



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
ORGANOIDES: SU USO EN INVESTIGACIÓN
DE ENFERMEDADES Y NUEVOS
TRATAMIENTOS.

Autora: Patricia Polo Ojea.

Tutora: Rafaela Raposo González.

Convocatoria de Junio 2019.

INDICE GENERAL

<u>PÁRRAFO</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>PÁGINA</u>
1	RESUMEN	3
2	INTRODUCCION Y ANTECEDENTES	4
2.1	CÉLULAS MADRE	4
2.1.1	Células madre embrionarias.....	4
2.1.2	Células madre pluripotenciales inducidas.....	5
2.2	ORGANOIDES	7
3	OBJETIVOS	9
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
5.1	ESTÓMAGO	10
5.2	HÍGADO	12
5.3	CEREBRO	15
6	CONCLUSIONES.....	18
7	BIBLIOGRAFÍA	19

INDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>DESCRIPCIÓN</u>	<u>PÁGINA</u>
Figura 1:	Formación de organoides a partir de células madre embrionarias y pluripotentes	6
Figura 2:	Organoides cerebrales como modelos del crecimiento cerebral y microcefalia7	
Figura 3:	Biorreactor	8
Figura 4:	Formación de organoides.....	8
Figura 5:	Crecimiento del antro y cuerpo gástrico.....	11
Figura 6:	Formación de organoides de cuerpo gástrico	11
Figura 7:	Células mesenquimales, LSEC y hepatocitos upcyte en cultivo monocapa....	13
Figura 8:	Formación de organoide hepático.....	14
Figura 9:	Formación de cuerpos embrioides a partir de IPS, ESC o células adultas	15
Figura 10:	Cultivo de los cuerpos embrioides en Matrigel	16
Figura 11:	Formación de bolas blancas.....	16

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ESC: Células madre embrionarias.
- iPS: Células prutipotenciales inducidas.
- MSC: Células madre mesenquimales.
- LSEC: Células endoteliales del sinusoide hepático.

1 RESUMEN

En este trabajo se tratará la importancia y el auge que están tomando las células madre en el mundo de la biorregeneración, en concreto los **organoides**.

A pesar de los avances científicos hay cuestiones que no se han llegado a comprender a día de hoy, como son muchas patologías degenerativas, y problemas de desarrollo, por este motivo comenzaron a recrear el funcionamiento de distintos órganos a partir de tejidos formados por células madre consiguiendo que se comportaran como el órgano.

Estos son los llamados organoides, cuyos objetivos en la biomedicina son la formación de modelos in vivo para analizar las enfermedades en profundidad y también para el ensayo del efecto de las terapias.

Actualmente, Hans Clevers, responsable de los primeros "mini órganos", ha creado un banco biológico de organoides de diferentes tejidos que pueden ser utilizados por la industria farmacéutica para el ensayo de fármacos.

Los organoides abren, por tanto, una puerta a la medicina personalizada y pueden contribuir a la reducción de animales de experimentación en los ensayos clínicos, puesto que constituyen un modelo superior de desarrollo de órganos humanos.

ABSTRACT

In this work the importance and the boom that the stem cells are taking in the world of bioregeneration, in particular the organoids, will be discussed.

Although science has advanced so much there are issues that the human being has not come to understand as degenerative pathologies, development problems and cancer for this reason began to recreate the functioning of different organs from tissues formed by stem cells getting them to behave like the organ.

These are the so-called organoids, whose objectives in biomedicine are the formation of in vivo models to analyze diseases in depth and also to test the effect of therapies.

Currently, Hans Clevers, responsible for the first "mini-organs", has created a biological bank of organoids of different tissues that can be used by the pharmaceutical industry for the testing of drugs.

The organoids open, therefore, a door to personalized medicine and can contribute to the reduction of experimental animals in clinical trials, since they constitute a superior model of development of human organs.

Palabras clave: organoides, iPS, ESC, células madre, reprogramación.

2 INTRODUCCION Y ANTECEDENTES

2.1 CÉLULAS MADRE

Las células madre son células con la capacidad de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, morfológica y funcionalmente.

Las células madre son monofórmicas y se distinguen del resto de células por marcadores de superficie, los cuales son CD34+ (glucoproteína) y CD 38- principalmente entre otros. Además, presentan un indicador genético, el cual es una molécula llamada LGR5.

Una célula madre puede dividirse simultáneamente mediante mitosis y formar dos células hijas, una se diferencia comprometida con diferentes linajes celulares y la otra mantiene características de la célula madre para que siempre mantengamos una población de éstas constantes. A estos fenómenos se les denomina autorreplicación y diferenciación.(1)

Podríamos clasificarlas según su potencialidad o capacidad de diferenciarse en distintos tejidos: totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales.(2)

Estas células se hacen crecer en el laboratorio y comienzan a generar células funcionales, formando una estructura igual a la del propio órgano del que proceden. En concreto se utilizan las células adultas del tejido en cuestión, las células madre embrionarias y las células madre inducidas para la producción de organoides.

2.1.1 Células madre embrionarias

- Las **células madre embrionarias** son las llamadas **ESC**, estas son pluripotentes, y se obtienen del blastocito, este cuenta con unas 300 células, las cuales se separan en dos regiones que son la masa celular interna y el trofoblasto. Las ESC se obtienen de la masa celular interna del blastocito del 5º o 7º día de desarrollo embrionario, cuya capacidad es la de formar cualquier célula del embrión, pero no da lugar a los tejidos extraembrionarios como es la placenta. Su capacidad de proliferación in vitro es muy elevada.

Su descubridor fue **Martin Evans** que en 1981 consiguió aislar células madre embrionarias de blastocitos de ratón y demostró su posible cultivo en el laboratorio. Consiguió manipular este tipo de células utilizando retrovirus, que transfieren ADN retroviral a las células ESC y consiguió la creación de ratones con mutaciones en los genes deseados.

Asimismo, su equipo demostró la contribución de las ESC en la línea germinal. Crearon embriones quiméricos o mosaicos inyectando en embriones de una cepa de ratón células ESC de otra cepa de ratón, estos embriones se implantaron en madres sustitutas.

Estos descubrimientos fueron revolucionarios en la biomedicina debido a la sencillez de modificación genética en cultivos celulares y la posibilidad de obtener ratones modificados

genéticamente en poco tiempo. Esto ha servido para la formación de modelos experimentales para enfermedades humanas o estudios de fármacos sobre individuos con ciertas mutaciones.

Hasta 1998 no se obtuvieron células madres embrionarias humanas de embriones procedentes de fecundación in vitro.

