

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***TRASPLANTE DE RIÑONES EMBRIONARIOS: UNA ALTERNATIVA A LA ESCASEZ DE DONANTES***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Ximo García Domínguez

TUTOR: Francisco Marco Jiménez

*Curso Académico: 2013-2014*

VALENCIA, JULIO 2014



**Datos personales y del trabajo de fin de grado**

Nombre y apellidos: Ximo García Domínguez

Título del TFG: Trasplante de riñones embrionarios: una alternativa a la escasez de donantes

Lugar de realización: Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA)

Titulación: Biotecnología

Intensificación: Biotecnología Animal y Humana

Tutor Académico: Francisco Marco Jiménez

Fecha de lectura: Julio de 2014

**Resumen**

Actualmente, la prevalencia de las enfermedades renales crónicas “ERC” sigue superando el desarrollo de estrategias de tratamiento eficaces, por lo que aquellos pacientes con enfermedades avanzadas deben recurrir a terapias de remplazo renal, como la hemodiálisis o la diálisis peritoneal.

El presente trabajo tiene como objetivo comprobar la capacidad de desarrollo de los metanefros (riñones embrionarios) al ser implantados en un organismo adulto sin necesidad de inmunosupresores. Usando el conejo como modelo animal, se obtuvieron metanefros (entendidos como posibles precursores de órganos) de embriones de 15 días y se trasplantaron en animales adultos (alotrasplante), analizándose su capacidad de desarrollo y de generar nefronas 21 días post-trasplante. Este proceso se repitió con metanefros vitrificados con dos medios de vitrificación diferentes, el VM3 y el M22, para evaluar el efecto de ambos medios sobre la viabilidad y el post-desarrollo de los metanefros.

Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: los metanefros frescos que se recuperaron habían adquirido un tamaño, morfología y estructura similar a los riñones controles de 36 días, además mostraban el resultado de una nefrogénesis activa (abundantes nefronas). Los metanefros vitrificados con el medio VM3 mostraron un desarrollo similar a los frescos, y además se observó el resultado de una gran nefrogénesis, presentando una gran integridad celular tras el proceso de crioconservación. En cambio los metanefros vitrificados con el medio M22 presentaban un mayor retraso en el desarrollo que los vitrificados con VM3 respecto a los frescos. Además la nefrogénesis en este experimento, aunque presente, había sido escasa y, aunque presentaban una gran integridad celular tras la vitrificación, ésta era menor que en los metanefros vitrificados con el medio VM3.

**Palabras clave**

Metanefros, trasplante renal, desarrollo renal, organogénesis, función renal, rechazo, crioconservación, vitrificación, enfermedad renal crónica.



**Dades personals y del treball de fi de grau**

Nom y Cognoms: Ximo García Domínguez

Títol del TFG: Trasplantament de ronyons embrionaris: una alternativa a l'escassetat de donants

Lloc de realització: Institut de Ciència y Tecnologia Animal (ICTA)

Titulació: Biotecnologia

Intensificació: Biotecnologia Animal y Humana

Tutor Acadèmic: Francisco Marco Jiménez

Data de lectura: Juliol de 2014

**Resum**

Actualment, la prevalença de les malalties renals cròniques segueix superant el desenvolupament de tractaments eficaços, de manera que aquells pacients amb malalties avançades deuen recórrer a teràpies de reemplaçament renal, com l'hemodiàlisi o la diàlisi peritoneal.

Aquest treball té com a objectiu comprovar la capacitat de desenvolupament dels metanefros (ronyons embrionaris) al ser implantats en un organisme adult sense necessitat d'immunosupressors. Usant el conill com a model animal, s'obtingueren metanefros (entesos com a possibles precursors d'òrgans) d'embrions de 15 dies i es trasplantaren en animals adults (al·lotrasplantament), analitzant la seua capacitat de desenvolupament i de generar nefrones 21 dies post-trasplantament. Aquest procés es va repetir amb metanefros vitrificats amb dos medis de vitrificació diferents, el VM3 i el M22, per avaluar l'efecte d'ambdós medis sobre la viabilitat i el post-desenvolupament dels metanefros.

Els resultats que s'obtingueren varen ser els següents: els metanefros frescs que es van recuperar havien adquirit una mida, morfologia i estructura similar als ronyons controls de 36 dies, a més mostraven el resultat d'una nefrogènesi activa (abundants nefrones). Els metanefros vitrificats amb el medi VM3 van mostrar un desenvolupament similar als frescs i, a més, es va observar el resultat d'una gran nefrogènesi, presentant una gran integritat cel·lular després del procés de crioconservació. En canvi els metanefros vitrificats amb el medi M22 presentaven un major retard en el desenvolupament que els vitrificats amb VM3 (respecte als frescs). A més la nefrogènesi en aquest experiment, encara que present, havia estat escassa i, tot i que presentaven una gran integritat cel·lular després de la vitrificació, aquesta era menor que en els metanefros vitrificats amb el medi VM3.

**Paraules clau**

Metanefros, trasplantament renal, desenvolupament renal, organogènesi, funció renal, crioconservació, vitrificació, rebug, malaltia renal crònica.

**Information about the author and the TFG**

Name and surnames: Ximo Garcia Dominguez

Title of TFG: Transplantation of embryonic kidneys: an alternative to the donor's shortage

Place of performance: Institute of Animal Science and Technology (ICTA)

Degree: Biotechnology

Intensification: Animal and Human Biotechnology

Academic tutor: Francisco Marco Jiménez

Reading date: Julio de 2014

**Abstract**

Currently, the prevalence of chronic kidney disease continues to overcome the development of effective treatment strategies. Therefore, those patients with advanced disease are obligated to use renal replacement therapies such as hemodialysis or peritoneal dialysis.

This work aims to test the ability of metanephros (embryonic kidneys) to develop after being implanted in an adult organism without immunosuppressants. Rabbit metanephros were obtained from 15-day-old embryos and transplanted into adult animals (allogeneic). Their ability to generate nephrons were analysed 21 days post-transplant. This process was repeated with vitrified metanephros, using two different vitrification solutions, the VM3 and M22. Then, the effect of both solutions in viability and development of metanephroi were evaluated.

As results showed, those recovered fresh metanephros acquired a size, morphology and a structure similar to the controls kidneys of 36-day-old. Additionally, fresh metanephros showed an active nephrogenesis (abundant nephrons). Vitrified metanephros with VM3 solution showed a similar development to the fresh metanephros. A large nephrogenesis and correct cell integrity after cryopreservation were also observed. However, vitrified metanephros with M22 solution showed more delay in development than fresh metanephros and VM3 vitrified metanephros. Furthermore, the nephrogenesis observed in this case was less than in the VM3 vitrified metanephros. Although vitrified metanephroi with M22 also presented a correct cell integrity after vitrification, it was lower than in the VM3 vitrified metanephros.

**Key Words**

Metanephros, kidney transplantation, kidney development, organogenesis, renal function, cryopreserved, vitrification, rejection, chronic-state renal disease.

## Agraïments

Arribat aquest punt, en el que acaba una etapa que ha estat clau en el meu desenvolupament tant personal com professional, m'agradaria dedicar unes paraules a totes aquelles persones que, d'una manera o d'altra, han sigut protagonistes d'aquest capítol de la meua vida.

En primer lloc, voldria agrair-li al director d'aquest projecte, Paco, l'oportunitat que em va donar quan li vaig demanar fer aquest treball amb ell, així com la confiança que va tindre en mi des del primer dia i tot el temps que m'ha dedicat per a resoldre els meus dubtes. Crec que es tremendament reconfortant, després del esforç realitzat per a dur a terme aquest treball, poder dir que ha valgut la pena. I això, es algo d'agrair.

També m'agradaria agrair a tot l'equip del laboratori la seva ajuda a l'hora de realitzar cadascun dels experiments. Sense la seva ajuda la cosa hagués estat molt més complicada. Per tot això, voldria donar-li les gràcies d'una manera especial a Estrella, però també d'igual manera a Jose, Luis, Mara, Carmen i Amparo, ja que, d'una manera o d'altra, han fet possible aquest treball.

No podia faltar en aquestes línies el que ha sigut com un germà per a mi durant estos anys, i de qui estic segur que, passe el temps que passe, mai m'oblidaré: Gracián. Ell ha sabut estar al meu costat en aquells moments en els que necessites un muscle sobre el que recolzar-te, però també a sabut fer, de qualsevol cosa, moments inoblidables. Han sigut quatre anys fins ara, però estic segur que açò es sols el començament. Avui en dia, costa trobar amics com ell. Gràcies per un infinitat de bons moments i per deixar-me compartir els no tan bons. Per a sempre!

També m'agradaria parlar de la meua amiga Silvia, ja que els bons moments han estat incalculables al seu costat. Gràcies pels teus consells i ànims quan els he necessitat i per la teua constant disposició a ajudar-me en tot. Però sobretot, gràcies per haver sigut, a més d'una bona companya, una amiga.

A continuació, voldria fer menció d'aquells que han compartit aquest camí universitari amb mi, a més de taula a classe durant els quatre anys. Han sigut fonamentals en la majoria de les històries que componen aquesta etapa de la meua vida y han estat disposats a escoltar-me sempre que ho he necessitat. Moltes gràcies amics: Alba, Marta i Pedro (un bon amic y un bon company de pràctiques).

Què dir dels meus amics de tota la vida? En aquests casos sobren les paraules. I sobren no perquè tot el mon pot deduir que seran paraules meravelloses y esplèndides, sinó perquè cap paraula podria definir amb justícia allò que Laura, Rebeca, Elena, Manu, Christian y la resta de baloners y baloneres han suposat per a mi des de que tinc ús de raó. Diuen que cadascú es el resultat de totes les experiències viscudes fins al moment, i per això he de dir que, si soc el que soc, es en part gràcies a tots ells.

I finalment, agrairé a aquells que han estat pendent de mi des de que vaig arribar al mon, aquells que, sense dubtar-ho, donarien el que fos pel meu bé, la meua família, ja que sense ells no haguera aconseguit aplegar fins ací. Agraïsc als meus pares, Ximo y Mariluz, el haver estat sempre al meu costat y haver-me guiat sempre pel bon camí. Gràcies per haver-me recolzat en totes les meues decisions, haver-les respectat, haver-me aconsellat, haver confiat sempre en mi i haver omplit la meua vida de bons moments. En definitiva, gràcies per fer-me la vida tan fàcil y per haver-me estimat incondicionalment, em sent realment afortunat y done gracias a la sort de ser el vostre fill. Sou els millors pares del mon!. A mesura que passa el temps, vaig valorant més les coses que he tingut i tinc, i si alguna cosa he après, es que vos ho dec tot a vosaltres.

Tornant a la línia d'abans, en la que faig menció de la sort, voldria tornar a agrair la sort d'haver tingut el privilegi de tindre els avis que tinc. Els seus consells han estat sempre a l'altura de la situació que els requeria. A més, la seua saviesa ha sigut clau per a formar-me en el sentit més important en el que pot formar-se una persona, en el sentit personal. Gràcies a vosaltres he crescut en el millor dels ambients, sentint-me part d'una gran família unida, i això, es una sort. Vosaltres heveu aconseguit que em plene d'orgull portar els meus cognoms. Gràcies per tot això. Vos estime: Juan, Pepica, Ramón y Carmen.

M'agradaria concloure dedicant-li les ultimes línies del apartat mes personal d'aquest projecte a la meua iaia Pepa, ja que ha sabut fer de la seva vida un exemple a seguir. Jo sé, igual que tots els que la coneixen, que d'haver sigut una època favorable la seua, haguera aplegat molt lluny, ja que tot el que es proposava aprendre ho aprenia bé i en poc temps. Des de ben menuda els mestres parlaven meravelles d'ella, i es que... com havien de parlar si antes d'anar a l'escola ja sabia escriure i llegir?. Sé que haguera pogut aplegat molt lluny, y em sent hereu de part del seu saber. Tots els èxits professionals que obtinc sent que d'alguna manera li pertanyen a ella també. Veig en mi, una projecció de la seua persona. Moltes gràcies per tot iaia!

**MOLTES GRÀCIES A TOTS!**

## **Índice general**

---

---

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Situación actual de los tratamientos de la insuficiencia renal crónica	1
1.2. Alternativas a la escasez de órganos	2
1.3. Crioconservación de órganos	10
1.4. El conejo como modelo animal	11
<b>2. Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>3. Material y Métodos</b>	<b>14</b>
3.1. Producción de embriones	14
3.2. Recuperación de los metanefros	16
3.3. Vitrificación y desvitrificación	16
3.4. Transferencia de los metanefros	19
3.5. Recuperación y evaluación histológica	20
3.6. Análisis estadístico	
<b>4. Resultados</b>	<b>22</b>
4.1. Histología y morfología de los embriones	22
4.2. Transferencia de los metanefros	23
4.3. Histología de los metanefros	26
<b>5. Discusión</b>	<b>28</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>33</b>
<b>7. Referencias</b>	<b>34</b>

## **Índice de figuras**

---

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Descelularización de órganos. (A, B, C) Descelularización de riñones de de rata progresivamente. Ra, Arteria Renal; Rv, Vena Renal; U, ureter. (D) Esquema del sembrado celular de células endoteliales (vía A-Arteria renal,ra) y células epiteliales(vía B-Ureter,u) mientras actúa una presión negativa ejercida por la vía C para generar un gradiente de presión transrenal (Song et al., 2013).	3
Figura 2. “Bioprinting”. (A) Esquema del bioensamblaje, de un tejido tubular construido mediante la técnica de impresión de tejidos, debido al autoensamblaje de los esferoides tisulares depositados capa por capa (Mironov et al., 2009). (B, C) pre-procesamiento o desarrollo del diseño de los órganos de forma digital; (D, E) impresión de los órganos reales; (F) post-procesado o acondicionamiento y maduración del órgano en un bioreactor (Mironov et al., 2011).	4
Figura 3. Trasplante de metanefros. [A] Metanefros de una camada entera de embriones de 15 días (E15) de rata (Clancy et al., 2009). [B] Metanefros. (M) trasplantados cerca de los vasos renales. Se puede observar el uréter metanéfrico (U), el riñón nativo (NK) y la vena renal (RV) (Clancy et al., 2009).	6
Figura 4. Conejo Blanco de Nueva Zelanda. Raza empleada en el presente trabajo.	12
Figura 5. Esquema de la inseminación artificial de conejo. (A) Vagina artificial. (B, C) Recuperación de semen. (D) Carga de la cánula de inseminación. (E) Inseminación artificial. (F) Inducción a la ovulación.	14
Figura 6. (A) Cuernos uterinos de una hembra gestante. (B) Vista macroscópica de una embrión E15 de conejo unido a la placenta fetal.	15
Figura 7. Fotografía de un embrión de conejo E15.	15
Figura 8. Metanefros en un embrión de conejo de 15 días. (A) Posición de los metanefros en un embrión de conejo E15. (B) Metanefros aislados.	16



<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 9. Proceso de vitrificación. (A) Cryotop. La flecha indica el lugar de colocación de los metanefros. (B) Cánister. (C) Recipiente de NL. (D) Banco de NL.	18
Figura 10. Desvitrificación de los metanefros. (A) Cánister. (B) Metanefro vitrificado en Cryotop. (C) Proceso de desvitrificación. (D) Desvitrificación del metanefro. (E) Aspecto del metanefro desvitrificado.	18
Figura 11. (A) Introducción de los metanefros en el catéter. (B) Catéter cargado con un metanefro (indicado con la flecha).	19
Figura 12. (A) Incisión en el tejido adiposo con la aguja epidural para crear el pocillo. (B) Deposición del metanefro en el pocillo tras la introducción del catéter.	20
Figura 13. (A) Inyección intravenosa de pentobarbital sódico. (B) Material empleado en la tinción histológica.	20
Figura 14. Histología de embriones E15. (A) Fotografía de un embrión de conejo E15. (B) Histología de un embrión de conejo E15. El círculo señala el metanefro. (C) Detalle del metanefro a 100x aumentos. (D) Detalle del metanefro a 200x aumentos.	22
Figura 15. Angiogénesis. Las flechas muestran los metanefros 21 días post-transferencia en la grasa omental.	23
Figura 16. Recuperación de los metanefros 21 días post-transferencia y riñones control de 36 días.	24
Figura 17. Recuperación y aspecto de los metanefros 21 días post-trasplante. (A) Recuperación de los metanefros. (B) Detalle del crecimiento y forma de los metanefros, así como la apariencia de los mismos. Se observa la apariencia de la corteza y la médula renal.	25

