

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***TRASPLANTE ALOGÉNICO DE METANEFROS: UNA SOLUCIÓN A LAS ENFERMEDADES RENALES CRÓNICAS***

TRABAJO FIN DE GRADO

ALUMNA: Silvia Vicente Ferrer

TUTOR: Francisco Marco Jiménez

*Curso Académico: 2013-2014*

**VALENCIA, Julio**

*Licencia Creative commons*



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL  
MEDIO NATURAL

Ficha resumen del Trabajo  
Fin de Grado

### Datos personales

Nombre y apellidos: Silvia Vicente Ferrer

### Datos del trabajo de fin de grado

Titulo del TFG: Trasplante alogénico de metanefros: una solución para las enfermedades renales crónicas

Lugar de realización: Laboratorio de biotecnología de la reproducción – Dpto. Ciencia Animal

Localidad y fecha de lectura: Valencia, Julio de 2014

Titulación: Grado en Biotecnología

Especialidad: Biotecnología animal y humana

Tutor: D. Francisco Marco Jiménez

### Resumen

El número de trasplantes de órganos está determinado por la disponibilidad de estos, y en concreto el riñón es uno de los órganos más demandados. En la actualidad, a pesar de los esfuerzos por aumentar el número de donantes de riñón, como consecuencia de los cambios demográficos y de la creciente incidencia de algunas enfermedades renales crónicas, la demanda es cada vez mayor, incrementándose las listas de espera de pacientes a la espera de un riñón.

Una alternativa novedosa que se está estudiando es el uso de riñones embrionarios que se desarrollen *in vivo*. Además, el desarrollo de la criobiología, en concreto la vitrificación, abre en la actualidad la posibilidad de conservar órganos a largo plazo. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto que dos medios de vitrificación distintos, el VM3 y el M22, presentan sobre el desarrollo *in vivo* de metanefros procedentes de embriones de 16 días de conejo de raza neozelandesa. Para ello, se extrajeron quirúrgicamente los metanefros de embriones de 16 días y se vitrificaron utilizando los medios de vitrificación VM3 y M22. Posteriormente, se realizaron las transferencias de los metanefros vitrificados y tras 3 semanas de crecimiento en los receptores se procedió a su extracción para su evaluación morfológica e histológica. El estudio histológico reveló la presencia de nefronas en todos los metanefros obtenidos. Este estudio permite concluir que tanto el medio de vitrificación M22 como el VM3 permiten el desarrollo *in vivo* de metanefros de 16 días.

## Palabras clave

Riñón, embrionario, metanefro, vitrificación, M22 y VM3

## Resum

El nombre de trasplantaments d'òrgans, està determinats per la disponibilitat d'òrgans i en concret el renyó és un dels òrgans més demandats. Actualment, malgrat els esforços per augmentar el nombre de donants de renyó, com a conseqüència dels canvis demogràfics i de la creixent incidència d'algunes malalties renals cròniques, la demanda és cada vegada més gran, incrementant-se les llistes d'espera als hospitals de pacients que esperen un renyó.

Una de les alternatives que s'està estudiant és l'ús de renyons embrionaris que es *desenvolupen in vivo*. L'objectiu d'aquest estudi és avaluar l'efecte que dos medis de vitrificació diferents, el VM3 i el M22, presenten sobre aquest desenvolupament *in vivo* de metanefros procedents d'embrions de 16 dies de conilles de raça neocelandesa. Per a això es van extreure quirúrgicament els metanefros d'embrions de 16 dies i es van vitrificar utilitzant els medis de vitrificació VM3 i M22. Posteriorment es van realitzar les transferències dels metanefros vitrificats conills adults. Després de 3 setmanes de creixement en els hostes es va procedir a la seua extracció, i els resultats van mostrar que no només els frescos proliferaven, sinó que també ho feien els vitrificats. A més, l'estudi histològic va revelar la presència de nefrones en tots els metanefros obtinguts. Aquest treball permet concloure que tant el medi de vitrificació M22 com el VM3 permeten el desenvolupament *in vivo* de metanefros de 16 dies.

## Palabras clave

Ronyó, embrionari, metanefro, vitrificació, M22, VM3

## Abstract

The number of organ transplants is determined by the availability of these, and specifically the kidney is one of the most demanded. Nowadays, despite the effort to raise the number of kidney donors, as a consequence of demographic changes and the increasing incidence of some chronic kidney diseases, the demand is growing, increasing the wait list of people awaiting a kidney. A novel alternative that is being studied is the use of embryonic kidneys developed *in vivo*. Furthermore, the development of cryobiology, especially vitrification, opens the possibility of long-term organ storage. The objective of this study is to evaluate the effect that two vitrification means, VM3 and M22, have upon the *in vivo* development in metanephros obtained from 16 day embryos. For this task, the metanephros of the 16-day embryos from rabbits were surgically extracted and vitrified using VM3 and

M22. After that, the transferences of the vitrified metanephros were performed, and after three weeks of growth in the recipients the extraction was performed to evaluate their morphology and histology. The histologic study revealed the presence of nephrons in all of the obtained metanephros. This study allows to conclude that both vitrification means allow the in vivo development of 16-day metanephros.

**Key words**

Kidney, embryonic, metanephroi, vitrification, VM3, M22

## - AGRADECIMIENTOS-

---

Supongo que es un tanto irónico que ésta sea, con diferencia, la parte que me resulta más complicada de escribir, verdad? Pero no complicada en un sentido negativo, sino todo lo contrario, complicada porque creo que es prácticamente imposible conseguir sintetizar en unas breves líneas a todos esos pilares que, a lo largo de los años han permitido de una forma u otra construir lo que ahora soy, y han hecho posible que llegado este punto me enfrente a esta compleja y a la vez bonita tarea: la de escribir los agradecimientos de mi trabajo de final de grado. Sin embargo, he dicho prácticamente pero no imposible, así que allá va mi humilde intento:

En primer lugar, cómo no, agradecer a mi familia, agradecer que me aguanten en momentos en los que ni siquiera yo soy capaz de hacerlo, que me brinden su apoyo incondicional, y que me den las fuerzas necesarias para seguir adelante siempre que el camino se vuelve rocoso y difícil.

Agradecer también a mis amigos y amigas sin los cuales nada sería lo mismo. Con ellos he perdido la noción del tiempo, y si intento hacer memoria, pierdo también la cuenta de todos los momentos inmejorables que hemos pasado juntos. Esto no tendría sentido sin alguno de vosotros!

Sin duda también al departamento de Ciencia Animal, por adoptarme unos meses en el laboratorio y darme la oportunidad de haber crecido no sólo a nivel intelectual, sino también personal. Ha sido todo un honor formar parte por un tiempo de esa gran familia que sois.

Y por supuesto, el rinconcito más especial va para mi iaio Jesús, porque aunque la vida se lo llevó hace ya unos años y no podrá leer estas líneas, sigue habitando en nuestras memorias y sé que estará orgulloso allá donde esté. Gràcies per ensenyar-nos tant, gràcies pels teus refrans valencians, per les teues cançons, per aportar sembré llum i alegría a tots nosaltres... Mil gràcies per ser la millor persona del món, i damunt ser el meu iaio.

A todos y cada uno de vosotros, a los que formáis parte de mi vida y a los que, aunque no haya nombrado, habéis conseguido dejar huella aunque algunos hayáis tenido un paso fugaz por mi vida, un enorme GRACIAS. En mayúsculas. Porque el mundo es demasiado grande para caminar solo.

# ***I. ÍNDICE GENERAL***

# -ÍNDICE GENERAL-

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introducción y objetivo</b>         | <b>1</b>  |
| 1.1. Situación de los trasplantes renales | 1         |
| 1.2. Alternativas al déficit de órganos   | 3         |
| 1.3. Conejo como modelo animal            | 7         |
| 1.4. Conservación de órganos              | 9         |
| 1.5. Objetivos                            | 10        |
| <b>2. Material y métodos</b>              | <b>11</b> |
| 2.1. Recuperación de embriones            | 11        |
| 2.2. Obtención de metanefros              | 12        |
| 2.3. Vitrificación de metanefros          | 12        |
| 2.4. Desvitrificación                     | 14        |
| 2.5. Transferencia del metanefro          | 15        |
| 2.6. Valoración histológica               | 15        |
| 2.7. Análisis de datos                    | 16        |
| <b>3. Resultados</b>                      | <b>17</b> |
| <b>4. Discusión</b>                       | <b>21</b> |
| <b>5. Conclusiones</b>                    | <b>24</b> |
| <b>6. Perspectivas de futuro</b>          | <b>25</b> |
| <b>7. Referencias</b>                     | <b>27</b> |

## ***II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS***

## -ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS-

---

| <b>TABLA</b>   | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| <b>Tabla 1.</b> Incidencia anua, prevalencia anual y costes agregados de la diálisis peritoneal, la hemodiálisis y el trasplante renal                           | 2             |
| <b>Tabla 2.</b> Composición de los medios de vitrificación M22 y VM3   | 13            |
| <br>   |               |
| <b>FIGURA</b>  |               |
| <b>Figura 1.1.</b> <i>Número de personas en lista de espera para trasplante renal y número de trasplantes renales realizados desde 1991 hasta 2012 en España</i> | 3             |
| <b>Figura 1.2.</b> <i>Diseño experimental para la obtención de organoides a partir de células de riñones murinos</i>   | 6             |
| <b>Figura 1.3.</b> <i>Riñones antes y después de ser descelularizados</i>  | 7             |
| <b>Figura 1.4.</b> <i>Conejo de la raza Neozelandés</i>  | 8             |
| <b>Figura 2.1.</b> <i>Tracto uterino con embriones de 16 días</i>  | 11            |
| <b>Figura 2.2.</b> <i>Embrión de 16 días</i>   | 11            |
| <b>Figura 2.3.</b> <i>Diseción quirúrgica de un embrión para la extracción de los metanefros</i>   | 12            |
| <b>Figura 2.4.</b> <i>Metanefro de 16 días</i>   | 12            |
| <b>Figura 2.5.</b> <i>Método de mínimo volumen con Cryotop</i>   | 12            |
| <b>Figura 2.6.</b> <i>Esquema del procedimiento de vitrificación en 3 pasos</i>  | 14            |
| <b>Figura 2.7.</b> <i>Esquema del procedimiento de desvitrificación en 5 pasos</i>   | 14            |
| <b>Figura 2.8.</b> <i>Tubos de ensayo con los metanefros extraídos en solución de fijación de Bouin</i>  | 16            |
| <b>Figura 2.9.</b> <i>Riñón control de 37 días</i>   | 16            |
| <b>Figura 3.1.</b> <i>Histología de un embrión de 16 días</i>  | 17            |
| <b>Figura 3.2.</b> <i>Histología de un metanefro de 16 días bajo microscopio óptico</i>  | 17            |
| <b>Figura 3.3.</b> <i>Metanefros transferido durante 21 días irrigado por el sistema vascular de la receptora</i>  | 17            |
| <b>Figura 3.4.</b> <i>Metanefros extraídos tras 21 días de transferencia</i>   | 18            |
| <b>Figura 3.5.</b> <i>Imagen de la corteza del riñón control de 37 días, en el que aparecen indicadas las nefronas</i>   | 19            |
| <b>Figura 3.6.</b> <i>Imagen de la corteza de un metanefro fresco</i>  | 19            |
| <b>Figura 3.7.</b> <i>Metanefro vitrificado con M22</i>  | 20            |
| <b>Figura 3.8.</b> <i>Metanefro vitrificado con VM3 con las nefronas indicada.</i>   | 20            |

# **1. *INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS***

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Situación actual de las enfermedades renales crónicas

A día de hoy entre un 5 y 7% de personas en todo el mundo sufren alguna enfermedad renal crónica (Xinaris y Yokoo 2014). Desde los años 70, la situación de los enfermos renales crónicos ha mejorado de forma notable, de manera que si antes morían irremediablemente, a día de hoy se dispone de tratamientos sustitutivos de la función renal dañada en los mismos que prolonga la vida considerablemente (A.L.M. de Francisco, 2011). Estos tratamientos sustitutivos; hemodiálisis y diálisis peritoneal, tan sólo corrigen parcialmente el daño, mejorando la calidad de vida de los enfermos, pero son incapaces de restablecer la función renal, lo cual hasta ahora sólo se consigue con el trasplante de riñón (Jofré, 1999).

