición de la matriz extracelular, los factores de crecimiento y la integridad del árbol vascular. Sin embargo no se puede usar como único detergente, ya que quedaría ADN remanente en el soporte.

Se han realizado estudios comparando protocolos de descelularización. Una combinación de Triton X-100 0,5% con hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) 0,05% resultó la más adecuada para hígados ovinos, en cambio para hígados porcinos se prefiere SDS 1% y Triton X-100 0,5% [8]. En general, las combinaciones de SDS (0,01-1%) y Triton X-100 (0,5-3%) en distintas concentraciones han sido usadas en múltiples estudios, demostrando gran capacidad de descelularización y mantenimiento de la integridad estructural [4]. Tras el empleo de estos dos detergentes se suele perfundir la matriz con tampón fosfato salino (PBS) para arrastrar los restos de SDS y Triton X-100, ya que restos de SDS presentarían toxicidad para las células que lo recelularicen [10].

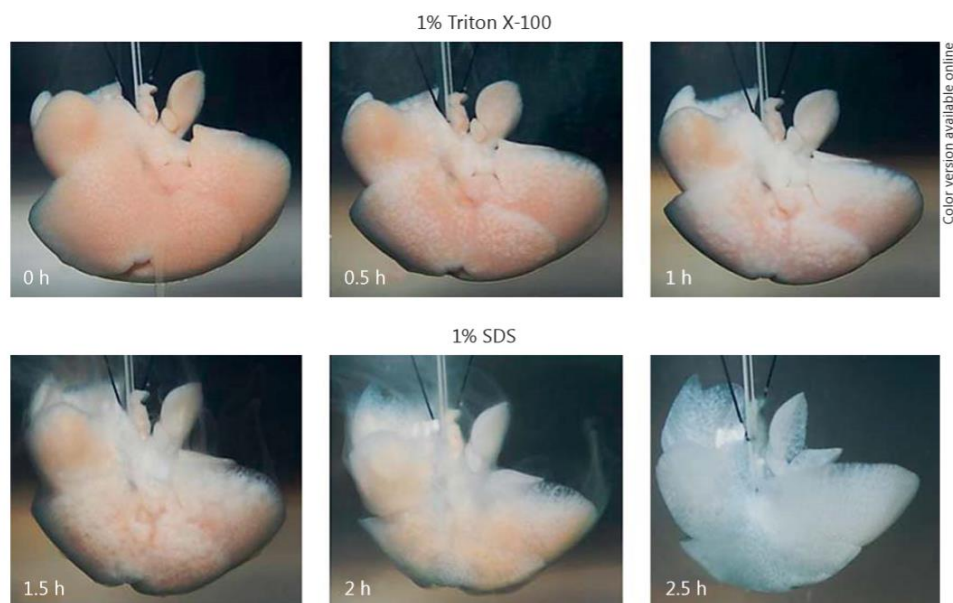


Figura 3. Imágenes de descelerización de un hígado porcino con detergentes. Se perfunde con Tritón X-100 1% seguido de SDS 1% usando un flujo de 1 mL/minuto. Tras aproximadamente 3 horas de perfusión el soporte se lavado con PBS. Obtenido de “Bioengineered Livers: A New Tool for Drug Testing and a Promising Solution to Meet the Growing Demand for Donor Organs. Franziska Mußbach U., Utz Settmacher, Olaf Dirsch, Chichi Xie”. 2016 [4].

Uno de los últimos avances ha sido la aplicación de la perfusión fisiológica, bajo condiciones de presión oscilante que imita las condiciones intra-abdominales durante la respiración. La presión oscilante reduce el tiempo de perfusión y mejora la homogeneidad de la misma [10]. La perfusión con electroporación simultánea también está siendo investigada. Otra variante reciente es el método crioquímico, en el que el hígado recién extirpado se congela en agua destilada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y al día siguiente se descongela lentamente antes de comenzar la perfusión. Esta congelación previa permite la lisis de las membranas celulares y daña el interior de los orgánulos, permitiendo que la perfusión siguiente elimine los restos celulares [4]. Se han usado procedimientos de congelación única o múltiple en ciclos de congelación y descongelación como primer paso de la descelerización [10]. El rápido cambio de temperatura resulta en una respuesta osmótica y la formación de cristales intracelulares que aceleran la lisis celular. Este proceso solo induce cambios menores en las propiedades mecánicas de la matriz extracelular en comparación con otros métodos y puede ser usado siempre que se controle muy bien la temperatura y el tiempo [10].

Hasta el momento no hay un protocolo único u óptimo establecido. Aunque se han estudiado múltiples concentraciones, compuestos y vías de perfusión no se ha hecho de tal forma que permitan una fácil comparación y elección de un método único.