El equipo del estadounidense James Thompson incubó un embrión en la fase de 8 a 10 células y mediante una pipeta con solución ácida formaron una apertura en la zona pelúcida que permitió extraer un blastocito el cual se cultivó in vitro, tras 5 meses de proliferación indiferenciada aún eran capaces de diferenciarse y formar múltiples tipos de células.

Se tuvieron que superar varios obstáculos como eran los medios de cultivo donde se realizaban las fertilizaciones in vitro ya que estos no eran los adecuados y no permitían el desarrollo del embrión el tiempo suficiente para obtener los blastocitos y poder obtener las células madres.

Hoy en día se está estudiando su capacidad proliferativa y su capacidad para diferenciarse en tipos celulares, se está investigando sobre las condiciones óptimas que necesitan y lo que hay que añadir al medio de cultivo para que la ESC se dividan sin parar y sin diferenciarse, para evitar teratomas. Para ello necesitan saber cuáles son los estímulos para la diferenciación de la ESC hacia los diferentes tipos celulares como puede ser una neurona. (3)(1)

2.1.2 Células madre pluripotenciales inducidas

- **Las células madre pluripotenciales inducidas** son las llamadas **iPS**, estas son células maduras del organismo manipuladas para que pierdan la identidad y regresen a un estado similar al embrionario sin necesidad de recurrir a óvulos o embriones.

En 2006 **Shinya Yamanaka** publicó un artículo que alteró el panorama de las células madres. Publicó la transformación de células diferenciadas de la piel, en este caso fibroblasto, en células madre pluripotentes inducidas, esto lo lograron gracias a la expresión de solamente 4 genes de los más de 30.000 que tiene nuestro genoma.

Escogieron 24 genes que según su hipótesis podrían inducir la conversión de células diferenciadas en embrionarias, es decir que fueran pluripotentes, los probaron uno a uno y mediante retrovirus insertaban cada uno de los genes en los cromosomas de células de la piel de ratones y después los 24 juntos. El análisis de esa célula tras el procedimiento anterior mostró que pasaban a comportarse como células embrionarias. Disminuyeron el número de genes hasta que dieron con los 4 responsables de la desdiferenciación que eran: **Oct3/4, Klf4, Sox2 y c-Myc**, estos son los famosos factores de Yamanaka.

Se siguió estudiando si se podría llegar a la desdiferenciación sin la necesidad de los 4 genes y asimismo se descubrió que C-Myc es un protooncogen, este estaba implicado en muchas funciones celulares, incluyendo el control del ciclo celular. La introducción de c-Myc era peligrosa porque su activación anómala o fuera de control puede causar tumores. Debido a esto el equipo de Yamanaka intentó obtener células iPS a través de los otros 3 genes Klf4, Oct3/4 y Sox2 excluyendo a c-Myc y obtuvieron células iPS igual de robustas, pero con menos eficacia, pero también vieron algo mucho más significativo que era que ninguno de los ratones derivados de esas células iPs desarrolló tumores.

Las iPS debido a su fácil producción se han empelado en estudios y tratamientos de un mayor número de afecciones que las células madre embrionarias. Un claro ejemplo es el de un grupo de la Universidad John Hopkins de Baltimore (EE.UU) que utiliza las iPS para producir estructuras que mimetizan a pequeña escala un cerebro, estas estructuras son organoides y les permite analizar mecanismos de acción de enfermedades y de virus como el zika , y conocer cómo puede producir microcefalia en los fetos de las mujeres embarazadas que se infectaron.

Además las iPS proceden de células adultas del paciente y se pueden probar en ellas la respuesta de esa persona a diferentes fármacos, y evaluar la eficacia o toxicidad de los mismos.(4)

Estas células favorecen el progreso en la medicina personalizada y evita los problemas éticos que hay con las células madre embrionarias.

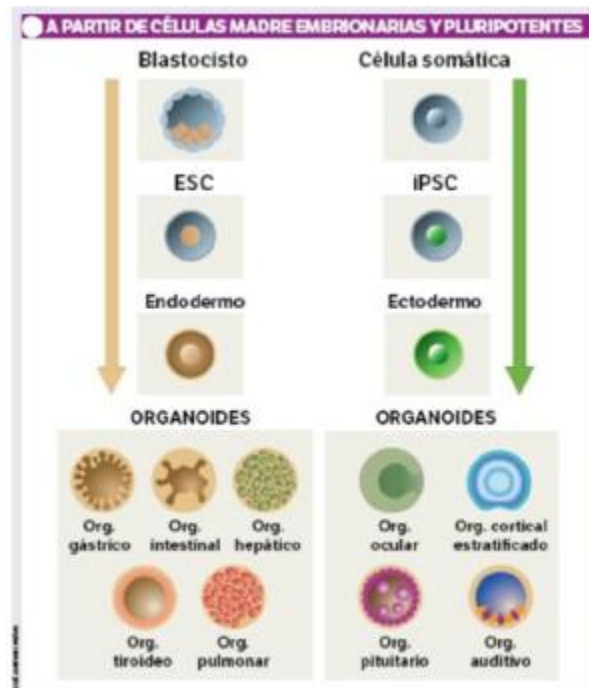


Figura 1: Formación de organoides a partir de células madre embrionarias y pluripotentes.(4)

2.2 ORGANOIDES

Los **organoides** son estructuras 3D desarrolladas a partir de células madre muy similares a los órganos cuyo objetivo es servir como modelo para un estudio en profundidad de diversas enfermedades, y por otro lado el ensayo de nuevos fármacos y su eficacia.

Huch y Koo, definieron un organoide como "una estructura 3D derivada de células madre pluripotentes, células madre de tejido neonatal o células madre adultas / promotoras adultas, en las que las células se autoorganizan espontáneamente en tipos de células funcionales y diferenciadas adecuadamente, y progenitores y que se asemejan a su contraparte in vivo y recapitulan al menos alguna función del órgano ".(5)

Son células específicas del organismo que se organizan según su clasificación celular y según el compromiso de la edad de la línea.

Estos no son órganos completos sino solo una parte del tejido que imita el funcionamiento molecular y celular del órgano con un nivel de detalle espectacular, es muy difícil conseguir la organización real, pero es similar su función. **Son órganos en miniatura que se obtienen in vitro a partir de células madre.**

Estos suponen un desarrollo "in vivo" de órganos humanos cuyo resultado es más preciso que lo que puede llegar a obtenerse con animales de experimentación.