Según se recoge en el último informe del Registro Español de Enfermos Renales (R.E.E.R, 2010) de la Sociedad Española de Nefrología y la Organización Nacional de Trasplantes, la incidencia de nuevos pacientes se ha estabilizado, siendo en el año 1999 de 126 pacientes por millón (ppm) y en el 2009 de 129 ppm, de los cuales el 85,1% son tratados mediante hemodiálisis, el 12,2% mediante diálisis peritoneal y el 2,8% restante mediante trasplante renal. Sin embargo, la prevalencia no está estabilizada; incrementándose el número de ppm que son tratados con tratamiento renal sustitutivo. Este ascenso queda patente al observar la evolución desde el año 2001 a 2009, con un incremento de los ppm de 885 a 1039.

A pesar de que el porcentaje de trasplantes es menor que el de hemodiálisis y diálisis peritoneal, el trasplante renal es la forma más óptima de tratamiento sustitutivo para los enfermos renales crónicos, pues como se ha descrito anteriormente, además de recuperar la función renal, es la opción más económica: el trasplante supone un gran coste el primer año (semejante a los tratamientos de diálisis), pero en los subsiguientes años el coste se reduce hasta un 20% (A.L.M. de Francisco 2011). La hemodiálisis y la diálisis peritoneal sin embargo, además de que no suponen una solución a largo plazo a los enfermos crónicos, afectan al estilo de vida de los pacientes y suponen un gasto mucho mayor con el tiempo que el trasplante. A pesar de ello la diálisis peritoneal se presenta como la segunda opción más rentable después de los trasplantes, como se refleja en la Tabla 1. (Villa *et al.*, 2011).

**Tabla 1.** Incidencia anual, prevalencia y costes agregados en 2010 en España (Villa et al., 2011)

|   | HD    | PD    | Tx    |
|---|-------|-------|-------|
| <b>Incidencia estimada(pacientes)</b>                                       | 5409  | 822   | 2317  |
| <b>Prevalencia estimada (pacientes)</b>                                     | 22582 | 2420  | 24761 |
| <b>Costes anuales incidencia (en €)</b>                                     | 2651  | 1808  | 38313 |
| <b>Costes anuales prevalencia (en €)</b>                                    | 37968 | 25826 | 6283  |
| <b>Costes agregados (en millones de €) (Costes indirectos no incluidos)</b> | 1077  | 85    | 244   |
| <b>Costes agregados (%) (Costes indirectos no incluidos)</b>                | 77    | 6     | 17    |
| <b>Costes agregados (en millones de €) (costes indirectos incluidos)</b>    | 1327  | 109   | 393   |
| <b>Costes agregados (%) (costes indirectos incluidos)</b>                   | 73    | 6     | 21    |

HD: Hemodiálisis; PD: Diálisis peritoneal; Tx: Trasplante renal

El hecho de que se lleven a cabo más tratamientos de diálisis que trasplantes en los enfermos renales crónicos se debe a que la demanda de órganos supera al número de donantes (vivos o muertos), y las listas de espera para ser trasplantado a día de hoy son cada vez más largas (Barnett y Mamode, 2011). Sólo en los Estados Unidos docenas de personas mueren cada día esperando para ser trasplantados, muertes especialmente trágicas ya que podrían ser evitadas si se dispusiera de los órganos necesarios (Caplan, 2008). En concreto, más de 89,000 personas en Estados Unidos está a la espera de un trasplante de riñón, por lo que la necesidad de alternativas al trasplante alogénico renal es evidente (OPTN, 2010).

En cuanto a la situación en España, a pesar de que es uno de los países que más trasplantes lleva a cabo, la Organización Nacional de trasplantes (2013) anotó, como se muestra en la Figura 1.1, un total de 4293 personas en listas de espera para un trasplante renal, de los cuales sólo se realizaron 2551, cubriendo tan sólo a poco más de la mitad de la demanda.

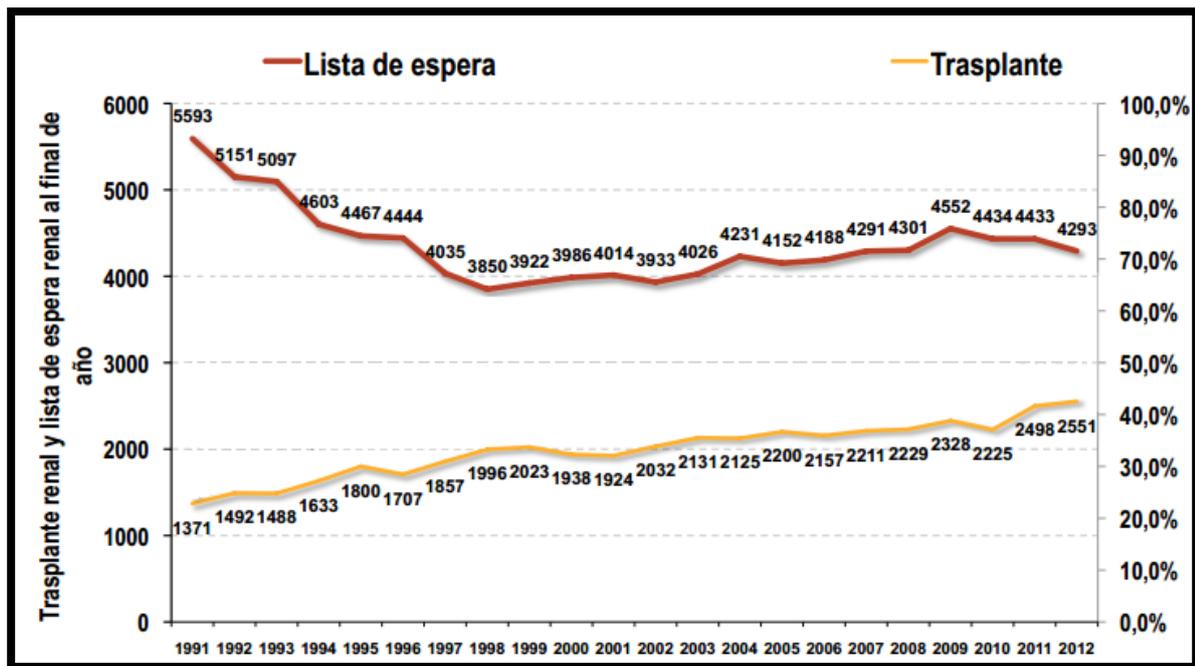


Figura 1.1. Número de personas en lista de espera para trasplante renal y número de trasplantes renales realizados desde 1991 hasta 2012 en España (ONT, 2013).

## 1.2. Alternativas al déficit de órganos

El número de trasplantes necesarios en los últimos años, ha aumentado dramáticamente, en concreto los trasplantes de riñón. Sin embargo el factor limitante sigue siendo el déficit de órganos, pues la demanda es superior a la disponibilidad de estos (Bottomley *et al.*, 2005). Dada la prevalencia de enfermos renales crónicos y el déficit de órganos disponibles, son muchas las alternativas evaluadas, una de ellas es el xenotrasplante (Hammerman, 2002). Más recientemente, los últimos avances sobre la biología de desarrollo del riñón además de las novedosas estrategias en el campo de la medicina regenerativa, están permitiendo un notable desarrollo en alternativas potenciales a la escasez de riñones (Xinaris y Yokoo, 2014). Una de estas alternativas es el trasplante de metanefros (riñones embrionarios) en receptores adultos (Hammerman, 2004) así como la construcción de un riñón fetal a partir de suspensiones de células simples procedentes de estos (Matsumoto *et al.*, 2012; Xinaris y Yokoo, 2014), en la cual la ingeniería tisular tiene un papel clave. Siguiendo el fundamento de esta estrategia, otra alternativa que se ha propuesto consiste en la regeneración de un riñón enfermo a partir de células epiteliales y mesenquimales (Song *et al.*, 2013).

La primera opción considerada como posible solución a la falta de disponibilidad de órganos, ha sido el uso de xenotrasplantes de riñón (Hammerman, 2002). El problema de esta alternativa al alotrasplante son los grandes desafíos inmunológicos que presenta al tratarse de especies distintas. Hasta la fecha los xenoinjertos renales clínicos llevados a cabo han utilizado donantes primates, sin embargo estos nunca serán donantes idóneos por razones principalmente éticas (Samstein y Platt, 2001). Por este motivo, una alternativa al uso de primates es el uso de riñones porcinos debido a que humanos y cerdos tienen un tamaño comparable y comparten parcialmente la fisiología renal (Hammerman, 2002). Además se dispone de estos animales en abundancia y pueden producirse libres de patógenos, por lo que se ha propuesto a esta especie como donante ideal para el trasplante de riñón (Samstein y Plat, 2001). Desafortunadamente, el trasplante de órganos vascularizados, resulta problemático debido al proceso de rechazo vascular hiperagudo y agudo que se desencadena, resultado de la unión de los anticuerpos xenorreactivos preformados o naturales presentes en las células en circulación del receptor, seguido de la activación del sistema complemento del mismo (Hammerman 2002). Por ello en la actualidad el rechazo vascular representa el principal obstáculo para el uso de órganos porcinos en huéspedes humanos: multitud de procesos implicados como causa del rechazo vascular agudo reflejan una fundamental incompatibilidad entre las proteínas del huésped y el sistema de proteínas y endotelio vascular del donante (Hammerman, 2002).

Debido a que el xenotrasplante convencional requiere una constante y fuerte inmunosupresión para evitar el rechazo humoral producido al pasar la barrera xenogenética (Cascalho y Platte, 2001), la cual puede además desencadenar distintos efectos secundarios incluyendo carcinogenicidad e infecciones severas, se ha propuesto el trasplante de riñones embrionarios como una terapia al remplazo de órganos (Xinaris y Yokoo, 2014). Estos aún no disponen de una irrigación sanguínea desarrollada completamente, de modo que no se desencadena el rechazo vascular agudo e hiperagudo que tiene lugar en los xenotrasplantes (Bottomley *et al.*, 2005). En resumen, el trasplante de metanefros en desarrollo presenta una serie de ventajas destacables frente al de riñón adulto (Xinaris y Yokoo, 2014):

- En primer lugar, si el metanefro en desarrollo es obtenido en un estadio lo suficientemente temprano, se espera que las células presentadoras de antígeno (APCs), las cuales median el reconocimiento del alo-antígeno o xeno-antígeno, no estén presentes, ya que el embrión aún no las habría desarrollado (Naito, 1993).
- La siguiente ventaja es que los antígenos del donante, como los antígenos del MHC de clase I y II probablemente no estén expresados en el metanefro en desarrollo del mismo modo en el que lo están en un riñón adulto (Statter *et al.*, 1989).