La evaluación del éxito y calidad del proceso de descelerización se estudia examinando la cantidad de nucleótidos y ADN remanente en el órgano, mediante tinción de hematoxilina-eosina (HE) o 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Se sugiere que el contenido de ADN remanente debe ser menor de 50 ng ADN residual/mg de tejido (peso seco), y fragmentos de longitud menor de 200 bp [4]. Es el criterio establecido para determinar el éxito del proceso de descelerización y está bastante extendido y aceptado.

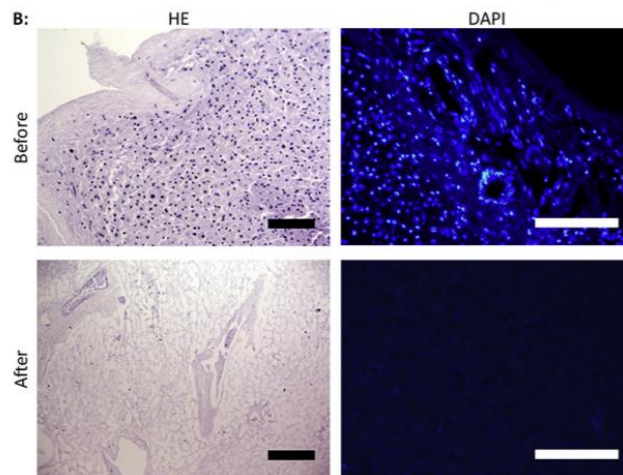


Figura 4. Imágenes microscópicas de un corte de tejido hepático antes (arriba) y después (abajo) de la desceldularización. Métodos de comprobación del éxito de la desceldularización con tinción HE (izquierda) y DAPI (derecha). Imagen obtenida de “From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix. Jorke Willemse, Ruby Lieshout, Luc van del laan, J.W, Monique Verstegen, M.A” 2017 [1].

Estas comprobaciones son esenciales, ya que los antígenos de membrana, el material celular como las mitocondrias o el material nuclear desencadenan la inflamación en el receptor al tratarse de órganos alogénicos o xenogénicos. Los restos nucleares por ejemplo desencadenarían la reacción de los macrófagos M1 [10].

Los niveles de los factores de crecimiento en la matriz, incluyendo los factores de crecimiento de los hepatocitos, factores de crecimiento básicos de los fibroblastos, factor de crecimiento endotelial y factor de crecimiento de la insulina deben estar en cantidad suficiente para permitir la implantación y arraigo de las células que se resiembren [10]. La presencia de estos factores nativos durante la desceldularización así como la inmovilización de otros factores deseados es esencial para conseguir una implantación exitosa de las nuevas células [10].

También es importante determinar la composición de la matriz extracelular resultante y para ello se analizan histológicamente la laminina, fibras de colágeno I, III y IV (con técnicas de tinción especiales para tejido conectivo como la tinción tricrómica de Masson, tinción pentacrómica de Russell-Movat, tinción de Gomori, Van Gieson, tinción de Sirius red, plata y reticulina), fibronectina y elastina. También se valoran con técnicas inmunohistoquímicas y tinción inmunofluorescente [4, 10]. La estimación cuantitativa de hidroxiprolina, colágeno, glicosaminoglicanos y elastina se determina con datos de Western blot [4]. Empleando como detergentes SDS y Triton X-100 se ha comprobado que el colágeno retenido es similar al de los hígados nativos, aunque los glicosaminoglicanos disminuyen [8].