Para obtener un organoide se debe cultivar esas células madres en un medio especial que permita su crecimiento y desarrollo tridimensional, es decir que no es sobre una placa petri, para ello se utilizan factores de crecimiento o inhibidores específicos de algunas rutas de señalización celular (6,7)



Figura 2: Organoides cerebrales como modelos del crecimiento cerebral y microcefalia.(8)

Hasta ahora se han realizado métodos donde se utilizan factores de crecimiento o combinación de nutrientes para derivar en el tejido precursor del órgano. Se tiene que aplicar un cultivo tridimensional, a menudo se utilizan geles de matriz extracelular como el Matrigel, ricos en laminina, que actúan como almacén de sostén para el tejido que va creciendo. Todo esto le confiere la capacidad de autoorganizarse a través de la clasificación celular y el compromiso del linaje para la organización de los diferentes tipos de células.

Tras el anclaje en el Matrigel que sirve como soporte, para el cultivo celular tridimensional se utilizan biorreactores de vasos de pared giratorio, su éxito se debe a que los cultivos celulares pueden abastecerse mejor de nutrientes y alcanzan estadios de maduración mayor que en los cultivos tradicionales en placa Petri. En ellos se simula el medio natural en el que crece un embrión y se pueden controlar parámetros como el pH y la temperatura.

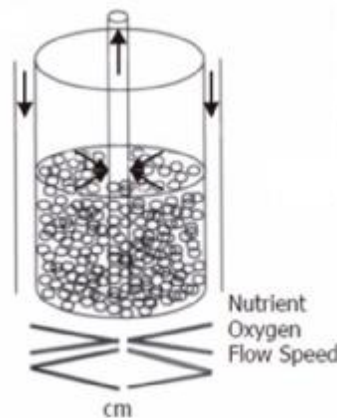


Figura 3: Biorreactor.(9)

Los agregados celulares se sitúan en un recipiente cilíndrico giratorio con un núcleo poroso en el centro para proporcionar un medio de cultivo y para poder expulsar los desechos mediante perfusión. La velocidad de rotación del vaso es clave para mantener los agregados celulares en suspensión estacionaria, y mantener la solución en una constante y lenta oscilación. Esto permite una transferencia de masa eficiente de factores exógenos y se evita el daño tisular por interacciones mecánicas con las paredes.(10)

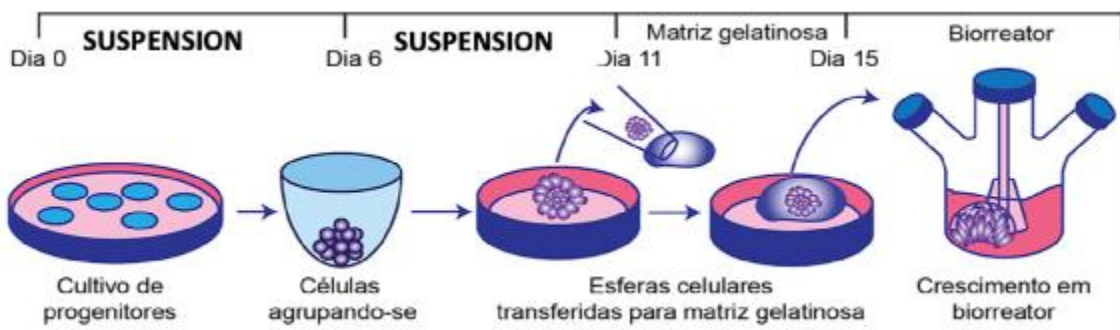


Figura 4: Formación de organoides.(11)

Esto permite modelar el desarrollo de órganos humanos muy similar al desarrollo in vivo. A día de hoy se ha demostrado que organoides del cerebro y la retina muestran propiedades que recapitulan el desarrollo de los órganos humanos y que no se puede estudiar ni observar en animales por diferencias notables.

Los organoides tienen limitaciones, ya que no contienen células que dan soporte al tejido, solo se obtiene la parte epitelial del tejido y además su vascularización es deficiente, es decir no tienen suministro de sangre.

El pionero de los organoides es **Hans Clevers** un especialista en células madre de la Universidad de Utrecht, en los Países Bajos, que en **2009** su equipo describió por primera vez un intestinoide de ratón, esto se consiguió con células madre del propio intestino. Este descubrimiento puede llegar a ser muy útil para poder probar fármacos y saber la respuesta que tendrán pacientes de fibrosis quística y cáncer de colon.

A partir de este descubrimiento empezaron a investigar la capacidad de formar otros organoides, teniendo más dificultades ya que el intestino es el órgano con mayor tasa de regeneración del cuerpo, ningún otro tejido se regenera a una velocidad semejante, por lo que es un trabajo más complejo.

Su investigación concluyó en que esa regeneración se debía a la cantidad de células madre específicas que se encuentran en ese órgano. El propio Clever explicó ``Hay células madre en todos los órganos``(3)

3 OBJETIVOS

- Aportar información sobre qué son los organoides, sus usos y limitaciones.
- Mostrar la importancia de las células madre para su formación.
- Recopilar información sobre los últimos avances en organoides.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología llevada a cabo para la elaboración del trabajo ha consistido en una revisión bibliográfica exhaustiva de artículos de ámbito científico de los últimos años, revistas nacionales como Diario Médico, Investigación y Ciencia, y Mente y cerebro e internacionales de gran prestigio como es Nature.

Para la búsqueda de artículos se emplearon buscadores científicos como Scielo, Pubmed, Scindirect, PubMed y BUCea que es la biblioteca perteneciente a la Complutense donde se puede acceder a artículos científicos.

Para buscar la información para elaborar dicho trabajo he utilizado las palabras: ``organoids``, ``bioreactors`` , ``stem cell``, ``microcephaly`` , ``Induced pluripotent stem cells (iPS)`` , ``Embryonic stem cells (ESC)`` entre otras.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A día de hoy se está practicando la experimentación con células pluripotenciales para la formación de diferentes organoides. La continua experimentación está dando buenos resultados, permitiendo conocer mejor la formación de dichos órganos y determinar los factores que necesitan para su desarrollo. A pesar de los incesantes obstáculos que están encontrando los investigadores cada vez están más cerca de la utilización de organoides para la eficacia de posibles terapias.