- El tercer punto a favor que tiene el trasplante de metanefros es la vascularización por parte del huésped que reciben los riñones embrionarios trasplantados (Rogers, y Hammerman, 2001).

Además, en comparación con las alternativas basadas en el uso de células madre embrionarias (ESC) o células pluripotentes inducidas (iPCs), el trasplante de metanefros es también ventajoso por las siguientes razones:

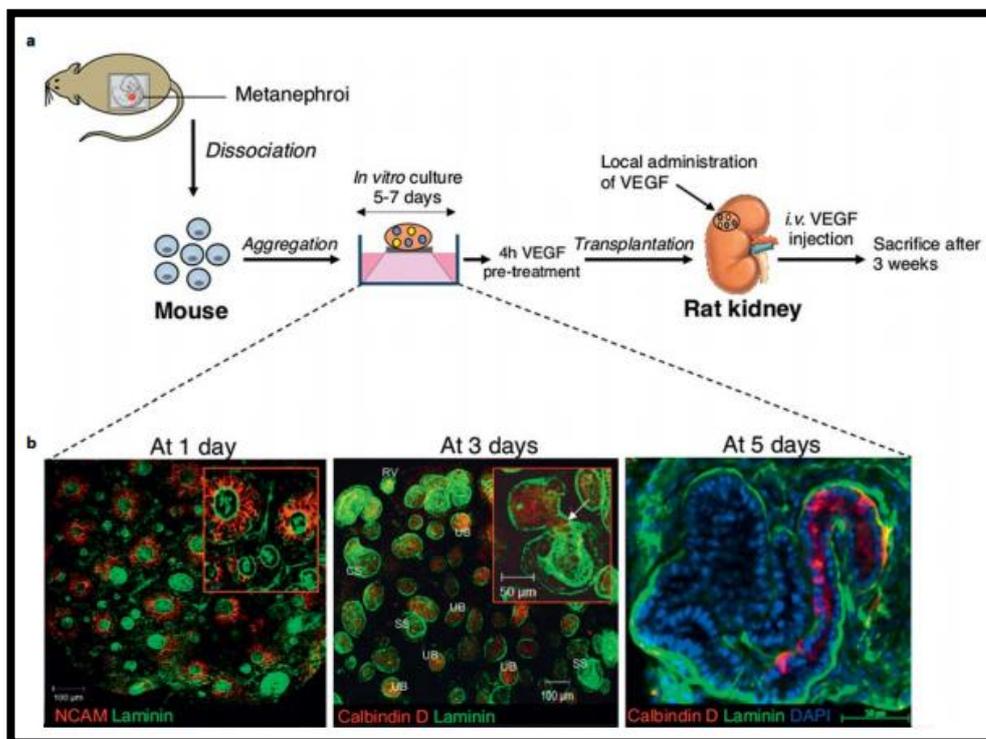
- No es necesario dirigir la diferenciación y no hay riesgo de formación de teratomas (Hammerman 2007)
- Las células metanéfricas están ya genéticamente programadas para el desarrollo del riñón, por lo que se evitaría la necesidad de preprogramar a las células (Xinares y Yokoo, 2014).

Los estudios realizados con metanefros han mostrado la supervivencia, el crecimiento, la maduración, la vascularización y la función del metanefro tras el trasplante demostrando que la organogénesis renal puede ocurrir bajo estas condiciones y que el resultado es la obtención de un órgano vascularizado funcional (Hammerman 2002). Por ello, dadas las ventajas que tienen estos riñones en desarrollo, sumada a la idea del xenotrasplante de utilizar donantes de otras especies surge la idea de realizar xenotrasplantes de metanefros que replacen la función de órganos enfermos (Hammerman, 2011). Con esta idea Hammerman (2002) llevó a cabo tanto trasplantes concordantes (rata-ratón) como discordantes (cerdo-roedor), obteniendo en ambos casos resultados positivos y demostrando que el trasplante de primordios embrionarios, incluso entre especies distintas puede dar lugar a un órgano funcional. Además, los resultados más recientes obtenidos que apoyan la funcionalidad de los metanefros desarrollados *in vivo* muestran que estos son capaces de mantener la presión sanguínea en ratas anéfricas con hipotensión aguda inducida, así como de reducir la calcificación vascular en ratas con fallo renal crónico (Yokote *et al.*, 2012), sugiriendo que el metanefro trasplantado cumple múltiples funciones renales además de la producción de orina (Xinares y Yokoo, 2014).

Otra estrategia relacionada con la anterior que combina conocimientos de ingeniería tisular junto con los avances en el conocimiento de la biología del desarrollo ha mostrado que suspensiones de células aisladas de metanefros murinos pueden llegar a organizarse *in vitro* y dar lugar a un tejido fetal que contiene nefronas inmaduras y tubos colectores (Unbekandt y Davies, 2010). Este abordaje, tanto para generar tejido fetal como maduro, se fundamenta en la capacidad intrínseca de las células para organizarse en estructuras complejas (Eiraku *et al.*, 2011; Suga *et al.*, 2011). Los resultados llevados a cabo para la generación de tejido fetal renal a partir de los metanefros, han demostrado que el cultivo de líneas celulares del epitelio renal en geles de matriz extracelular

puede inducir a estas para crear túbulos ramificados ya sea por el metanefro completo o el mesénquima metanéfrico, similares a los presentes en metanefros normales (Steer y Nigam, 2004).

Con un abordaje similar al anterior, recientemente se ha dado un paso hacia delante al demostrar que organoides construidos *in vitro* a partir de suspensiones de células metanéfricas pueden ser integrados en el riñón de un receptor vivo y dar lugar a glomérulos vascularizados así como llevar a cabo funciones específicas del éste, tales como la filtración glomerular, la reabsorción tubular de macromoléculas y la producción de eritropoyetina (EPO) (Xinaris *et al.*, 2012). En este caso para conseguir la completa glomerulogénesis es necesario suministrar factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) tanto a la suspensión de células metanéfricas como al receptor una vez la suspensión de células ha sido implantada en el riñón (Xinaris *et al.*, 2012), siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 1.2. (Xinaris y Yokoo, 2014)



**Figura 1.2.** Diseño experimental para la obtención de organoides a partir de células de riñones murinos (Xinaris *et al.*, 2012)

Sin embargo, a pesar de los resultados anteriores, para que el trasplante de tejido metanéfrico rudimentario sea clínicamente aplicable, todavía han de superarse numerosos desafíos, tales como que estos tejidos trasplantados puedan dar lugar a órganos en 3D con el aspecto, volumen y anatomía propios de los riñones humanos, que se lleguen a integrar completamente en el receptor

e induzcan la mínima respuesta inmune y sean vascularizados por los vasos de éste, además de que las nefronas resultantes estén vinculadas al sistema colector de drenaje (Xinaris y Yokoo, 2014).

Una última alternativa también derivada de la ingeniería tisular para que el riñón generado sea totalmente implantable y permanente, es el desarrollo de un *scaffold* totalmente biocompatible que facilite el injerto celular y la función, además de permitir la integración completa en el receptor (Song *et al.*, 2013). Por ello y en base a la experiencia previa en el uso de *scaffolds* de matriz extracelular en corazón (Ott *et al.*, 2008) y pulmones (Ott *et al.*, 2010) completos, se ha hipotetizado que la matriz extracelular del riñón nativo del futuro receptor, podría proporcionar el *scaffold* para el posterior subcultivo celular. Para ello se realiza la perfusión con detergentes del riñón completo, de manera que éste funcione como *scaffold*, pero sin provocar la disrupción de la ultraestructura vascular, glomerular y tubular (Figura 1.3.). Posteriormente el *scaffold* se repoblaría con células endoteliales y epiteliales y, tras unos días en cultivo se ha demostrado que el riñón regenerado produce orina. Estos resultados sugieren por tanto que los riñones cadavéricos o dañados podrían ser descelularizados para funcionar como *scaffolds*, que al ser repoblados con células endoteliales y epiteliales y madurados generarían un riñón funcional *in vivo* (Song *et al.*, 2013).

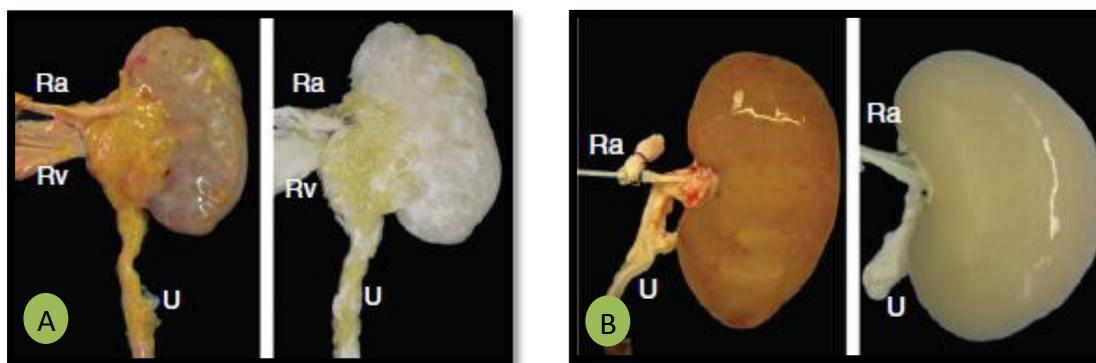


Figura 1.3. Riñones antes y después de ser descelularizados. A. Riñón porcino. B. Riñón humano

### 1.3. Conejo como modelo animal

El uso de animales en biomedicina está recomendado para el perfeccionamiento y validación de los procedimientos existentes, el desarrollo de materiales y la comprensión de ciertos procesos fisiológicos y patológicos, ya que no hay modelos *in vitro* capaces de reproducir la complejidad del organismo humano (Calasans-Maia *et al.*, 2009).

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Figura 1.4), es un animal más cercano filogenéticamente a los primates que los roedores (Graur *et al.*, 1996) además de ser genéticamente más diverso, lo que hace que sea un modelo más cercano a los humanos (Bosze, and Houdebine, 2006). Después de los ratones (59,3%) y las ratas (17,7%), el conejo representa el tercer mamífero experimental utilizado con mayor frecuencia (2,78%) en la Unión Europea (Fischer *et al.*, 2012). Presentan además una serie de ventajas que lo hace ser un modelo animal comúnmente utilizado (Calasans-Maia *et al.*, 2009):

- Son fáciles de manipular y transportar
- Permiten trabajar con un número elevado de individuos,
- Tienen un ciclo vital corto (gestación, lactancia y pubertad)
- Permiten la estandarización genética y del ambiente
- Son relativamente baratos de adquirir y mantener en comparación con otros modelos animales más grandes (Bosze and Houdebine, 2006).



**Figura 1.4.** Conejo blanco de la raza Neozelandés

En cuanto al ciclo reproductivo, como se ha dicho es corto, por cada 14-16 días de fertilidad, son infértiles 1-2 (Pearce *et al.*, 2007), aunque este tiempo está influido por la nutrición, la luz, la temperatura, el estímulo sexual y las variaciones individuales (Cardoso *et al.*, 2007). El tiempo de gestación es entre 30-32 días, y el tamaño de camada alrededor de 10 gazapos (Calasans-Maia *et al.*, 2009). Además el conejo es una de las pocas especies en las que se induce la ovulación mediante el apareamiento (o estímulo hormonal en su defecto, lo que resulta en el conocimiento definido de la edad embrionaria (Fischer *et al.*, 2012), característica muy deseada en algunas ramas de investigación.