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 18. Riñón de conejo de 36 días vs Metanefro fresco 21 días post-trasplante. En esta imagen se aprecia con detalle la similitud de tamaño entre un riñón control de 36 días y un metanefro fresco 21 día post-trasplante. Además, el metanefro, no solo ha desarrollado la ultraestructura renal, sino que presenta también un uréter definido.	25
Figura 19. Histología controles. (A, B) Riñón control adulto a 200x y 400x aumentos respectivamente. (C, D) Riñón control 5 semanas a 200x y 400x aumentos respectivamente.	26
Figura 20. Histología de los metanefros 21 días post-trasplante. (A) Frescos a 400x aumentos. (B) Vitrificados con VM3 a 400x aumentos. (C) Vitrificados con M22 a 400x aumentos y vacuolización a 100x aumentos.	27
Figura 21. (A) Corte histológico de metanefro de rata 19 días post-transferencia (Clancy et al. 2009). (B) Corte histológico de metanefro de conejo 21 días post-transferencia (Escala: 0,1 mm).	28
Figura 22. (A) Metanefros de embriones de conejo E15. Riñón control de 36 días y Metanefro 21 días post-trasplante. La flecha señala el uréter desarrollado en el metanefro trasplantado.	29
Figura 23. Vascularización de novo de los metanefros. Las felchas indican la posición de los metanefros 21 días post-transferencia.	30
Figura 24. (A) Congelación vs Vitricación. (B) Morfología e histología del riñón control de 36 días y los metanefros (21 días post-trasplante) frescos, vitrificados con el medio VM3 y con el medio M22.	31
Figura 25. Biobanco.	32

## **Índice de tablas**

---

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla1. Costes anuales relativos al tratamiento en España de las enfermedades renales en estado terminal en 2010 (Villa et al., 2011).	2
Tabla 2. Porcentajes de éxito estimados en los distintos experimentos.	23

## **Abreviaturas**

---

## **Abreviaturas**

**APCs:** Células presentadoras de antígenos

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CaCl<sub>2</sub>:** Cloruro cálcico

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**DMSO:** Dimetil Sulfóxido

**DPBS:** Tampón fosfato salino sin cloruro cálcico

**EG:** Etilén glicol

**EPO:** Eritropoyetina

**ERC:** Enfermedad renal crónica

**E15:** Embriones de 15 días

**FBS:** Suero fetal bovino

**HMC:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**ICTA:** Instituto de Ciencia y Tecnología Animal

**MB:** Medio base

**NL:** Nitrógeno líquido (-196 °C)

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PROH:** 3-Metoxi,1,2-propanediol

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**UPV:** Universitat Politècnica de València

# 1. Introducción

---

# 1. Introducción

## 1.1. Situación actual de los tratamientos de la insuficiencia renal crónica

A día de hoy, el número de órganos disponibles para ser trasplantados en pacientes que sufren insuficiencia renal crónica sigue siendo muy inferior a los necesarios, generándose extensas listas a la espera de un órgano (OPTN, 2014). Aproximadamente, la insuficiencia renal crónica afecta a un 5-7% de la población mundial (Xinaris y Yokoo, 2014). Así, en Estados Unidos, se dispone en términos cuantitativos de aproximadamente 10.000 riñones para el trasplante en pacientes con una enfermedad renal crónica (ERC), sin embargo las listas de espera para trasplantes de riñón oscilan en torno a 100.000 pacientes (Hammerman y Rogers, 2014). Como consecuencia, alrededor de una docena de personas mueren diariamente en Estados Unidos a la espera de un trasplante de órganos. Además, esta situación es cada vez peor, ya que la demanda de órganos está creciendo más rápido que la oferta (Caplan, 2008), generándose largas listas de espera de más de 3 años que aumentan la mortalidad en un 5-10% de los casos (Xinaris y Yokoo, 2014). Esto implica la necesidad de recurrir a terapias que consigan mantener o suplantar la función perdida en aquellos casos en los que sea posible, puesto que muchos pacientes fallecen antes de que haya un órgano disponible para el trasplante (Hammerman y Rogers, 2014). Estos pacientes deben recurrir a tratamientos que imitan la función de filtrado glomerular, como la hemodialisis o la diálisis peritoneal. Sin embargo, estas técnicas no consiguen suplir las funciones endocrinas y de reabsorción propias de un riñón funcional (Salvatori et al., 2014). Además, es obvia la molestia para el paciente y su efecto sobre la calidad de vida del mismo (Jofré, 1999).

El tratamiento de la insuficiencia renal crónica supone un coste considerable a las Administraciones Públicas. En España, las cifras superan los 1430 millones de euros anuales (Tabla 1), y en Reino Unido, más de 30.000 personas están recibiendo este tipo de terapias de reemplazo renal con un coste estimado de £1,2 billones por año. Esto supone un 2% del presupuesto destinado a la salud en Reino Unido, donde más de 632 pacientes por millón de personas padecen una enfermedad renal en etapa terminal que requiere de terapias de reemplazo renal (Dilworth et al., 2008; Clancy et al., 2009).



Tabla1. Costes anuales relativos al tratamiento en España de las enfermedades renales en estado terminal en 2010 (Villa et al., 2011).

Terapia frente a la ERC	Hemodiálisis	Diálisis Peritoneal	Trasplante Renal
Pronóstico de la incidencia (pacientes)	5409	822	2317
Pronóstico de la prevalencia (pacientes)	22582	2420	24761
Costes anuales de las incidencia (€)*	2651	1808	38313
Costes anuales de la prevalencia (€)*	37968	25826	6283
Costes anuales indirectos (€)*	8929	7429	5483
Total Costes (millones de €)	1327	109	393

\*por paciente

## 1.2. Alternativas a la escasez de órganos

El trasplante alogénico sigue siendo el único tratamiento que restaura la función fisiológica completa, sin embargo, como ya se ha indicado anteriormente, la escasez de donantes junto a la elevada morbilidad quirúrgica y la necesidad de tratamientos inmunosupresores (tóxicos) a largo plazo limitan significativamente la aplicación clínica de este tratamiento (Salvatori et al., 2014). Por ello es necesario buscar alternativas que permitan subsanar todos estos inconvenientes, cobrando una gran importancia la medicina regenerativa en los últimos años (Daar, 2013). Esto se debe a que el potencial de la medicina regenerativa puede dirigirse hacia la obtención de una ultraestructura capaz de suplir todas las funciones del órgano nativo (Salvatori et al., 2014).

En esta línea, se está avanzando en estrategias, como el uso de células madre adultas o inducidas para la regeneración de tejido renal, que reduzcan la progresión hacia estadios más avanzados de la enfermedad o promueva la curación (Chou et al., 2014).

De esta forma, surge también la estrategia de descelularización de órganos, que consiste en la eliminación de las células que constituyen la ultraestructura de un órgano (Zhao et al., 2013), mediante procedimientos químicos (como ácidos o bases), físicos (temperatura o presión) o enzimáticos (Crapo et al., 2012). Así, se consigue obtener un soporte tridimensional, formado por la matriz extracelular del órgano tratado, susceptible de actuar como sustrato para el cultivo de nuevas células precursoras, procedentes del paciente, obteniéndose una estructura similar al órgano original pero con material biológico del propio paciente (tratando de evitar el rechazo hiperagudo y crónico). No obstante, sigue sin solventarse el problema de crear un órgano vascularizado e innervado capaz de

responder a estímulos y mantener la función *in vivo* (Bonandrini et al., 2014). Song et al. (2013) consiguieron producir así andamios acelulares (con arquitectura vascular, cortical, medular y sistemas de conductos colectores) que conservan las propiedades biomecánicas del riñón (Figura 1). Posteriormente estos riñones fueron sembrados con células epiteliales y endoteliales mediante la perfusión de las mismas (Figura 1), consiguiendo construcciones capaces de producir orina *in vitro*, al perfundirse a través del sistema vascular intrínseco, o *in vivo*, al ser trasplantados.

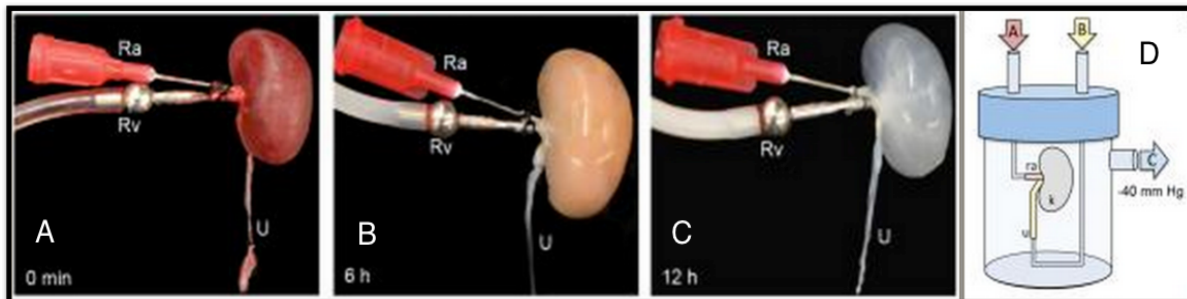


Figura 1. Descelularización de órganos. (A, B, C) Descelularización de riñones de de rata progresivamente. Ra, Arteria Renal; Rv, Vena Renal; U, ureter. (D) Esquema del sembrado celular de células endoteliales (vía A-Arteria renal,ra) y células epiteliales(vía B-Ureter,u) mientras actúa una presión negativa ejercida por la vía C para generar un gradiente de presión transrenal (Song et al., 2013).

Existe otra vertiente en esta misma línea científica basada en la impresión de órganos o “bioprinting”. Esta técnica se basa en la colocación de diversos tipos celulares en un andamio de acuerdo a una plantilla de diseño asistido por ordenador, pudiéndose imprimir simultáneamente células y biomateriales de forma precisa conformando una estructura 3D (Boland et al., 2006). En cuanto a los materiales de andamiaje biológicos empleados para este tipo de técnicas, cobran importancia los derivados de la matriz extracelular de los tejidos de mamífero, los cuales se pueden emplear con éxito para técnicas de ingeniería de tejidos debido a sus características estructurales y funcionales, siendo susceptibles de degradación y/o remodelación *in vivo* (Badylak et al, 2009). Cui et al. (2013) comprobaron que el proceso de impresión puede combinarse de forma efectiva con técnicas de transfección de genes o la administración de fármacos de forma precisa. Estos autores afirman que mediante ésta técnica, se pueden lograr estructuras 3D muy complejas, así como sistemas vasculares o nerviosos. Por ello, la impresión de tejidos puede convertirse en una técnica capaz de recrear un sistema vascular y nervioso que permita fabricar un órgano competente y funcional. El proceso de “bioprinting” queda esquematizado en la Figura 2, así como los pasos que implica (Mironov et al., 2009; Mironov et al., 2011).

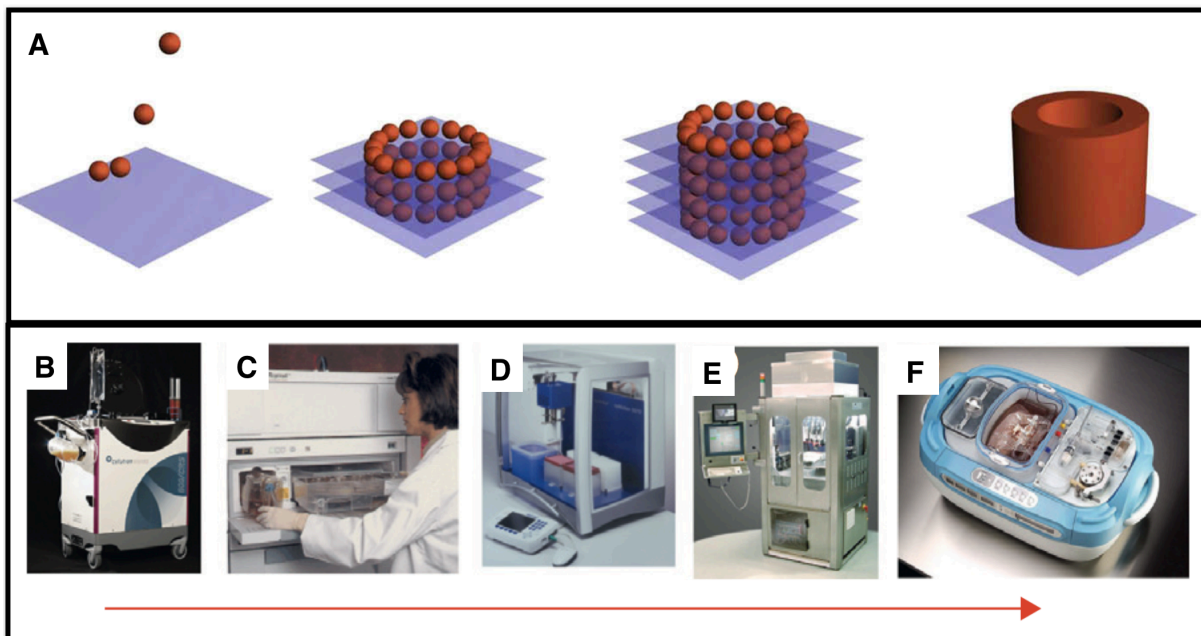


Figura 2. “Bioprinting”. (A) Esquema del bioensamblaje, de un tejido tubular construido mediante la técnica de impresion de tejidos, debido al autoensamblaje de los esferoides tisulares depositados capa por capa (Mironov et al., 2009). (B, C) pre-procesamiento o desarrollo del diseño de los órganos de forma digital; (D, E) impresión de los órganos reales; (F) post-procesado o acondicionamiento y maduración del órgano en un bioreactor (Mironov et al., 2011).

Se han conseguido resultados sorprendentes en medicina regenerativa, como la construcción de estructuras renales *in vitro* a partir de suspensiones de células disociadas, obtenidas de tejido renal fetal, que son capaces de reorganizarse *in vivo*, mostrando nefronas y sistemas de conductos (Unbekandt y Davies, 2010). Esto es debido a la competencia intrínseca de las células a organizarse en estructuras sofisticadas (Suga et al., 2011; Eiraku et al., 2011). Esto se consiguió con la previa disociación celular, re-agregación *in vitro*, y transferencia *in vivo* acompañada de nefrectomía unilateral, que potencia la implantación del tejido transferido debido a la liberación o activación de factores mitógenos, morfogénicos o genes de supervivencia (D’Agati, 2012), consiguiéndose estructuras capaces de realizar funciones específicas de nefronas *in vivo*, como la reabsorción tubular proximal. Sin embargo, estos organoides solo se mantenían viables 3-4 semanas, por lo que se tiene que seguir investigando en los parámetros influyentes en el proceso, como el sitio de transferencia (Xinaris et al., 2012). Estos resultados, aunque son satisfactorios, todavía no son capaces de solventar la escasez de órganos disponibles, pues aún no se ha sido capaz de generar un riñón completamente funcional (Vera-Donoso et al., 2014).

Hasta hoy, se había pensado en los xenotrasplantes como una perspectiva de futuro para solventar este problema. No obstante las reacciones inmunológicas que se desencadenan y la problemática ética que genera la posibilidad de introducir patógenos característicos de la especie donante en la especie receptora, han sido los principales problemas a los que se ha enfrentado esta línea de investigación (Cooper, 2012 ; Rodrigues et al., 2014). Además, los xenoinjertos tienden a producir las biomoléculas en las proporciones típicas de la especie de origen, pudiendo ser excesivas o deficientes en la especie receptora (Yang y Sykes, 2007). Históricamente, en 1964, cuando los órganos humanos no estaban disponibles y la diálisis aún no estaba en uso, Reemtsma et al. (1964) trasplantaron riñones de chimpancés en 13 pacientes humanos, la mayoría de los cuales murieron en 4-8 semanas debido al rechazo del órgano o a complicaciones por infecciones. Sin embargo, uno de los cuales sobrevivió casi 9 meses, pudiendo llevar vida normal antes de morir repentinamente de lo que se cree que fue un trastorno electrolítico (Traeger, 1969). También se ha realizado un trasplante de corazón de babuino a una niña recién nacida que, aunque evolucionó favorablemente al principio, falleció a las pocas semanas debido al rechazo inmunológico del órgano (Bailey et al., 1985). Más recientemente, se realizaron dos trasplantes de hígado de babuino a dos pacientes que sobrevivieron durante 70 y 26 días respectivamente (Starzl et al., 1993). Sin embargo, los corazones e hígados de cerdo podrían usarse inicialmente a modo de puente mientras el paciente está a la espera de un órgano humano, un hecho que arrojaría luz a las experiencias con xenotrasplantes. No ocurre así en el caso de los riñones debido a que la diálisis puede mantener la vida del paciente con insuficiencia renal durante años, por lo que probablemente las experiencias con xenotrasplantes de riñones porcinos se retrasen (Cooper, 2012).