5.1 ESTÓMAGO

El estómago se divide en dos áreas anatómicamente distintas: el corpus (cuerpo principal del estómago) y el antro pilórico (área cercana al intestino). El cuerpo es responsable de las funciones digestivas del estómago, segregando ácido clorhídrico y zimógenos, mientras que el antro pilórico produce principalmente moco y hormonas gástricas

En el **corpus**, encontramos células mucosas superficiales también conocidas como células pit, células parietales o células secretoras de ácido, células principales, que contienen gránulos de zimógeno y secretan la enzima pepsinógeno y endocrina o células productoras de hormonas. En contraste, en el **antro** pilórico, la composición de la unidad gástrica es mucho más simple, y consiste principalmente en células mucosas que secretan mucina gástrica protectora células enteroendocrinas y células parietales ocasionales

El epitelio gástrico, como el epitelio intestinal, está experimentando una renovación celular continua. El estudio de la rotación del epitelio gástrico en ratones adultos mediante el etiquetado de timidina tritiada mostraron que, con la excepción de las células parietales y principales, las demás células de las unidades gástricas migran hacia la superficie del epitelio eliminándose.

Debido a su capacidad regenerativa se empezó a investigar sobre la posibilidad de que fuera por células madres estomacales. Se encontraron ciertas células con la característica de no contener gránulos y se propuso que estas células libres de gránulos actúen como células madre multipotentes que dan origen a células progenitoras de fosas, parietales y cuello, que a su vez se diferencian en sus respectivos linajes celulares.

Se cultivó con anterioridad el antro gástrico a partir de células madres embrionarias, en cambio el cuerpo gástrico hasta ahora solo se había realizado a partir de células adultas del estómago, estas tienen información de que son células gástricas y aportan las características del cuerpo gástrico.

Los autores de la creación de organoides del cuerpo gástrico a partir de células madres embrionarias tuvieron que enfrentarse a dos retos. El primero era el desconocimiento de la regulación espacial y temporal de las proteínas específicas para desarrollar el cuerpo gástrico. Y el segundo reto era cómo inducir o mantener la formación de células parietales, porque éstas desaparecían.

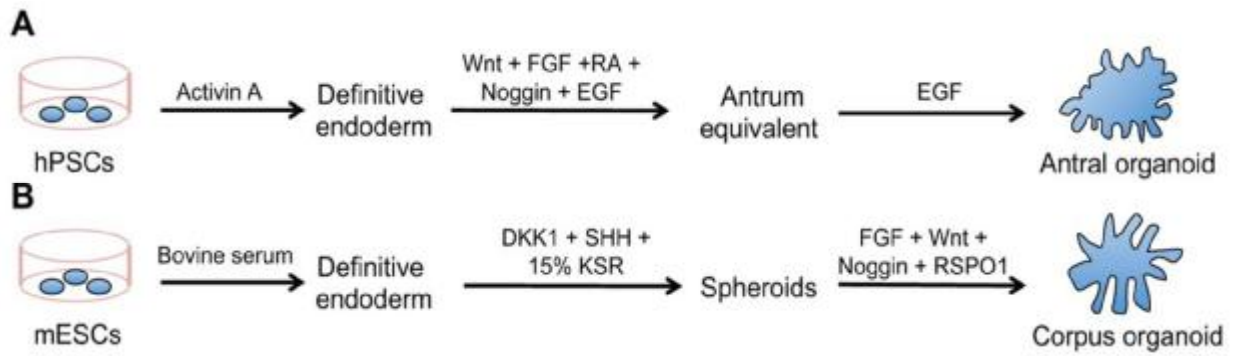


Figura 5: Crecimiento del antro y cuerpo gástrico. (12)

Estudiaron embriones de ratón, siguieron y manipularon la etapa de desarrollo del cuerpo gástrico para descubrir que factores necesitaban. Descubrieron 3 factores transcripcionales codificados por los genes: *Irx2*, *Irx3* e *Irx5*.

El grupo que llevó a cabo el estudio, utilizó un protocolo basado en la aplicación de diferentes factores de crecimiento para que las células madres embrionarias formaran precursores del intestino anterior.

Se descubrió que la señalización **wnt-b-catenina** era esencial para la diferenciación y proliferación celular. Probaron a eliminar la proteína b-cateína de las células epiteliales que recubren el estómago en desarrollo. Esto permitió descubrir que la señalización Wnt es restrictivo, es decir, impide la aparición del antro gástrico mientras que estimula el crecimiento del intestino colindante.

Así llegaron a la conclusión de otra función de **wnt** como era la de promover el crecimiento del cuerpo gástrico por medio del antro gástrico.

El segundo reto que tuvieron que afrontar fue conocer los mecanismos de señalización que provocan el desarrollo de las células parietales y descubrieron que la inhibición de la señalización **MEK** aumentaba la expresión de genes específicos de las células parietales. Y esto lo hacía mediante un tratamiento con las proteínas **BPM4**, que son un factor de crecimiento.

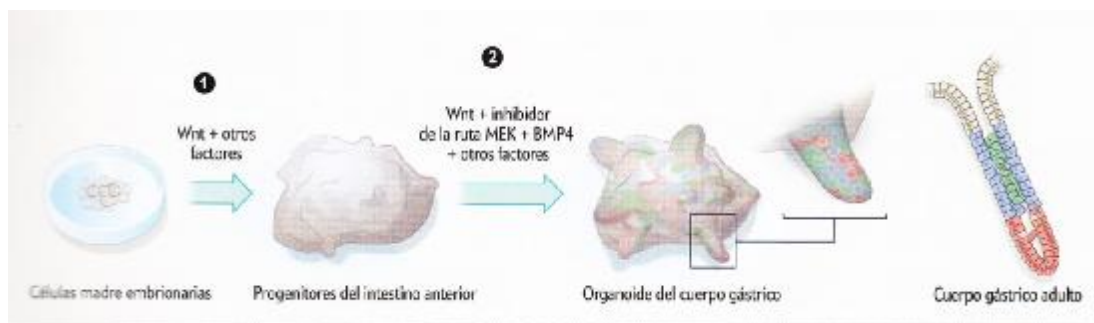


Figura 6: Formación de organoides de cuerpo gástrico.(13)

Este trabajo tiene grandes repercusiones en el estudio del epitelio gástrico, en especial en la forma en el que el estómago responde a la pérdida gradual de células parietales como sucede en la gastritis autoinmunitaria, por otro lado, también encontramos la destrucción de estas células por la infección de *Helicobacter pylori* que aumenta el riesgo de cáncer de estómago de los pacientes. Estudiando los organoides del estómago se comprobó que cuando el estómago sufre una herida las células epiteliales del estómago adultas sufren una reprogramación volviendo a su estado más indiferenciado e inmaduro, y esto ocurre por la regulación de diferentes rutas de señalización que ocurren durante el desarrollo.

Aunque haya sido un gran paso para conocer las señales que mandan el desarrollo del cuerpo gástrico hay un inconveniente, y es que este organoide se asemeja al estómago fetal, no sirve como muestra de un cuerpo gástrico maduro ya que las células principales están inmaduras, de manera que no tienen utilidad clínica ni pueden usarse como modelos experimentales.