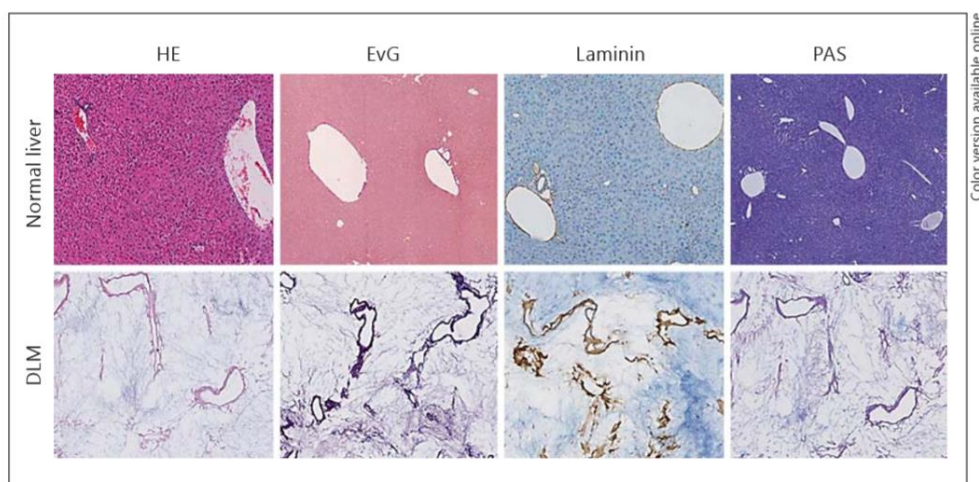


Figura 5. Imagen histológica de la matriz antes (arriba) y después (abajo) de la desceldularización usando diferentes tinciones. EvG: tinción elastic Van Gieson. DLM: decellularized liver matrix. “Bioengineered Livers: A New Tool for Drug Testing and a Promising Solution to Meet the Growing Demand for Donor Organs. Franziska Mußbach U., Utz Settmacher, Olaf Dirsch, Chichi Xie”. 2016 [4].

Como característica física macroscópica se puede apreciar que el soporte desceldularizado queda sin color. Las mismas técnicas empleadas para determinar la composición de la matriz se pueden aprovechar para examinar la porosidad, tamaño de poro y textura de la superficie [10]. Estas propiedades, así como las propiedades mecánicas de la matriz, son esenciales para las células sembradas. Las propiedades mecánicas evaluadas son la resistencia a la tracción uniaxial/biaxial, módulo elástico, comportamiento de relajación tras el estrés, estabilidad térmica y prueba de presión de ráfaga [10].

Se está investigando en técnicas de análisis no invasivas ni destructivas ya que a veces las técnicas histológicas suponen el fin del proceso para la matriz preparada. Ya se usa por ejemplo la medida de la presión hidrostática, ya que la resistencia a la perfusión de la matriz cambia cuando se han eliminado las células. Se han encontrado diferencias significativas [8]. Otra técnica no invasiva usada es el análisis de la solución perfundida una vez ha atravesado el órgano. La cantidad de ADN remanente detectada en la solución va disminuyendo conforme avanza el proceso de desceldularización y llega un momento en el que se estabiliza y no sigue descendiendo significativamente ya que la continuación de la perfusión no reduce más el nivel de ADN residual [8].

Como en el caso del proceso de desceldularización, tampoco hay un protocolo único u óptimo para evaluar la calidad y el éxito del proceso.

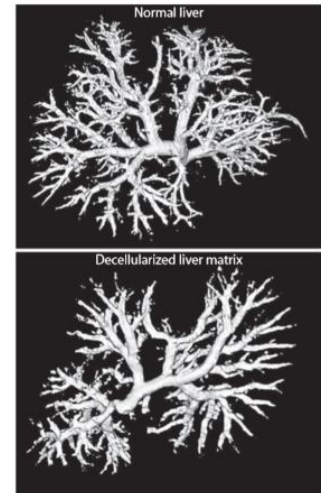
La conservación del árbol vascular y la eliminación total de las células parenquimales y endoteliales sin la pérdida de la matriz extracelular nativa son requisitos esenciales para conseguir la repoblación posterior [4].

La integridad del árbol vascular se examina con métodos de ultraimagen como la resonancia magnética o la tomografía axial computarizada con agentes de contraste como iotalamato de meglumina. También se usa el “vascular corrosion casting” y técnicas microscópicas como



microscopía electrónica de barrido, de transmisión y de fluorescencia para ver la estructura de los sinusoides vasculares [4]. “Vascular corrosion casting” es una prueba en la que se usa una resina que se perfunde en el árbol vascular para obtener una especie de molde de éste tras la corrosión del tejido donde se ha perfundido. Otros autores usan técnicas más convencionales como la inyección de fluoresceína unida a dextrano vía vena portal, o la perfusión de azul tripán o de agarosa teñida con azul de metileno [4].

Figura 6. Imagen de la integridad del árbol vascular examinada con métodos de imagen y agente de contraste. Obtenida de “Bioengineered Livers: A New Tool for Drug Testing and a Promising Solution to Meet the Growing Demand for Donor Organs. Franziska Mußbach U., Utz Settmacher, Olaf Dirsch, Chichi Xie”. 2016 [4].



En el caso de los órganos bioartificiales generados para servir como injertos para trasplantes otro requisito esencial que se debe tener en cuenta es la eliminación de todos los antígenos asociados a la matriz que puedan provocar un rechazo en el receptor. La eliminación de las células del soporte no asegura el cumplimiento de este requisito, la eliminación de antígenos dirigida es interesante para eliminar aquellos que son conocidos por desencadenar una reacción inmunitaria [8]. Con este propósito se suele hacer un proceso de desinfección antes de la esterilización final de la matriz descelularizada. El ácido peracético es el desinfectante más usado, cuya acción se basa en la oxidación de la membrana celular de los microorganismos. Para esterilizar se usa radiación gamma, óxido de etileno gaseoso o radiación de haz de electrones. Dosis muy altas de radiación gamma o haz de electrones pueden afectar a la remodelación tisular in vivo, la dosis óptima es aquella que esteriliza y afecta lo mínimo posible a las propiedades de la matriz. La combinación de dos de los métodos suele ser necesaria para conseguir una esterilización completa [8].