Así, las investigaciones realizadas en xenotrasplantes no han conseguido los resultados esperados. Sin embargo, existe una línea de investigación basada en el uso de riñones embrionarios entendidos como precursores de riñones adultos, los metanefros (Figura 3A), que ha devuelto a un primer plano el uso de los xenotrasplantes (Hammerman, 2002a). Se han realizado ensayos de xenotrasplantes de metanefros entre especies como la rata y el ratón en los que se ha conseguido que los metanefros de rata crecieran *in situ* en ratones receptores (Figura 3B), observándose desarrollo de nefronas (Clancy et al., 2009).

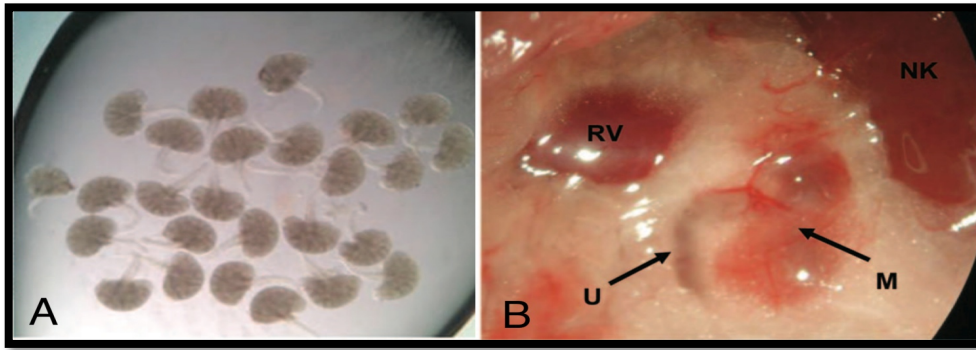


Figura 3. Trasplante de metanefros. [A] Metanefros de una camada entera de embriones de 15 días (E15) de rata (Clancy et al., 2009). [B] Metanefros (M) trasplantados cerca de los vasos renales. Se puede observar el uréter metanéfrico (U), el riñón nativo (NK) y la vena renal (RV) (Clancy et al., 2009).

También se ha probado entre especies más alejadas, trasplantando (xenotrasplante) metanefros de cerdo en ratas y ratones (Hammerman, 2002b), obteniéndose resultados equivalentes a los anteriores, e incluso de humano a ratón, formándose un órgano vascularizado y con túbulos y glomérulos diferenciados con apariencia normal (Dekel et al., 2002).

Por ello, investigadores como Rogers et al. (1998) creen que los metanefros pueden ser la solución al limitado número de riñones. Hammerman y Rogers (2014) afirman que el fundamento de esta línea se centra en el crecimiento de grupos de células embrionarias conocidos como primordios de órganos que, a diferencia de las células madre, no pueden convertirse en cualquier tipo celular, pues ya están destinados a transformarse en determinados tipos celulares que además “saben” como auto-ensamblarse. Estos aspectos suponen un punto clave, puesto que para crecer un riñón se necesitan numerosos tipos celulares diferentes que tienen que ensamblarse en la configuración correcta, siendo este uno de los principales problemas de las células madre embrionarias. Además, si se trasplanta también la parte que se diferencia en el uréter, posteriormente podría conectarse mediante microcirugía con el uréter del huésped (Hammerman y Rogers, 2014). Por ello, si se obtuviese un procedimiento que permitiera el uso de metanefros como progenitores de riñones se obtendría una fuente inagotable de riñones en aquellas especies en las que generar y trabajar con embriones no fuese un problema, pudiéndose entender los xenoembriones como una fábrica de órganos (Yokoo y Kawamura, 2009). De esta manera, podría cobrar fuerza el uso de xenotrasplantes como terapia, puesto que los metanefros desarrollados cuentan con indicios de funcionalidad basados en la clarificación de la creatinina e inulina, así como la secreción de una orina concentrada (Rogers et al., 1998).

Matsumoto et al. (2012a) demostraron recientemente que los metanefros xenotrasplantados podrían suministrar un nicho adecuado para la diferenciación de células madre mesenquimales endógenas. Utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos de especie, junto a un análisis de las secuencias, estos autores observaron que los metanefros xenotrasplantados expresaban eritropoyetina (EPO) del animal receptor. Esto reveló que las células productoras de EPO procedían de los animales huésped (células madre mesenquimales movilizadas desde la médula ósea), las cuales podían desarrollarse en los metanefros trasplantados y producir EPO. Además, los metanefros pueden eliminarse por apoptosis (pre-introducción y activación de un gen suicida), manteniéndose los tejidos productores de EPO autólogos desarrollados sin necesidad de inmunosupresión (Xinaris y Yokoo, 2014).

Este tipo de experimentos también ha sido realizado con primordios pancreáticos, los cuales también pueden ser trasplantados en organismos adultos no inmunosuprimidos, a través de barreras tanto alogénicas como xenogénicas (requiere de estadios suficientemente tempranos), donde son sometidos a crecimiento y diferenciación, desarrollando componentes endocrinos capaces de secretar insulina de forma fisiológica (Hammerman, 2007). De la misma forma, células secretoras de insulina procedentes de primordios pancreáticos de embriones de 28 días de cerdos han sido trasplantadas en ratas y macacos diabéticos, avanzando hacia la apertura de una ventana para un nuevo tratamiento de la diabetes en los seres humanos (Hammerman, 2009).

No obstante, esta propuesta no es tan sencilla como parece, puesto que existe un “periodo ventana” del desarrollo embrionario en el cual se elimina el riesgo de teratogenicidad, se maximiza el potencial de crecimiento y se reduce la inmunogenicidad, siendo este el momento idóneo para la transferencia de los metanefros al organismo adulto (Hammerman, 2005). Así, se dan tres razones por las cuales la transferencia de un metanefro en estadios tempranos resulta ventajoso (Hammerman, 2002b):

- En estadios suficientemente tempranos, los metanefros están libres de Células Presentadoras de Antígenos (APCs), las cuales median el reconocimiento antigénico. Esto es así debido a que en el organismo donante las APCs todavía no se han desarrollado ni han migrado al metanefro, con lo que el potencial inmunogénico se reduce (Hammerman, 2002b). Los primeros estudios para abordar esta cuestión fueron realizados por Foglia et al. (1986), quienes alotrasplantaron metanefros de rata que fueron desde el día 15 del desarrollo embrionario (E15) hasta el día 20 (E20), comprobándose que los metanefros de 15 días mostraban una maduración de elementos renales significativa sin indicios de rechazo a los 10 días post-trasplante. En cambio los metanefros

E20 mostraron una arquitectura renal pobre y una elevada infiltración linfocitaria. Además, la importancia de las APCs fue constatada por Rogers et al. (2001), quienes sugieren que un injerto desprovisto de las APCs tiene elevadas probabilidades de ser ignorado por las células T y conllevar la aceptación del mismo.

- El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HMC) no se expresa en las células embrionarias en la misma medida que en los riñones adultos, por lo que la presentación de antígenos se reduce considerablemente. Así, Statter et al. (1989) comprobaron que los transcritos de mRNA correspondientes a la expresión del HMC se detectaban en concentraciones crecientes a medida que la edad del metanefro era mayor. Además, tras de la supervivencia del injerto, tanto HMC de clase I como de clase II aumentan su nivel de expresión, pero, sin embargo, su presencia en el injerto embrionario era mucho menor que en el tejido renal adulto (Hammerman, 2004).
- Los metanefros desarrollan un sistema vascular integrado por componentes de ambos linajes, donante y, sobretodo, receptor (Takeda et al., 2006). De esta manera, un órgano quimérico reduce la presencia de antígenos propios de la especie donante, reduciendo la inmunogenicidad del órgano y la probabilidad de que se produzca su rechazo (Rogers et al., 1998). El origen de la vascularización de los metanefros trasplantados se puede rastrear utilizando anticuerpos específicos contra el antígeno endotelial CD31 (característico en cada especie), demostrándose así que el huésped generaba la mayor parte del sistema vascular, incluidos los capilares glomerulares (Hammerman, 2004).

Así pues, los estadios tempranos equivalen a plasticidad tisular, potencial de crecimiento y baja inmunogenicidad. Sin embargo, el metanefro debe ser lo suficientemente maduro, de manera que su potencial de diferenciación sea más limitado que el de las células madre embrionarias o las células madre pluripotentes inducidas, habiéndose comprometido ya a un programa genético de desarrollo renal (D'Agati, 2012).

Otra cuestión importante de esta técnica es la de establecer el lugar idóneo para la inserción del metanefro en el receptor, puesto que no todos los tejidos son adecuados para propiciar su desarrollo (Matsumoto et al., 2012b). La grasa supra renal y adyacente a la zona ovárica (omento) contiene una gran irrigación de vasos sanguíneos que favorecen las condiciones de desarrollo de los metanefros (Rogers et al., 1998; Hammerman 2002b). Los alotrasplantes realizados en la cápsula renal de ratas impedían el crecimiento de los trasplantes debido al espacio reducido. Sin embargo

cuando los trasplantes se realizaron en un pliegue del omento, los metanefros crecieron y adquirieron una estructura de riñón normal (corteza y medula renal bien definidas, además de nefronas maduras), promoviendo el desarrollo de una gran irrigación vascular derivada de la arteria mesentérica (Hammerman, 2002b).

Las diferencias en el periodo de gestación de las distintas especies es una cuestión a tener en cuenta, ya que un embrión de una especie con una gestación larga (Bovino, 275-290 días) no tiene el mismo grado de desarrollo que un embrión de una especie de gestación corta (Conejo, 30-32 días) en el mismo día del desarrollo embrionario (Austin y Short, 1982). Así, los metanefros en humanos se originan durante la quinta semana, sin embargo, éstos se desarrollan el día 11 y 12 del desarrollo embrionario en ratones y ratas respectivamente, y entre el día 21-28 en cerdos (Hammerman, 2004). Además, el periodo de desarrollo de los metanefros es dependiente de la especie originaria e independiente del receptor. Se necesitan 120 días para crecer un metanefro de cerdo en una rata porque ese es el tiempo que abarca el desarrollo de los metanefros en un cerdo (Hammerman y Rogers, 2014). Además, no solo es cuestión los tiempos de desarrollo de la especie original, sino también los mecanismos. La nefrogénesis, durante el desarrollo de metanefros de rata, se limita a las primeras semanas post-trasplante en ratas, deteniéndose en una etapa equivalente a la del momento del nacimiento del donante de los metanefros (Dilworth et al., 2008). Esto es así debido a que la mayor parte de la nefrogenesis en ratas ocurre tras el nacimiento, poseyendo un 10% de las nefronas típicas en un organismo adulto en dicho momento (Kavlock, 1982).

Para que el trasplante de tejidos metanéfricos pueda ser clínicamente aplicable, deben superarse una serie de retos (Xinaris y Yokoo, 2014):

- Los tejidos trasplantados deben convertirse en órganos tridimensionales con la forma, el volumen y la anatomía de los riñones receptores nativos, capaces de sostener la vida a largo plazo.
- Los trasplantes desarrollados tienen que integrarse plenamente en el huésped (han de presentar vascularización y no desencadenar respuestas inmunes).
- Las nefronas deben estar vinculadas a un sistema colector de drenaje.

A pesar de estos desafíos, las estrategias descritas en el presente documento se abren camino en una nueva dirección para la generación de órganos adecuados para el trasplante (Xinaris y Yokoo, 2014).



### 1.3. Crioconservación de órganos

A mediados de la década de los 80 la mayoría de los riñones se conservaban mediante almacenamiento en frío (Yuan et al., 2010), desarrollándose la primera solución efectiva para este almacenamiento en 1969 (Collins et al., 1969). D'Alessandro et al. (1994), empleando técnicas y equipos de perfusión, obtuvieron tasas de supervivencia del injerto después de un año del 90%. Estos resultados hicieron pensar en un aumento del número de órganos disponibles (provenientes de cadáveres) para los pacientes con enfermedades de los órganos en fase terminal (D'Alessandro et al., 1994). Las técnicas de conservación de órganos han ido perfeccionándose, minimizando el daño celular (Suszynski et al., 2012), gracias al descubrimiento de nuevos polímeros para los medios de conservación (Hauet y Eugene, 2008), sin embargo, el almacenamiento a largo plazo de órganos humanos ha sido y es una necesidad sin resolver (Smith, 1957; Starzl, 1970; Karow, 1974; Fahy et al., 2009).

El uso de la criobiología se enfrenta a dos grandes problemas a la hora de ser efectiva en órganos:

- La isquemia (debida al corte del suministro sanguíneo), responsable de una funcionalidad retardada del órgano trasplantado que puede comprometer al injerto (Salahudeen, 2004). Entre otras cosas, se producen desordenes como la pérdida a largo plazo de las bombas de intercambio iónico de la membrana plasmática (trastornos iónicos y osmóticos) o de la integridad celular (membrana y orgánulos). Por ello, se sigue investigando en nuevas soluciones que eviten este tipo de daños (Watson y Bradley, 2012).
- El daño celular debido a la formación de hielo (Pegg, 2010), pues existe una correlación directa entre la formación de hielo durante el proceso de crioconservación y el daño estructural y funcional del tejido u órgano crioconservado. Este hecho perjudicial no resulta fácil de evitar, afectando diferencialmente según el tejido en cuestión (en un órgano vascularizado, como el riñón, el sistema vascular resulta el principal afectado). Por ello, el éxito en la crioconservación dependerá en gran medida del desarrollo de métodos que impidan la formación de hielo o eviten el daño producido por este. Así, la vitrificación surge como una técnica prometedora, ya que evita la formación de cristales de hielo (Pegg, 2010).

Tal y como describe Fahy et al. (2009), el objetivo de poder construir un biobanco de órganos destinados a suplir la demanda de las extensas listas de espera sigue siendo un reto para los investigadores. Como el mismo autor afirma, en el caso de órganos como el riñón o el corazón, no se han conseguido recuperaciones efectivas tras almacenamientos inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En estos procedimientos resulta clave la técnica antes mencionada, la vitrificación, ya que evita la formación de cristales de hielo. Sin embargo, la elevada concentración de crioprotectores supone una elevada toxicidad celular, por lo que es necesario minimizar los tiempos de exposición del tejido a la solución de vitrificación. La técnica ha avanzado y se han conseguido vitrificaciones de órganos enteros, aunque no se ha conseguido todavía la plena recuperación debido principalmente al mecanismo de desvitrificación, en el cual se forman cristales de hielo por la presencia de núcleos del mismo (Fahy et al., 2009). Tan solo pequeñas estructuras, como trozos pequeños de ovarios, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas o corneas, se han podido crioconservar, al menos en parte, con éxito (Fahy et al., 2009).

Rogers y Hammerman (2001), fueron los primeros en trasplantar metanefros tras su preservación *in vitro* a corto plazo. Estos autores conservaron durante 3 días metanefros de embriones de rata de 15 días en frío (empleando la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin) y observaron que no había diferencias significativas en cuanto a tamaño y diferenciación entre los metanefros E15 transferidos conservados y frescos. Hasta la fecha, en el único trabajo en el que se ha estudiado la crioconservación de metanefros, comparando congelación y vitrificación, no se han obtenido buenos resultados tras el análisis *in vitro* de los mismos (Bottomley et al., 2005). Estos autores no observaron diferencias en la viabilidad de los metanefros entre ambas técnicas, frente a los frescos. Sin embargo, la congelación indujo una elevada vacuolización citoplasmática frente a la vitrificación. Los mismos autores indican que, aunque ambas técnicas de crioconservación producen daños en los tejidos, la vitrificación mostró resultados más prometedores (Bottomley et al., 2005).