#### 1.4. Conservación de órganos

El almacenamiento a largo plazo de órganos humanos o de sus sustitutos para el subsiguiente trasplante es un objetivo muy buscado y de gran interés (Smith, 1954; Starzl, 1970; Karow, 1974). Aunque es difícil, se trata de una meta crucial en parte porque los límites actuales en los tiempos de almacenamiento de órganos antes del trasplante reducen sustancialmente la efectividad además de aumentar el coste del reemplazo de órganos (Khirabadi y Fahy, 2000). Estos problemas podrían ser eliminados si los órganos fueran almacenados durante tiempos más cortos que los actuales tiempos de espera. Además, los biobancos facilitarían el control de las existencias, así como la distribución de órganos y tejidos (Bottomley *et al.*, 2005). En este terreno entra en juego la crioconservación, la cual representa una herramienta esencial para resolver el gran problema en la medicina de trasplantes, que es la falta de órganos disponibles en relación con el número total de trasplantes necesarios en un momento concreto (Fahy *et al.*, 2004).

Gracias a los avances en la tecnología de vitrificación, parece posible crioconservar órganos enteros (Fahy *et al.*, 2004), aunque lograr la total viabilidad tras el trasplante es un reto complicado debido al proceso de desvitrificación (Fahy *et al.*, 2009). Hasta la fecha las únicas estructuras macroscópicas que han mostrado resultados favorables tras ser vitrificadas son pequeños ovarios (Sugimoto *et al.*, 2000; Salehnia, 2002; Migishima *et al.*, 2003), (Courbiere *et al.*, 2005), vasos sanguíneos (Song *et al.*, 2000), válvulas cardíacas (Brockbank y Song, 2004), y córneas (Armitage *et al.*, 2002). También se han realizado estudios sobre la vitrificación de riñón, órgano que requiere anastomosis vascular inmediata para el trasplante, aunque en este caso sólo un riñón sobrevivió al proceso de vitrificación (Fahy *et al.*, 2009).

Además de los riñones procedentes de donantes, la aparición de nuevas alternativas al déficit de órganos junto con la disponibilidad de un biobanco para su almacenamiento, en teoría podría aumentar radicalmente la esperanza de vida media incluso en ausencia de cualquier mejora en la mitigación de los procesos de envejecimiento en un nivel fundamental (Fahy, *et al.*, 2006). En el único experimento desarrollado en rata encontrado sobre la crioconservación de metanefros, se ha descrito que tanto la congelación como la vitrificación presentaban inconvenientes, ya que el primer método producía daños como consecuencia de la formación de hielo, mientras que los daños del segundo eran consecuencia de la toxicidad (Bottomley *et al.*, 2005). En resumen, estos resultados sugieren que es necesaria la optimización de los métodos actuales de crioconservación (Bottomley *et al.*, 2005).

## **1.5. Objetivos**

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- Evaluar el desarrollo de metanefros embrionarios de embriones de 16 días en receptores no inmunodeprimidos.
- Estudiar el efecto de la vitrificación de los metanefros sobre su desarrollo empleando dos medios: VM3 y M22.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los productos químicos de este estudio fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, Spain) a menos que se especifique lo contrario. Este estudio fue aprobado por el Comité de la Universidad Politécnica de Valencia Ética y Bienestar Animal. Todos los animales fueron manejados de acuerdo a los principios de cuidado de los animales publicados por españoles Real Decreto 53/2013 (BOE, 2013; BOE = BOE español).

### 2.1. Recuperación de embriones

Se escogieron 6 hembras de conejo de raza blanca de neozelaandesa (*Oryctolagus cuniculus*) y se inseminaron con 0,5mL de semen de conejo de la misma raza con una concentración 40 millones de espermatozoides por mililitro previamente recuperado. A continuación se indujo su ovulación mediante una dosis intramuscular de 1 µg de acetato de buserelina.

Después de 16 días estas hembras fueron sacrificadas con una inyección de 0,6g de Pentobarbital sódico (Dolethal) en la vena marginal de la oreja, y se procedió a la extracción de los embriones implantados en el tracto uterino de las hembras (Figura 2.1), lavándolos en una solución con tampón fosfato salino (PBS), antibióticos (50µg/mL de estreptomycin y penicilina), 0,2%w/v albúmina sérica bovina (BSA) y 0,132g/L cloruro cálcico (CaCl) (Figura 2.2). A continuación los embriones fueron pesados, y uno de ellos se fijó en solución de fijación de formalina al 10% (que contiene formaldehído al 4% w/v), para su posterior análisis histológico.



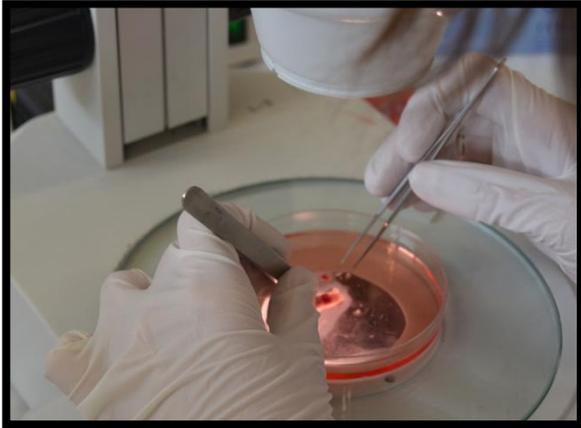
**Figura 2.1.** Tracto uterino con embriones de 16 días



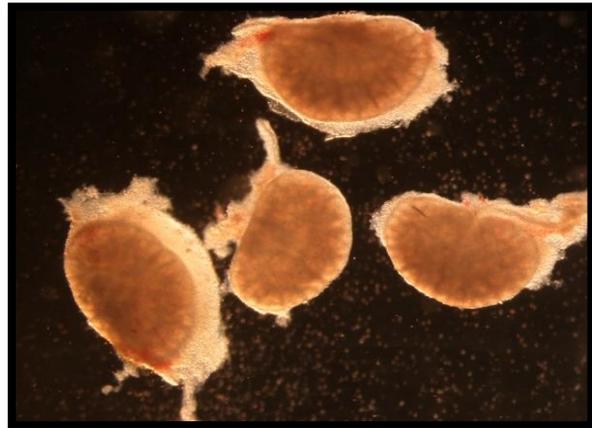
**Figura 2.2.** Embrión de 16 días

## 2.2. Obtención de metanefros

Una vez recuperados los embriones, estos fueron diseccionados quirúrgicamente empleando un estereomicroscopio, colocando al embrión en posición *decúbito supino* y utilizando las técnicas previamente descritas para ello por Rogers *et al.* (1991) para la obtención de los metanefros (Figura 2.3). A continuación fueron lavados en la misma solución descrita anteriormente, como se muestra en la Figura 2.4.



**Figura 2.3.** Disección quirúrgica de un embrión para la extracción de los metanefros



**Figura 2.4.** Metanefros de 16 días

## 2.3. Vitrificación de metanefros (M22 y VM3)

La vitrificación fue llevada a cabo utilizando el método de mínimo volumen esencial (MEV), usando para ello el Cryotop (Figura 2.5) como soporte (Kuwayama *et al.*, 2005). Se utilizaron dos medios de vitrificación, el M22 (Fahy *et al.*, 2009) y el VM3 (Fahy *et al.*, 2004), cuyas composiciones se describen en la Tabla 2. El volumen de medio que se añadía a cada Cryotop era de 2  $\mu$ L.



**Figura 2.5.** Método del mínimo volumen en Cryotop

**Tabla 2.** Composición de las soluciones de vitrificación M22 y VM3

|                                  | Composición |         |
|----------------------------------|-------------|---------|
|                                  | M22         | VM3     |
| <b>Dimetil sulfóxido</b>         | 2,855 M     | 2,855 M |
| <b>Formamida</b>                 | 2,885 M     | 2,885 M |
| <b>Etilenglicol</b>              | 2,713 M     | 2,713 M |
| <b>N-Metilformamida</b>          | 0,508 M     | -       |
| <b>3 methoxy-1,2-propanodiol</b> | 0,377 M     | -       |
| <b>Polivinil pyrrolidone K12</b> | 2,8 % w/v   | 7% w/v  |
| <b>X-100 ice blocker</b>         | 1% w/v      | 1% w/v  |
| <b>Z-100 ice blocker</b>         | 2% w/v      | 1% w/v  |
| <b>Molaridad Total</b>           | 9,345 M     | 8,41 M  |

En el caso del medio VM3, los metanefros eran primero expuestos durante 3 minutos en una solución de equilibrio que contenía 1,7% w/v de etilenglicol (EG), 1,3% w/v de formamida, 2,2% w/v de dimetil sulfóxido (DMSO), 0,7% w/v de PVP K12 (polivinil pirrolidona de Mr 5000 Da) y 0,1% w/v de Super-Cool X-1000 y Super-Cool Z-1000 (ice blockers) en medio base (BM: Tampón fosfato bovino sin CaCl (DPBS) + 20% suero fetal bovino). A continuación, se pasaban durante 1 minuto a una solución que contenía 4,7% w/v EG, 3,6% w/v formamida, 6,2% w/v DMSO, 1,9% w/v PVP K12 y 0,3 w/v de ice blockers en medio base. Por último, los metanefros se transferían durante otro minuto a otra solución de vitrificación de 16,84% w/v EG, 12,86% w/v formamida, 22,3% w/v DMSO, 7% w/v PVP K12 y 1% w/v de ice blockers en medio base. Después del último paso, los metanefros fueron uno a uno colocados en el Cryotop con la ayuda de una micropipeta y vitrificados en nitrógeno líquido, donde estuvieron almacenados durante 1 mes.

Para la vitrificación con M22 se adaptó un protocolo de Fahy *et al.* (2009) también se realizaban tres pases en concentraciones crecientes de crioprotectores como en el VM3. En el primer paso los metanefros eran expuestos durante 3 minutos en una solución que contenía 2,07% w/v de DMSO, 1,19% w/v de formamida, 1,56% w/v de EG, 0,28% w/v de N-metilformamida, 0,37% w/v de 3-metoxi-1,2-propanodiol (PROH), 0,26% w/v de PVP-K12, 0,09% w/v de X-100 y 0,19% w/v de Z-100 en medio base. A continuación se pasaban durante 1 minuto a una solución compuesta por 5,85% w/v de DMSO, 3,37% w/v de formamida, 4,42% w/v de EG, 0,79% w/v de N-metilformamida, 1,05% w/v de (PROH), 0,73% w/v de PVP-K12, 0,26% w/v de X-100 y 0,52% w/v de Z-100 en medio base. Por último los metanefros eran transferidos a una última solución de vitrificación que contenía 22,305% w/v de DMSO, 12,86% w/v de formamida, 16,84% w/v de EG, 3% w/v de N-metilformamida, 4% w/v de PROH, 2,8% w/v de PVP-K12, 1% w/v de X-100 y 2% w/v de Z-100 en

medio base. Tras este último paso, los metanefros fueron vitrificados del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

En resumen, el primer pase de ambos medios era una solución al 6% de la solución de vitrificación durante 3 minutos; en el segundo la concentración de la solución de vitrificación aumentaba al 13,2% donde los metanefros permanecían durante 1 minuto; para finalizar, en el último pase se sumergían en la solución al 65% durante 1 minuto (Figura 2.6).