La presencia de xenoantígenos se examina con PCR semicuantitativa o técnicas de inmunodetección [8].

Aunque la descelularización es el procedimiento más estudiado en la generación de órganos por bioingeniería tisular, aún es necesario profundizar en la investigación de algunos aspectos: la selección de las especies donadoras del órgano que constituirá la matriz; el impacto de la isquemia, paro cardíaco o patologías en la calidad de la matriz obtenida y el establecimiento de protocolos óptimos y estandarizados para la descelularización [4]. Además, también sería conveniente estandarizar los métodos de control de calidad para facilitar la comparación de estudios.

### III. Recelularización

La siguiente dificultad con la que se encuentra la bioingeniería tisular hepática es la elección del mejor tipo celular para la recelularización. Las células con las que se recelulariza el soporte obtenido son cultivadas tras la implantación en condiciones estáticas o en un biorreactor en el que se puede realizar la perfusión dinámica de la estructura. Después es necesario realizar un control de calidad sobre el órgano recelularizado [4].

En los primeros estudios se ha repoblado con células ya maduras, tanto hepáticas como endoteliales. La matriz es capaz de ayudar al crecimiento y supervivencia de las células repobladoras como lo son los hepatocitos primarios para el parénquima y las células endoteliales para el árbol vascular. Las células se infunden por perfusión y tienden a situarse e injertarse en la matriz en los lugares que ocuparían en el órgano nativo [4]. El uso de estas células alogénicas primarias queda limitado a estudios preclínicos; porque aunque ofrece fenotipos maduros y ahorra el tiempo de la maduración, es difícil obtener células de buena calidad y en una escala relevante [8].

En estudios posteriores se han utilizado células madre y progenitoras como las células madre mesenquimales (MSC), células madre fetales, células madre hepáticas y células madre de la médula ósea. En teoría, las células madre hepáticas específicas o progenitoras que tienen el potencial para diferenciarse en hepatocitos y colangiocitos funcionales serían las mejores candidatas, aunque sigue siendo necesaria mucha proliferación y diferenciación [1]. El empleo de células autólogas para la recelularización es interesante por la disminución del riesgo de rechazo inmunológico [1]. En estos estudios se ve que la matriz ayuda a la diferenciación de las células madre. Actualmente, las células progenitoras y las células madre son el tipo celular más prometedor. El empleo de células madre mesenquimales (MSCs) del futuro receptor parece ser la aproximación más prometedora. Las MSC de hecho muestran una expresión superior de marcadores hepáticos y una mayor función metabólica tras su injerto y cultivo en la matriz al comparar este método con un cultivo in vitro de las mismas [4]. Las MSC se aíslan fácilmente y de forma directa desde la médula, y son bien toleradas inmunológicamente. Es necesario obtener un protocolo óptimo para su diferenciación, para conseguir células prácticamente idénticas a las células primarias que se buscan [8]. Recientemente se ha establecido un nuevo método de cultivo tridimensional para la expansión a largo plazo de células madre hepáticas; las células madre se autoorganizan en los llamados organoides hepáticos. Éstos suponen una nueva e interesante fuente de células para ingeniería hepática, ya que con ellos es posible conseguir in vitro la enorme cantidad de células que se necesitan [1].

Las células madre son prometedoras, pero implican un mayor consumo de tiempo ya que suelen ser necesarias de 2 a 4 semanas para diferenciarse in vitro exitosamente [4]. La matriz extracelular posee señales intrínsecas para el mantenimiento del tipo celular y dirigir la diferenciación y las interacciones entre las células parenquimáticas y no parenquimáticas suponen un beneficio para la supervivencia y funcionalidad [8].

Varios tipos celulares se han evaluado en múltiples estudios. Las MSCs de ratones que se usan para recelularizar se diferencian tras cuatro semanas de cultivo en perfusión. La diferenciación se confirma con inmunotinción de ácido periódico de Schiff (PAS), albumina, alfa-fetoproteína (AFP) y marcador CK19 comparándolo con secciones de hígado de ratón como control positivo. Su actividad metabólica en términos de producción de albumina y urea es mayor que la de cultivos bidimensionales (2D) convencionales [4]. Las células hepáticas fetales para recelularización de una matriz porcina también maduran y presentan una mayor actividad metabólica frente a su cultivo en 2D [4]. Las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) son autólogas y se expanden fácilmente, se han usado para recelularizar un hígado porcino de forma exitosa; las mayores preocupaciones con respecto al uso de estas células son la memoria epigenética y la tumorigenicidad [8].