#### **1.4. El conejo como modelo animal**

El conejo es un animal de laboratorio estándar utilizado en la investigación biomédica (Houdebine y Fan, 2009). Así, el conejo ha sido empleado durante décadas como fuente principal de anticuerpos policlonales y, más recientemente, monoclonales (Duranton et al., 2012). Además, se trata de un organismo modelo que permite el estudio de numerosas enfermedades humanas y la comprensión de los mecanismos patológicos de las mismas, resultando ventajosa en enfermedades

como las de tipo cardiovascular, donde una especie genéticamente modificada de conejo puede simular la clínica de estas enfermedades. Además, en estudios cardíacos, el mayor tamaño del conejo frente a otras especies, como el ratón, facilita el trabajo debido al mayor tamaño del órgano (Peng, 2012). Debido a las similitudes entre los conejos y los seres humanos, en términos de anatomía de la vía aérea y de las respuestas a mediadores inflamatorios, destaca el valor de esta especie en la investigación de las fisiopatologías pulmonares y el desarrollo de agentes terapéuticos (Kamaruzaman et al., 2013). El conejo de laboratorio (*Oryctolagus cuniculus*) resulta una especie excelente para la investigación gracias a su tamaño, fácil manejo, y los bajos costes de mantenimiento (Stübinger y Dard, 2013). Su tamaño, permite una monitorización no letal de los cambios fisiológicos y las características de las enfermedades, siendo esta una de las razones que convierten al conejo en una especie ampliamente utilizada como organismo modelo en las enfermedades humanas. Además, el conejo es filogenéticamente más cercano a los primates que los roedores (Graur *et al.*, 1996). Por ello el conejo es también una especie prometedora en la investigación de las células madre pluripotentes (Tancos et al., 2012), bien embrionarias o bien inducidas. Esto supone un punto de partida en el estudio de enfermedades humanas debido a la gran similitud del desarrollo embrionario del conejo con la especie humana (Houdebine and Fan, 2009).

El conejo constituye un organismo modelo reproductivo idóneo gracias a su exactitud en la cronología de la fecundación, gestación, desarrollo embrionario y fetal como consecuencia de tratarse de una especie de ovulación inducida. Cabe destacar la gran ventaja que supone la ovulación inducida de los conejos, puesto que es lo que permite establecer un orden cronológico en los acontecimientos que se estén estudiando (Fischer et al., 2012; Tao y Niemann, 2000). Finalmente, cabe destacar que los conejos cumplen las características esenciales de un buen organismo modelo, como el pequeño tamaño, su fácil manejo, un tiempo de gestación corto y unos costes relativamente baratos en concepto de transferencia de embriones, si se compara con el ganado o los cerdos. Todos estos hechos hacen que numerosos equipos de investigación hayan seleccionado el conejo (Figura 4) como organismo modelo en sus estudios (Naturil, 2001).



Figura 4. Conejo de Nueva Zelanda (Línea Blanca).

## **2. Objetivos**

---

## 2. Objetivos

Evaluar la capacidad de desarrollo de los metanefros de embriones de 15 días de conejo, tanto frescos como vitrificados, al ser trasplantados (alotrasplante) en un conejo adulto.

Además, se quiere comparar el efecto de dos medios de vitrificación (VM3 y M22) sobre la crioconservación de los metanefros.

## **3. Material y Métodos**

---

### 3. Material y Métodos

Todos los productos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Química S.A. (Madrid, España) a menos que se indique lo contrario. Los Ice Blockers SuperCool X-1000 y SuperCool Z-1000 se adquirieron de 21st Century Medicina Inc. (Fontana, CA, EE.UU.).

Los conejos que se utilizaron como donantes y receptores pertenecían a la línea White New Zealand del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Animal) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Todos los animales fueron tratados de acuerdo a los principios de cuidado de los animales publicados por el Real Decreto Español 53/2013.

#### 3.1. Producción de embriones

Para la producción de embriones se emplearon 6 hembras (donantes de metanefros), las cuales fueron inseminadas artificialmente con 0,5 mL de una mezcla heterospérmica con una concentración de  $40 \cdot 10^6$  espermatozoides/mL en diluyente Tris-citrato-glucosa (Viudes-De-Castro y Vicente, 1997). La recuperación del semen se realizó mediante el uso de vaginas artificiales, siguiendo el método descrito por Vicente et al. (2011). Una vez evaluada la motilidad, bajo un microscopio óptico, solo aquellos eyaculados con al menos un 70% de espermatozoides móviles se usaron en la inseminación artificial. Inmediatamente después de la inseminación, la ovulación fue inducida por la inyección intramuscular de 1 µg de acetato de buserelina (Suprefact, Hoechst Marion Roussel SA, Madrid, España). Este proceso se muestra en la Figura 5.

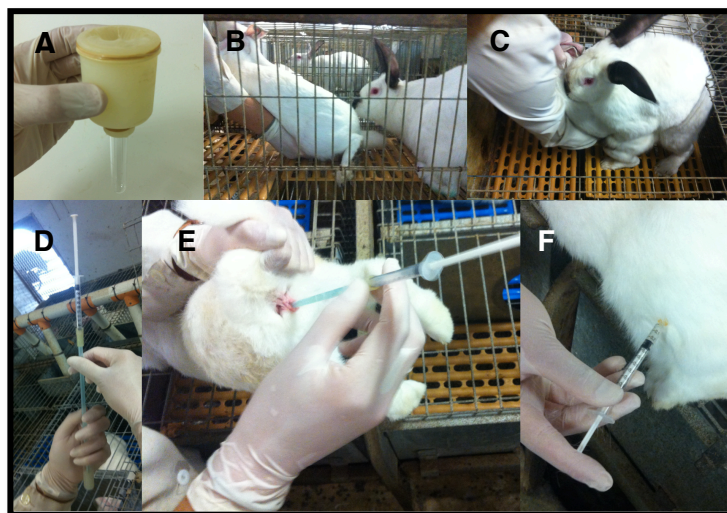


Figura 5. Esquema de la inseminación artificial de conejo. (A) Vagina artificial. (B, C) Recuperación de semen. (D) Carga de la cánula de inseminación. (E) Inseminación artificial. (F) Inducción a la ovulación.

Tras 15 días de gestación, las hembras fueron eutanasiadas mediante una inyección intravenosa de 0.6 g de pentobarbital sódico, extirpando los cuernos uterinos (Figura 6A) para recuperar, mediante disección, los embriones de 15 días (Figura 6B). Los embriones fueron lavados con tampón fosfato salino (PBS) suplementado con antibiótico (penicilina G sódica 300.000 IU, penicilina G procaína 700.000 IU y sulfato de dihidrostreptomycin 1250 mg, Penivet 1, Divasa Farmavic, Barcelona, España), albúmina de suero bovino (BSA, 2 g/L) y  $\text{CaCl}_2$  (1,18 mM).

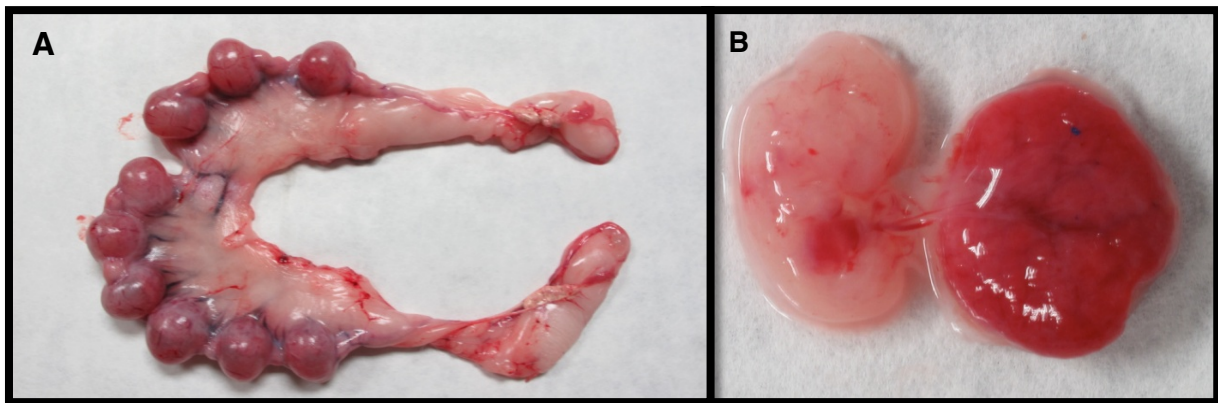


Figura 6. (A) Cuernos uterinos de una hembra gestante. (B) Vista macroscópica de una embrión E15 de conejo unido a la placenta fetal.

Cuarenta embriones (Figura 7) fueron pesados para determinar el peso medio. Además, tres embriones fueron fijados, con el objetivo de realizar una valoración histológica para observar la presencia de los metanefros. Para ello, se fijaron en solución de Formalina al 10% y pH neutro durante 7 días. Posteriormente, se llevo a cabo la deshidratación e inclusión en parafina, cortando las muestras a 5  $\mu\text{m}$  y tiñéndose mediante la tinción clásica de eosina-hematoxilina.



Figura 7. Fotografía de un embrión de conejo E15.



### 3.2. Recuperación de los metanefros

Los metanefros se obtuvieron mediante microdissección en PBS suplementado, siguiendo el procedimiento descrito por Barak y Boyle (2013):

El embrión, de forma individual, se coloca en posición decúbito supino, eliminando los órganos superficiales internos para visualizar los metanefros, los cuales se encuentran en la cavidad abdominal inferior, a nivel de las extremidades posteriores (Figura 8A). Los metanefros (Figura 8B) se recuperan con la ayuda de las pinzas de microdissección, separando cada metanefro del tejido circundante. Finalmente, éstos, se transfieren a una placa con PBS suplementado.

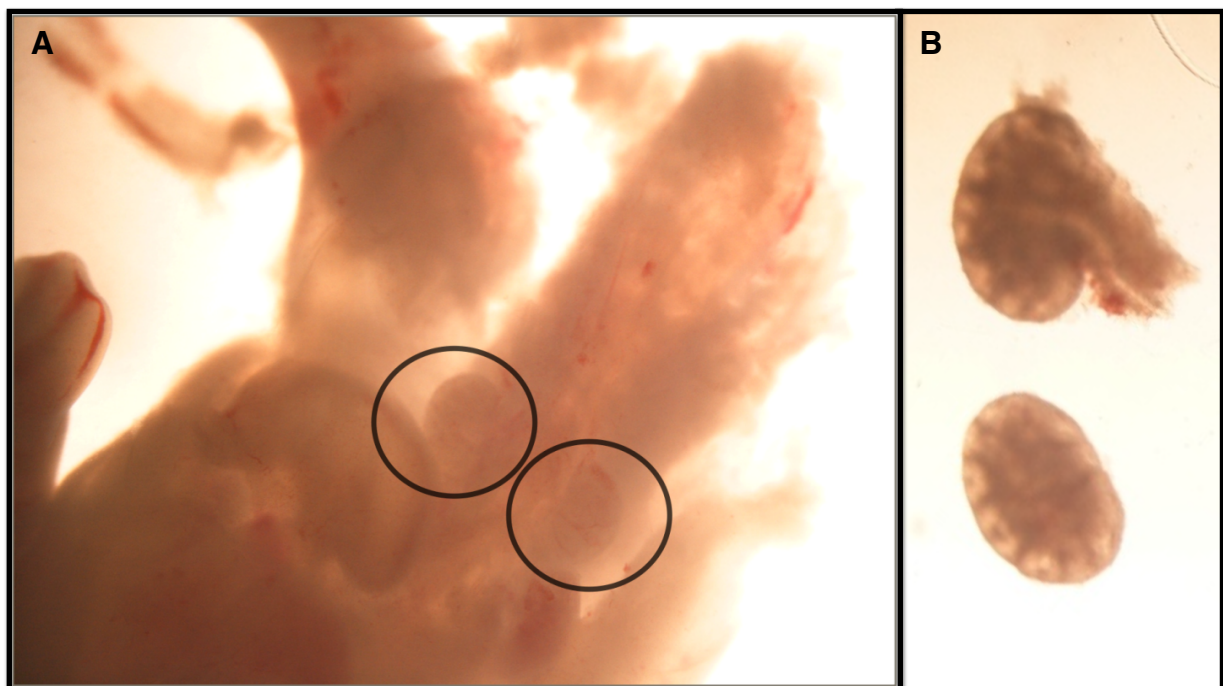


Figura 8. Metanefros en un embrión de conejo de 15 días. (A) Posición de los metanefros en un embrión de conejo E15. (B) Metanefros aislados.

### 3.3. Vitrificación y desvitrificación de los metanefros

La vitrificación se realizó utilizando dos medios de vitrificación, el VM3 (Fahy et al., 2004) y el M22 (Fahy et al., 2009), y el método del Volumen Mínimo Esencial, empleando como dispositivo de depósito el Cryotop (Jiménez-Trigos et al., 2011).

La vitrificación, con el medio VM3, se llevo a cabo en 3 pasos introduciendo los metanefros en concentraciones crecientes de solución crioprotectora de la siguiente manera:

1. Los metanefros se introdujeron durante 3 minutos en una solución de equilibrio compuesta por 1.7% w/v de etilen glicol (EG), 1.3% w/v de formamida, 2.2% w/v de Dimetil Sulfóxido (DMSO), 0.7 w/v de PVP K12 (polivinilpirolidona con Mr 5000 Da) y 0.1% w/v de ice blockers comerciales (SuperCool X-1000 y SuperCool Z-1000) en Medio Base (MB= Tampón fosfato salino sin cloruro cálcico (DPBS) + 20% Suero Fetal Bovino (FBS)).
2. Posteriormente se trasladaron durante 1 minuto a una solución compuesta por 4.7% w/v de EG, 3.6% w/v de formamida, 6.2% w/v de DMSO, 1.9% w/v de PVP K12, y 0.3% w/v de los ice blockers en MB.
3. Finalmente, se sumergieron durante 1 minuto en la solución de vitrificación compuesta por 16.84% w/v de EG, 12.86% w/v de formamida, 23.3% w/v de DMSO, 7% w/v de PVP K12 y 1% w/v de los ice blockers en MB.

La vitrificación con el medio M22 se realizo, de la misma forma que en el caso anterior, con concentraciones crecientes de solución crioprotectora:

1. Los metanefros se introdujeron durante 3 minutos en una solución de equilibrio compuesta por 1.56% w/v de EG, 1.19% w/v de formamida, 2.07% w/v de DMSO, 0.26% w/v de PVP K12, 0.28% w/v de N-metilformamida, 0.37% w/v de 3-Metoxi,1,2-propanediol (PROH), 0.09% w/v de SuperCool X-1000 y 0,19% w/v de SuperCool Z-1000 en MB.
2. Posteriormente se trasladaron durante 1 minuto a una solución compuesta por 4.42% w/v de EG, 3.37% w/v de formamida, 5.58% w/v de DMSO, 0,73% w/v de PVP K12, 0,79% w/v de N-metilformamida, 1.05% w/v de PROH, 0,26% w/v de SuperCool X-1000 y 0,52% w/v de SuperCool Z-1000 en MB.
3. Finalmente, se sumergieron durante 1 minuto en la solución de vitrificación compuesta por 16.84% w/v de EG, 12.86% w/v de formamida, 22.31% w/v de DMSO, 2.8% w/v de PVP K12, 3% w/v de N-metilformamida, 4% w/v de PROH, 1% w/v de SuperCool X-1000 y 2% w/v de SuperCool Z-1000 en MB.

Tras ello, los metanefros se depositaron en el Cryotop y éstos se sumergieron en Nitrógeno líquido (NL,  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), almacenándose en cánisters en el banco de NL (Figura 9).



Figura 9. Proceso de vitrificación. (A) Cryotop. La flecha indica el lugar de colocación de los metanefros. (B) Cánister. (C) Recipiente de NL. (D) Banco de NL.