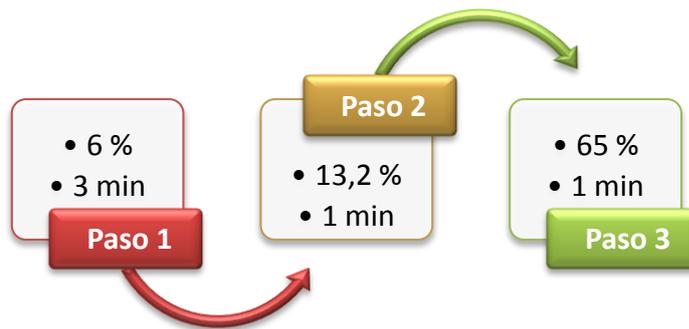


Figura 2.6. Esquema del procedimiento de vitrificación en 3 pasos

#### 2.4. Desvitrificación

Previa a la transferencia de los metanefros vitrificados, estos tuvieron que desvitrificarse. Para llevar a cabo la desvitrificación, los metanefros fueron colocados en una solución compuesta de 1,25M de sacarosa en medio base (BM) (TCM 199 y suero fetal bovino al 20%) durante 1 minuto y a continuación transferidos a soluciones decrecientes de sacarosa (0.6, 0.3, 0.15 y 0 M de sacarosa en BM) durante 30 segundos, como se describe en la Figura 2.7. Después del último pase, los metanefros se sumergieron en PBS hasta su transferencia en el receptor.

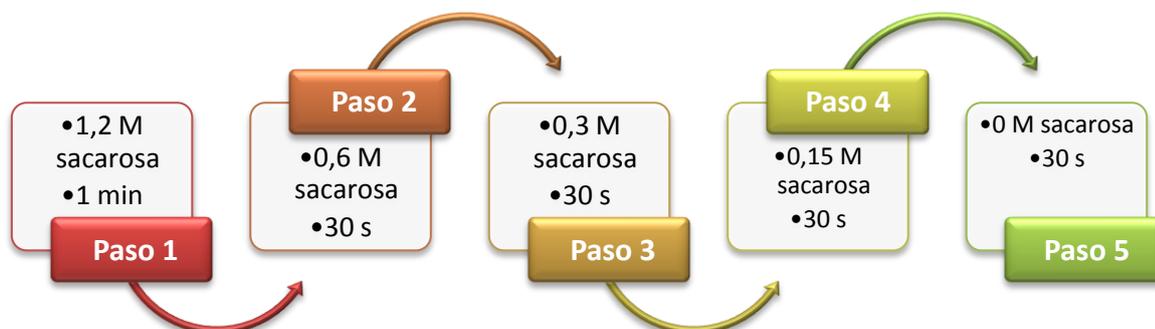


Figura 2.7. Esquema del proceso de desvitrificación en 5 pasos

## 2.5. Transferencia del metanefro

La transferencia de los metanefros se llevó a cabo por laparoscopia. El equipo utilizado para ello fue un Laparoscopio Hopkins<sup>®</sup> que es un laparoscopio de visión recta, de 30 cm de longitud con un canal de trabajo de 5 mm (Karl Storz Endoscopia Ibérica SA Madrid). Previamente las hembras receptoras fueron sedadas mediante una inyección intramuscular de 16 mg de Xilazina (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Alemania). Como preparación quirúrgica para la laparotomía, la anestesia se realizó mediante la inyección intravenosa de 16-20mg de clorhidrato de ketamina (Imalgene<sup>®</sup>, Merial, SA, Lyon, Francia) en la vena marginal de la oreja. A continuación, la región abdominal de los animales fue rasurada y estos fueron posicionados en una tabla de operaciones en posición vertical (cabeza abajo en un ángulo de 45°). De este modo se aseguró que el estomago y los intestinos no dificultaran la visión. El trocar y los fórceps se insertaron en la cavidad abdominal. Al retirar el trocar el abdomen se insufló con CO<sub>2</sub> y a continuación se insertó el endoscopio. Con la ayuda de los catéteres, los metanefros fueron colocados en el tejido graso de los animales posicionándolos lo más cerca en la medida de lo posible de la arteria renal, para que la irrigación se viera más favorecida.

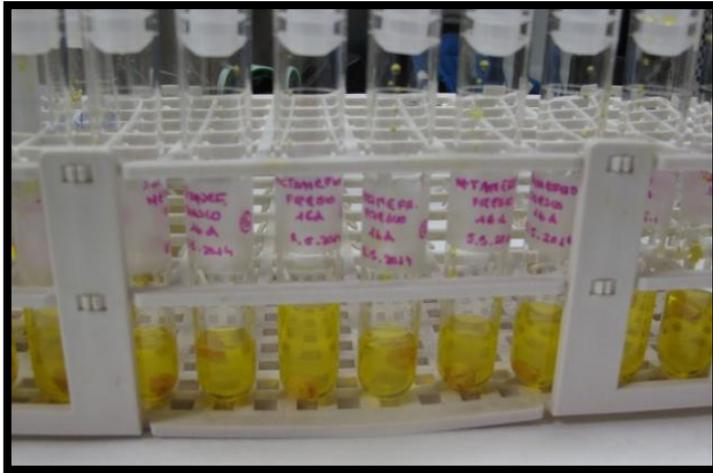
La deposición de los metanefros tuvo lugar en ambos lados del animal, izquierdo y derecho, de manera que por cada hembra se transfirieron entre 5 y 12 metanefros a un total de 7 hembras. Para eliminar el posible 'efecto hembra', a cada lado de las receptoras se les transfería un tipo de metanefros (vitrificados en M22, VM3 o frescos).

El número total de metanefros transferidos fue de 22 metanefros frescos, 20 metanefros vitrificados con M22 y 20 metanefros vitrificados con VM3.

## 2.6. Valoración histológica

Inmediatamente tras la extracción de los metanefros, estos se fijaron durante una semana en solución de Bouin (Chem-Lab) (Figura 2.8). Pasado este tiempo se llevó a cabo la deshidratación de los mismos y a continuación fueron embebidos en parafina. Posteriormente fueron cortados con el microtomo a 7 µm, y teñidos siguiendo el protocolo clásico de hematoxilina-eosina. Paralelamente se hizo lo mismo con un riñón procedente de un embrión de 37 días (Figura 2.9), de manera que funcionara como control.

Finalmente se observaron todos los cortes histológicos al microscopio óptico, evaluando la presencia o no de estructuras glomerulares características del riñón.



**Figura 2.8.** Tubos de ensayo con los metanefros extraídos en solución de fijación de Bouin



**Figura 2.9.** Riñón control de 37 días

## 2.7. Análisis de los datos

Dado que el número de metanefros transferidos en este experimento fue reducido, se llevó a cabo un análisis descriptivo expresando los resultados como el porcentaje de desarrollo de cada tipo de metanefro vitrificado tras 21 días de transferencia.

### **3. *RESULTADOS***

### 3. RESULTADOS

Tras realizar la deshidratación y posterior tinción con hematoxilina-eosina del embrión de 16 días que se fijó (Figura 3.1), se puede observar la posición del metanefro en el interior de éste así como su aspecto del embrión, de manera que pueden apreciarse ya las estructuras que darán lugar a las formaciones típicas del futuro riñón, como se muestra en la Figura 3.2.

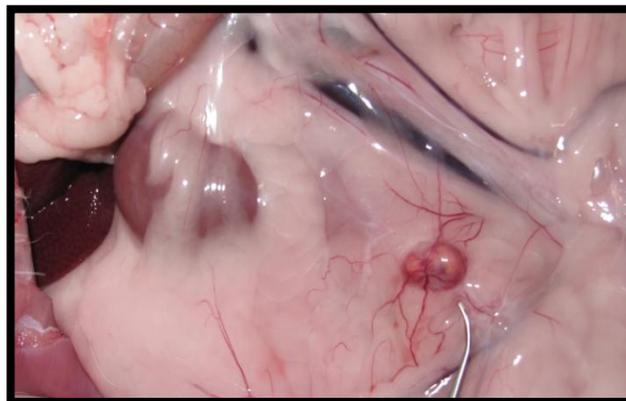


**Figura 3.1.** Histología de un embrión de 16 días



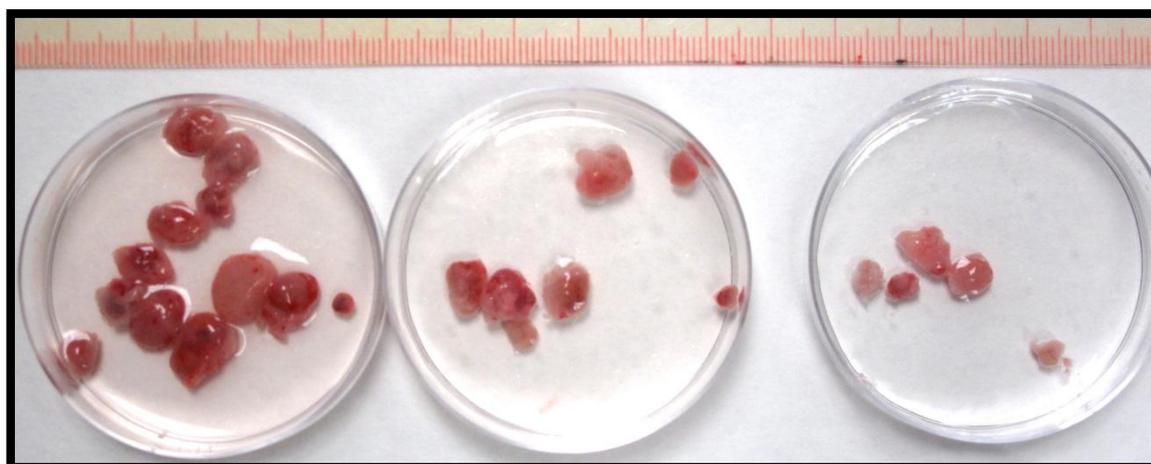
**Figura 3.2.** Metanefro de un embrión de 16 días bajo microscopio óptico

Después de 21 días de transferencia de los metanefros, las receptoras fueron sacrificadas para evaluar si se había producido el desarrollo de los metanefros transferidos, y en ese caso, cuantificarlo. Como se observa en la Figura 3.3, todos los metanefros que se habían desarrollado estaban notablemente irrigados por el sistema vascular de las receptoras.



**Figura 3.3.** Metanefro transferido durante 21 días irrigado por el sistema vascular de la receptora

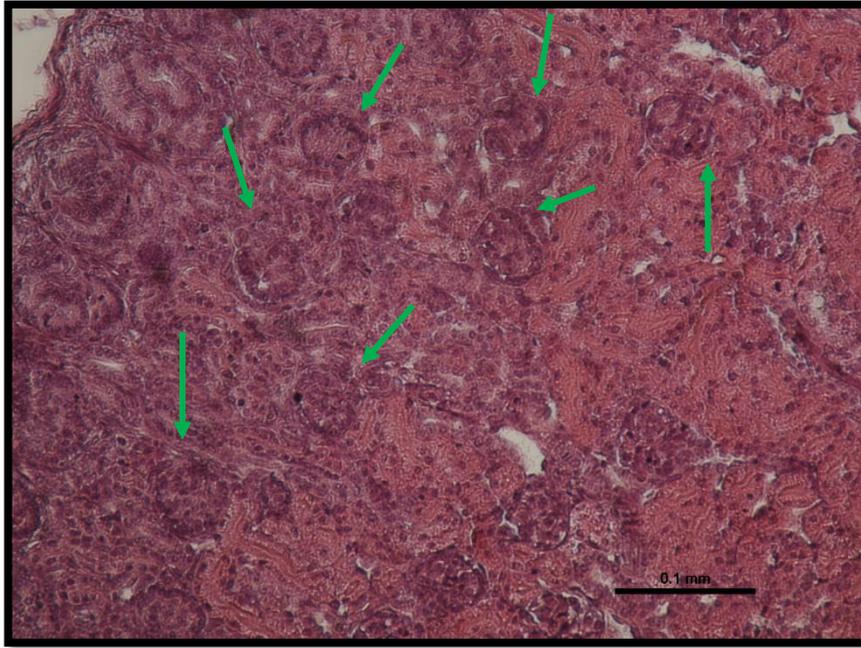
El número total de metanefros frescos que habían proliferado era de 12 y en el caso de los metanefros vitrificados se recuperaron 7 que habían sido vitrificados con M22 y 5 que habían sido vitrificados con VM3, tal y como se muestran en la Figura 3.4.