Las células madre hepáticas sembradas en una matriz murina también sufren una maduración que puede ser confirmada por técnicas inmunoquímicas y RT-PCR presentando mayor actividad del CYP3A4 y mayor síntesis de urea que cultivos 2D [4].

Comparando tres métodos de recelularización como son la perfusión continua, perfusión multietapa e inyección parenquimática directa se vio que las células aplicadas por perfusión multietapa mostraban la mayor tasa de injerto [8]. La perfusión única continua fue la que menos tasa de injerto mostró en comparación con los otros dos métodos, probablemente porque la perfusión constante permite menos tiempo de contacto entre las células y matriz para injertarse [10]. El peligro de perfundir las células en el árbol vascular es que queden retenidas en él y obstruyan los vasos, la alternativa de usar los conductos biliares se está estudiando [1]. Cuando la matriz descelularizada se divide en cubos o discos se tienen que emplear otras técnicas de recelularización, se está probando a dejar caer una suspensión celular sobre los fragmentos, aunque solo se puede emplear cuando el número de células a implantar es pequeño [10].

Es esencial asegurar sea cual sea el tipo celular, su distribución homogénea en la matriz. Es necesario un alto número de células y la técnica de aplicación dinámica por perfusión

multietapa vía vascular permite una mejor distribución de las células infundidas que una única inyección parenquimática de las células. La perfusión se puede realizar con presión negativa para mejorar la distribución, así como emplear también los conductos biliares [8]. La distribución homogénea se evalúa con microscopía electrónica de barrido [4]. Otro parámetro a evaluar es la repoblación completa y continua del endotelio vascular. Si la barrera endotelial conseguida con la recelularización no es continua se pueden desencadenar reacciones inflamatorias severas tras la implantación. La recelularización del endotelio se está centrando en una sustancia gelatinosa que combina heparina mezclada con células endoteliales y que presenta potencial antitrombótico [10]. Los conductos biliares también deben ser completamente recelularizados con colangiocitos para conseguir una secreción biliar apropiada [1].

Se ha estudiado la perfusión de las células vía vena cava y vía vena porta. La densidad de repoblación es mayor usándolas simultáneamente [4].

Tras la infusión de las células se necesitan varios días de cultivo in vitro del órgano recelularizado. Las condiciones de cultivo pueden ser estáticas o dinámicas. En el caso de que sean estáticas se sumerge el órgano en un medio en el que el aporte de nutrientes y oxígeno es limitado [4]. Si el cultivo se realiza en condiciones dinámicas hay una continua perfusión con medio y con un flujo definido que permite mayor intercambio de oxígeno y nutrientes [4]. Los biorreactores de cultivo dinámico están diseñados de tal manera que mimetizan el ambiente in vivo creando condiciones de cultivo óptimas para las células repobladoras. Tienen en cuenta factores clave, como el intercambio de nutrientes y desechos con las células, el control de la temperatura, suministro de gas, monitorización en tiempo real de moléculas de interés y estímulos específicos del órgano [8]. El medio de perfusión puede ser suplementado con ligandos bioactivos y factores de crecimiento específicos que mejoren la funcionalidad de las células sembradas [8]. La suplementación del medio depende también del proceso de descelularización anterior, en el análisis de calidad de la descelularización se analiza cuanto se han reducido los factores nativos [8].

La evaluación del proceso de recelularización se realiza verificando la densidad y la homogeneidad de las células sembradas en la matriz. El éxito del proceso también se juzga según la eficiencia metabólica de las células parenquimáticas y la reendotelización del sistema vascular [4].

Para evaluar la densidad celular se usan las tinciones de hematoxilina-eosina y DAPI. Para la homogeneidad en la distribución la microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal laser [4].

La funcionalidad del órgano obtenido se evalúa con parámetros metabólicos básicos como la secreción de albumina, producción de urea y de ácido biliar y la eliminación de amonio [4].

Las células cultivadas en la matriz tras la recelularización presentan una actividad metabólica mayor que las que se cultivan en sistemas convencionales, independientemente del tipo celular. Se vio con hepatocitos primarios en ratas y cerdos infundidos en perfusión frente a cultivos estáticos en placas cubiertas con colágeno [4].