La desvitrificación se llevo a cabo mediante el proceso, descrito por Jiménez-Trigos et al. (2011), esquematizado en la Figura 10. Para ello, los Cryotops fueron introducidos en una solución compuesta por 1,25 M de sacarosa en Medio Base (MB= TMC-199 + 20% FBS) durante un minuto, transfiriéndose posteriormente a soluciones con concentraciones decrecientes de sacarosa (0'6, 0'3 y 0'15 M de sacarosa en MB) durante 30 segundos en cada paso. Los metanefros se almacenaban finalmente en suspensión en MB.

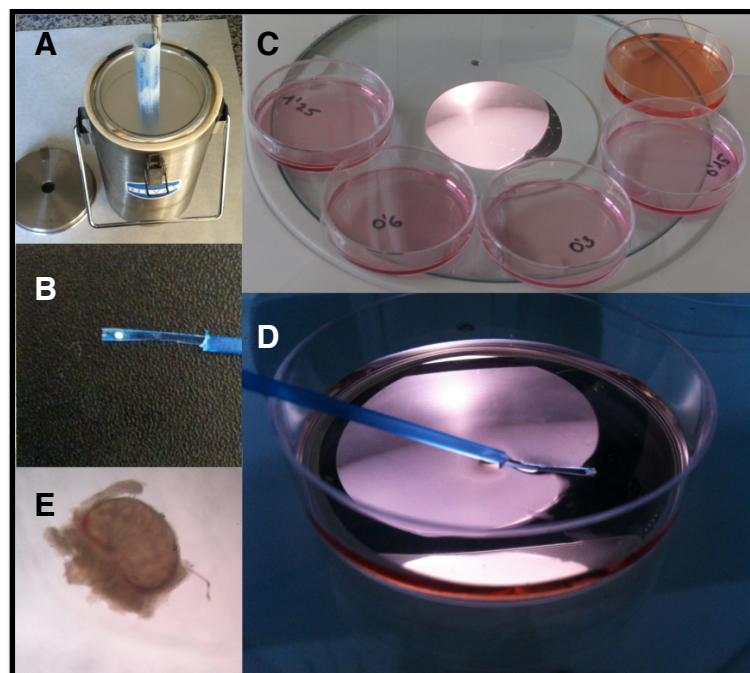


Figura 10. Desvitrificación de los metanefros. (A) Cánister. (B) Metanefro vitrificado en Cryotop. (C) Proceso de desvitrificación. (D) Desvitrificación del metanefro. (E) Aspecto del metanefro desvitrificado.

### 3.4. Transferencia de los metanefros

Previamente al proceso de transferencia, los 9 conejos que se emplearon como receptores (en ayunas) fueron sedados, tras la inyección intramuscular de 16 mg de Xylacina (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) como relajante muscular, con 16-20 mg de Clorhidrato de Ketamina (Imalgene®, Merial, S.A., Lyon, Francia). Durante el proceso de laparoscopia, se administraron 12 mg de Clorhidrato de Morfina por vía intramuscular (Morfina®, B. Braun, Barcelona, España). Para la transferencia, se empleó un sistema de cirugía endoscópica. Así, como describe Jiménez-Trigos et al. (2013), las transferencias por laparoscopia se llevaron a cabo utilizando solamente el trocar endoscópico. Los metanefros se introdujeron en un catéter epidural acoplado a una jeringa mediante la aspiración producida por la misma (Figura 11). El catéter se introdujo en el animal a través de una aguja epidural al tiempo que se monitorizaba el proceso mediante el endoscopio introducido a través de un trocar conectado a un insuflador de CO<sub>2</sub>.

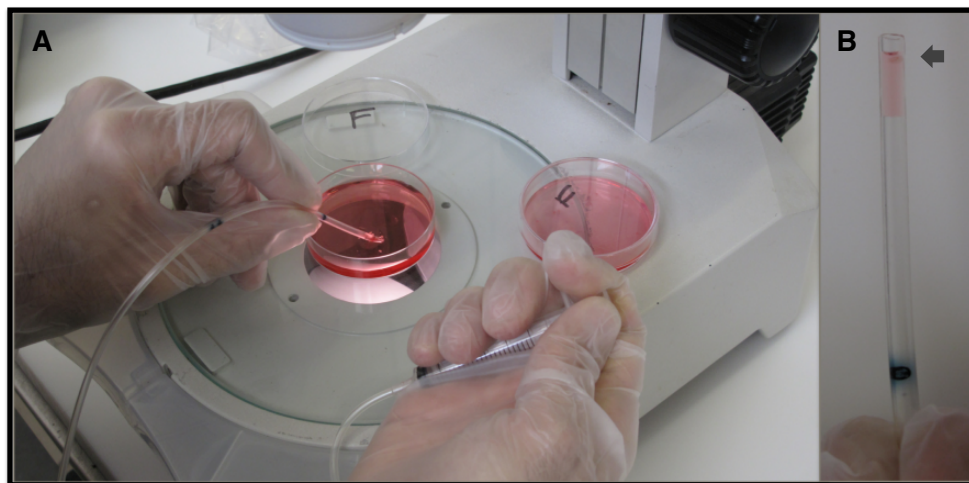


Figura 11. (A) Introducción de los metanefros en el catéter. (B) Catéter cargado con un metanefro (indicado con la flecha).

La transferencia se realizó mediante la incisión con una aguja epidural en el tejido adiposo omental para formar un “pocillo”, seleccionando una zona con notable irrigación sanguínea (Figura 12A). Tras ello, el catéter se introdujo en el pocillo y se depositó un metanefro por pocillo (Figura 12B), transfiriéndose de 4 a 6 metanefros por conejo en función de la cantidad de tejido adiposo presente. Así, se transfirieron 16 metanefros frescos, 18 vitrificados con VM3 y 19 vitrificados con M22.

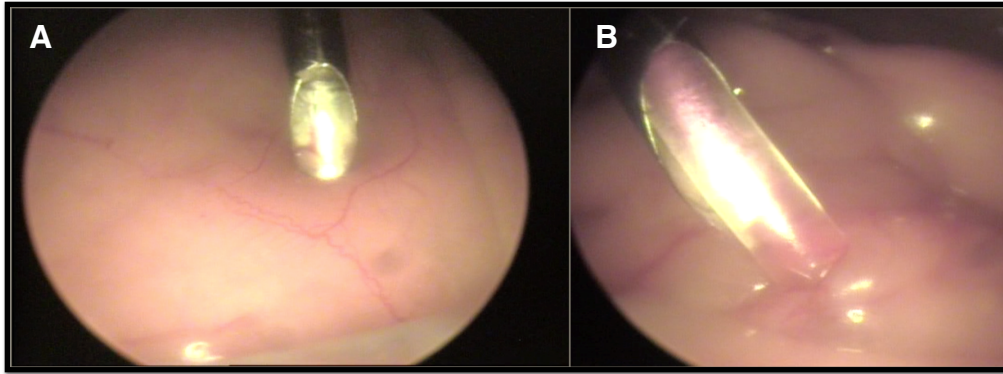


Figura 12. (A) Incisión en el tejido adiposo con la aguja epidural para crear el pocillo. (B) Deposición del metanefro en el pocillo tras la introducción del catéter.

Finalmente, el aire peritoneal fue retirado de la cavidad abdominal, y la incisión fue tratada con un apósito plástico Dermafill (Nobecutan, Laboratorios Inibsa, SA Barcelona), administrando antibiótico (200.000 UI de penicilina procaína y 250 mg de estreptomicina, Duphaphen® Strep, Pfizer, SL) por vía intramuscular (Jiménez-Trigos et al., 2013).

### 3.5. Recuperación y observación histológica de los metanefros

Tras 21 días, los receptores fueron eutanasiados mediante la inyección intravenosa de 0.6 g de pentobarbital sódico (Figura 13A) , examinando el desarrollo de los metanefros a nuevos riñones. Se recuperaron dichos riñones para evaluar mediante histología su estructura biológica y organización celular, así como las estructuras formadas. Para ello, estos riñones fueron fijados en solución de Bowin a 4 °C durante 24 horas. Tras ello, las muestras se deshidrataron y se incluyeron en parafina, realizándose cortes de 5  $\mu\text{m}$  y tiñéndose mediante una tinción clásica de eosina-hematoxilina (Figura 13B).

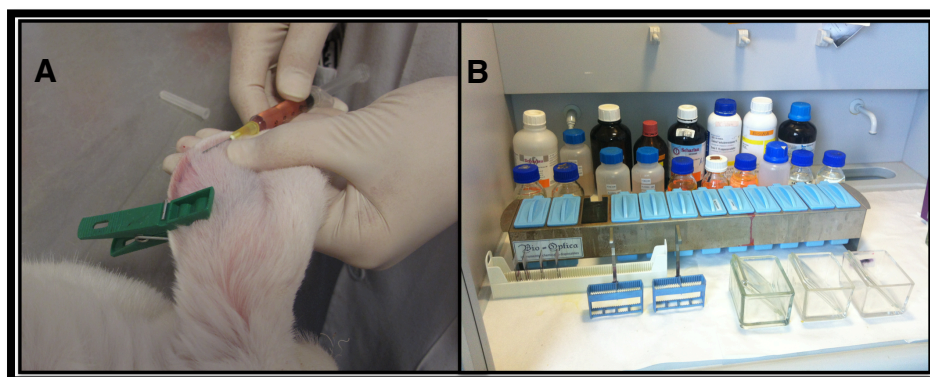


Figura 13. (A) Inyección intravenosa de pentobarbital sódico. (B) Material empleado en la tinción histológica.

Para poder tener muestras histológicas de referencia con las que comparar las obtenidas de los nuevos riñones, se realizó el mismo procedimiento de histología con los riñones de los conejos receptores y con los riñones de un conejo de 36 días, edad similar a la de los metanefros tras su desarrollo.

### **3.6. Análisis estadístico**

Una vez recuperados los embriones se realizó un análisis descriptivo de su peso. El desarrollo de los metanefros post-transferencia fue evaluado mediante un análisis descriptivo de los porcentajes de desarrollo tanto para los metanefros frescos, como para los vitrificados en función de cada medio de vitrificación.

## **4. Resultados**

---



## 4. Resultados

### 4.1. Histología y peso de los embriones

Un total de 40 embriones de 15 días fueron pesados, obteniéndose un valor medio para el peso de los embriones E15 de  $0,47 \pm 0,046$  g.

La histología de los embriones E15 se muestra en la Figura 14. Los metanefros se observan en la cavidad abdominal inferior, a nivel de las extremidades posteriores. Los embriones E15 tienen un tamaño aproximado de 1,5 cm de longitud, mientras que los metanefros que presentan tienen un tamaño aproximado de 0,8 mm.

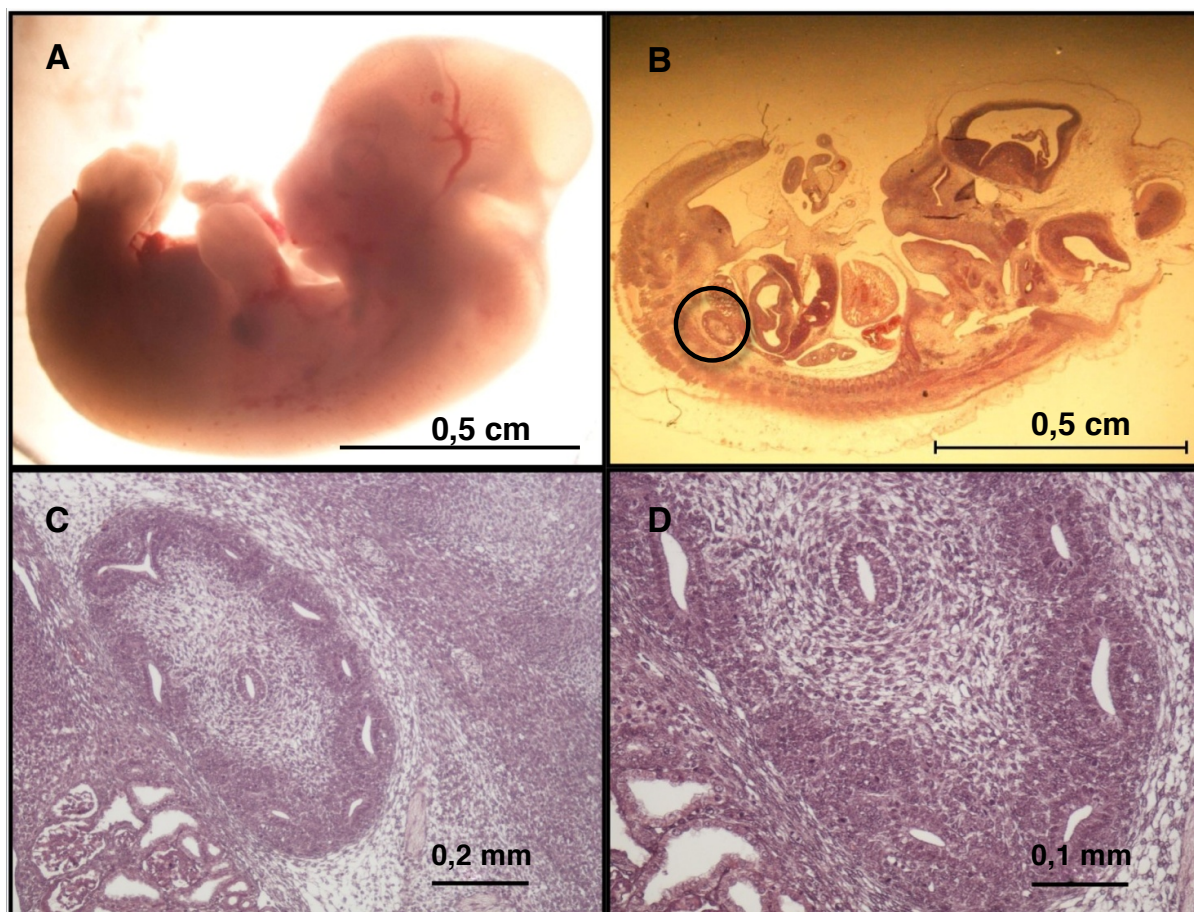


Figura 14. Histología de embriones E15. (A) Fotografía de un embrión de conejo E15. (B) Histología de un embrión de conejo E15. El círculo señala el metanefro. (C) Detalle del metanefro a 100x aumentos. (D) Detalle del metanefro a 200x aumentos.



## 4.2. Transferencia de los metanefros

Se transfirieron un total de 53 metanefros, correspondiendo 16 de estos a metanefros frescos, 18 a vitrificados con el medio VM3 y 19 a vitrificados con el medio M22. Como se observa en la Figura 15, los metanefros promovieron una respuesta angiogénica en la zona de transferencia. Esta vascularización generada *de novo* es fundamental para el desarrollo del metanefro.

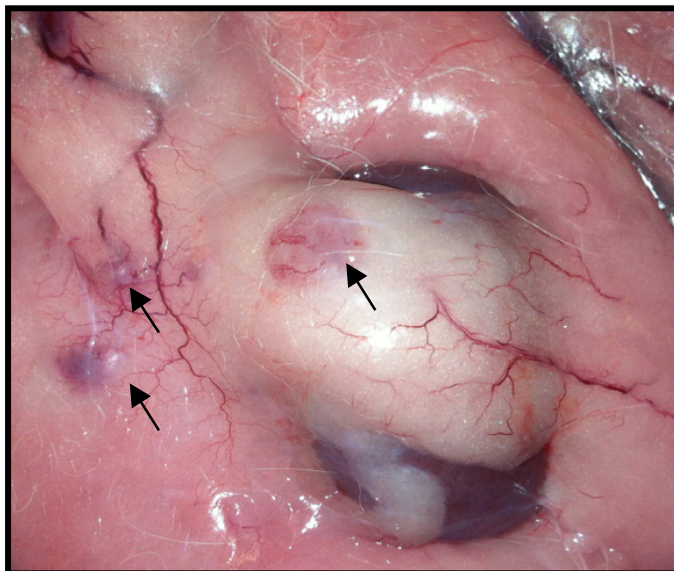


Figura 15. Angiogénesis. Las flechas muestran los metanefros 21 días post-transferencia en la grasa omental.