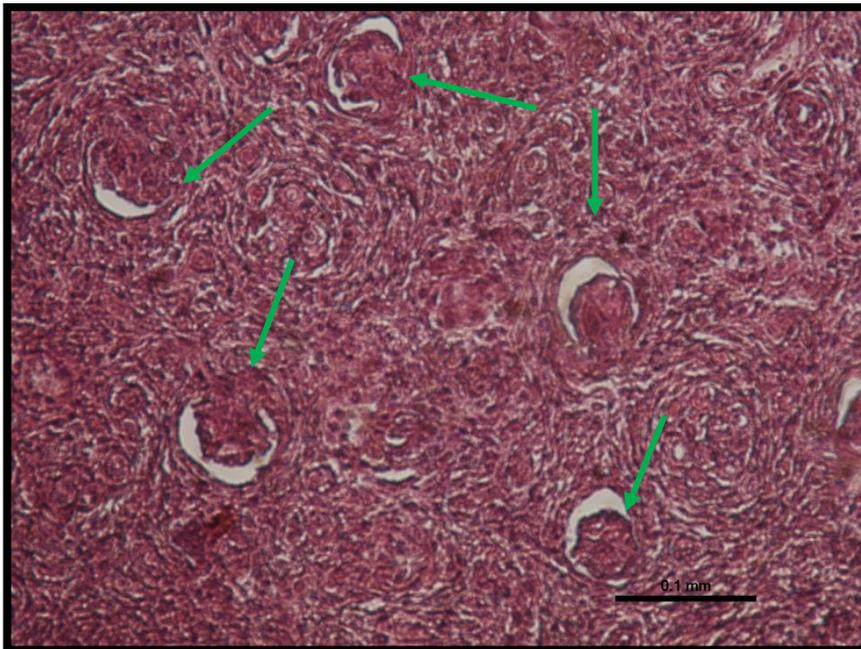
**Figura 3.4.** Metanefros extraídos tras 21 días de transferencia. De izquierda a derecha, en la primera placa se encuentran los metanefros frescos recuperados tras 21 días de implantación en los conejos adultos, un total de 1. En la segunda placa se encuentran los 7 recuperados que habían sido vitrificados en medio M22 y en la última los 5 vitrificados en VM3.

Teniendo en cuenta el número de metanefros que fueron transferidos, el porcentaje fue del 55,5% para los metanefros frescos, mientras que en el caso de los vitrificados con M22 y con VM3 resultó de un 35,0% y de un 25,0% respectivamente. Estos resultados demuestran que los metanefros vitrificados mantienen la capacidad de desarrollo tras su implantación, siendo esta ligeramente inferior a la de los metanefros frescos.

En lo referente al tamaño de los metanefros extraídos, éste era poco homogéneo incluso dentro del mismo tipo, como se aprecia en la Figura 3.4. Si bien, el tamaño fue mayor en el caso de los frescos comparados con los vitrificados, aunque de menor tamaño que el riñón control de 37 días. En cuanto al color y la textura, se observaba homogeneidad en los tres grupos. Sin embargo, tras realizar el análisis histológico sí que se observaron ligeras diferencias en cuanto a los tres grupos y el control. La Figuras 3.5 y 3.6. muestran la imagen de la corteza del riñón control y de un metanefro fresco respectivamente. En ambos casos se observa un gran número de nefronas y estructuras glomerulares, si bien en el riñón control se evidencia un mayor grado de diferenciación celular y desarrollo, que en el caso del metanefro transferido.



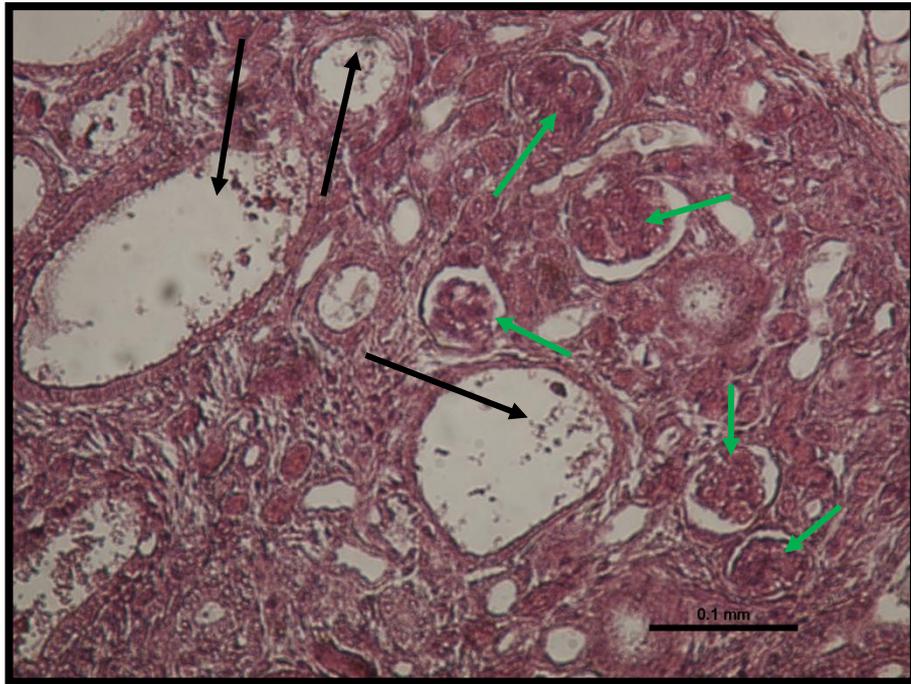
**Figura 3.5.** Imagen de la corteza del riñón control de 37 días, en el que aparecen indicadas las nefronas mediante flechas verdes



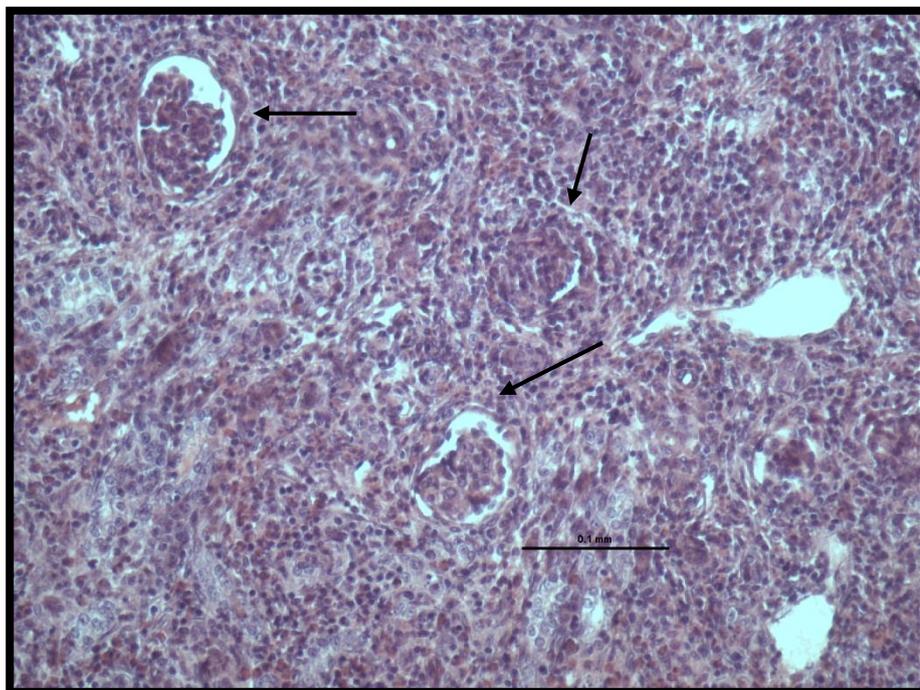
**Figura 3.6.** Imagen de la corteza de un metanefro fresco en el que se indican las nefronas mediante las flechas verdes

Este retraso en el desarrollo en cuanto al control se incrementa al observar los metanefros vitrificados con M22 (Figura 3.7.) y los VM3 (Figura 3.8). Al comparar los metanefros vitrificados frente a los frescos sí que se observan diferencias. Mientras que los metanefros vitrificados con el medio VM3 presentaban una estructura celular similar a la de los frescos, tanto en la zona medular

como en la corteza, los metanefros vitrificados con el medio M22 presentaban una vacuolización evidente, aunque también estaban presentes estructuras glomerulares.



**Figura 3.7.** Metanefro vitrificado con M22. Las flechas negras indican la presencia de vacuolas, y las nefronas aparecen indicadas con una flecha verde



**Figura 3.8.** Metanefro vitrificado con VM3 con las nefronas indicadas mediante flechas negras

## **4. *DISCUSIÓN***

## 4. DISCUSIÓN

A pesar de los esfuerzos sustanciales para incrementar el número de donaciones de riñón, los cambios demográficos y la creciente incidencia de enfermedades crónicas como la diabetes hace que cada año la demanda de reemplazo renal aumente con respecto a la disponibilidad, creando una brecha cada vez mayor (Marshall *et al.*, 2005). Por esta razón, en los últimos años se han desarrollado una serie de nuevos enfoques para reducir este déficit, uno de ellos es el trasplante de primordios embrionarios que se desarrollen dentro del receptor (Marshall *et al.*, 2005).

Los experimentos anteriores han demostrado que la implantación de estos riñones embrionarios en receptores adultos tiene como resultado el desarrollo *in vivo* de estos, así como su vascularización (Hammerman 2002). El primer estudio a propósito de este tema fue llevado a cabo por Rogers *et al.* (1998), y reveló que el trasplante de metanefros procedentes de embriones de 15 días en ratas de Splage-Dawley, tras ser implantados durante 5 semanas en ratas adultas era exitoso. Además, Rogers y Hammerman (2001) fueron un paso más y demostraron que este crecimiento y diferenciación se daba también entre receptores de distintas especies, pues implantaron con éxito metanefros de 15 días de ratas de Lewis en ratones C57B1/6J. Siguiendo en la misma línea, Rogers *et al.* (2003) también demostraron la implantación con éxito de metanefros de 28 días procedentes de cerdos en cerdos adultos, así como en ratones C57B1/6J. En contraposición a estos autores que demostraron que el trasplante de metanefros no presentaba problemas inmunológicos, más recientemente Clancy *et al.* (2009), llevaron a cabo un estudio cuyos resultados confirmaban el hecho de que era posible el alotrasplante de metanefros en receptores adultos y la funcionalidad de los mismos (lo hicieron midiendo las tasas de filtración glomerular), pero que sin embargo los metanefros no eran menos inmunogénicos que los órganos adultos, si bien este rechazo era controlable. Años después, Matsumoto *et al.* (2012), realizaron un estudio en el que implantaron metanefros de 13 días de ratón C57BL/6 en ratas de Lewis inmunodeprimidas y no inmunodeprimidas, y analizaron la expresión de EPO. Los resultados fueron positivos en ambos casos y mostraron que estos niveles procedían de la migración de células del receptor, apoyando los estudios que demostraban la no inmonogenicidad de los riñones embrionarios además de la funcionalidad de los riñones embrionarios. Con respecto a nuestro estudio llevado a cabo con conejos no inmunodeprimidos, los experimentos de Rogers y Hammerman (2001) abalan los resultados obtenidos, pues se observó una clara irrigación sanguínea de los metanefros por parte del sistema vascular del receptor, además de un desarrollo notable reflejado no sólo en el aumento del tamaño tras la transferencia *in vivo*, sino también en la aparición de estructuras glomerulares. En cuanto a los resultados que mostró Clancy *et al.* (2009), en nuestro caso, aunque sólo se ha

medido el porcentaje de éxito de los metanefros transferidos sin tener en cuenta en cuenta otros análisis como la tasa de filtración glomerular que midieron estos autores, o la expresión de EPO (Matsumoto *et al.*, 2012), el desarrollo y la maduración de los metanefros *in vivo* a nivel histológico que muestran nuestros resultados parecen indicar que no es un requisito esencial la inmunosupresión de los conejos. En resumen podemos decir que nuestros resultados suponen la demostración de que los el trasplante de metanefros en un receptor tiene como consecuencia el desarrollo de éste en una especie que hasta la fecha nunca se había probado: el conejo.