Es importante controlar todos los factores que influyen en el proceso de recelularización: el tipo de células y su número; las condiciones de injerto como el ritmo de flujo, el modo de inyección (constante o dinámico), una o multietapa, la ruta de aplicación (vía vena porta o arteria hepática); así como la optimización de las condiciones de cultivo posterior [4]. Pero hay 3 aspectos claves para obtener órganos funcionales en los que es necesario profundizar la investigación: repoblar con el número suficiente de células parenquimáticas que permitan cumplir las necesidades metabólicas del receptor, reendotelizar el árbol vascular para evitar la trombosis al perfundir la sangre que proporciona los nutrientes y el oxígeno, y la epitelización de los conductos biliares [4]. Es esencial evitar la coagulación de la sangre perfundida para evitar una trombosis y el fracaso del proceso [8].

Para evaluar la biocompatibilidad de los órganos bioartificiales generados se han realizado distintos estudios. En uno de ellos se realizaron injertos de matrices acelulares alogénicas y xenogénicas en el tejido graso subcutáneo de ratas. No se ha visto un aumento de la respuesta inflamatoria en ninguno de los casos, se ha visto una infiltración de células del huésped en la matriz, pero no de células inflamatorias. Tampoco aumentan los parámetros inflamatorios sistémicos [4]. En estos estudios los resultados apuntan a que se podría suprimir la inmunosupresión tras un trasplante de este tipo de órganos [4].

En otro estudio se han implantado pequeñas piezas acelulares de matriz en el área subhepática de ratas y se han unido al lóbulo derecho con 4 simples suturas sin revascularización. Se vio con tinción una repoblación con células binucleadas similares a hepatocitos. Tanto en implantación alogénica como xenogénica solo se vio una leve reacción inflamatoria con infiltración de células inflamatorias [4]. Una potencial xenozoonosis es otro de los riesgos del uso de estas células xenogénicas [10]. Se trata de una enfermedad infecciosa transmitida desde un animal donante a un humano por un trasplante de un tejido u órgano.

La biocompatibilidad y funcionalidad de las matrices recelularizadas también se ha investigado en un modelo de ratón con fallo hepático provocado por tetracloruro de carbono. Se implantaron pequeñas piezas de matrices acelulares y de matrices recelularizadas con MSC funcionales. Se implantaron directamente en el parénquima hepático asegurándolas con una malla hemostática y pegamento biológico. Se vio una mejoría de las funciones hepáticas y un injerto exitoso en la región del lóbulo, además de una tasa de supervivencia más alta en el grupo que había recibido las matrices recelularizadas [4].

Se ha experimentado también con un trasplante del lóbulo hepático mediano derecho tras una hepatectomía del 90% en ratas. El trasplante del órgano bioartificial prolongó la supervivencia de las ratas de 16 a 72 horas. Tras las 72 horas se vio la expresión de genes relacionados con la funcionalidad hepática en los hepatocitos que recelularizaban el órgano. Expresaban los genes del factor X de coagulación, albumina, citocromo 450 (CYP1A2), AcetilCoA sintetasa, triacilglicerol hidrolasa y el factor de transcripción de los receptores activados de proliferación de los peroxisomas alfa (PPAR $\alpha$ ) que está implicado en la oxidación lipídica. Además, era capaz de sintetizar albumina y la tinción de PAS demostró la presencia de glucógeno [4]. Se ha visto que el injerto de estos órganos bioartificiales parece reducir la formación de tejido cicatricial y facilita la remodelación tisular [8].

A pesar de los prometedores resultados no hay investigaciones que vayan más allá de unos días en esta técnica, por lo tanto es necesario continuar esta vía de experimentación.

### Organoides

Un organoide se define como una estructura tridimensional derivada de cualquier célula madre pluripotente, célula madre de tejido neonatal o células madre de adultos o progenitoras, en los que las células se autoorganizan espontáneamente en tipos celulares funcionales, diferenciados y progenitores que se asemejan a su homólogo in vivo y presentan al menos algunas funciones del órgano [1].

El primer organoide se desarrolló hace una década. Este método de cultivo ha permitido hacer cultivos organoides de muchos tipos de células madre, incluyendo las de tejidos neonatales y adultos, y células madre pluripotentes de humanos u otros mamíferos. Este campo avanza muy rápidamente por su potencial no solo en investigación sino en la clínica. Tienen un gran potencial de expansión, pudiendo generar hasta aproximadamente un millón de células a partir de una única célula en dos meses [1]. Además, han probado tener una buena estabilidad genética, un análisis cariotípico deja ver que mantienen un número normal de cromosomas tras múltiples meses de cultivo. En un estudio más detallado del genoma de las células iniciadoras del organoide se vio que el genoma es notablemente estable a lo largo del tiempo, con casi ninguna mutación adquirida durante tres meses de cultivo. Esto destaca frente a otros sistemas



de obtención de células similares a hepatocitos, como los cultivos in vitro de células pluripotentes inducidas, que suelen adquirir mutaciones [1].