Tras 21 días de la transferencia, los nuevos riñones fueron localizados y recuperados, obteniendo los resultados que se reflejan en la Tabla 2. Tanto los metanefros frescos como los vitrificados, con ambos medios de vitrificación, tuvieron capacidad de desarrollo.

Tabla 2. Porcentajes de éxito estimados en los distintos experimentos.

	Metanefros Trasferidos	Metanefros Recuperados	Porcentaje de éxito
<b>Frescos</b>	16	7	44%
<b>Vitrificados (VM3)</b>	18	9	50%
<b>Vitrificados (M22)</b>	19	6	32%

Un ejemplo de los metanefros que se recuperaron se muestra en la Figura 16.

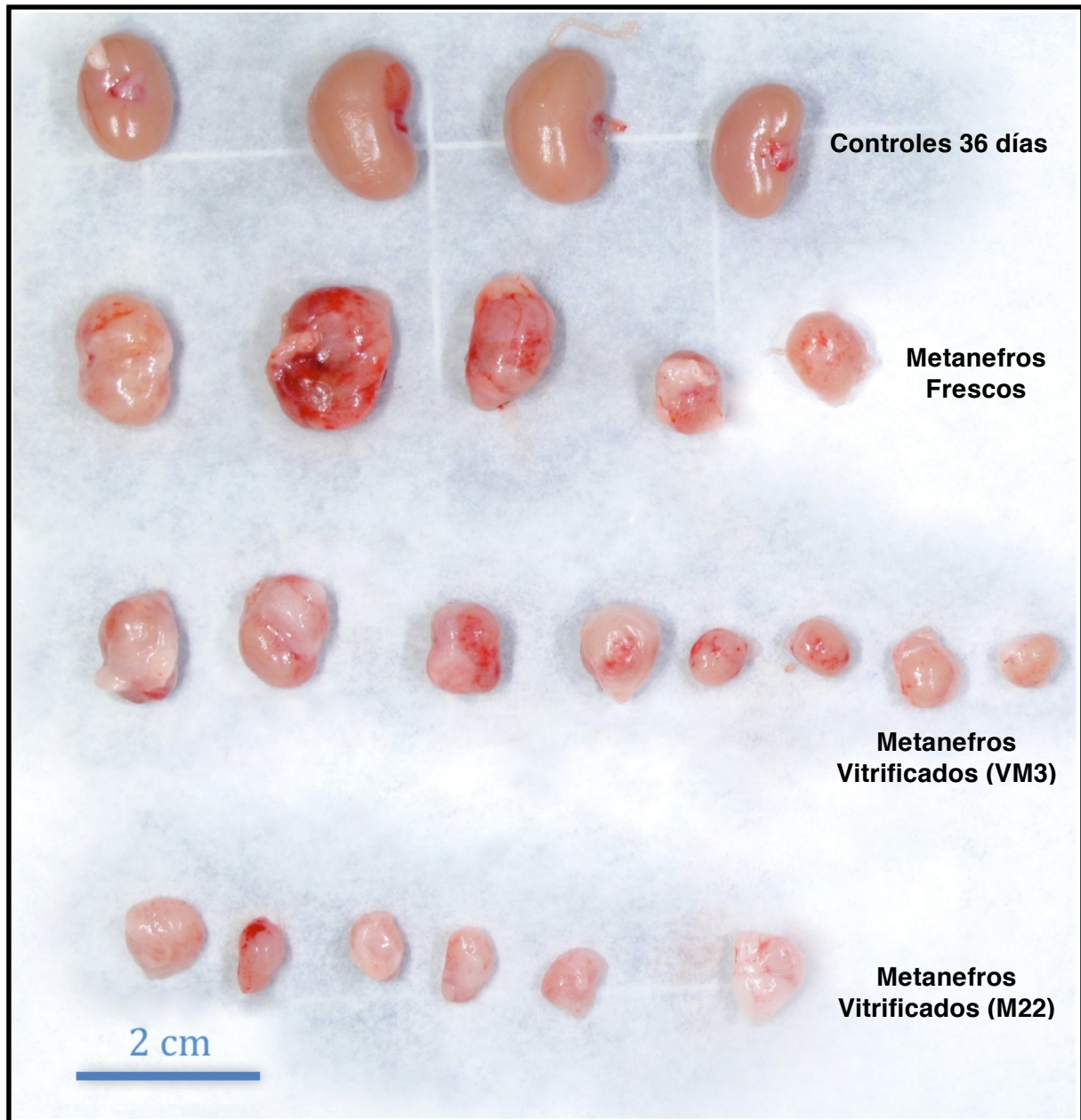


Figura 16. Recuperación de los metanefros 21 días post-transferencia y riñones control de 36 días.

En la Figura 17, se observa que los metanefros frescos adquieren prácticamente el mismo tamaño que los riñones control de 36 días. Recordemos que se los metanefros transferidos provienen de embriones E15, por lo que 21 días post-transferencia poseen el mismo tiempo de desarrollo que los riñones control de 36 días. Los riñones vitrificados con VM3 presentan un crecimiento similar al de los metanefros frescos, sin embargo, en los vitrificados con el medio M22 se observa un retraso en el crecimiento.

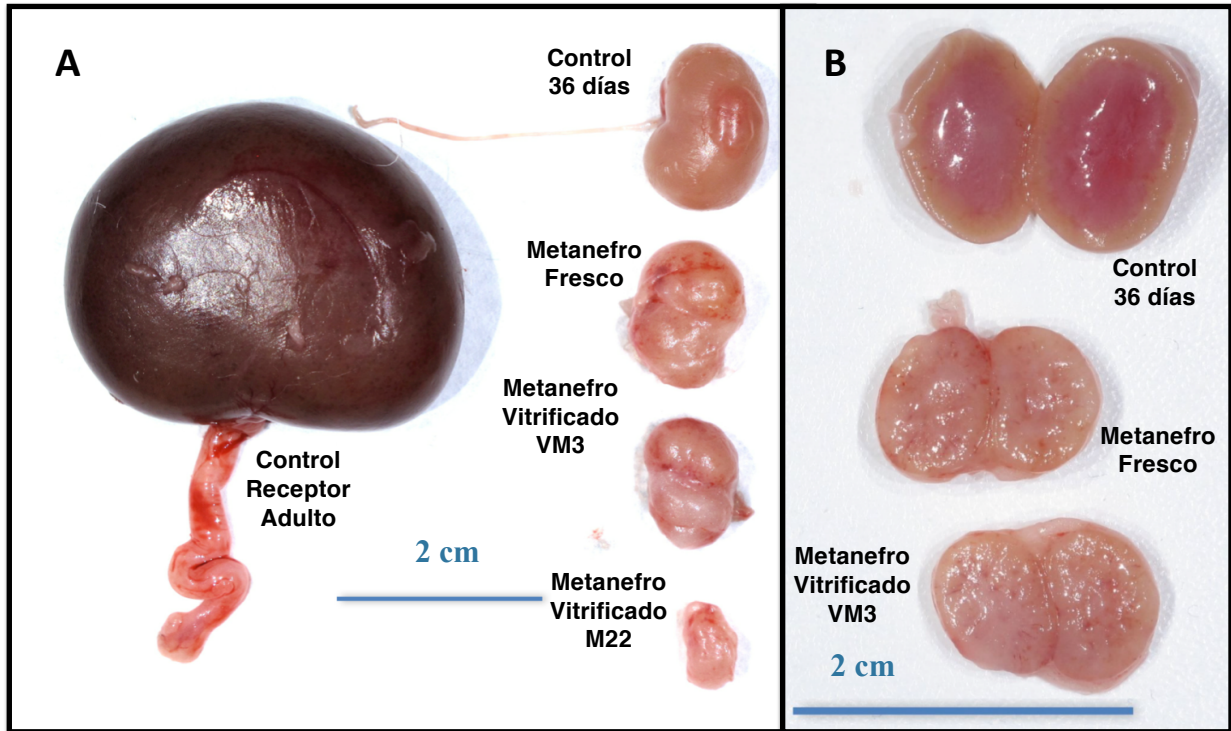


Figura 17. Recuperación y aspecto de los metanefros 21 días post-transferencia. (A) Recuperación de los metanefros. (B) Detalle del crecimiento y forma de los metanefros, así como la apariencia de los mismos. Se observa la apariencia de la corteza y la médula renal.

Como se observa en la Figura 18, los metanefros también desarrollaron un uréter definido.

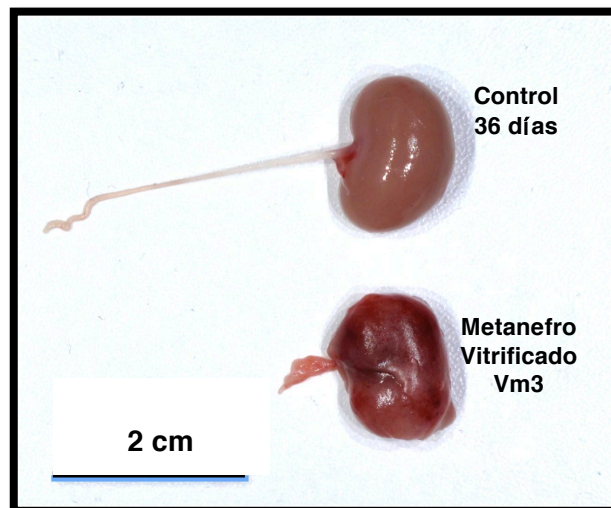


Figura 18. Riñón de conejo de 36 días vs Metanefro fresco 21 días post-transferencia. En esta imagen se aprecia con detalle la similitud de tamaño entre un riñón control de 36 días y un metanefro fresco 21 día post-trasplante. El metanefro, no solo ha desarrollado la ultraestructura renal, sino que presenta también un uréter definido.



### 4.3. Histología metanefros

Como puede observarse en la Figura 19, ambos controles, tanto el del riñón adulto del receptor como el riñón de 36 días, presentan una estructura íntegra típica de un riñón funcional, con abundantes nefronas.

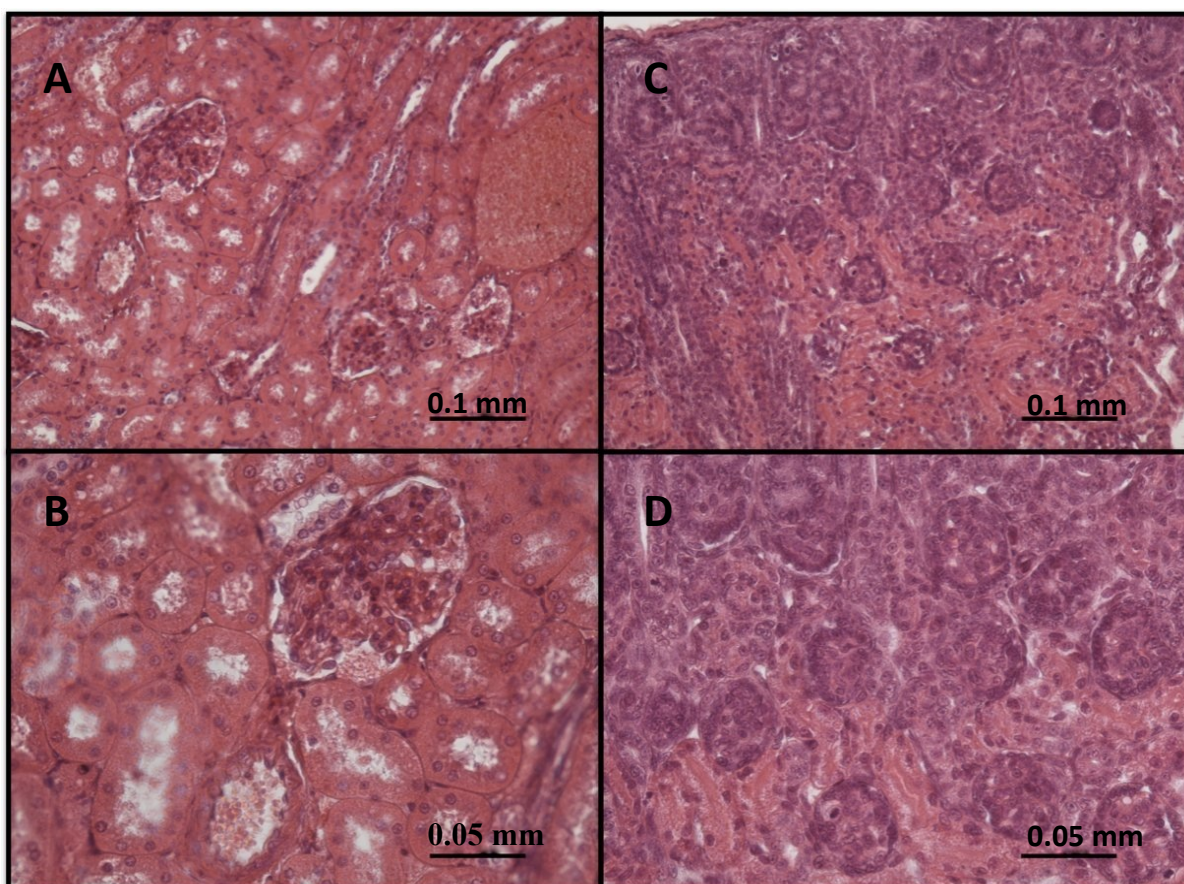


Figura 19. Histología de los controles. (A, B) Riñón control adulto a 200x y 400x aumentos respectivamente. (C, D) Riñón control 5 semanas a 200x y 400x aumentos respectivamente.

En la Figura 20, se observa una apariencia similar entre los metanefros frescos y los controles, con una densidad glomerular similar. Además la estructura celular en ambas muestras es similar. Las muestras histológicas de los metanefros trasferidos tras la vitrificación con el medio VM3, aunque ligeramente menor, también presentan una densidad de nefronas similar a los frescos, así como la estructura tisular. Sin embargo, en las muestras histológicas de los metanefros trasferidos tras la vitrificación con el medio M22, aunque se observan nefronas, la densidad de estas es menor que la observada tanto en los frescos como en los vitrificados con el medio VM3. Además en estas muestras, hay indicios de vacuolización, denotando una ligera afección sobre la estructura tisular.

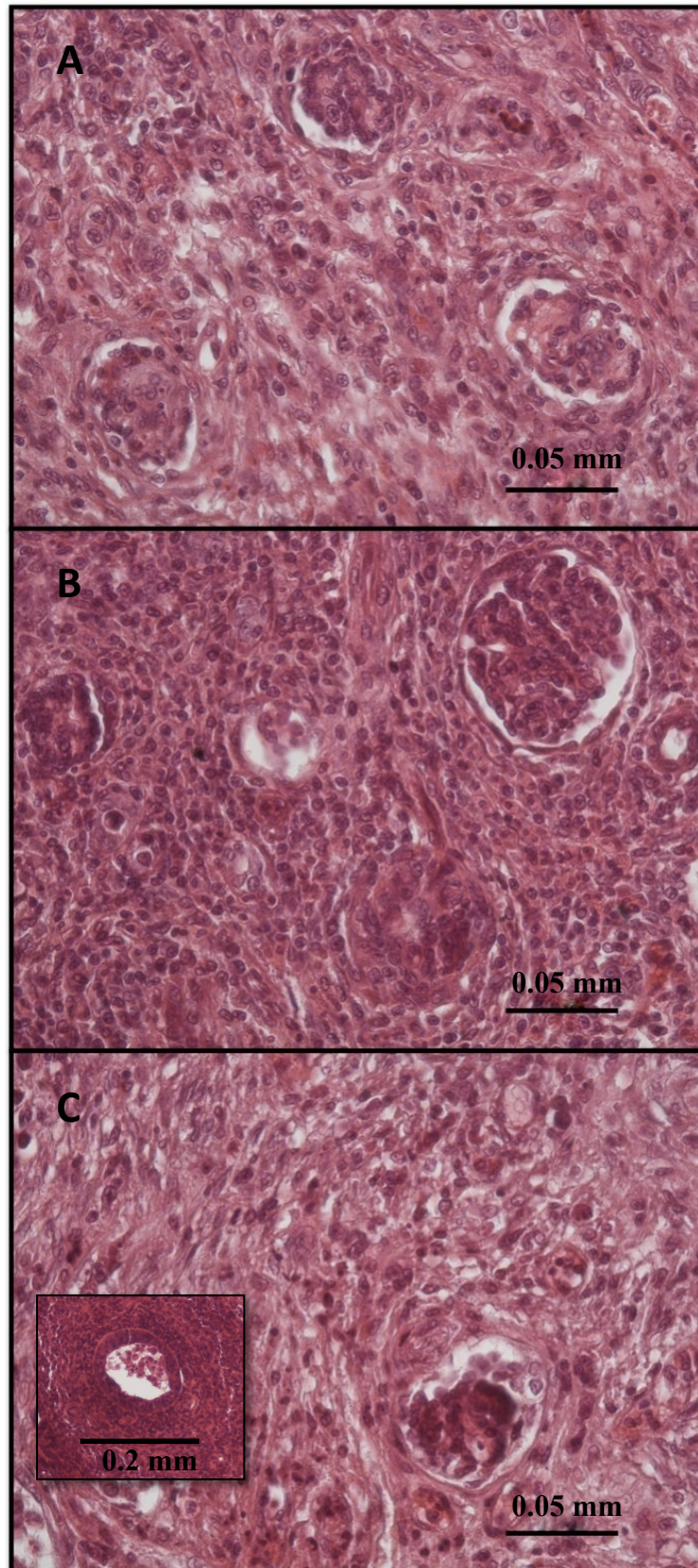


Figura 20. Histología de los metanefros 21 días post-trasplante. (A) Frescos a 400x aumentos. (B) Vitrificados con VM3 a 400x aumentos. (C) Vitrificados con M22 a 400x aumentos y vacuolización a 100x aumentos.