Por otro lado, pensando en la aplicabilidad de esta alternativa en un futuro, aunque el metanefro podría ser recuperado inmediatamente antes del trasplante en humanos, sería preferible almacenarlo *in vitro* antes del éste (Fahy *et al.*, 2009). Es por ello que la crioconservación supone una herramienta clave en este trabajo, en el cual se ha estudiado también cómo afectaría el proceso de vitrificación utilizando para ello dos soluciones distintas; M22 y VM3. Con esta premisa Rogers y Hammerman (2001) llevaron a cabo un primer experimento en el que se proponía almacenar *in vitro* metanefros de rata durante un periodo de 3 días, y que tuvo como resultado la producción de riñones quiméricos funcionales. Este primer intento, abrió una nueva puerta a otros investigadores que más recientemente han tratado de aplicar los nuevos avances en criobiología para poder conservar metanefros a largo plazo. Esta necesidad impulsó a Bottomley *et al.* (2005) a llevar a cabo dos aproximaciones de crioconservación en metanefros de 15 días de ratas de Lewis: La congelación y la vitrificación usando el medio VS55. Los resultados metabólicos de este estudio fueron buenos tanto para los congelados como los vitrificados, sin embargo a nivel histológico la congelación reveló daños celulares, mientras que la vitrificación, aunque produjo menor daño, mostraba efectos tóxicos, lo que sugería que era necesaria la optimización de estos métodos, así como el desarrollo de medios de vitrificación menos tóxicos. Más adelante Fahy *et al.* (2009) utilizaron el medio M22 para la vitrificación de riñones de conejo, y aunque sólo tuvo éxito uno de ellos, demostró la supervivencia de éste al proceso de crioconservación y su viabilidad tras el posterior trasplante. Por este motivo, se creyó apropiado para nuestro estudio el uso de la solución de vitrificación M22, aunque en nuestro caso no difundimos el medio en los metanefros sino que los sumergimos en él. Además, para tener otro medio con el que comparar resultados, se eligió el VM3, descrito también por Fahy (2004), y caracterizado por tener una menor toxicidad que el anterior. Lo obtenido en nuestros resultados reveló que en metanefros vitrificados con ambos medios, se producía el desarrollo de estos una vez transferidos en el receptor, con unos porcentajes de éxito más o menos similares. Sin embargo, el análisis histológico de aquellos que habían sido vitrificados con M22 mostraba mayores daños, producto del proceso de crioconservación, como la vacuolización indicada anteriormente, así como el retraso en la

maduración de las nefronas. Aunque se quería probar que los resultados utilizando el M22 tenían el éxito que tuvieron Fahy *et al.* (2009) con el riñón, nuestros resultados, a pesar de no ser negativos, muestran daños importantes debidos probablemente a que el tamaño del riñón desarrollado es mucho mayor que el del riñón embrionario, por lo que la toxicidad del medio M22 podría tener un mayor impacto en estos últimos, causando daños como la vacualización presente. Además, en nuestro caso sumergimos los metanefros en la solución de vitrificación, mientras que el protocolo seguido por Fahy *et al.* (2009) se basa en la difusión del medio en el interior del riñón, por lo que esto también podría haber influido en que los resultados sean distintos. Por el contrario, en los vitrificados con VM3 se observó una mayor similitud en comparación con los metanefros frescos y por tanto al control de 37 días utilizado: el número de nefronas así como el desarrollo de las mismas era prácticamente idéntico al observado en los metanefros frescos, y no se mostraban daños característicos del proceso de vitrificación. Estos resultados podrían ser debidos probablemente a la naturaleza menos tóxica de esta solución. Al observar la composición de ambos medios puede apreciarse que a pesar de son muy similares, difieren en una serie de puntos importantes: en el caso del M22 hay presencia de los compuestos N-metilformamida y de 3 metoxy-1,2-propanodiol, dos crioprotectores penetrantes y por tanto más tóxicos. El VM3 en cambio no está constituido por ninguno de estos dos crioprotectores, y la falta de estos es suplida por un aumento de la concentración en favor de la polivinil pirrolidona K12 con respecto al medio M22, el cual es un crioprotector no penetrante y por tanto de menor toxicidad.

## **5. *CONCLUSIONES***

## **5. CONCLUSIONES**

Las conclusiones que se pueden extraer tras la realización de este trabajo son:

- En primer lugar, que los metanefros se desarrollan en el receptor no inmunodeprimido tras su implantación y son capaces de formar estructuras glomerulares.
- En segundo lugar, se demuestra que es posible almacenar metanefros a largo plazo mediante el proceso de vitrificación. Empleando ambos medios, VM3 y M22, para vitrificar metanefros de embriones de 16 días junto con el soporte "Cryotop" se obtuvo un porcentaje similar de desarrollo a las 3 semanas tras su transferencia en un receptor adulto sin inmunodeprimir.

Futuros trabajos deberán demostrar la funcionalidad de los nuevos riñones.

## **6. *PERSPECTIVAS DE FUTURO***

## 6. PERSPECTIVAS DE FUTURO

El riñón es un órgano que presenta una compleja estructura cuyo correcto funcionamiento es íntimamente dependiente de que el crecimiento y diferenciación de sus células precursoras se lleve a cabo de manera orquestada para que tenga lugar la formación de un órgano maduro que comprenda numerosos tipos celulares distintos (Hammerman, 2002). Debido al déficit de este órgano para cubrir a todos los enfermos renales crónicos, y dado que las terapias sustitutivas como la diálisis no ponen fin al problema, además de alterar el estilo de vida del enfermo, en la actualidad hay abiertas muchas líneas de investigación para aportar alternativas al trasplante convencional, algunas de las cuales se han explicado en este trabajo.

Una de las líneas de investigación por la que más se apuesta es el uso de células madre embrionarias (ESC) o células pluripotentes inducidas (iPCs), sin embargo para que el uso clínico de este tipo de células sea viable, éstas deberían diferenciarse en formas maduras funcionales, lo cual hasta la fecha sólo se ha conseguido con muy pocos tipos celulares, concretamente con las células  $\beta$ -pancreáticas y los miocitos cardíacos (Kelly *et al.*, 2011; Dambrot *et al.*, 2011). La razón del poco éxito de estas terapias en el problema que se presenta radica en que en los programas de desarrollo que median la diferenciación de las células madre en células maduras intervienen numerosos factores que todavía se desconocen. Es por esta razón que elucidar estos programas de desarrollo celular para cada órgano, en concreto el riñón, supone un reto al que hacer frente de cara al futuro, de modo que puedan aportar en un futuro una solución viable al déficit presente.

Dadas las incógnitas que quedan aún por resolver en el campo de la investigación con células madre, parece ser que la forma más práctica y que hasta la fecha ha mostrado resultados más prometedores para emplear la terapia celular con el fin de desarrollar un riñón maduro, es el uso de metanefros, los cuales están ya preprogramados para formar un riñón. En concreto esta estrategia tiene una relevancia importante si se hace hincapié en la idea del xenotrasplante de estos riñones embrionarios de cerdo, por las similitudes fisiológicas comentadas. Esto se debe a que el xenotrasplante de metanefros de cerdo ampliaría la disponibilidad de órganos además de contar con las ventajas en cuanto a rechazo que presenta el trasplante de tejido embrionario. Además el xenotrasplante de metanefros de cerdo, una vez empleado con seguridad y eficacia en los seres humanos, podrá proporcionar, un suministro ilimitado de donantes de órganos, lo que supondrá un cambio en el paradigma actual de sustitución de órganos, aportando grandes mejoras:

- No habrá necesidad de transportar los órganos a través de largas distancias (Hammerman, 2007).

- El trasplante se podrá hacer de forma efectiva en el momento conveniente (Hammerman, 2009).
- El trasplante se podrá ofrecer a los individuos de alto riesgo y repetirse si es necesario (Brands *et al.*, 2008).
- El trasplante se podrá ofrecer a los pacientes que actualmente no los candidatos al no presentar una situación crítica, pero que son enfermos renales crónicos (Dekel *et al.*, 2002).

Además de las alternativas abiertas para aportar alternativas al trasplante convencional de riñón en las cuales todavía queda mucho que hacer, otro objetivo muy a tener en cuenta y que también se plantea en este trabajo es el de disponer de métodos que permitan la conservación a largo plazo de órganos enteros así como de sus sustitutos. Hasta ahora la vitrificación parece ser el método más idóneo para llevar a cabo este fin, sin embargo también habría que seguir desarrollando nuevas técnicas para mejorar los resultados actuales.

En este trabajo en concreto, dado que se ha demostrado que los metanefros vitrificados también se desarrollan *in vivo*, el paso siguiente iría enfocado a ver de qué manera estaría afectando a nivel metabólico y proteómico el proceso de vitrificación, además de llevar a cabo estudios de apoptosis celular. Sólo de este modo podría llegar a ser viable y segura en un futuro la creación de un biobanco de metanefros.