También encontramos un obstáculo como es el de hacer pases repetidos, que es repartir los organoides en diferentes placas de cultivos de tejidos para evitar el crecimiento en exceso da una pérdida paulatina de células parietales por lo que es una gran limitación ya que no puede expandirse una población inicial de células de un individuo para generar suficientes organoides para llevar a cabo la experimentación. (12,14)

Esto nos indica que se necesitan otras moléculas señalizadoras en el medio de cultivo que hoy son desconocidas.

5.2 HÍGADO

El hígado tiene una función y estructura compleja por lo que se requieren soluciones para poder tratar las enfermedades hepáticas, hasta ahora la única opción curativa es el trasplante de hígado, pero es algo complejo debido a la escasez de donantes, por eso ha habido un creciente interés en la investigación de ingeniería de tejidos.

Se ha llegado al descubrimiento de sistemas de cultivo para la formación de organoides similares al hígado a partir de células madre hepáticas, aunque a día de hoy no se haya conseguido, se sigue investigando para llegar a la recreación del tejido trasplantable a partir de células madre autólogas o alogénicas.

Los organoides hepáticos son adecuados para la ingeniería de tejidos y los enfoques de terapia con células madre debido a su capacidad proliferativa, tienen la capacidad de dar origen a aproximadamente un millón de células de una sola célula madre en unos meses, además tienen gran estabilidad genética y no sufren mutaciones adquiridas durante los meses de cultivo.

Se llevaron a cabo experimentos con las células iPS pero no imitaban por completo todas las características de los hepatocitos, lo cual ha obligado a buscar otras alternativas. Las células del estroma mesenquimatoso, es decir las **células madre mesenquimales (MSC)** son células madre adultas multipotentes que se plantearon como otra forma alternativa ya que estas tienen una plasticidad y una capacidad de diferenciación multidireccional y sí que pueden diferenciarse en células similares a hepatocitos en contra posición con las iPS.

Descubrieron que las células madre mesenquimales que son células madre adultas multipotentes con capacidad de diferenciarse en hepatocitos, desempeñan un papel muy importante en la formación de la estructura tridimensional. La diferenciación puede inducirse por factores de crecimiento de hepatocitos mediante el co-cultivo con hepatocitos. Las MSC tienen un posible efecto hepatoprotector basado en la secreción de factores que pueden modular las células del sistema inmune y efectos antiapoptóticos. Se sabe que hay factores que liberan las MSC que son esenciales para la formación de organoides, pero a día de hoy no se han identificado.(15)

Para conseguir la formación del organoide hepático se utilizaron unas células adultas diferenciadas de upcyte. Estas células son cepas celulares que se modifican genéticamente, estas se derivan de células humanas primarias que se extraen de la estructura ductal del hígado o el páncreas. Por traducción lenti-viral de genes o combinaciones de genes inducen la capacidad de proliferación transitoria ya que esos genes codifican factores inductores de la proliferación, lo que permite controlarla y producir hasta 40 duplicaciones de población. Estas células al retirarles los factores estimulantes de proliferación adquieren las características de las células más primarias.

Gracias al estudio que se llevó a cabo se consiguió la formación de organoides hepáticos in vitro a partir de células adultas diferenciadas de upcyte de **células madre mesenquimales (MSC)**, **células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC)**, estas son células endoteliales capaces de endocitar macromoléculas y coloides fisiológicos y extraños de la sangre, y **hepatocitos**.(16)

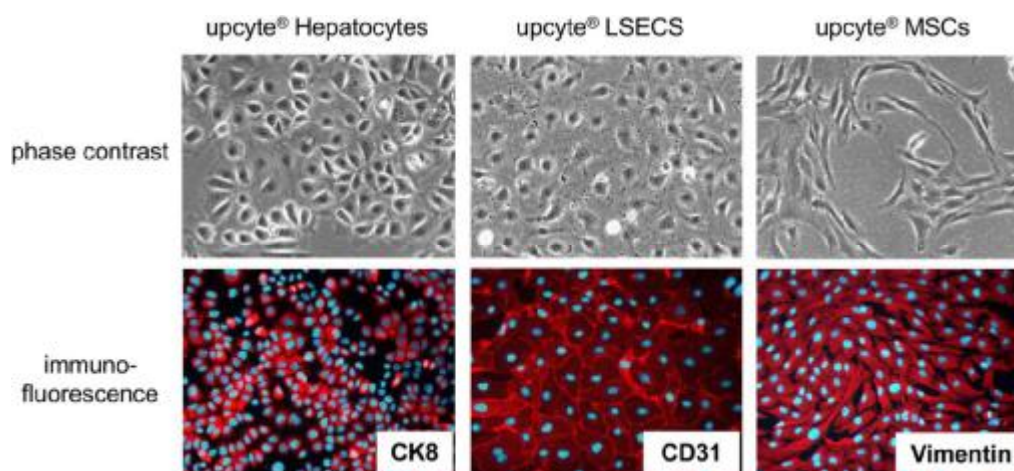


Figura 7: Células mesenquimales, LSECS y hepatocitos upcyte en cultivo monocapa.(16)

Cabe destacar las ventajas que ofrecen las células upcyte frente a células primarias de fuentes humanas, y es que las células upcyte presentan fenotipos celulares primarios que se obtienen del donante y que pueden satisfacer la demanda, en cambio las células primarias muestran un fenotipo inestable y producen resultados variados dependiendo de los donantes y efectividad variable del aislamiento.(17)

Las técnicas principales que se llevaban a cabo en la construcción celular en 3D mediante la formación de esferoides, que consiste en la autoagregación de las células, o cultivo en sándwich que es la construcción de estructuras similares al tejido, se colocan hojas de células y componentes de la matriz extracelular unos encima de otros. Pero los esferoides tienen una gran

desventaja que es que las células se organizan espacialmente de forma aleatorio, no se distribuyen de la misma manera que los hepatocitos polarizados en una situación in vivo. Debido a estos inconvenientes se suele utilizar la formación en sándwich que es la de colocar células unas encima de otras.

Como se comentó anteriormente se utilizaron tres tipos de células humanas upcyte como son los hepatocitos, las células endoteliales sinusoidales del hígado (LSEC) y las células madre mesenquimales (MSC). Estas se cultivaron in vitro en una capa de Matrigel, y las células se autoorganizaron para formar un organoide hepático y dieron estructuras a las 24 horas.