## 5. Discusión

---



## 5. Discusión

Actualmente existe una escasez de órganos disponibles para el trasplante en pacientes con una enfermedad renal crónica y, además, esta situación empeora con el paso del tiempo, ya que las listas de espera están creciendo más rápido que la oferta de órganos (Caplan, 2008). Esto implica, que los pacientes deben recurrir a terapias de sustitución de la función renal como la hemodiálisis. Dejando de lado, la obvia molestia para el paciente y su efecto sobre la calidad de vida (Jofré, 1999), estas técnicas presentan un elevado coste y no suplen las funciones endocrinas de un riñón funcional (Villa et al., 2011; Salvatori et al., 2014). Es por ello que la medicina regenerativa esta en búsqueda de soluciones a este problema pero, aunque se han logrado avances, todavía no se ha conseguido generar un riñón completamente funcional que pudiera solventar el problema (Vera-Donoso et al. 2014).

El xenotrasplante en particular, constituye actualmente una línea de investigación muy prometedora, pero las reacciones inmunológicas que se desencadenan y la ética que genera la posibilidad de introducir patógenos característicos de la especie donante en la especie receptora, son dos de los principales problemas a los que se enfrentan los investigadores de este campo (Rodrigues et al., 2014). Sin embargo, el uso de los metanefros embrionarios (grupos de células embrionarias destinados a convertirse en un riñón) puede suponer una alternativa de xenotrasplante viable en este sentido (Hammerman, 2002b; Hammerman y Rogers, 2014). Nuestros resultados apoyan esta hipótesis. Es posible desarrollar riñones en individuos adultos, sin terapia inmunodepresora, observándose la presencia de estructuras glomerulares similares a las de los riñones funcionales. Aunque nosotros no hemos podido demostrar la funcionalidad (producción de orina), existen trabajos que empleando la misma metodología y otras especies han obtenido resultados similares (Figura 21) y sí han demostrado su funcionalidad (Rogers et al., 2001).

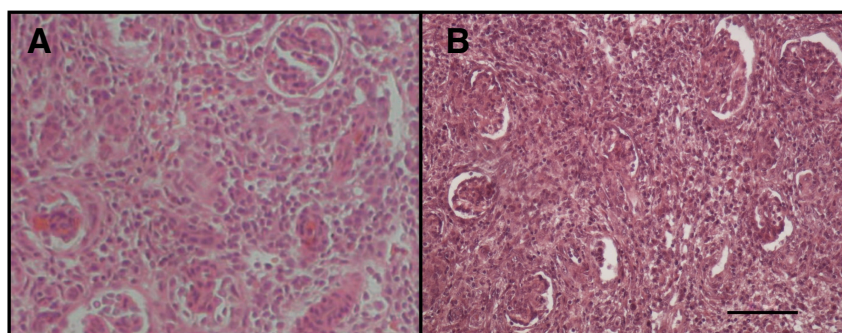


Figura 21. (A) Corte histológico de metanefro de rata 19 días post-transferencia (Clancy et al. 2009). (B) Corte histológico de metanefro de conejo 21 días post-transferencia (Escala: 0,1 mm).

Hasta la fecha, y que nosotros sepamos, es la primera vez que se obtienen estos resultados en conejo, aunque sí se habían logrado en ratón (Armstrong et al., 2005), rata (Dilworth et al., 2008) y cerdo (Rogers et al., 2003).

En este estudio se ha logrado que metanefros obtenidos de embriones de 15 días de conejo (Figura 22) se desarrollen en un “riñón” sin necesidad de inmunosupresión del receptor. Además, no solo aumentan de tamaño (alcanzando practicante el mismo tamaño que un riñón control con los mismos días de desarrollo) sino que histológicamente son similares a las muestras control, observandose unas estructuras glomerulares semejantes. También se observó que si se trasplanta la estructura correspondiente al uréter embrionario, esta se desarrolla originando un uréter diferenciado (Figura 22) que, por lo tanto, sería susceptible de ser conectado al sistema urinario del receptor, tal y como describen Hammerman y Rogers (2014).

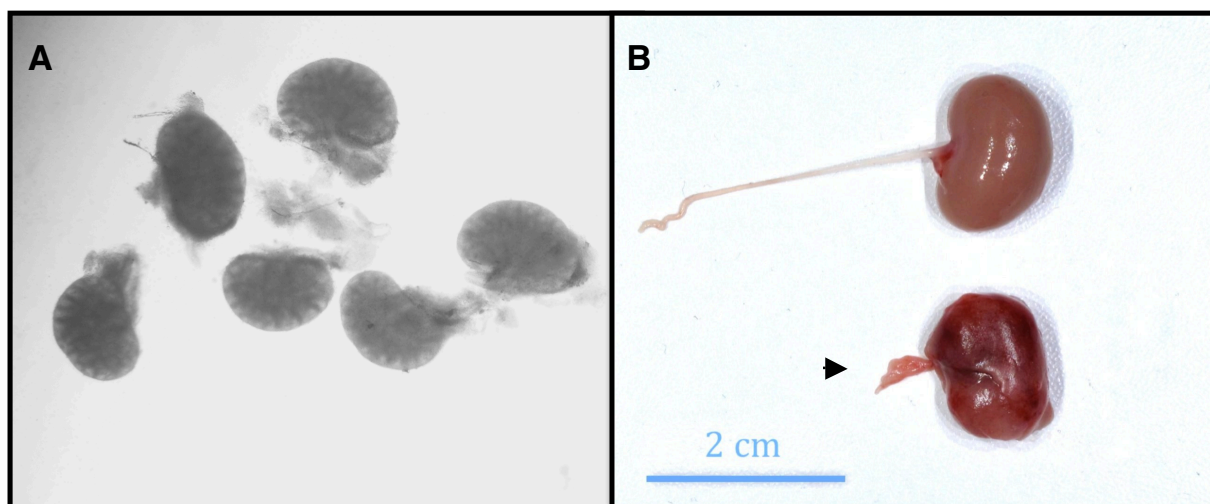


Figura 22. (A) Metanefros de embriones de conejo E15. (B) Riñón control de 36 días y Metanefro 21 días post-trasplante. La flecha señala el uréter desarrollado en el metanefro trasplantado.

En el presente trabajo, los metanefros fueron trasplantados en el tejido adiposo omental del conejo, cerca de los vasos sanguíneos del riñón del animal receptor, confirmándose que se trata de una zona propicia para su desarrollo, tal y como indicaba Hammerman (2002b). Además, se desarrolló una notable vascularización (Figura 23) tal y como Hammerman (2002b) observó.



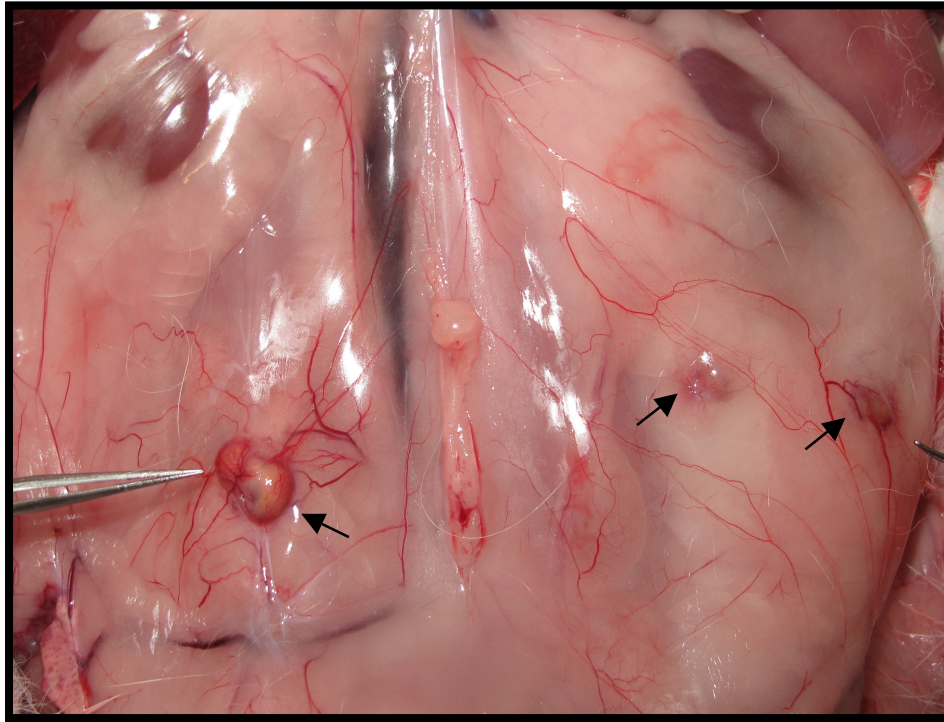


Figura 23. Vascularización *de novo* de los metanefros. Las flechas indican la posición de los metanefros 21 días post-transferencia.

Pero si hipotéticamente la oferta y la demanda de órganos se equilibrase gracias a técnicas como esta, o por otras técnicas derivadas del campo de la medicina regenerativa, como la ingeniería de tejidos e incluso a través de órganos creados en el laboratorio, su aplicabilidad dependerá de la capacidad física de distribución de estos órganos a los pacientes (Fahy et al., 2009). Además, será necesario tener un control de existencias, y un control sanitario de los órganos disponibles (Fahy et al., 2009). El almacenamiento a largo plazo de órganos humanos o de sus sustitutos para el subsiguiente trasplante es un objetivo muy buscado e importante (Smith, 1957; Starzl, 1970; Karow, 1974; Fahy et al., 2009). Hasta el momento, tan sólo pequeños ovarios, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas y córneas han sido las únicas estructuras macroscópicas que han sido crioconservadas (Fahy et al., 2009). Hasta la fecha, tan sólo Bottomley et al. (2005) han descrito la crioconservación de metanefros. No obstante, sus resultados se basan en valoraciones *in vitro*, basados en viabilidad y en la distribución celular del tejido. Estos autores indican que la vitrificación impide la formación de cristales de hielo (Figura 24), evitando el daño producido por los mismos, por lo que sugieren que esta técnica es más prometedora que la congelación lenta. Nuestros resultados, demuestran que los metanefros vitrificados se desarrollan a “nuevos riñones” en individuos adultos sin terapia inmunodepresora, con la presencia de estructuras glomerulares similares a las de los riñones funcionales (Figura 24).

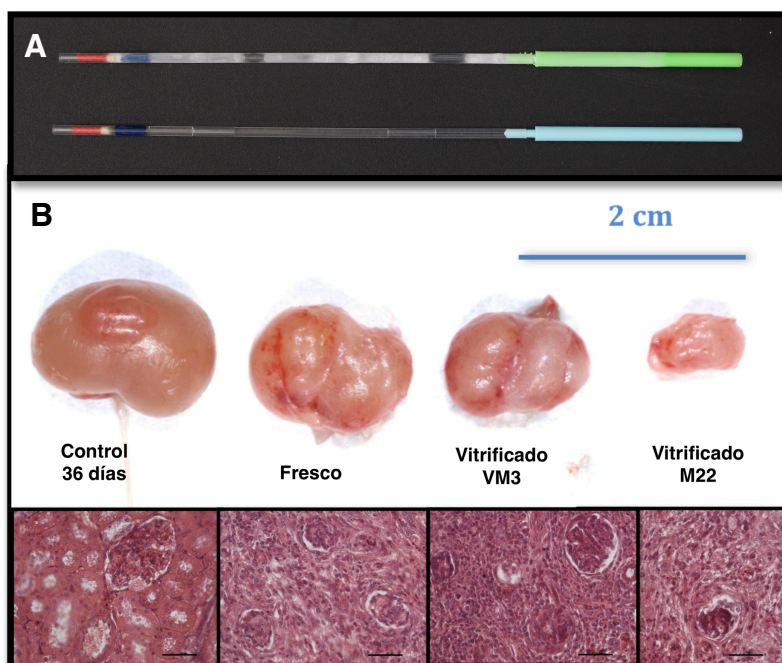


Figura 24. (A) Congelación vs Vitrificación. (B) Morfología e histología del riñón control de 36 días y los metanefros (21 días post-trasplante) frescos y vitrificados con el medio VM3 y M22.

Estos resultados son contundentes, ya que esto se logró con ambos medios; VM3 y M22. El medio M22 se escogió debido a que Fahy et al. (2009) habían obtenido resultados satisfactorios en la vitrificación de tejido renal con este medio de vitrificación. El medio VM3 fue elegido por ser un medio característico por su baja toxicidad (Marco-Jimenez et al., 2012). Valorando de forma conjunta nuestros resultados, se desprende que el proceso de vitrificación no parece afectar significativamente al porcentaje de desarrollo, ya que el 50% de los metanefros vitrificados con el medio VM3, el 32% de los vitrificados con el medio M22 y el 44% de los frescos, se desarrollaron como un “nuevo riñón” (histológicamente normal) al ser transferidos *in vivo*. Sin embargo, la vitrificación con el medio M22 originó unos riñones con una menor presencia de nefronas, así como algunas zonas de vacuolización, también observadas por Fahy et al. (2009), que de forma preliminar podrían indicar una menor funcionalidad frente a los otros grupos (metanefros vitrificados con VM3 y frescos). No obstante esto será necesario estudiarlo en un futuro.

El éxito logrado en la vitrificación de metanefros se puede fundamentar en el reducido tamaño de los mismos, que permite un proceso de vitrificación y desvitrificación mucho más rápido que estructuras de gran tamaño, y en que se trata de un órgano avascular que, por tanto, no requiere de una vascularización y aporte sanguíneo inmediato después de su desvitrificación. Estas hipótesis están acordes con lo descrito por Fahy et al. (2009), quienes indicaron que hasta el momento, tan sólo pequeños ovarios, vasos sanguíneos, válvulas cardíacas y córneas han sido las

únicas estructuras macroscópicas que han sido crioconservadas (Fahy et al., 2009). Tanto la velocidad de vitrificación como la de desvitrificación es máxima debido al empleo del soporte cryotop (basado en el método del volumen mínimo esencial), ya que este dispositivo permite trabajar con volúmenes reducidos que facilitan notablemente el intercambio de calor, disminuyéndose los efectos tóxicos y osmóticos de las soluciones de vitrificación (Vajta y Kuwayama 2006; Yavin et al. 2009).

Tras estos resultados, y como un paso más allá de la utilización de órganos primordiales embrionarios, se abre la posibilidad de constituir biobancos (Figura 25) de metanefros, con un control sanitario de los órganos disponibles y con un control absoluto de su distribución, entendidos como una fuente ilimitada de riñones para tratar la insuficiencia renal crónica.



Figura 25. Biobanco.