De manera reciente se ha instaurado un nuevo método de cultivo tridimensional para expandir las células madre epiteliales hepáticas a largo plazo; las células se organizan en los llamados organoides hepáticos. Además, los organoides son bipotentes, tienen el potencial para diferenciarse hacia hepatocitos y colangiocitos. La diferenciación in vitro requiere un cambio de la composición del medio, después de la cual las células se diferencian hacia hepatocitos o colangiocitos. En el caso de que se diferencien hacia hepatocitos, además de adquirir su morfología y regulación de marcadores; adquieren algunas funciones de los hepatocitos: síntesis de glucógeno y LDL, y producen albumina y ácidos biliares aunque en menor medida que los hepatocitos primarios. Los organoides derivados de tejido adulto se parecen mucho más a su tejido original que aquellos que vienen de células fetales o células madre pluripotentes inducidas, que son onnipotentes. Estas últimas presentan un alto riesgo de diferenciarse hacia células tumorales que forman un teratoma. Las células madre derivadas de tejidos adultos no presentan riesgo de formación de teratoma, tienen muy poca capacidad de mutación y trasdiferenciación hacia otros tipos celulares, tan solo hay algunas posibilidades entre aquellos con el mismo origen embrionario (como entre los organoides intestinales y gástricos o los pancreáticos y hepáticos in vivo). Suponen una nueva e interesante fuente de células para ingeniería hepática [1].

Los organoides, además de para bioingeniería tisular, pueden ser empleados para ensayos de toxicidad y como modelos para el estudio de múltiples desordenes y patologías, desde las infecciosas a las genéticas, incluyendo varios tipos de cáncer. Así se pueden estudiar los mecanismos de dichas patologías para descubrir nuevos métodos de diagnóstico, tratamiento y pronóstico [1].

Un gran beneficio de usar organoides hepáticos para propósitos de bioingeniería es la posibilidad de usar células del propio paciente ya que los organoides pueden ser cultivados desde pequeñas biopsias de hígado. La proliferación in vitro es estable, pudiendo generar gran cantidad de células. El uso de estas células autólogas para trasplantes es un beneficio pues reduce la posibilidad de rechazo y el uso de medicamentos inmunosupresores de por vida, que son caros y tienen serios efectos secundarios como el aumento del riesgo de infección y desarrollo de cáncer [1]. Aunque el cultivo de organoides es posible a partir de hígados con alguna patología, algunas deficiencias genéticas deben ser corregidas con técnicas de edición genómica como la transducción con vectores virales o la técnica de edición del genoma CRISPR/Cas 9 ya que si no todo el organoide desarrolla la misma mutación. Hay controversia sobre la aplicación de estas técnicas en terapia celular o bioingeniería de tejidos, pero al ser aplicadas ex vivo se pueden analizar los efectos antes de usarlos [1].

Los organoides se cultivan normalmente sobre hidrogeles como el Matrigel™, siendo uno de los mayores problemas el hecho de no estar aprobado por autoridades sanitarias como la FDA, por lo que no se pueden usar para usos clínicos. Estos geles permiten la autoorganización de las células en estructuras esféricas. Además de la no aprobación de Matrigel™ se sabe que previene la diferenciación de ciertos tipos de células madre, conservando su potencialidad y no es específica del tipo de tejido. Por estos motivos es necesario un soporte específico del tejido como los usados en la generación de órganos bioartificales derivados de verdaderos órganos para mimetizar el microambiente y crear el nicho perfecto [1]. El uso de soportes específicamente diseñados para el cultivo de organoides permite que tengan todos un tamaño uniforme y similar que no genera problemas de desabastecimiento o exceso de oxígeno o nutrientes [5].

Se ha estudiado la infusión de organoides hepáticos en modelos animales, sobre todo en ratas. La tasa de injerto fue relativamente baja, pero en aquellos en los que se produjo tuvieron un beneficio en la supervivencia, que fue mayor que en aquellos no trasplantados. Con organoides

humanos en modelos murinos se vio a las dos semanas producción de albumina humana y alfa 1-antitripsina, y se mantuvieron estables al menos 60 días. En el caso de injertar organoides indiferenciados, casi la mitad se injertaron exitosamente y algunas se diferenciaron a hepatocitos in vivo, mientras que otras formaron conductos biliares o retuvieron su bipotencialidad [1].