Se llegaron a cultivar más tiempo, durante unos 10 días en biorreactores y pudieron observar que el organoide hepático que se obtenía tenía las características funcionales del parénquima hepático, incluyendo las actividades de los citocromos P450, CYP3A4, CYP2B6 Y CYP2C9. A su vez vieron que expresaba el ARNm de varios genes marcadores y otras enzimas, y que mostraban la morfología hepática típica. Se pudo indicar mediante técnicas inmunohistoquímicas y PCR que expresaban marcadores de polaridad, que sintetizan albúmina en un grado comparable a los hepatocitos primarios humanos y que llevan a cabo el metabolismo de la glucosa.

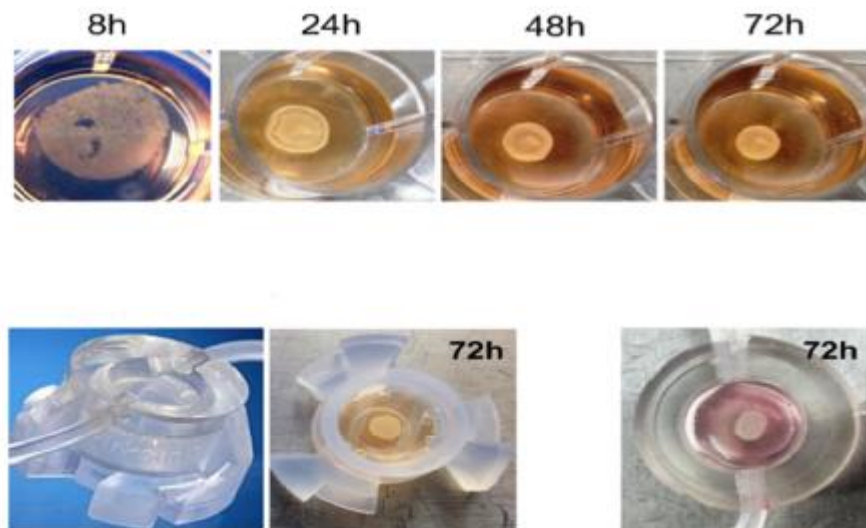


Figura 8: Formación de organoide hepático. (16)

Estos organoides son modelos ex vivo del órgano y son muy útiles para el estudio de las funciones hepáticas, inflamación, cirrosis o fibrogénesis, así como para el estudio farmacológico y toxicológico de fármacos.

Hoy en día se utiliza para probar tratamientos y el estudio fisiológico del órgano, pero estos cultivos son prometedores para el posible trasplante de hepatocitos.

Debido a la capacidad de expansión y diferenciación de los cultivos hepático se ha facilitado el injerto y repoblación de hígados de ratones que padezcan enfermedad metabólica y que restablezcan parcialmente su función hepática. Se está comprobando si también puede aplicarse a la alteración de la función biliar como puede ser la atresia biliar. Los cultivos de organoides hepáticos podrían adoptar un destino biliar y ser fuente de células madre para poder tratar las colangiopatías.

Este experimento ha dado esperanzas y se ve a los organoides hepáticos como una fuente alternativa de tejido trasplantable en un futuro. Se podrían formar a partir de células autólogas lo cual provocaría menos complicaciones respecto al rechazo y supresión inmunológica. Pero todavía hay barreras que superar como son los hidrogeles, los cuales permiten que las células se autoorganicen en formas esféricas, son similares a la membrana basal colagenosa, pero estos carecen de la complejidad de la matriz extracelular característica, tienen una bioactividad insuficiente, y no siempre son biodegradables.(18,19)

5.3 CEREBRO

Los organoides cerebrales, también llamados mini-cerebros son bolas de células cerebrales humanas, estas crecen y forman estructuras similares a las del cerebro en dos meses.

Estos organoides miden entre 4 y 6 milímetros, se crean a partir de células iPS formadas a partir de células de la piel de adultos y sus características le confieren una similitud al cerebro humano en etapas iniciales de la gestación.

Hay un motivo por el que hoy en día la investigación de mini-cerebros está en auge y es la diferencia entre los cerebros humanos y los de los roedores, estos últimos no tienen pliegues, su superficie es lisa en contraposición a la superficie plegada del cerebro humano. Los neurobiólogos creen que el plegamiento es una diferencia significativa para el funcionamiento del cerebro humano, que permite colocar mucho más volumen en un mismo volumen, además las neuronas se originan a partir de un conjunto de células precursoras que en ratones son escasas.(8)

Esto puede ser la causa del porqué no se ha encontrado cura para trastornos mentales como son la esquizofrenia, epilepsia o autismo. Ya que si se estudian mutaciones que afectan al desarrollo o que afectan a la arquitectura del cerebro humano o a células que solo posee nuestra especie el estudio en ratones está condenado a fracasar.

El procedimiento para la formación de los mini cerebros se basa en células madres pluripotentes como son las células embrionarias o las células iPS que se obtienen reprogramando células cutáneas adultas.

Lancaster y Knoblich elaboraron un procedimiento para la elaboración de organoides cerebrales.

Parten de células IPS o ESC capaces de convertirse en cualquier tipo celular. Estas células se dividen y se agregan y forman unas bolas que se llaman **cuerpos embrioides**, que tras 3 días van a formar las diferentes capas: ectodermo, mesodermo y endodermo.

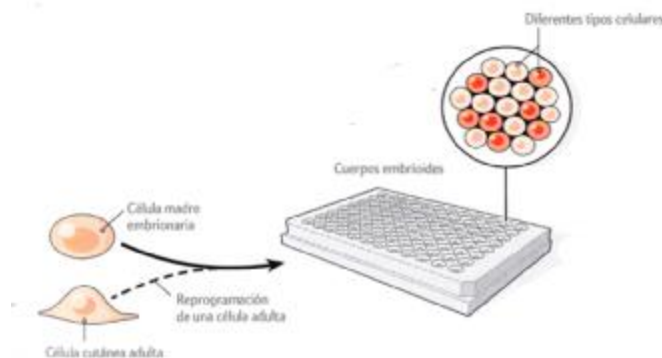


Figura 9: Formación de cuerpos embrioides a partir de IPS, ESC o células adultas.(20)

Estos cuerpos embrioides se cultivan en un líquido con los nutrientes necesarios para el crecimiento del neuroectodermo, se organizan en capas y dan lugar al tejido embrionario que conforma el cerebro humano.