## **6. Conclusiones**

---

## 6. Conclusiones

Los metanefros de embriones de 15 días de conejo mantienen su capacidad de desarrollo, tanto frescos como tras su vitrificación, al ser trasplantados en conejos adultos sin tratamiento inmunosupresor.

El medio VM3 presenta mejores resultados (morfología e histología) frente al medio M22 cuando se vitrifican matanefros de conejo de embriones de 15 días.

## **7. Referencias**

---

## 7. Referencias

- ARMSTRONG, S.R.; CAMPBELL, G.R.; CAMPBELL, J.H.; LITTLE, M.H (2005). Establishment of metanephros transplantation in mice highlights contributions by both nephrectomy and pregnancy to developmental progression. *Nephron Exp Nephrol*, 101: 155-164.
- AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. (1982). *Reproduction in Mammals Vol. 1: Germ Cells and Fertilization*. Ed. Cambridge University Press.
- BADYLAK, S.F.; FREYTES, D.O.; GILBERT, T.W. (2009). Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 5: 1-13.
- BAILEY, L.L.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L.; CONCEPCION, W.; JOLLEY, W.B. (1985). Baboon-to-human cardiac xenotransplantation in a neonate. *JAMA*, 254: 3321-3329.
- BARAK, H.; BOYLE, S.C. (2013). Organ culture and immunostaining of mouse embryonic kidneys. *Cold Spring Harb Protoc*, doi: 10.1101/pdb.prot5558.
- BOLAND, T.; XU, T.; DAMON, B.; CUI, X. (2006). Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol J*, 1: 910-917.
- BONANDRINI, B.; FIGLIUZZI, M.; PAPANIMOU, E.; MORIGI, M.; PERICO, N.; CASIRAGHI, F.; DIPL, C.; SANGALLI, F.; CONTI, S.; BENIGNI, A.; REMUZZI, A.; REMUZZI, G. (2014). Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*, 20: 1486-1498.
- BOTTOMLEY, M.J.; BAICU, S.; BOGGS, J.M.; MARSHALL, D.P.; CLANCY, M.; BROCKBANK, K.G.M.; BRAVERY, C.A. (2005). Preservation of Embryonic Kidneys for Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 37: 280–284.
- 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, NY: The Hastings Center, 2008), 129-132.
- CHOU, Y.H.; PAN, S.Y.; YANG, C.H.; LIN, S.L. (2014). Stem cells and kidney regeneration. *J Formos Med Assoc*, 113: 201-209.
- CLANCY, M.J.; MARSHALL, D.; DILWORTH, M.; BOTTOMLEY, M.; ASHTON, N.; BRENCHLEY, P. (2009). Immunosuppression Is Essential for Successful Allogeneic Transplantation of the Metanephros. *Transplantation*, 88: 151-159.
- COLLINS, G.M.; BRAVO-SHUGARMAN, M.; TERASAKI, P.I. (1969). Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours' ice storage. *Lancet*, 2: 1219.

- COOPER, D.K.C. (2012). A brief history of cross-species organ transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 25: 49-57.
- CRAPO, P.M.; GILBERT, T.W.; BADYLAK, S.F. (2012). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32: 3233-3243.
- CUI, X.; BOLAND, T.; D'Lima, D.D.; LOTZ, M.K. (2013). Thermal Inkjet Printing in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 6: 149–155.
- D'AGATI, V.D. (2012). Growing New Kidneys from Embryonic Cell Suspensions: Fantasy or Reality?. *J Am Soc Nephrol*, 23: 1761–1768.
- D'ALESSANDRO, A.M.; SOUTHARD, J.H.; LOVE, R.B.; BELZER, F.O. (1994). Organ preservation. *Surg Clin North Am*, 74: 1083-1095.
- DAAR, A.S. (2013). The future of replacement and restorative therapies: from organ transplantation to regenerative medicine. *Transplant Proc*, 45: 3450-3452.
- DEKEL, B.; AMARIGLIO, N.; KAMINSKI, N.; SCHWARTZ, A.; GOSHEN, E.; ARDITTI, E.; TSARFATY, I.; PASSWELL, J.H.; REISNER, Y.; REHAVI, 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: 977-990.
- DILWORTH, M.R.; CLANCY, M.J.; MARSHALL, D.; BRAVERY, C.A.; BRENCHLEY, P.E.; ASHTON, N. (2008). Development and functional capacity of transplanted rat metanephroi. *Nephrol Dial Transplant*, 23: 871-879.
- DURANTHON, V.; BEAUJEAN, N.; BRUNNER, M.; ODENING, K.E.; SANTOS, A.N.; KACSKOVICS, I.; HIRIPI, L.; WEINSTEIN, E.J.; BOSZE, Z. (2012). On the emerging role of rabbit as human disease model and the instrumental role of novel transgenic tools. *Transgenic Res*, 21: 699-713.
- EIRAKU, M.; TAKATA, N.; ISHIBASHI, H.; KAWADA, M.; SAKAKURA, E.; OKUDA, S.; SEKIGUCHI, K.; ADACHI, T.; SASAI, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472: 51-56.
- FAHY, G.M.; WOWK, B.; PAGOTAN, R.; CHANG, A.; PHAN, J.; THOMSON, B.; PHAN, L. (2009). Physical and biological aspects of renal vitrification. *Organogenesis*, 5: 167-175.
- 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.
- FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; NAVARRETE SANTOS, A.; DURANTHON, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144: 1-10.



- FOGLIA, R.P.; LAQUAGLIA, M.; STATTER, M.B.; DONAHOE, P.K. (1986). Fetal allograft survival in immunocompetent recipients is age dependent and organ specific. *Ann Surg*, 204: 402–410.
- GRAUR, D.; DURET, L.; GOUY, M. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies). *Nature*, 25: 333-335.
- HAMMERMAN, M.R. (2002a). Xenotransplantation of developing kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol*, 283: 601-606.
- HAMMERMAN, M.R. (2002b). Transplantation of embryonic kidneys. *Clinical Science*, 103: 599-612.
- HAMMERMAN, M.R. (2004). Renal Organogenesis from Transplanted Metanephric Primordia. *J Am Soc Nephrol*, 15: 1126–1132.
- HAMMERMAN, M.R. (2005). Windows of opportunity for organogenesis. *Transpl Immunol*, 15: 1-8.
- HAMMERMAN, M.R. (2007). Organogenesis of Kidney and Endocrine Pancreas: the window opens. *Organogenesis*, 3: 59-66.
- HAMMERMAN, M.R. (2009). Xenotransplantation of pancreatic and kidney primordia - Where do we stand?. *Transplant Immunology*, 21: 93–100.
- HAMMERMAN, M.R.; ROGERS, S.A. (2014). WASHINGTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE IN ST.LOUIS. *Is it possible to grow a Kidney?*, St. Louis, Estados Unidos, visto el 14 de Mayo de 2014. [http://medschool.wustl.edu/news/patient\\_care/hammerman2013](http://medschool.wustl.edu/news/patient_care/hammerman2013)
- HAUET, T.; EUGENE, M. (2008). A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. *Kidney Int*, 74: 998-1003.
- HOUDEBINE, L.M.; FAN, J. (2009). Derivation and Characterization of Rabbit Embryonic Stem Cells, en: *Rabbit Biotechnology: Rabbit genomics, Transgenesis, Cloning and Models*. Ed. Springer Science+Business Media B.V., 77-105.
- JIMÉNEZ-TRIGOS, E; VICENTE, J.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F. (2013). Live Birth from Slow-Frozen Rabbit Oocytes after In Vivo Fertilisation. *Plos One*, 8: 1-8.
- JIMÉNEZ-TRIGOS, E.; NATURIL-ALFONSO, C; VICENTE, J.S.; MARCO-JIMÉNEZ, F. (2011). Effects of Cryopreservation on the Meiotic Spindle, Cortical Granule Distribution and Development of Rabbit Oocytes. *Reprod Domest Anim*, 47: 472-478.
- JOFRÉ, R. (1999). Factores que afectan a la calidad de vida en pacientes en prediálisis, diálisis y trasplante renal. *Nefrología*, 19: 84-90.
- KAMARUZAMAN, N.A.; KARDIA, E.; KAMALDIN, N'.; LATAHIR, A.Z.; YAHAYA, B.H. (2013). The rabbit as a model for studying lung disease and stem cell therapy. *Biomed Res Int*, doi: 10.1155/2013/691830.

- KAROW, A.M. JR. (1974). The organ bank concept, en: Karow, A.M. JR.; Abouna, G.J.M.; Humphries, A.L. JR.; Editors. *Organ Preservation for Transplantation*. Ed. Boston: Little, Brown and Company, 3–8.
- KAVLOCK, R.J.; GRAY, J.A. (1982). Evaluation of renal function in neonatal rats. *Biol Neonate*, 41: 279-288.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; CASARES-CRESPO, L.; VICENTE, J.S. (2012). Porcine oocyte vitrification in optimized low toxicity solution with open pulled straws. *Zygote*, 29: 1-9.
- 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. (2012a). Xenotransplanted Embryonic Kidney Provides a Niche for Endogenous Mesenchymal Stem Cell Differentiation Into Erythropoietin-Producing Tissue. *Stem Cells*, 30: 1228-1235.
- MATSUMOTO, K.; YOKOO, T.; YOKOTE, S.; UTSUNOMIYA, Y.; OHASHI, T.; HOSOYA, T. (2012b). Functional development of a transplanted embryonic kidney: effect of transplantation site. *J Nephrol*, 25: 50-55.
- MIRONOV, V.; KASYANOV, V.; MARKWALD, R.R. (2011). Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 667–673.
- MIRONOV, V.; VISCONTI, R.P.; KASYANOV, V.; FORGACS, G.; DRAKE, C.J.; MARKWALD, R.R. (2009). Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 30, 2164-2174.
- NATURIL, C. (2001). Parthenogenetic blastocyst cultured under in vivo conditions exhibited proliferation and differentiation expression genes similar to those normal embryos. Trabajo Final de Carrera. Universitat Politècnica de València. 43 pp.
- ORGAN PROCUREMENT AND TRANSPLANTATION NETWORK (OPTN). Waiting list candidates as of today, visto el 24 de Enero de 2014. <http://optn.transplant.hrsa.gov/data/>
- PEGG, D.E. (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*, 60: 36-44.
- PENG, X. (2012). Transgenic rabbit models for studying human cardiovascular diseases. *Comp Med*, 62: 472-479.
- REEMTSMA, K.; MCCracken, B.H.; SCHLEGEL, J.U.; PEARL, M.A.; PEARCE, C.W.; DEWITT, C.W.; SMITH, P.E.; HEWITT, R.L.; FLINNER, R.L.; CREECH, O. Jr. (1964). Renal heterotransplantation in man. *Ann Surg*, 160: 384-410.
- RODRIGUES, M.; FISCHER, N.; GULICH, B.; TÖNJES, R.R. (2014). Comparison of porcine endogenous retroviruses infectious potential in supernatants of producer cells and in cocultures. *Xenotransplantation*, 21: 162-173.

- ROGERS, S. A.; LIAPIS, H.; HAMMERMAN, M. R. (2001). Transplantation of metanephroi across the major histocompatibility complex in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 280: 132-136.
- ROGERS, S.A.; HAMMERMAN, M.R. (2001). Transplantation of metanephroi after preservation in vitro. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 281: 661-665.
- ROGERS, S.A.; LOWELL, J.A.; HAMMERMAN, N.A.; HAMMERMAN, M.R. (1998). Transplantation of developing metanephroi into adult rats. *Kidney International*, 54: 27-37.
- ROGERS, S.A.; TALCOTT, M.; HAMMERMAN, M.R. (2003). Transplantation of pig metanephroi. *ASAIO J*, 49: 48-52.
- SALAHUDEEN, A.K. (2004). Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: 181-187.
- SALVATORI, M.; PELOSO, A.; KATARI, R.; ORLANDO G. (2014). Regeneration and bioengineering of the kidney: current status and future challenges. *Curr Urol Rep*, 15: 379.
- SMITH, A.U. (1957). Problems in the resuscitation of mammals from body temperatures below 0 degrees C. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 147: 533-544.
- 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: 646-651.
- STARZL, T.E. (1970). A look ahead at transplantation. *J Surg Res*, 10: 291-297.
- STARZL, T.E.; FUNG, J.; TZAKIS, A.; TODO, S.; DEMETRIS, A.J.; MARINO, I.R.; DOYLE, H.; ZEEVI, A.; WARTY, A.; MICHAELS, M. (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*, 341: 65-71.
- STATTER, M.; FAHRNER, K.J.; BARKSDALE, E.M.; PARKS, D.E.; FLAVELL, R.A.; DONAHOE, P.K. (1989). Correlation of fetal kidney and testis congenic graft survival with reduced major histocompatibility complex burden. *Transplantation*, 47: 651-660.
- STÜBINGER, S.; DARD, M. (2013). The rabbit as experimental model for research in implant dentistry and related tissue regeneration. *J Invest Surg*, 26: 266-282.
- 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.
- SUSZYNSKI, T.M.; RIZZARI, M.D.; SCOTT, W.E. 3rd; TEMPELMAN, L.A.; TAYLOR, M.J.; PAPAS, K.K. (2012). Persufflation (or gaseous oxygen perfusion) as a method of organ preservation. *Cryobiology*, 64: 125-143.

- TAKEDA, S.; ROGERS, S.A.; HAMMERMAN, M.R. (2006). Differential origin for endotelial and mesangial cells after transplantation of pig fetal renal primordia into rats. *Transpl Immunol*, 15: 211-215.
- TANCOS, Z.; NEMES, C.; POLGAR, Z.; GOCZA, E.; DANIEL, N.; STOUT, T.A.; MARAGHECHI, P.; PIRITY, M.K.; OSTEIL, P.; TAPPONNIER, Y.; MARKOSSIAN, S.; GODET, M.; AFANASSIEFF, M.; BOSZE, Z.; DURANTHON, V.; SAVATIER, P.; DINNYES, A. (2012). Generation of rabbit pluripotent stem cell lines. *Theriogenology*, 78: 1774-1786.
- TAO, T.; NIEMANN, H. (2000). Cellular characterization of blastocysts derived from rabbit 4-, 8- and 16-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro. *Hum Reprod*, 15: 881-889.
- TRAEGER, J. (1969). Transplantations of kidneys from chimpanzees to man. *Primates Med*, 3: 52-54.
- UNBEKANDT, M.; DAVIES, J.A. (2010). Dissociation of embryonic kidneys followed by reaggregation allows the formation of renal tissues. *Kidney Int*, 77: 407-416.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65: 236-244.
- VERA-DONOSO, C.D.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VICENTE-ANTÓN, J.S. (2014). Looking for solutions to the kidneys shortage: Xeno-transplantation of metanephroi. *European Urology Supplements*, 13: 908.
- VICENTE, J.S.; LAVARA, R.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76: 1120-1125
- VILLA, G.; RODRÍGUEZ-CARMONA, A.; FERNÁNDEZ-ORTIZ, L.; CUERVO, J.; REBOLLO, P.; OTERO, A.; ARRIETA, J. (2011). Cost analysis of the Spanish renal replacement therapy programme. *Nephrol Dial Transplant*, 26: 3709-3714.
- VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; VICENTE, J.S. (1997). Effect of sperm count on the fertility and prolificity rates of meat rabbits. *Anim Reprod Sci*, 46: 313-319.
- WATSON, C.J.; BRADLEY, J.A. (2012). Cold storage of deceased donor kidneys: does the solution matter or is the solution elsewhere?. *Am J Transplant*, 12: 806-807.
- 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.

- 
- YANG, Y.G.; SYKES, M. (2007). Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol*, 7: 519-531.
  - YAVIN, S.; AROYO, A.; ROTH, Z.; ARAV, A. (2009). Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod*, 24: 797–804.
  - YOKOO, T.; KAWAMURA, T. (2009). Xenobiotic kidney organogenesis: a new avenue for renal transplantation. *J Nephrol*, 22: 312-317.
  - YUAN, X.; THERUVATH, A.J.; GE, X.; FLOERCHINGER, B; JURISCH, A.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; TULLIUS, S.G. (2010). Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transpl Int*, 23: 561- 570.
  - ZHAO, Y.; YU, M.; BAI, S. (2013). Research progress of decellularization and application in tissue engineering. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 27: 950-954.