## **7. *REFERENCIAS***

## 7. REFERENCIAS

A.L.M. DE FRANCISCO. (2011). Sostenibilidad y equidad del tratamiento sustitutivo de la función renal en España. *Revista Nefrología. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología*. 31(3):241-6

ARMITAGE W. J., HALL S. C., ROUTLEDGE C. (2002). Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at -110°C. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 43:2160-4

BARNETT N.; MAMODE N. (2011). Kidney Transplantation, *Surgery* 29; 7

BŐSZE Z. S., HOUEBINE L. M. (2006). Application of rabbits in biomedical research: a review. *World Rabbit Sci*. 14: 1 – 14

BOTTOMLEY M. J., BAICU S., BOGGS J. M., MARSHALL D. P., CLANCY M., BROCKBANK K. G. M., AND BRAVERY C. A. (2005) Preservation of Embryonic Kidneys for Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 37, 280–284

BRANDS K., COLVIN E., WILLIAMS L. J., WANG R., LOCK R. B., TUCH B. E. (2008). “Reduced immunogenicity of first-trimester human fetal pancreas,” *Diabetes*, vol. 57, no. 3, pp. 627–634

BROCKBANK K. G., SONG Y. C. (2004). Morphological analyses of ice-free and frozen cryopreserved heart valve explants. *J Heart Valve Dis*; 13:297-301

CALASANS-MAIA M. D. , MONTEIRO M. L., ÁSCOLI F. O., GRANJEIRO J. M. (2009) The rabbit as an animal model for experimental surgery. *Acta Cir Bras*. 24-4

CAPLAN A. (2008). Organ Transplantation en: *From Birth to Death and Bench to Clinic: The Hastings Center Bioethics Briefing Book For Journalists, Policymakers, And Campaigns*. Ed. Mary Crowley. Garrison, 129-132

CARDOSO E. S., CANÇADO, R. P., HEITZ C. , GERHARDT DE OLIVEIRA M. (2007). Estudo exploratório descritivo do emprego de coelhos brancos da Nova Zelândia (*Orytolagus cuniculus*) como modelo animal na avaliação dos padrões de crescimento craniofacial. *Revista Odonto Ciênc*. 22(55):66-71

CASCALHO M., PLATTE J. L. (2001). Xenotrasplantation and other means of organ replacement. *Nat Rev Immunol*; 1:154-160

CLANCY M. J., MARSHALL D., DILWORTH M., BOTTOMLEY M., ASHTON N., BRECHLEY P. (2009). Immunosuppression is essential for successful allogeneic transplantation of the metanephros. *Transplantation*. 88(2):151-9

COURBIERE B., MASSARDIER J., SALLE B., MAZOYER C., GUERIN J-F, LORNAGE J. (2005). Follicular viability and histological assessment after cryopreservation of whole sheel ovaries with vascular pedicle by vitrification. *Fertil Steril* 84: 1065-71

DAMBROT C., PASSIER R., AT SMA D., MUMMERY C. L. (2011). Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells and their use as cardiac disease models. *Biochem J*. 15;434(1):25-35. doi: 10.1042/BJ20101707

DEKEL B., AMARIGLIO N., KAMINSKI N., SCHWARTZ A., GOSHEN E., ARDITTI F. D., TSARFATY I., PASSWELL J. H., REISNER Y., RECHAVI G. (2002). Engraftment and differentiation of human metanephroi into functional mature nephrons after transplantation into mice is accompanied by a profile of gene expression similar to normal human kidney development. *J Am Soc Nephrol*. 13(4):977-90.

EIRAKU M, TAKATA N, ISHIBASHI H, KAWADA M., SAKAKURA E., OKUDA S., SEKIGUCHI K., ADACHI T., SASAI Y. (2011). Selforganizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*; 472: 51–56

FAHY G. M., WOWK B., WU J., PHAN J., RASCH C., CHANG A., ZENDEJAS E. (2004). Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances. *Cryobiology* 48, 157–178

FAHY G. M., WOWK B., WU J. (2006). Cryopreservation of Complex Systems: The Missing Link in the Regenerative Medicine Supply Chain. *Rejuvenation research*. Volume 9, Number 2

FAHY G. M., WOWK B., PAGOTAN R., CHANG A., PHAN J., THOMPSON B., PHAN L. (2009). Physical and biological aspects of renal vitrification. *Orgnanogenesis* 5:3, 167-175

FISCHER B., CHAVATTE-PALMER P., VIEBAHN C., NAVARRETE SANTOS A., DURANTHON V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*. 144(1):1-10. doi: 10.1530/REP-12-0091

GRAUR D., DURET L., GOUY M. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature.*, 379, 333-335

HAMMERMAN M. R. (2002). Transplantation of developing kidneys. *Transplantation Rev.* 16, 62±71

HAMMERMAN M. R. (2002). Xenotransplantation of developing kidneys. *Am. J. Physiol.* 283, F601±F606

HAMMERMAN M. R. (2004). Growing new kidneys in situ. *Clin Exp Nephrol*; 8: 169–177

HAMMERMAN M. R. (2007). “Organogenesis of kidney and endocrine pancreas: the window opens,” *Organogenesis*, vol. 3, no. 2, pp. 59–66

HAMMERMAN M. R. (2009). “Xenotransplantation of pancreatic and kidney primordia: where do we stand?” *Transplant Immunology*, vol. 21, no. 2, pp. 93–100

HAMMERMAN M. R. (2009). Xenotransplantation of Embryonic Pig Kidney or Pancreas to Replace the Function of Mature Organs. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Transplantation* Volume 2011, Article ID 501749, 9 pages doi:10.1155/2011/501749

JOFRÉ R. (1999). Factores que afectan a la calidad de vida en pacientes en prediálisis, diálisis y trasplante renal. *Nefrología*. Vol. XIX. Suplemento 1

KAROW A. M. JR. (1974). The organ bank concept, en: *Karow AM Jr, Abouna GJM, Humphries AL Jr*, Ed. *Organ Preservation for Transplantation*. Boston: Little, Brown and Company 3-8

KELLY C., FLATT C. C., MCCLENAGHAN N. H. (2011). Stem cell-based approaches for the treatment of diabetes. *Stem Cells Int.*:424986. doi: 10.4061/2011/424986

KHIRABADI B., FAHY G. M. (2000). Permanent life support by kidneys perfused with a vitrifiable (7.5 molar) cryoprotectant solution. *Transplantation* 70 (1) 51–57

MACHIGUCHI T., NAKAMURA T. (2013). Cellular interactions via conditioned media induce in vivo nephron generation from tubular epithelial cells or mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*; 435: 327–333

MATSUMOTO K, YOKOO T., MATSUNARI H., IWAI S., YOKOTE S., TERATANI T., GHEISARI Y., TSUJI O., OKANO H., UTSUNOMIYA Y., HOSOYA T., OKANO H. J., NAGASHIMA H., KOBAYASHI E. (2012). Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem cells: Regenerative medicine*; 30: 1228–1235

MERUSSE J. L. B., LAPICHIK V. B. V. (1996) Instalações e equipamentos en: *Manual para técnicos em bioterismo*. 2ª Ed. São Paulo: EPM

MIGISHIMA F., SUZUKI-MIGISHIMA R., SONG S-Y, KURAMOCHI T., AZUMA S., NISHIJIMA M., YOKOYAMA M. (2003). Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod*; 68:881-7

NAITO, M. (1993) Macrophage heterogeneity in development and differentiation. *Arch. Histol. Cytol.* 56, 331±351

OPTN. Annual report of the U.S. Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) and the scientific registry of transplant recipients: Current U.S. Waiting list based on OPTN data as of April 2, 2010. (Dept. of Health and Human Services)

ONT (2013) Datos registro mundial de trasplantes

OTT H. C., MATTHIESEN T. S., GOH S-K, BLACK L. D., KREN S. M., NETOFF T. I., TAYLOR D. A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.* 14, 213–221

OTT, H.C., CLIPPINGER B., CONRAD C., SCHUETZ C., POMERANTSEVA I., IKONOMOU L., KOTTON D., VACANTI J. P. (2010). Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat. Med.* 16, 927–933

PEARCE A. I., RICHARDS R. G., MILZ S., SCHNEIDER E., PEARCE S. G. (2007). Animal models for implant biomaterial research en *Bone: a review*. Ed. *Eur Cell Mater* 2(13):1-10

REGISTRO ESPAÑOL DE ENFERMOS RENALES R.E.E.R (2010) <http://www.registrorenal.es/index.php>

ROGERS S. A, RYAN G., HAMMERMAN M. R. (1991). Insulin-like Growth Factors I and II Are Produced in the Metanephros and Are Required for Growth and Development In Vitro. *The Journal of Cell Biology*, Volume 113, Number 6, 1447-1453

ROGERS S. A., LOWELL J. A., HAMMERMAN N. A., HAMMERMAN M. R. (1998). Transplantation of developing metanephroi into adult rats. *Kidney Int.* 54 (1):27-37

ROGERS, S. A. AND HAMMERMAN, M. R. (2001) Transplantation of rat metanephroi into mice. *Am. J. Physiol.* 280, R1865±R1869

ROGERS S. A., HAMMERMAN M. R. (2001) Transplantation of metanephroi after preservation in vitro. *Am j physiol regul integr comp physiol.* 281(2):r661-5

ROGERS S. A., TALCOTT M., HAMMERMAN M. R. (2003). Transplantation of pig metanephroi. *ASAIO J* 49:48

SALEHNIYA M. (2002). Autograft of vitrified mouse ovaries using ethylene glycol as cryoprotectant. *Exp Anim* 5:509-12

SAMSTEIN, B. AND PLATT, J. (2001) Physiologic and immunologic hurdles to xenotransplantation. *J. Am. Soc.Nephrol.* 12, 182±193

SMITH A. U. (1957). Problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0°C. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:533-44.

SONG Y. C., KHIRABADI B.S., LIGHTFOOT F., BROCKBANK K. G., TAYLOR M. J. (2000). Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol*; 18:296-9

SONG J. J., GUYETTE J. P., GILPIN S. E., GONZALEZ G., VACANTI J. P., OTT H. C. (2013). Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nature medicine.* 19-5

STEER D.L., NIGAM S. K. (2004). Developmental approaches to kidney tissue engineering. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F1

STARZL T. E. (1970) A look ahead at transplantation. *J Surg Res* 10:291-7

STATTER, M., FAHRNER, K. J., BARKSDALE, E. M., PARKS, D. E., FLAVELL, R. A. AND DONAHOE, P. K. (1989) Correlation of fetal kidney and testis congenic graft survival with reduced major histocompatibility complex burden. *Transplantation* 47, 651±660

SUGA H., KADOSHIMA T., MINAGUCHI M., OHGUSHI M., SOEN M., NAKANO T., TAKATA N., WATAYA T., MUGURUMA K., MIYOSHI H., YONEMURA S., OISO Y., SASAI Y. (2011). Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature*. 480: 57–62

SUGIMOTO M., MAEDA S., MANABE N., MIYAMOTO H. (2000). Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 53:1093-103

TAYLOR M. J., SONG Y. C., BROCKBANK K. G. (2004). Vitrification in tissue preservation: new developments, en: *Fuller B. J., Lane N., Benson E.E.* Eds. *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC Press; 603-41.

UNBEKANDT M., DAVIES J. A. (2010). Dissociation of embryonic kidneys followed by reaggregation allows the formation of renal tissues. *Kidney Int* 77: 407–416.

VILLA G., RODRÍGUEZ-CARMONA A., FERNÁNDEZ-ORTIZ L., CUERVO J., REBOLLO P., OTERO A. AND ARRIETA J. (2011). Cost analysis of the Spanish renal replacement therapy programme. *Nephrol Dial Transplant* 26: 3709–3714

XINARIS C., BENEDETTI V., RIZZO P., ABBATE M., CORNA D., AZZOLLINI N., CONTI S., UNBEKANDT M., DAVIES J. A., MORIGI M., BENIGNI A., REMUZZI G. (2012). In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol*; 23: 1857–1868

XINARIS C.; YOKOO T. (2014). Reforming the Kidney Starting from a Single-Cell Suspension. *Nephron Exp. Nephrol*; 126:107–112

XINARIS C., BENEDETTI V., RIZZO P., ABBATE M., CORNA D., AZZOLLINI N., CONTI S., UNBEKANDT M., DAVIES J. A., MORIGI M., BENIGNI A., REMUZZI G. (2012). In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol*; 23: 1857–1868

YOKOTE S., YOKOO T., MATSUMOTO K., OHKIDO I., UTSUNOMIYA Y., KAWAMURA T., HOSOYA T. (2012). Metanephros transplantation inhibits the progression of vascular calcification in rats with adenine-induced renal failure. *Nephron Exp Nephrol.* 120:e32–e40