Tras el décimo día los cuerpos embrioides se introducen en Matrigel, este gel se obtiene tras cultivar células de un tumor cartilaginoso de un roedor, el gel se asemeja a la membrana en la que se asientan las células del feto. Contiene factores que estimulan la división celular y que evita la muerte de estas, además es un soporte suficientemente rígido para que las células puedan agarrarse y suficientemente maleable para que las células puedan modificar su forma. Tras 15 días se forma un tejido tridimensional con cámaras llenas de líquido, que recuerdan a los ventrículos cerebrales con líquido cefalorraquídeo.

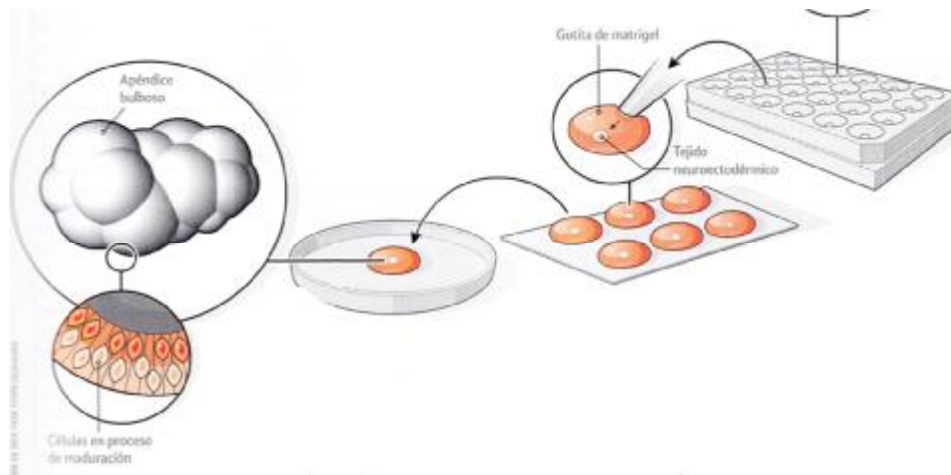


Figura 10: Cultivo de los cuerpos embrioides en Matrigel.(20)

Se transfieren gotas de Matrigel a un biorreactor que dispone de un sistema de agitación para proporcionar nutriente y oxígeno y se forman bolas blancas de tejido que se asemejan al cerebro de un embrión humano y dan lugar a los 20-30 días a réplicas del prosencéfalo humano de un embrión de 10 semanas responsable de las funciones mentales superiores. Incluyen componentes como la corteza y el plexo coroideo.

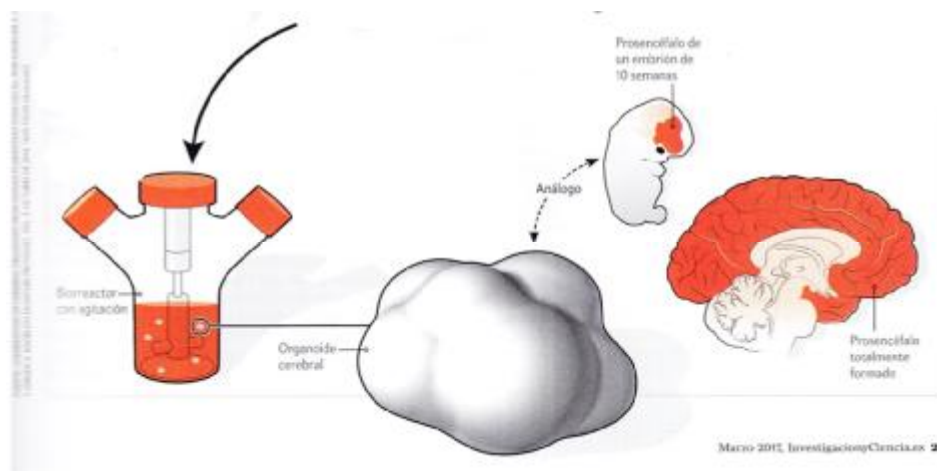


Figura 11: Formación de bolas blancas. (20)

Tras las 8 semanas estos minicerebros desarrollan cuatro tipos de neuronas y dos tipos de células estructurales como son los astrocitos y oligodendrocitos, que generarán mielina. Además, estos presentan actividad electrofisiológica espontánea.

Los organoides cerebrales obtenidos in vitro no contienen todas las estructuras del cerebro en desarrollo, no presentan las seis capas de la neocorteza humanas, además carecen de células inmunitarias y vasos sanguíneos, lo que provoca que no puedan nutrirse, por eso su crecimiento para a los 2 meses y su tamaño no supera los 6 milímetros. A parte de esas limitaciones se necesitan la estandarización de la formación de organoides porque los mini-cerebros producidos en distintos laboratorios presentan grandes diferencias.

Pero dejando a un lado sus limitaciones, el mini cerebro supone un gran descubrimiento, ya que facilitan la investigación del desarrollo de la corteza cerebral humana y de las causas de algunas malformaciones, ya que los ratones presentan limitaciones por su estructura cortical. Y por otro lado tienen una ventaja en las cuestiones éticas clásicas ya que se pueden usar las células pluripotenciales inducidas y evitar el uso de células madre embrionarias.

Knoblich, el pionero de los mini cerebros, y su equipo cultivaron organoides cerebrales que mostraban indicios de microcefalia, las personas que lo padecen tienen la cabeza y el cerebro de un tamaño menor, además de limitaciones psíquicas y motoras y alteraciones auditivas y de la visión. Tomaron células de la piel de un paciente que padecía una variante genética de microcefalia y las reprogramaron formando células iPS y llevando a cabo el proceso de formación de los mini-cerebros. Hallaron que los organoides de pacientes enfermos tenían muchas neuronas ya formadas pero pocas células precursoras.

Se propone que en pacientes con microcefalia durante la formación embrionaria las células madres forman neuronas demasiado pronto en lugar de seguir dividiéndose y aumenta el número de células precursoras, por lo que terminarían formando menos neuronas.