### Liver-on-a-chip

Es una tecnología que consiste en dispositivos fabricados a escalas micrométricas, descritos como sistemas biomiméticos cuya función principal es lograr el mantenimiento de la unidad funcional de un órgano vivo en una estructura tridimensional. Son órganos en chip que permiten el cultivo de células en dispositivos perfundidos con microfluidos con un ajuste fino de señales físicas, químicas y biológicas. Se aplica en la investigación de interacciones célula-célula y en la selección de fármacos y monitorización en tiempo real de respuestas celulares bajo condiciones fisiológicas o farmacéuticas [11, 12]. Se ofrece un flujo dinámico de un fluido en un entorno de cultivo tridimensional proporcionando factores solubles de forma controlada. Hasta ahora se han usado las tecnologías de órgano en chip para pruebas de medicamentos, ya que el cultivo tridimensional con perfusión permite una representación más real de las condiciones in vivo que el cultivo 2D convencional. Por ejemplo, se ha usado para probar el efecto de la dosis de paracetamol sobre la apoptosis de organoides hepáticos [11, 12].

## **CONCLUSIONES**

En resumen, generar órganos biológicamente funcionales por ingeniería hepática es una nueva estrategia con potencial para cumplir dos importantes objetivos: ser usados como un sistema de cultivo de células humanizado en ensayos intensivos de fármacos y como reemplazo de trasplantes debido a la alta demanda y baja disponibilidad de órganos adecuados para el trasplante.

Aunque la descelularización y recelularización han demostrado ser posibles, un éxito a largo plazo no ha sido demostrado aún. Hay que optimizar y estandarizar los métodos de descelularización, recelularización y sus controles de calidad para que la investigación avance y esta tecnología puede ser usada como una alternativa terapéutica real en un futuro cercano. Además, hay que aprovechar técnicas prometedoras como la generación de organoides.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Jorke Willemse, Ruby Lieshout, Luc Van der laan, J. W., Monique Verstegen, M. A. From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2017; 31 (3): 151-159.
2. Huppert, Stacey S., Campbell, Kathleen M. Emerging advancements in liver regeneration and organogenesis as tools for liver replacement. *HHS Public Access Author manuscript Curr Opin Organ Transplant Author manuscript*. 2017; 21 (6) (101097): 581–587
3. Malchesky, Paul S., Abdallah Assiri, Dipok Dhar, Dieter Broering. Artificial Organs 2016: A Year in Review. *Artificial Organs*. 2017; 41 (3): 10-19.
4. Franziska Mußbach, U., Utz Settmacher, Olaf Dirsch, Chichi Xie. Bioengineered Livers: A New Tool for Drug Testing and a Promising Solution to Meet the Growing Demand for Donor Organs. *European Surgical Research*. 2016; 57 (101159/000446211): 224–239.

5. Gregory H. Underhill, Salman R. Khetani, Harvey S. Chen, Jeffery J. Ross, Silvana B de Lorenzo. Bioengineered Liver Models for Drug Testing and Cell Differentiation Studies. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology. 2017; 2045 (3): 1-15.
6. Ogechi Ogoke, Janet Oluwole, Natesh Parashurama, Jeffery J. Ross, Silvana B. de Lorenzo. Bioengineering considerations in liver regenerative medicine. Journal of Biological Engineering. 2017; 11 (46): 1-16.
7. www.ont.es [Online]. Available from: <http://www.ont.es/infesp/Memorias/Actividad de Donación y Trasplante Hepático.pdf> [Accessed 7 May 2019].
8. Fanwei Meng, Abdallah Assiri, Dipok Dhar, Dieter Broering. Whole liver engineering: A promising approach to develop functional liver surrogates. Wiley Liver International. 2017; 1 (101111/liv13444): 1-14.
9. Lara T. Nicolas, Raymond D. Hickey, Harvey S. Chen, Shennen A. Mao, Manuela Lopera Higueta. Liver Regenerative Medicine: From Hepatocyte Transplantation to Bioartificial Livers and Bioengineered Grafts. HHS Public Access Author manuscript Stem Cells Author manuscript. 2017; 35 (1) (101002/stem2500): 42–50.
10. Yujia Wang, Clara T. Nicolas, Harvey S. Chen, Jeffery J. Ross, Silvana B. de Lorenzo. Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts. Cells Tissues Organs. 2017; 204 (101159/000479597): 125-136.
11. Jingwei Zhang, Xin Zhao, Liguang Liang A., Jun Li, Utkan Demirci. A decade of progress in liver regenerative medicine. Biomaterials. 2018; 157 (1): 161-176.
12. Colin H. Beckwit, Amanda M. Clark, Sarah Wheeler, D. Lansing Taylor, Donna B. Stolz. Liver ‘organ on a chip’. HHS Public Access Author manuscript Exp Cell Res Author manuscript. 2018; 363 (1) (101016/jyexcr): 15–25.