Se llevaron a cabo experimentaciones con células iPS derivadas del paciente y ARN de horquilla corta (shRNA) en los organoides para modelar la patogénesis de la microcefalia primaria dependiente de la pérdida de la proteína CD5RAP2 y pudieron comprobar que había una diferenciación neural prematura, por lo que se llegó a la conclusión de que la pérdida de la proteína CDK5RAP2 conducía a una gran diferenciación prematura neural en comparación con pacientes que sí la tenían. Y esto pudo estudiarse gracias a la formación de mini-organoides ya que la población de progenitores neurales de los ratones no se expande de la misma forma que en los humanos en el origen de la neurogénesis por lo tanto con los ratones no podía estudiarse.(21)

La microcefalia también puede surgir por otras causas como es el virus del Zika. Se estudió el efecto del virus en el tejido cerebral humano y se cultivaron organoides siguiendo el método de Knoblich y se vieron como los cultivos infectados crecían un 40% menos, estos organoides presentaban estructuras anormales, células alteradas y lesiones en las membranas. En un futuro estos organoides podrían servir para identificar el receptor que utiliza el virus para poder entrar en las células, y se podrán probar posibles fármacos en ellos antes de administrárselo a pacientes en ensayos clínicos.(22)

6 CONCLUSIONES

1. Los organoides presentan la misma estructura y funcionamiento de un órgano, lo que permitirá probar terapias y en el futuro fabricar tejidos, sirviendo como modelo de enfermedades para su análisis y evaluación de la eficacia de distintas terapias.
2. Los organoides son un modelo de desarrollo in vivo de órganos humanos muy superior al que puede lograrse con animales de experimentación.
3. Los organoides son el primer paso para obtener órganos que puedan ser trasplantados, pero para ello hay que solucionar varias cuestiones:
 - El número de células que podemos expandir para generar órganos con el tamaño necesario para poder ser utilizado.
 - La revascularización adecuada que permita trasplantarlos sin inducir coagulación por contener vasos sanguíneos aún muy inmaduros.
4. En la actualidad se están utilizando para probar fármacos que eviten la progresión de enfermedades y comprender como se desarrollan nuestros tejidos y órganos.
5. En un futuro no muy lejano, los organoides podrán solucionar el problema de escasez de órganos para trasplantes sin posibilidad de rechazo.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas [Internet]. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000300001
2. Prósper F, Gavira JJ, Herreros J, Rábago G, Luquin R, Moreno J, et al. Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre. An Sist Sanit Navar [Internet]. agosto de 2006 [citado 8 de mayo de 2019];29:219-34. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1137-66272006000400018&lng=es&nrm=iso&tlng=es
3. Araújo SJ. La biorregeneración: el reto de generar órganos humanos. Barcelona; Ciudad de México, Mexico: RBA Coleccionables : RBA Editores; 2017.
4. “ La revolución de los organoides” – Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC) [Internet]. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.ibecbarcelona.eu/es/la-revolucion-de-los-organoides-2/>
5. Prósper F, Verfaillie CM. Células madre adultas. An Sist Sanit Navar [Internet]. diciembre de 2003 [citado 13 de mayo de 2019];26(3):345-56. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1137-66272003000500002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
6. «Miniórganos», el último hito de la bioingeniería [Internet]. Diariomedico.com. 2014 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.diariomedico.com/especialidades/genetica/miniorganos-ultimo-hito-bioingenieria.html>
7. Los organoides alcanzan la madurez como modelos de enfermedades [Internet]. Diariomedico.com. 2018 [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.diariomedico.com/especialidades/los-organoides-alcanzan-la-madurez-como-modelos-de-enfermedades.html>
8. Pequeños cerebros -artificiales para investigar [Internet]. Investigación y Ciencia. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/mente-y-cerebro/altamente-sensible-700/pequeos-cerebros-artificiales-para-investigar-15062>
9. Saito M, Matsuura T, Masaki T, Maehashi H, Shimizu K, Hataba Y, et al. Reconstruction of liver organoid using a bioreactor. World J Gastroenterol WJG [Internet]. 28 de marzo de 2006 [citado 8 de mayo de 2019];12(12):1881-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4087513/>
10. DiStefano T, Chen HY, Panebianco C, Kaya KD, Brooks MJ, Gieser L, et al. Accelerated and Improved Differentiation of Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells in Rotating-Wall Vessel Bioreactors. Stem Cell Rep [Internet]. 9 de enero de 2018 [citado 8 de mayo de 2019];10(1):300-13. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213671117304873>
11. que C descobriram. Organoides, muito mais que apenas órgãos em miniatura! [Internet]. Cientistas descobriram que... «CDQ». 2017 [citado 13 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://cientistasdescobriramque.com/2017/05/16/organoides-muito-mais-que-apanas-orgaos-em-miniatura/>
12. Kim T-H, Shivdasani RA. Stomach development, stem cells and disease. Development [Internet]. 15 de febrero de 2016 [citado 8 de mayo de 2019];143(4):554-65. Disponible en: <http://dev.biologists.org/content/143/4/554>
13. Estómagos en una placa de Petri [Internet]. Investigación y Ciencia. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y->

ciencia/un-xito-en-la-lucha-contra-el-alzheimer-706/estmagos-en-una-placa-de-petri-15304

14. Stange DE, Koo B-K, Huch M, Sibbel G, Basak O, Lyubimova A, et al. Differentiated Troy+ Chief Cells Act as Reserve Stem Cells to Generate All Lineages of the Stomach Epithelium. *Cell* [Internet]. 10 de octubre de 2013 [citado 8 de mayo de 2019];155(2):357-68. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867413011458>

15. Concise Review: Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Acute Liver Failure and Cirrhosis - Volarevic - 2014 - STEM CELLS - Wiley Online Library [Internet]. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://stemcells.journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/stem.1818>

16. Ramachandran SD, Schirmer K, Müntz B, Heinz S, Ghafoory S, Wöfl S, et al. In Vitro Generation of Functional Liver Organoid-Like Structures Using Adult Human Cells. *PLOS ONE* [Internet]. 21 de octubre de 2015 [citado 8 de mayo de 2019];10(10):e0139345. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139345>

17. Burkard A, Dähn C, Heinz S, Zutavern A, Sonntag-Buck V, Maltman D, et al. Generation of proliferating human hepatocytes using upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica* [Internet]. 1 de octubre de 2012 [citado 13 de mayo de 2019];42(10):939-56. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/00498254.2012.675093>

18. Shu S-N, Wei L, Wang J-H, Zhan Y-T, Chen H-S, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* [Internet]. 1 de octubre de 2004 [citado 8 de mayo de 2019];10(19):2818-22. Disponible en: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v10/i19/2818.htm>

19. From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix - ScienceDirect [Internet]. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/bucm.idm.oclc.org/science/article/pii/S1521691817300240>

20. Cerebros de laboratorio [Internet]. *Investigación y Ciencia*. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/cerebros-de-laboratorio-699>

21. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly | *Nature* [Internet]. [citado 8 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www-nature-com.bucm.idm.oclc.org/articles/nature12517>

22. Lavazza A, Massimini M. Cerebral organoids: ethical issues and consciousness assessment. *J Med Ethics Lond* [Internet]. 2018 [citado 8 de mayo de 2019];44(9). Disponible en: <http://search.proquest.com/docview/2098378554/abstract/958CBD8E5AE54E14PQ/1>